

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie



HABILITAČNÍ PRÁCE

Cirkadiánní regulace fyziologických funkcí ve zdraví a nemoci

PharmDr. Alena Sumová, CSc., DSc.

Fyziologický ústav AVČR

Praha, 2016

Poděkování

Ráda bych zde na prvním místě poděkovala Prof. RNDr. Heleně Illnerové, DrSc. za to, že jsem s ní vždy mohla sdílet nadšení z každého nového, byť jen dílčího, poznatku. Velký dík patří mým kolegům v týmu, především Martinovi Sládkovi, PhD, který je spoluautorem všech předložených prací a bez jehož expertízy v molekulárně biologických technikách by tato práce nevznikla. Také děkuji Martě Novákové, PhD a Lence Polidarové, PhD., které podstatně přispěly k řadě výsledků a byly či jsou významnou oporou v týmu. Pro část této habilitační práce byla zcela zásadní spolupráce s Prof. RNDr. Jiřím Páchou, DrSc., kolegou a přítelem, který se nechal nadchnout pro chronobiologii, a z této naší spolupráce vzešly zajímavé výsledky o časové regulaci ve střevě. Také jsem velmi vděčná za to, že jsem byla vždy obklopena celou řadou nadšených studentů bakalářského, magisterského i postgraduálního studia, kteří svým elánem a zaujetím pro experimentální práci přispěli nemalou mírou k výsledkům, prezentovaným v této habilitační práci.

Alena Sumová

Osnova

1. Úvod.....	4
2. Přehled současného stavu poznání.....	4
2.1. Cirkadiánní systém.....	4
2.1.1. Centrální hodiny.....	6
2.1.2. Periferní hodiny.....	7
2.2. Cirkadiánní systém a zdraví člověka.....	8
3. Cíle.....	9
4. Metody.....	9
4.1. Přehled použitých modelů a postupů.....	9
4.1.1. Animální modely.....	9
4.1.2. Účastníci humánních studií.....	10
4.2. Metody použité v animálních studiích.....	10
4.2.1. Sledování lokomoční aktivity a příjmu potravy.....	10
4.2.2. Imunohistochemie.....	10
4.2.3. Laserová mikrodisekce.....	11
4.2.4. Odběr vzorků periferních tkání.....	11
4.2.5. Izolace RNA and real-time RT qPCR.....	11
4.2.6. In situ hybridizace.....	11
4.2.7. Příprava explantů tkání a monitorování bioluminiscence.....	11
4.2.8. Chirurgické metody.....	12
4.2.9. Experimentální navození kolorektálních nádorů.....	12
4.3. Metody použité v humánních studiích.....	12
4.3.1. Stanovení hladin melatoninu ve slinách.....	12
4.3.2. Stanovení exprese hodinových genů pomocí qRT PCR.....	12
4.3.3. Sledování režimu aktivity a spánku pomocí Actiwatch.....	13
4.4. Statistické metody.....	13
5. Výsledky a diskuze.....	14
5.1. Cirkadiánní hodiny v gastrointestinálním traktu, jejich funkce a regulace	14
5.2. Funkční stav cirkadiánního systému u animálního modelu kardiovaskulárního a metabolického onemocnění – spontánně hypertenzního potkana (SHR).....	19
5.3. Funkční stav cirkadiánního systému u člověka ve zdraví a při různých neuropsychiatrických onemocněních.....	21
6. Shrnutí a závěr.....	27
7. Literární odkazy.....	28
8. Seznam zkratk.....	35
8. Seznam vybraných publikací autorky s IF (<i>s vyznačením publikací tvořících součást habilitační práce</i>).....	36
9. Seznam příloh.....	41
10. Přílohy.....	43

1. Úvod

Fyziologické funkce jsou regulovány komplexně na mnoha úrovních a cílem všech těchto regulací je udržení homeostázy v organismu. Poznatky vědeckého bádání v poslední době stále více odhalují význam obecného regulačního mechanismu, který zajišťuje optimální průběh fyziologických funkcí v měnícím se prostředí, ve kterém se živé organismy od počátku své existence nacházejí. Vznik tohoto tzv. časového regulačního systému (angl. „*temporal time-keeping system*“) je spojován již s počátkem života na Zemi, jelikož představoval významnou evoluční výhodu pro přežití v těchto podmínkách. Již u nejjednodušších jednobuněčných organismů umožňoval předvídat pravidelné změny v prostředí a přizpůsobit jim průběh vnitřních procesů. Prostřednictvím velmi obecných regulačních mechanismů je zapojen do řízení základních buněčných procesů na úrovni energetického metabolismu, dělení a proliferace. U mnohobuněčných organismů pak dosáhl vysokého stupně komplexnosti a hierarchického uspořádání, umožňujícího regulaci téměř všech funkcí v těle. Člověk, který je na vrcholu evolučního řetězce, je vybaven tímto systémem stejně jako ostatní živočichové. Na rozdíl od nich však jako jediný svým chováním působí proti jeho přirozené funkci. Moderní styl života si žádá zvyšování výkonu na úkor přirozených potřeb a vede často ke změně životního stylu, na kterou není lidský organismus přizpůsoben. Tyto změny především souvisejí s přesunem pracovních aktivit a jiných činností do noční doby a tím stále výraznějším odpoutáváním vnitřního časového programu od přirozených světelných podmínek. Obor, který se časovým regulačním systémem zabývá, chronobiologie, nyní zažívá obrovský boom, protože se ukazuje, že právě tato situace přispívá k rozvoji řady chorob, které nazýváme civilizačními. Řada chorob též negativně zpětně ovlivňuje funkci tohoto systému. Vzhledem ke stupni rozvoje lidské společnosti nelze u moderního člověka předpokládat návrat k původním přirozeným životním podmínkám. Je proto nutné zkoumat mechanismy, jakými je časový systém propojen s životními procesy a jak tyto procesy časově řídí, abychom mohli pomocí preventivních a terapeutických (tzv. chronoterapeutických) postupů alespoň zmírnit dopady moderního životního stylu na naše zdraví.

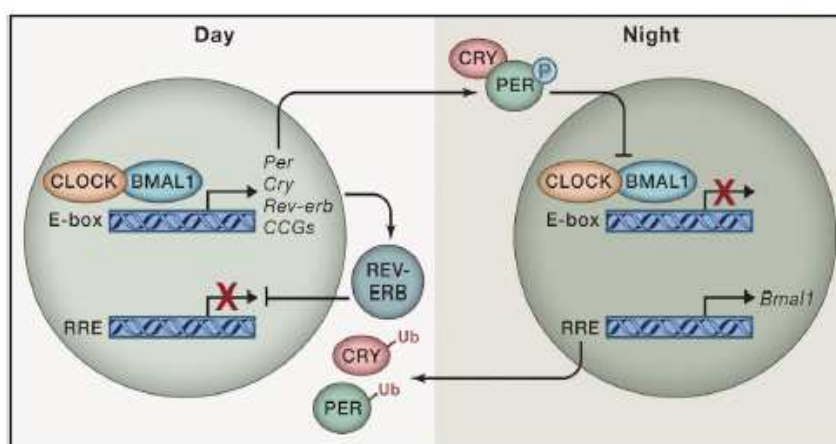
2. Přehled současného stavu poznání

2.1. Cirkadiánní systém

Cirkadiánní systém (angl. circadian, z latin. *circa diem*) je základní regulační systém živých organismů, zajišťující optimalizaci průběhu funkcí v těle vzhledem k proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí, které souvisejí se střídáním dne a noci, případně roční doby. Systém se skládá z buněčných oscilátorů (hodin), tj. buněk vybavených geneticky k tomu, aby autonomně generovaly cirkadiánní signál. **Endogenní perioda** cirkadiánního signálu je v rozsahu cca 22 až 28 h a je geneticky podmíněna. Autonomní molekulární mechanismus zodpovědný za generování rytmického cirkadiánního signálu je založen na obecném mechanismu zpětnovazebné regulace exprese sady tzv. **hodinových genů** prostřednictvím transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček (Reppert, 2000). Obecným základem tohoto molekulárního mechanismu hodin je smyčka, ve které je exprese genů aktivována působením pozitivních elementů a inhibována prostřednictvím negativních elementů, přičemž tyto negativní elementy jsou proteinové produkty právě těchto aktivovaných genů. Tato základní smyčka je podporována dalšími přidavnými smyčkami, které zajišťují načasování hladin pozitivních elementů na správnou denní dobu a současně také umožňují percepci buněčných signálů, které mohou chod hodin ovlivňovat (Lowrey a Takahashi, 2011). Popis současného modelu molekulárního mechanismu cirkadiánních hodin a interakce jeho jednotlivých komponent (hodinových genů) je shrnut na Obr. 1.

Cirkadiánní signál generovaný hodinovým mechanismem je přenášen na procesy v buňce pomocí rytmického spínání **hodinami kontrolovaných genů**, tj. genů, které jsou součástí obecných (např. transkripční faktory) nebo specifických (receptory, kanály, neuropřenašeče,

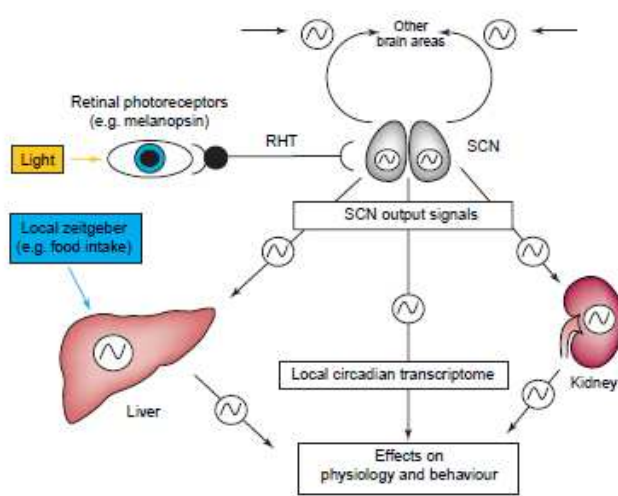
enzymy, apod.) signálních a regulačních drah. To je umožněno díky přítomnosti regulačních míst ("response element") v promotorech těchto hodinami kontrolovaných genů; přítomnost E-boxu umožňuje aktivaci a přítomnost RORE inhibici exprese těchto genů hodinovými proteiny dostupnými rytmicky během určité části dne. Tímto způsobem je rytmicky regulováno v různých tkáních asi 5-10% transkriptomu (Akhtar a spol., 2002; Panda a spol., 2002; Storch a spol., 2002) a až 20% proteomu Reddy a spol., 2006. Ačkoliv výsledky zkoumání molekulárního mechanismu chodu cirkadiálních hodin doznaly v posledních letech značného pokroku, není dosud detailně prozkoumán. Stále více se také ukazuje, že tento mechanismus je těsně propojen s ostatními procesy nezbytnými pro život buňky, jako je energetický metabolismus a buněčný cyklus (Eckel-Mahan a Sassone-Corsi, 2009; Sahar a Sassone-Corsi, 2009). Nejen že rytmicky reguluje průběh těchto buněčných procesů v čase, ale také na změnu jejich stavu reaguje a je jimi přímo seřizován (Asher a Schibler, 2011).



Obr. 1: Schéma molekulárního mechanismu cirkadiálních hodin v buňce (převzato z Asher a Sassone-Corsi, 2015). Během dne pozitivní elementy zpětnovazebného mechanismu, tj., transkripční faktory CLOCK a BMAL1, spolu dimerizují a váží se na E-box na promotorech hodinových genů (*Per*, *Cry*, *Rev-erb*) a hodinami kontrolovaných genů (CCGs z angl. clock controled genes). Hladiny negativních elementů, tj. proteinů PER a CRY, stoupají v cytoplasmě v odpoledních hodinách, na začátku noci spolu dimerizují a vstupují do jádra buňky, kde potlačují transkripci aktivovanou CLOCK:BMAL1 heterodimerem. Proteiny PER a CRY procházejí post-translačními modifikacemi, které vedou k jejich degradaci (PER-Ub, CRY-Ub). Pokles jejich hladin je předpokladem pro zahájení nového cirkadiálního cyklu. Příkladná zpětnovazebná smyčka je tvořena transkripčním faktorem REV-ERB, tj. proteinem jehož hladiny stoupají během dne, váží se na specifická místa (RRE) na promotorech genů a inhibují jejich transkripci. Tímto mechanismem je inhibována transkripce *Bmal1*, která je tak umožněna během noci, kdy je hladina proteinu REV-ERB nízká.

V těle savců dosáhl cirkadiální systém evolučně nejvyššího stupně hierarchického upořádání jednotlivých složek (buněčných a tkáňových oscilátorů) (Obr. 2). Na rozdíl od nižších obratlovců má pouze jedny tzv. **centrální** hodiny, které přijímají signály o vnějších světelných podmínkách prostřednictvím spoje z retiny, přizpůsobují svůj chod podle těchto podmínek a vysílají takto seřízený rytmický signál k ostatním, tzv. **periferním**, oscilátorům. Periferní oscilátory jsou uloženy jak v nervové tkáni, tak v ostatních buňkách těla, kde řídí tkáňově specifický program. Pokud jsou centrální hodiny správně seřízeny s denní dobou, dochází ke stavu vnitřní synchronizace cirkadiálního systému, kdy hodiny v každé tkáni či orgánu nastavují fázi rytmických procesů tak, aby byly v optimálním stavu v očekávání

nadcházející změny denní doby. Například, cirkadiální systém takto řídí rytmickou produkci hormonů glukokortikoidů v nadledvině (Moore a Eichler, 1972) a časuje dobu jejich výlevu do krevního oběhu na období před probuzením a začátkem pohybové aktivity, tj. těsně předtím než je zapotřebí jejich vysoká hladina.



Obr. 2. Schéma cirkadiálního systému savců (převzato z Looby a Loudon, 2005). Centrální hodiny v suprachiasmatických jádrech (SCN) přijímají signály o světle přímým spojením z retiny (RHT, retino-hypothalamický trakt). Světlo seřizuje autonomní oscilátor v SCN podle vnějšího osvětlení. Rytmičké signály vysílané z SCN seřizují molekulární oscilátory v ostatních částech mozku a v různých periferních tkáních. Periferní oscilátory jsou též citlivé k lokálním signálům (včetně příjmu potravy), které je mohou seřizovat i přímo, nezávisle na SCN.

2.1.1. Centrální hodiny

Centrální hodiny se u savců nacházejí v mozku, v předním hypothalamu, přímo nad křížením optických nervů v bilaterálně uspořádaných jádrech po obou stranách 3. mozkové komory, tzv. **suprachiasmatických jádrech (SCN)** (Moore a Eichler, 1972; Moore a spol., 2002; Ralph a spol., 1990; Stephan a Zucker, 1972). Tato jádra jsou složena z buněčných oscilátorů, které však na rozdíl od ostatních v těle vykazují vysoký stupeň vnitřní integrity a organizace, daný především jejich vzájemným propojením sítí synapsí a funkční specializací buněčných subpopulací. Tato komplexnost zajišťuje specifické vlastnosti SCN, které jsou nutné pro jejich funkci jakožto centrálních hodin v těle. Tyto vlastnosti zahrnují schopnost generovat robustní a relativně stabilní cirkadiální signál (Welsh a spol., 2010), přijímat informaci o světelných podmínkách ve vnějším prostředí a seřizovat generovaný rytmický signál podle změny těchto podmínek (Abrahamson a Moore, 2001; Meijer a Schwartz, 2003). Při absenci světla (ve stále tmě) je cirkadiální cyklus rozdělen na dobu zvanou **subjektivní den** (kdy jsou denní živočichové aktivní a noční neaktivní) a **subjektivní noc** (kdy jsou denní živočichové neaktivní a noční naopak aktivní).

Světlo je nejsilnějším synchronizátorem cirkadiálních hodin v SCN. **Seřizování** hodin (angl. termín "entrainment") v SCN s denní dobou vyžaduje úpravu fáze a vnitřní periody hodin, která je pouze přibližně 24 h, podle solárního dne (tj. přesně 24 h). Seřizování je umožněno díky tomu, že světlo posouvá fázi hodin ve smyslu zpoždění v případě prodloužení jeho působení večera (během první části subjektivní noci) a naopak ve smyslu předběhnutí v případě jeho dřívějšího působení zrána (během druhé části subjektivní noci) (Illnerova a spol., 1998; Pittendrigh, 1981). Večerní světlo tak zpomaluje hodiny, které mají tendenci se předbíhat (mají periodu kratší než 24 h) a ranní světlo naopak urychluje hodiny, které mají tendenci se zpomalovat (mají periodu delší než 24 h). Výsledkem je dosažení stavu, kdy je chod cirkadiálních hodin v SCN zcela v souladu s denní dobou. Mechanismus zodpovědný za seřizování hodin v SCN světlem je shrnut v práci Golombek a Rosenstein (2010). Hodiny v SCN se mohou také přizpůsobovat změně délky dne, ke které dochází v důsledku změny roční doby (Sumova a spol., 1995). Hodiny v SCN tak vykazují poměrně velkou plasticitu a schopnost postupně se přizpůsobovat takovým měnícím se světelným podmínkám, které se v přírodě přirozeně vyskytují. Pokud však světlo působí na hodiny způsobem, který je v přírodě nepravděpodobný a jeho působení přesahuje limit pro jejich seřizování (např. světlo

a tma se střídá v nepravidelných intervalech a/nebo jsou tyto intervaly nepřírodně krátké nebo dlouhé), hodiny přestanou být synchronizovány s denní dobou a běží podle svého geneticky nastaveného programu. Pokud jsou hodiny v SCN vystaveny působení stálého světla, jednotlivé buněčné oscilátory ztrácí vzájemnou koordinaci a synchronizaci a SCN jako celek nejsou schopna tvorby robustního výstupního rytmického signálu (Ohta a spol., 2005). Lze tedy shrnout, že zatímco při absenci světla cirkadiánní hodiny běží podle svého vnitřního programu (tzv. "volný běh v čase"), absence tmy se jeví jako závažný faktor ohrožující funkci SCN.

Přenos signálu z SCN se uskutečňuje především pomocí neuronálních a humorálních drah (shrnuto v práci Dibner a spol., 2010). Na **neuronálním** přenosu se podílí hlavně dvě hypothalamická jádra, ke kterým axony neuronů SCN přímo míří, tj. paraventriculární jádro (PVN) a dorsomediální jádro (DMH). PVN je přepojovací stanicí pro cirkadiánní regulaci autonomního nervového systému a DMH je převodní stanicí pro regulaci a integraci spánkového režimu a rytmu v **příjmu potravy** (Dibner a spol., 2010), který je významným synchronizačním signálem pro některé periferní hodiny související s metabolismem (Damiola a spol., 2000). PVN se podílí též na **humorálním** přenosu cirkadiánního signálu z SCN, a to prostřednictvím spojení s hypofýzou a regulací uvolňování jejích hormonů (např. ACTH), a také prostřednictvím spojení s autonomním nervstvem, který kromě inervace vnitřních orgánů reguluje též uvolňování hormonu melatoninu z epifyzy (Illnerova, 1999). Dalším mechanismem, který se podílí na přenosu cirkadiánního signálu k periferním oscilátorům, je cyklus **tělesné teploty** (Morf a Schibler, 2013), který je řízen z SCN pomocí spojení do mediální preoptické oblasti hypothalamu. Kromě těchto drah a mechanismů SCN také produkuje **faktory**, které difundují do různých částí mozku, kde se vážou na receptory a regulují rytmicky různé funkce, např. spánek a pohybovou aktivitu. Mezi tyto faktory patří TGF (Kramer a spol., 2001), prokineticin-2 (Cheng a spol., 2002) a CLC (Kraves a Weitz, 2006). Další faktory, signální proteiny, jsou rytmicky přítomny v krvi (séru) a také se podílejí na synchronizaci periferních oscilátorů (Schibler a spol., 2015).

2.1.2. Periferní hodiny

Periferní hodiny se nacházejí prakticky ve všech buňkách těla, liší se však stupněm své nezávislosti na centrálních hodinách, od autonomních, schopných udržet rytmický signál zcela nezávisle na SCN, přes semi-autonomní až po podřízené, u kterých je závislost na SCN částečná či naprostá. Poznání těchto vztahů má velký význam pro pochopení důsledků narušení rytmické signalizace z SCN, ke které může docházet v případě, že je člověk vystaven situaci konfrontující stav vnitřní synchronizace cirkadiánního systému (viz 2.2.). K seřizování periferních oscilátorů dochází pomocí výše popsaných signálů z SCN, které jsou označovány jako systémové, ale také pomocí signálů lokálních, specifických pro danou buňku. Ve stavu vnitřní synchronizace jsou systémové a lokální signály v souladu a vzájemně se podporují. V periferních orgánech a tkáních aktivují synchronizační signály různé signální dráhy, které vedou k regulaci exprese k nim sensitivních hodinových genů, což má nakonec za následek seřízení molekulového mechanismu hodin. Jako hodinové geny, které odpovídají na systémové signály v periferních hodinách, byly označeny např. geny *Per2* a *Nr1d1* (označován též synonymem *Rev-erba*) (Hughes a spol., 2012; Kornmann a spol., 2007).

Mechanismus synchronizace periferních oscilátorů je předmětem intenzivního výzkumu. Bylo například prokázáno, že synchronizace periferních oscilátorů systémovými signály proteinové povahy oscilujícími v krvi je zřejmě zprostředkována aktivací IETFs (z angl. immediate early transcription factors), jako je např. SRF (z angl. serum response factor) (Gerber a spol., 2013). Synchronizace teplotními cykly zahrnuje aktivaci HSF1 (z angl. heat shock factor 1), který je exprimován rytmicky (Reinke a spol., 2008) a váže se na HSE (z ang.

heat shock element) promotorů různých genů, včetně hodinového genu *Per2* (Tamaru a spol., 2011). Synchronizace příjmem potravy pravděpodobně souvisí s citlivostí hodinového mechanismu ke změně energetického stavu buňky. Při změně poměru NAD(P)^+ a NAD(P)H (z angl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) je aktivován enzym Sirtuin1, který kromě jiného deacetyluje také komplex hodinových proteinů CLOCK a BMAL1 (pozitivní element zpětnovazebné smyčky), čímž ovlivňuje jeho schopnost aktivovat transkripci hodinových genů (Nakahata a spol., 2008), a také deacetyluje přímo hodinový protein PER2, čímž podporuje jeho degradaci (Asher a spol., 2008). Dalším příkladem ovlivnění hodin změnou metabolického stavu je jejich citlivost ke změně poměru ATP a AMP v buňce, prostřednictvím AMPK (z angl. AMP-dependent protein kinase). AMPK je hlavním senzorem tohoto poměru a zvýšené hladiny AMP stimulují její aktivitu. Aktivace AMPK pak ovlivňuje negativní elementy zpětnovazebného mechanismu hodin, buď přímo jejich fosforylací (CRY1) nebo nepřímo (PER2), což vede k jejich degradaci (Lamia a spol., 2009; Um a spol., 2007). Změna režimu v příjmu potravy je dominantním synchronizátorem pro některé periferní hodiny (např. v játrech) (Obr. 2), které jsou touto změnou seřizovány i pokud je zvíře stále vystaveno střídání světla a tmy. V těchto podmínkách jsou centrální hodiny v SCN ke změně v příjmu potravy rezistentní a zůstávají ve fázi s vnějším světelným režimem, který je pro ně dominantním synchronizátorem (Damiola a spol., 2000). Výsledkem může být vzájemná desynchronizace centrálních a periferních oscilátorů, tzv. vnitřní desynchronizace. Synchronizace hormonálními signály je podmíněna přítomností receptorů v dané tkáni. Výsadní postavení při synchronizaci periferních oscilátorů mají glukokortikoidní hormony, jejichž receptory (GR) jsou přítomny ve všech periferních tkáních a v mozku s výjimkou SCN (Rosenfeld a spol., 1988). Aktivované GR působí jako transkripční faktory ovlivňující genovou expresi v cílových tkáních a aplikace glukokortikoidů fázově posouvá hodiny v játrech (Balsalobre a spol., 2000).

Uvedené příklady mechanismů ukazují, že signální dráhy zapojené do synchronizace periferních oscilátorů jsou velmi komplexní. Tato komplexnost je nezbytná pro udržení jednotného fázového vztahu mezi všemi buněčnými oscilátory v určitém orgánu tak, aby mohl vykonávat rytmicky příslušnou funkci, a aby tento byl rytmus seřizen do správné fáze s rytmem oscilátorů v ostatních orgánech či tkáních v těle.

2.2. Cirkadiánní systém a zdravý člověk

Používání umělého světla v novodobé historii (v současnosti až 75% světové populace je vystavována umělému světlu v noci), spolu se zvyšujícím se socio-ekonomickým tlakem na výkonnost, vede ke stále častějšímu přesunu aktivit člověka do noční doby, což má zcela zásadní vliv na funkčnost cirkadiánního systému (Bennie a spol., 2014; Falchi a spol., 2011). Z hlediska existence člověka na Zemi působí tento významný faktor pouze během poměrně krátkého období a cirkadiánní systém se mu tak nemohl přizpůsobit. Je nezvratným faktem, že pro zajištění chodu moderní společnosti je nezbytný směnný provoz v mnoha profesích, kterému je ve vyspělých zemích nyní vystaveno 20 - 40% pracujících lidí. Opakované a nepravidelné vystavování umělému intenzivnímu světlu v noci, spojené s pracovní či jinou aktivitou a příjmem potravy, významně konfrontuje náš cirkadiánní systém. Tato konfrontace vede k narušení vnitřní synchronizace cirkadiánního systému a tím jeho schopnosti optimalizovat fyziologické procesy vzhledem k denní době. Teprve poznatky posledních desetiletí ukázaly na souvislost mezi tímto narušením a výskytem chorob, které jsou typické pro moderní společnost, a které proto nazýváme civilizačními. Epidemiologické studie u pracovníků ve směnném provozu odhalily zvýšené riziko některých onemocnění, např. metabolického syndromu (Pietrojusti a spol., 2010), kardiovaskulárních onemocnění (Obayashi a spol., 2014a) a nádorového onemocnění prsu (Stevens a spol., 2014). Lidé, kteří jsou nadměrně vystavováni světlu v noci, také častěji trpí poruchami spánku (Obayashi a spol., 2014b). Ačkoliv tyto studie ukazují na vzájemnou korelaci mezi změnou chování a

výskytem choroby, nemohou jednoznačně prokázat jejich příčinnou souvislost. Jedním z velkých témat chronobiologie je hledání spojení mezi poruchou časové regulace a rozvojem neuropsychiatrických onemocnění. Toto spojení je zvažováno především proto, že většina těchto onemocnění je doprovázena také poruchou cirkadiánních rytmů, ať už se projevuje poruchami spánku či poruchou regulace hladin hormonů (Barnard a Nolan, 2008). Je také velmi dobře známo, že narušení cirkadiánní regulace, např. v důsledku směnného provozu nebo následkem přesunu mezi více časovými pásmy („jet lag“), má za následek dočasné zhoršení spánku a významné zhoršení kognitivních funkcí a psychického stavu (Bedrosian a spol., 2011; Bedrosian a Nelson, 2013; Cho, 2001). Podobně jako v případě jiných chorob, také u neuropsychiatrických onemocnění je otázka "vejce a slepice" intenzivně diskutována (Bedrosian a Nelson, 2012; Moghekar a O'Brien, 2012) a současné znalosti zdaleka neumožňují definitivní závěry (Karatsoreos, 2014). Z tohoto důvodu je třeba dalšího intenzivního výzkumu, který přispěje k odhalení těchto souvislostí.

3. Cíle

I. Popsat cirkadiánní hodiny v gastrointestinálním traktu, poznat jejich funkci a odhalit centrální a periferní mechanismy jejich regulace

II. Popsat funkční stav cirkadiánního systému u animálního modelu kardiovaskulárního a metabolické onemocnění – spontánně hypertenzního potkana (SHR)

III. Zjistit funkční stav cirkadiánního systému u člověka ve zdraví a při různých neuropsychiatrických onemocněních

4. Metody

4.1. Přehled použitých modelů a postupů

4.1.1. Animální modely

V experimentech byli použiti potkani kmene Wistar a SHR (zdroj, stáří a pohlaví je uvedeno v příslušných publikacích). Dále byly v pokusech použity myši kmene CD-1 (Charles River, Sultfeld, Německo), C57Bl6/J (Fyziologický ústav AVČR) a transgenní myši mPer2^{Luc} (kmen B6.129S6-Per2^{tm1It}/J, JAX, USA)(Yoo a spol., 2004). Zvířata byla chována ve standardních podmínkách, tj. při konstantní teplotě cca 21 ± 2 °C a vlhkosti. Světelný režim byl monitorován, a pokud není uvedeno jinak, byl nastaven na 12 h světla a 12 h tmy (**LD12:12**). Světlo bylo zajištěno zářivkami, které poskytovaly světlo o intenzitě přibližně 150 lux v úrovni chovné nádoby. Pokud není uvedeno jinak, měla zvířata volný přístup k potravě a pití (příjem potravy *ad libitum*).

V případě odběru vzorků tkáně během 24 h pro určení denních profilů exprese genů byla zvířata v den odběrů tzv. „vypuštěna do stálé tmy“ (**DD**, z angl. dark:dark), což znamená, že se ráno světlo nerozsvítilo a tma byla prodloužena na celou dobu následujících 24 h. Tento postup zajistil zabránění přímého vlivu světla na sledované ukazatele.

V určitých experimentech byla zvířata vystavena dlouhodobě pobytu ve stálém světle (**LL**, z angl. light:light), tj. světlo mělo intenzitu, která odpovídala dennímu osvětlení při režimu LD12:12. Tento postup vedl k postupné desynchronizaci centrálních hodin v SCN a tím odstranění rytmických signálů, které vysílají k periferním hodinám. V těchto experimentech byl odběr vzorků prováděn dle výše zmíněného postupu, avšak zvířata nebyla vystavena DD, ale byla ponechána v den odběru ve stálém světle.

V experimentech sledujících vliv změny režimu v příjmu potravy byla potrava podávána zvířatům pouze během omezené doby, kdy zvířata potravu téměř nepřijímají, tedy po dobu

6 h během světlé fáze dne (v době mezi 3 h a 9 h po rozsvícení). Tento postup se označuje termínem z angl. „restricted feeding (RF)“.

Pro odběr vzorků tkání byla nejprve zvířata uvedena do hluboké narkózy aplikací thiopentalu (50 mg/kg, i.p.) a následně usmrčena dekapitací, po které následovalo rychlé odebrání vzorků sledovaných tkání.

Všechny experimentální postupy byly schváleny odbornou komisí Fyziologického ústavu a příslušnou rezortní komisí a odpovídaly "European Community Council directives 86/609/EEC".

4.1.2. Účastníci humánních studií

V experimentech byli sledováni zdraví jedinci, kteří se dobrovolně do studií přihlásili a pacienti, kteří byli vybráni na základě diagnózy provedené specialisty na příslušných klinikách (podrobný popis v příložených publikacích, tvořících součást habilitační práce). Všichni participující jedinci podepsali informovaný souhlas a postupy byly schváleny etickými komisemi Fyziologického ústavu AVČR a příslušných klinických pracovišť a v soulase s "Declaration of Helsinki".

Protokol odběru vzorků slin a bukální sliznice se lišil v jednotlivých studiích a je detailně popsán v příslušných publikacích. Vzorky byly odebírány za kontrolovaných podmínek buď v klinických zařízeních, nebo v domácím prostředí. Ve všech experimentech byly kontrolovány především světelné podmínky, které by mohly přímo ovlivnit hladinu melatoninu (intenzita světla v noci méně než 20 lux). Vzorky byly odebírány každé 2 - 4 h během 24 h, obvykle odběry začínaly a končily v 07:00. Účastníci studie byli požádáni, aby nepili a nejedli alespoň 1 h před odběrem, během odběrového dne si nečistili zuby, nepili nápoje obsahující kofein a alkohol a nekonzumovali banány. Vzorky slin byly poskytnuty buď přímo do zkumavek nebo pomocí žvýkání bavlněných tampónů (Bühlman saliva collection device, Bühlmann Laboratories, Allschwil, Switzerland). Vzorky slin pak byly uchovány při teplotě -20 °C. Okamžitě po poskytnutí vzorku slin byly odebrány vzorky bukální sliznice pomocí stěrů ústní sliznice cytologickým kartáčkem. Vzorky byly uchovávány v RNAlater reagent (Sigma, Taufkirchen, Germany) při -20°C. Všichni účastníci studie snášeli odběry bez jakýchkoliv obtíží.

4.2. Metody použité v animálních studiích

4.2.1. Sledování lokomoční aktivity a příjmu potravy

Pohybová aktivita byla sledována pomocí postupu dříve podrobně popsáném v práci (Polidarova a spol., 2011). K monitorování byly použity IČ pohybové detektory umístěné na víku chovných nádob a pohyb byl zaznamenáván pomocí cirkadiálního monitorovacího systému (Dr. H. M. Cooper, INSERM, France), který měřil aktivitu v 1-min intervalech. Data byla analyzována pomocí ClockLab toolbox (Actimetrics, Wilmette, IL, USA). Pohybová aktivita byla vyjádřena pomocí dvojité plotovaných aktogramů a tzv. "chi-squared" periodogramů pro výpočet periody a amplitudy rytmu.

Příjem potravy byl sledován pomocí IČ videokamer umístěných nad chovnými nádobami. Videozáznam byl analyzován a doba, kterou zvíře strávilo příjmem potravy, byla zaznamenána v 1 h intervalech.

4.2.2. Imunohistochemie

Vzorky tkáně byly nakrájeny na mrazícím mikrotomu (tloušťka řezů 12 µm), umístěny na podložní sklíčka a fixovány ve 4 % paraformaldehydu ve fosfátovém pufru (PBS). Imunohistochemická analýza byla provedena standardní avidin-biotinovou metodou s použitím diaminobenzidinu jako chromogenu (Vector Laboratories, Peterborough, UK).

Použité primární protilátky jsou specifikovány v jednotlivých publikacích. Detailní popis metody je poskytnut v práci (Sumova a spol., 2002).

4.2.3. Laserová mikrodisekce

Pro selektivní izolace oblastí mozku byla použita metoda laserové mikrodisekce s následnou detekcí hladin mRNA pomocí RT PCR. Mozky byly nakrájeny na mrazícím mikrotomu (tloušťka řezů 20 μ m) a obarveny kresylovou violetí (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Oblast zájmu byla poté přesně separována pomocí mikrodisektoru (LMD6000, Leica) a vzorky byly sbírány do mikrozkuhavek obsahujících pufr (RNeasy Micro kit, Qiagen, Valencia, USA), ve kterém byly uchovávány do izolace RNA.

4.2.4. Odběr vzorků periferních tkání

Vzorky periferních tkání byly odebírány do stabilizačního reagens RNAlater (Qiagen, Valencia, CA, USA). V případě vzorků tlustého střeva byl odebírán střevní epitel tak, že střevo bylo nejprve propláchnuto PBS puftrem, podélně rozříznuto a epitelová vrstva seškrábnuta do RNAlater, ve kterém byly vzorky uchovávány při -20 °C do izolace RNA.

4.2.5. Izolace RNA a real-time RT qPCR

Vzorky tkání byly homogenizovány ultrazvukovým sonikátorem a RNA byla purifikována pomocí RNeasy Mini kit (Qiagen) podle instrukcí výrobce. Koncentrace RNA byly určeny pomocí Nanodrop (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) spectrophotometru při 260 nm a kvalita RNA byla posouzena dle elektroforézy na 1,5 % agarózovém gelu. Kromě toho byla ve vybraných vzorcích testována integrita RNA s použitím 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Pro detekci hladin mRNA byla použita metoda real-time RT qPCR dle postupu popsaného dříve (Sladek a spol., 2007). Ve zkratce, RNA byla reverzně transkribována s použitím High Capacity cDNA RT kit (ThermoFisher). Naředěná cDNA byla následně amplifikována na LightCycler480 (Roche, Basel, Switzerland) s použitím SYBR Select qPCR Master Mix (ThermoFisher) a odpovídajících primerů. Relativní kvantifikace bylo dosaženo s použitím standardní křivky a následnou normalizací měřené exprese genu k průměrné relativní expresi tzv. "house-keeping" genů pro *β 2-microglobulin (B2M)*, *Gapdh* nebo *Tbp*. Tyto referenční geny byly použity proto, že jejich exprese je stabilní během 24 hodin. Sekvence použitých primerů jsou specifikovány v příslušných publikacích, tvořících součást habilitační práce. Ve všech experimentech byly vzorky z experimentální a kontrolní skupiny vždy stanoveny ve stejné RT qPCR esaji.

4.2.6. In situ hybridizace

Pro in situ hybridizaci byly jako templaty pro *in vitro* transkripci cRNA prób použity cDNA fragmenty hodinových genů (specifikace uvedena v jednotlivých publikacích). Próby byly značeny ³⁵S-UTP a in situ hybridizace byla provedena dle dříve popsaného postupu (Sumova a spol., 2003). Nejprve byly tkáňové řezy hybridizovány se specifickými próbami při 60 °C po dobu 20 h. Následovalo odmytí hybridizačního pufru, dehydratace v etanolu a usušení podložních skel s tkáňovými řezy. Nakonec byl na skla přiložen film BIOMAX MR (Kodak, Rochester, NY, USA) a po 10 - 14 dnech byly exponované filmy vyvolány s použitím vývojky (Adefo-Chemie, Dietzenbach, Germany) v přístroji pro automatické vyvíjení filmů. Autoradiografické filmy pak byly vyhodnoceny s použitím systému pro analýzu mikroskopického obrazu (Image Pro, Olympus, Tokyo, Japan), který detekoval relativní optickou denzitu hybridizačního signálu ve specifických oblastech sledovaných tkání.

4.2.7. Příprava explantů tkání a monitorování bioluminiscence

Per2^{Luc} myši byly usmrceny rychlou dekapitací v isofluranové narkóze a sledované tkáně (např. tlusté střevo) byly odebrány do HBSS pufru. Specifické podmínky pro kultivaci explantů a složení kultivačních pufrů jsou popsány v příslušné publikaci. Tkáňové explanty

byly umístěny na inserty (Merck, Darmstadt, Germany) uložené v Petriho miskách, které byly zakryty krycími sklíčky a umístěny do zařízení Lumicycle (Actimetrics, Wilmette, IL, USA) pro dlouhodobé snímání bioluminiscence. Záznam bioluminiscence byl analyzován pomocí programu Lumicycle Analysis (Actimetrics) pro výpočet periody a amplitudy rytmu.

4.2.8. Chirurgické metody

Chirurgické zákroky byly prováděny v hluboké narkóze navozené buď kombinací ketaminu 85 mg/kg, xylazinu 10 mg/kg a atropinu 0,1 mg/kg nebo isofluranovými parami).

Pro odstranění epifýzy byl zubní vrtačkou vytvořen v lebce otvor v pozici lambda, kterým byla pomocí jemné pinzety vyjmuta epifýza. Následně byl otvor uzavřen pomocí fragmentu lebky, zafixován zubním tmelem a řez kůže byl sešit chirurgickým hedvábím. Zvířatům byla poskytnuta pooperační péče a podáno analgetikum. Švy byly odstraněny po dvou týdnech od operace a zvířata byla použita v experimentu až poté co byla rána zcela zhojena (cca za 1 měsíc). Účinnost operace byla kontrolována pomocí radioimunologického stanovení hladin hormonu melatoninu v krvi (Houdek a Sumova, 2014) a též *post mortem* pomocí kontroly absence epifýzy. Kontrolní zvířata byla vystavena tzv. "sham" operaci, která probíhala dle popisu výše, avšak epifýza byla ponechána intaktní.

Pro odstranění nadledvin byl na zádech proveden oboustranný řez kůže a svaloviny a pinzetou byly vyjmuty nadledviny. Řez byl následně zašit a rána byla ošetřena antibiotiky. „Sham“ operace byla provedena stejným způsobem, ale nadledviny byly ponechány intaktní. Zvířata, jimž byly odstraněny nadledviny, dostávala v pitné vodě roztok 0,9 % NaCl. Účinnost operace byla kontrolována radioimunologickým stanovením hladin kortikosteronu dle postupu popsaného v práci (Sotak a spol., 2016).

4.2.9. Experimentální navození kolorektálních nádorů

Ve věku 20 měsíců byly CD-1 myši vystaveny protokolu pro indukci nádorů v kolonu. Nejprve byl zvířatům jednorázově injekčně (i.p.) aplikován azoxymetan (AOM) v dávce 10 mg/kg a za týden po aplikaci AOM dostávala zvířata v pitné vodě rozpuštěný 2% dextran sulfát sodný (DSS) po dobu 7 dnů, následovaný pitím destilované vody po dobu 14 dnů. Cyklus aplikace DSS a destilované vody byl opakován celkem 6krát. 3 měsíce po poslední aplikaci DSS byla zvířata usmrcena. V době usmrcení byly myši staré 52 týdnů (metoda převzata z Tanaka a spol., 2003).

4.3. Metody použité v humánních studiích

4.3.1. Stanovení hladin melatoninu ve slinách

Pro stanovení hladin melatoninu ve slinách byla použita metoda "direct double-antibody radioimmunoassay". Kit (Bühlmann Laboratories, Allschwil, Switzerland) byl použit dle návodu výrobce. Analytická citlivost metody byla 0,2 pg/ml. Detailní popis metody je uveden v příslušných publikacích, tvořících součást habilitační práce.

4.3.2. Stanovení exprese hodinových genů pomocí qRT PCR

Vzorky stěrů ústní sliznice byly použity pro izolaci mRNA pomocí Dynabeads mRNA Direct Micro Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) a vzorek mRNA byl reverzně transkribován na cDNA pomocí SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). cDNA byla použita pro PCR reakci, která probíhala ve skleněných kapilárách obsahujících SYBR green PCR Mix (Sigma, Taufkirchen, Germany) a specifické primery pro hodinové a referenční geny. Sekvence primerů jsou specifikovány v jednotlivých publikacích, tvořících součást habilitační práce. PCR reakce byla amplifikována v LightCycler 2.0 (Roche, Basel, Switzerland). Standardní křivky byly vytvořeny pro každou PCR esej ze sériově řaděných cDNA primárních linií lidských fibroblastů. Prahové cykly byly kvantifikovány s použitím LightCycler Analysis software 3.5 (Roche, Basel, Switzerland) pomocí "second derivative maximum method". Relativní hladiny exprese hodinových genů byly

normalizovány k expresi referenčních genů (*GAPDH* a *B2M*) a identita PCR produktů byla ověřena sekvenováním.

4.3.3. Sledování režimu aktivity a spánku pomocí Actiwatch

Pacienti a zdraví jedinci byli po dobu experimentu vyzváni k vedení spánkového kalendáře, do kterého zaznamenávali čas, který strávili v bdělém stavu či ve spánku. Tyto kalendáře sloužily jako doplněk k záznamům aktivity získaným pomocí zařízení Actiwatch (AW4 model; Cambridge Neurotechnology Ltd, UK), které účastníci studie nosili připevněné jako náramek na zápěstí nedominantní ruky po dobu 21 dnů. Zařízení zaznamenávalo v 1-min intervalech vykonaný pohyb a tato data byla zpracována pomocí programu Actiwatch Activity & Sleep Analysis V 5.42 software (Cambridge Neurotechnology Ltd, UK). Záznamy aktivity (aktigramy) byly dvojitě plotovány a v kombinaci se záznamy spánkových kalendářů byla určena doba usnutí a probuzení. Pro vytvoření profilů celkové 24 h aktivity byly aktivity zaznamenané programem v 1-min intervalech spojeny do 30-min intervalů a data pak byla kumulována pro 21 dní záznamu a vyjádřena jako průměrná aktivita \pm S.E.M. pro každý z 30-min intervalů.

Program umožňoval dále analyzovat spánkové parametry, jako i) předpokládaná délka spánku, ii) počet a trvání nočních probuzení, iii) procento skutečného spánku, iv) spánková účinnost, v) fragmentační index. Pro analýzu denního zdřimnutí byl software nastaven tak, že jako zdřimnutí byla považována doba nečinnosti delší než 15 min. Tyto údaje byly opět porovnávány s údaji ve spánkovém kalendáři pro odlišení pasivní bdělosti a spánku. Detailní popis parametrů a nastavení je uveden v práci (Weissova a spol., 2016).

4.4. Statistické metody

Všechny statistické výpočty byly prováděny a použitím programu Prism 6 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

Pro analýzu denních profilů stanovených veličin (hladin hormonů, exprese genů apod.) byla použita jednoduchá analýza variance (one-way ANOVA) pro testování efektu času. Pro testování přítomnosti či nepřítomnosti denního rytmu byla použita kosinová analýza pomocí fitování dat ke dvěma alternativním regresním modelům, tj. buď horizontální rovná čára (pro nulovou hypotézu) a jednoduchá sinusová křivka (pro alternativní hypotézu). Přítomnost cirkadiánního rytmu byla zvažována v případě, že profil splňoval dvě kritéria, tj., i) signifikantní efekt času pomocí ANOVA a ii) signifikantní výsledek kosinové analýzy. Kosinová metoda byla využita pro výpočet parametrů křivky, jako je amplituda (rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší střední hodnotou kosinové křivky), akrofáze (fázový úhel maxima sinusové křivky), koeficient určení R^2 (přesnost fitování křivky). Pro porovnání těchto parametrů byl použit "extra sum-of-squares F-test" s limitem $P < 0,05$ požadovaným pro statistickou významnost rozdílů.

Pro porovnání 24-h profilů mezi experimentálními skupinami byla použita dvojná analýza variance (two-way ANOVA); pro signifikantní rozdíl bylo požadováno $P < 0,05$. Post hoc analýza byla provedena s použitím "Sidak's multiple comparisons test". Pro porovnání akrofází či amplitudy mezi experimentálními skupinami byl použit buď "multiple t tests s Holm-Sidak metodou (pro dvě skupiny) nebo one-way ANOVA s Tukey metodou (tři skupiny); pro signifikantní výsledek bylo požadováno $P < 0,05$ ("multiplicity-adjusted").

Pro zpracování záznamů bioluminiscenčních profilů byla data normalizována pomocí 24-h průměrů (running average) a fitována k sinusoidní křivce s klesající amplitudou ("dampened sine wave"). Vypočtené fázové posuny a amplitudy byla porovnávány nepárovým t testem ($P < 0,05$).

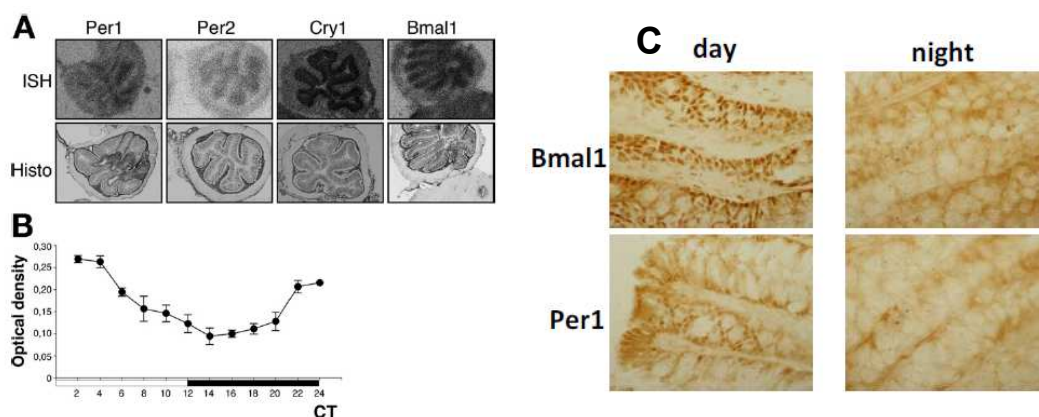
5. Výsledky* a diskuze

(* publikace tvořící součást habilitační práce jsou v textu zvýrazněny **modře a tučně**)

5.1. Cirkadiánní hodiny v gastrointestinálním traktu, jejich funkce a regulace

Gastrointestinální systém (GIT) je životně důležitým ústrojím, zajišťujícím energetickou rovnováhu organismu. Tento systém se musí vyrovnávat s denními změnami v příjmu potravy v návaznosti na cyklus spánku a bdění a na tyto změny reagovat. V dřívějších studiích byla popsána přítomnost cirkadiánních hodin v různých částech GIT a hodiny v játrech jsou považovány za "modelový" periferní oscilátor (Balsalobre, 2002). Obecně se předpokládá, že cirkadiánní hodiny v GIT umožňují anticipaci denní doby, kdy dojde k příjmu potravy a bude zapotřebí zahájení procesů k jejímu zpracování a využití pro získání energie. **Ve spolupráci s Oddělením Funkce epitelu Fyziologického ústavu AVČR** jsme se proto zaměřili na detailní charakterizaci cirkadiánních hodin v různých částech GIT. Zvláštní pozornost byla věnována hodinám ve střevu, a jejich významu při regulaci fyziologických funkcí střeva.

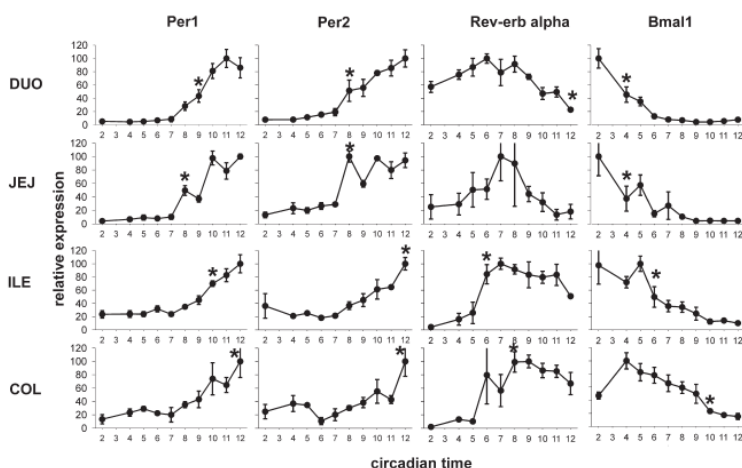
Nejprve jsme prokázali (Sladek a spol., 2007), že epiteliální buňky tlustého střeva (kolonu) laboratorního potkana kmene Wistar exprimují rytmicky hodinové geny *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Bmal1*, *Clock* a *Rev-erba* a jejich vzájemná fáze odpovídá funkčnímu oscilátoru. Kromě hladin transkriptů jsme v epiteliálních buňkách kolonu prokázali i rytmickou přítomnost hodinových proteinů PER1 a BMAL1 (Obr. 3).



Obr.3: (Sladek a spol., 2007) Expres hodinových genů v epiteliálních buňkách kolonu laboratorního potkana. (A) Repräsentativní autoradiografy řezů kolonu, ukazující pozitivní signál z *in situ* hybridizace (ISH) pro expresi *Per1*, *Per2*, *Cry1* a *Bmal1* a jejich histologické podbarvení metylénovou modří (Histo). Hybridizační signál získaný v IHS odpovídá oblasti epiteliální vrstvy v Histo. (B) Denní profil exprese hodinového genu *Bmal1* v epitelu kolonu detekovaný pomocí ISH. CT = cirkadiánní čas (CT0 je doba rozsvícení a CT12 je doba zhasnutí na původním LD12:12). (C) Imunohistochemické barvení řezů kolonu pro hodinové proteiny PER1 a BMAL1 v epiteliálních buňkách krypt kolonu. Intenzita barvení je vyšší během dne (a,c) než v noci (b,d).

Hodiny v kolonu byly přibližně ve stejné fázi jako hodiny v játrech a byly fázově opožděné za hodinami v SCN. Současně s naší studií byla exprese hodinových genů popsána také u myši v jejunu (Froy a Chapnik, 2007) a kolonu (Hoogerwerf a spol., 2007). Kromě kolonu jsme u potkana sledovali rytmickou expresi hodinových genů také v epiteliálních buňkách jiných částí střeva, tj. duodena, jejunu a ilea, a to především s cílem porovnat vzájemně jejich fázi (Polidarova a spol., 2009). Detailní analýza doby, kdy exprese jednotlivých hodinových genů začíná narůstat či klesat (pomocí sledování této exprese v 1 h intervalech během světlé části dne) ukázala, že hodiny v jednotlivých částech střeva jsou vzájemně fázově posunuty (Obr. 4). Zjistili jsme, že v distální části střeva (kolon) jsou hodiny fázově opožděny za

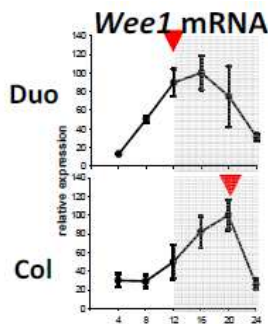
hodinami v proximální části střeva (duodenum). Výsledek tak poprvé ukázal, že jednotlivé segmenty trávicí trubice mají hodiny načasovány vzájemně tak, jak odpovídá směru pasáže tráveniny střevem během dne. Tento poznatek podporuje hypotézu, že cirkadiánní hodiny ve střevu slouží k anticipaci doby příjmu potravy. Pokud jsme dobu příjmu potravy posunuli do doby, kdy potkani potravu přijímají jen velmi omezeně (tj. světlá část dne), a to tak že zvířata jsou vystavena RF (tzv. "restricted feeding"), hodiny v kolonu byly seřizeny podle této změny (Sladek a spol., 2007).



Obr. 4: (Polidarova a spol., 2009) Relativní exprese hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Rev-erba*, *Bmal1*, měřená v 1 h intervalech během světlé části LD12:12 v epiteliálních buňkách duodena (DUO), jejunu (JEJ), ilea (ILE) a kolonu (COL). Hvězdička označuje hodnoty, které jsou signifikantně zvýšeny proti basální hodnotě. Doba signifikantního nárůstu exprese *Per1* a *Per2* nastává v duodenu v CT8, avšak v kolonu až v CT12. Podobně, doba signifikantního poklesu exprese *Bmal1* nastává v duodenu v CT4 a v kolonu až v době CT10. Fáze rytmické exprese hodinových genů je tak v kolonu významně opožděna za duodenem. CT= cirkadiánní čas (CT0 je doba rozsvícení a CT12 je doba zhasnutí na původním LD12:12)

Funkční význam cirkadiánních hodin lze prokázat na příkladu jejich zapojení do regulace spínání genů kódujících proteiny, které mají fyziologický význam v dané tkáni. V distálním kolonu byla pomocí metody „microarray“ zjištěna rytmická exprese u 3,7% sledovaných genů (Hoogerwerf a spol., 2008). V našich studiích jsme prokázali, že hodiny v kolonu mají význam pro regulaci transportu iontů přes membránu kolonocyty. V kolonu je rytmicky spínána exprese genu *Nhe3*, který kóduje elektroneutrální přenašeč Na^+ a H^+ iontů (Sladek a spol., 2007). Přitom po vystavení potkana RF byla fáze rytmické exprese *Nhe3* seřizena stejně jako fáze hodin v kolonu (Sladek a spol., 2007). V následné práci jsme pak popsali, že kromě *Nhe3* je i řada dalších transportérů iontů a kanálů zapojených do regulace rovnováhy Na^+ a Cl^- regulována cirkadiánními hodinami a jejich exprese vykazuje cirkadiánní rytmus (Sotak a spol., 2011).

Dále jsme prokázali, že kromě transportu molekul přes membránu mají hodiny ve střevním epitelu ještě další funkce, např. se účastní časování průběhu buněčného cyklu pomocí regulace exprese genu *Wee1*, který kóduje kinázu inhibující vstup kolonocyty do mitózy. Fáze denních profilů exprese *Wee1* odpovídala fázi hodin v jednotlivých úsecích střeva v kranio-kaudální ose (Polidarova a spol., 2009) (Obr. 5).

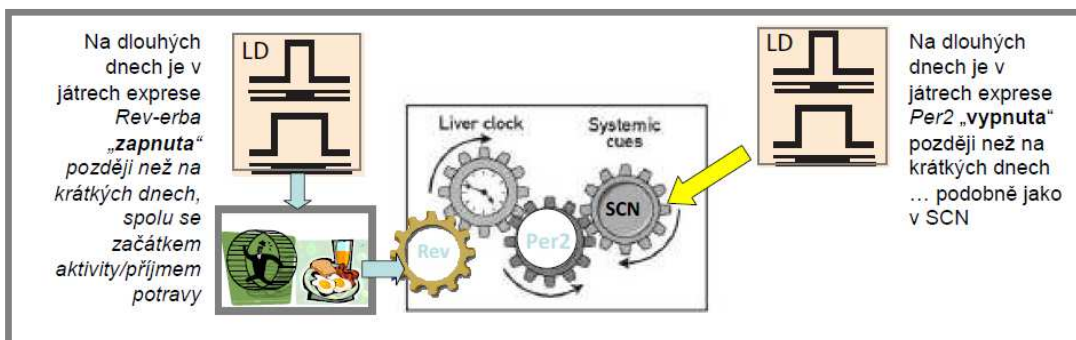


Obr. 5: (Polidarova a spol., 2009) Denní profil relativní exprese genu *Wee1* v epitelu duodena (DUO) a kolonu (COL). Šedá oblast odpovídá době subjektivní noci. Červená šipka označuje fázi rytmu, která je v duodenu předběhnuta před rytmem v kolonu.

Význam cirkadiánní kontroly buněčného cyklu kolonocyty není jasný, nicméně se zdá, že narušení tohoto regulačního mechanismu může souviset s rozvojem nádorového onemocnění u člověka (Mazzoccoli a spol., 2011). Bylo totiž prokázáno, že experimentální narušení cirkadiánní regulace vede k urychlení růstu nádorů tlustého střeva (Filipski a spol., 2002). Zjistili jsme (Sotak a spol., 2013), že u CD-1 myši, kterým jsme experimentálně navodili kolorektální nádory podle dříve popsaného postupu (Tanaka a spol., 2003), byly rytmy v expresi hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Rev-erba* a *Bmal1* a hodinami kontrolovaného genu *Dbp* významně potlačeny v nádoru vzhledem k okolní zdravé tkáni, a také ve srovnání s rytmy v kolonu u zdravých kontrolních myši. Zajímavé bylo, že procedura pro vyvolání kolorektálních nádorů měla vliv i na hodiny v nenádorové tkáni, tj. játrech, které byly fázově předběhnuty ve srovnání s kontrolními zvířaty. Tento náš výsledek přispívá k hypotéze, že narušení cirkadiánní regulace může být predisponujícím faktorem pro rozvoj kolorektálního karcinomu. Naše výsledky odpovídaly zjištění na základě metody „microarray“, že až 7% (64/906) z rytmicky exprimovaných genů v distálním kolonu je asociováno s tvorbou kolorektálního karcinomu (Hoogerwerf a spol., 2008). Naše výsledky týkající se fyziologického významu cirkadiánních hodin pro funkci střeva byly shrnuty a diskutovány ve vztahu k současnému stavu poznání v přehledných článcích (Pacha a Sumova, 2013; Sotak a spol., 2014).

Ačkoliv je v současné době funkci cirkadiánních hodin v GIT věnována velká pozornost, znalosti o tom, jak jsou tyto hodiny seřizovány centrálními hodinami v SCN jsou zatím velmi limitované. V našich studiích jsme se proto pokusili přispět k poznání těchto mechanismů. Dříve jsme podrobně popsali, jak změna délky světlé části dne, tj. fotoperioda, moduluje funkci centrálních hodin v SCN (Sumova a Illnerova, 1998; Sumova a spol., 1995). Zajímalo nás tedy, zda a jak fotoperiodou modulované signály z SCN seřídí chod periferních hodin v GIT a zda se na tomto seřízení podílí změna v intervalu příjmu potravy (Parkanova a spol., 2012; Sosniyenko a spol., 2010). Myši kmene C57Bl6/J jsme nejprve vystavili změně z dlouhé fotoperiody (LD18:6) na krátkou fotoperiodu (LD6:18). Následně jsme za 3, 5, a 13 dnů po této změně detekovali denní profily exprese hodinových genů v SCN (*Per1*, *Per2* a *Rev-erba*) a játrech (*Per2* a *Rev-erba*) a porovnávali dynamiku jejich re-synchronizace mezi centrálními a periferními hodinami. Zjistili jsme, že v SCN docházelo postupně ke změně fáze hodin v rostrální, mediální a kaudální části SCN a to tak, že dlouhou fotoperiodou desynchronizované hodiny v těchto 3 částech SCN se po změně na krátkou fotoperiodu postupně synchronizovaly do jednotného fázového vztahu. K jejich synchronizaci došlo především pomocí fázového předbírání doby, kdy exprese všech sledovaných genů klesala. Zjistili jsme, že fotoperioda v játrech moduluje rytmy v expresi sledovaných genů rozdílným způsobem než v SCN. Na rozdíl od SCN se v játrech rytmy v expresi genů *Per2* a *Rev-erba* přizpůsobovaly změně fotoperiody odlišně; zatímco profil exprese *Per2* se přizpůsoboval posunem doby poklesu exprese (tj., podobně jako v SCN), profil exprese *Rev-erba* se přizpůsoboval pomocí posunu doby jejího nárůstu. Zjistili jsme, že synchronizace rytmu *Rev-erba* se změnou fotoperiody odpovídala synchronizaci rytmu v lokomoční aktivitě těchto zvířat, která se přizpůsobovala dobou svého večerního nástupu (Sosniyenko a spol., 2010). Tento výsledek naznačuje duální mechanismus, jakým SCN seřizuje hodiny v játrech.

Fotoperiodou modulované signály z SCN pravděpodobně přímo nastavují v játrech fázi rytmické exprese genu *Per2* tím, že regulují dobu ukončení jeho exprese. Současně, fotoperiodou indukovaná změna aktivity přispívá k nastavování jaterních hodiny pomocí regulace doby, kdy je zahájena exprese genu *Rev-erba* (schematické znázornění hypotézy je na Obr. 6). Tato hypotéza je podpořena výsledky studií, které určily geny *Per2* a *Rev-erba* v periferních oscilátorech jako geny citlivé na signály z centrálních hodin (Hughes a spol., 2012; Kornmann a spol., 2007).

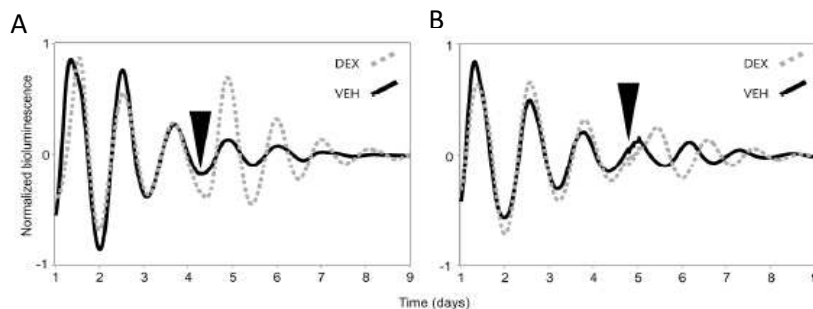


Obr. 6: Schématické znázornění naší hypotézy plynoucí z výsledků publikovaných v (Sosniyenko a spol., 2010 a Parkanova a spol., 2012). Z výsledků vyplývá, že při změně z dlouhé fotoperiody (LD18:6) na krátkou fotoperiodu (LD6:18) jsou periferní hodiny v játrech seřizovány systémovými a lokálními signály pomocí časování ukončení exprese genu *Per2* a zahájení exprese genu *Rev-erba*.

Následně (Parkanova a spol., 2012) jsme řešili otázku, zda a do jaké míry hraje v mechanismu fotoperiodické modulace periferních hodin úlohu změna délky doby příjmu potravy, která je přímo úměrná změně doby, kdy je zvíře aktivní. Jak již bylo zmíněno, příjem potravy je nejsilnějším synchronizátorem cirkadiálních hodin v játrech (Damiola a spol., 2000). V této studii byly myši vystaveny opačné změně fotoperiody, tj. z krátké (LD6:18) na dlouhou (LD18:6), a opět byla sledována exprese hodinových genů v SCN a játrech. Dynamika přizpůsobení se této změně v centrálních a periferních hodinách pak byla srovnávána se situací, kdy zvířata byla ponechána na LD6:18, ale byla jim změněna doba dostupnosti potravy pouze na 6 hod., tak jak to odpovídá délce jejich aktivity na LD18:6. Zjistili jsme, že zatímco změna dostupnosti potravy neměla vliv na hodiny v SCN (jak jsme předpokládali na základě dřívějších studií - Damiola a spol., 2000), hodiny v játrech byly významně ovlivněny, avšak toto ovlivnění nebylo zcela stejné jako v případě změny fotoperiody z LD6:18 na LD18:6. Výsledky naznačily, že fotoperiodická modulace periferních hodin v játrech není zprostředkována pouze pomocí změny v příjmu potravy, ale jedná se o komplexní proces, zahrnující i jiné signály z SCN. V následující studii jsme řešili otázku, zda se periferní hodiny v různých částech GIT liší v citlivosti k centrálním signálům z SCN (Polidarova a spol., 2011). Potkani byli vystaveni LL (stálému světlu), které po určité době působení způsobí desynchronizaci oscilátorů v SCN a následnou ztrátu výstupních rytmů. Po 30 denní expozici zvířat LL byly v játrech, duodenu a kolonu sledovány denní profily exprese hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Rev-erba* a *Bmal1* a hodinami kontrolovaných genů *Wee1* a *Dbp*. Vystavení LL vedlo u všech zvířat ke kompletní ztrátě rytmu v lokomoční aktivitě a příjmu potravy, avšak rytmy v expresi genů v GIT byly ovlivněny v závislosti na sledované tkáni. Nejméně ovlivněny byly rytmy v duodenu, což naznačuje větší autonomnost těchto hodin a jejich větší nezávislost na signálech z SCN. U skupiny zvířat, které byly vystaveny LL a současně jim byl umožněn přístup k potravě jen na 6 h během dne, byly rytmy v expresi všech sledovaných genů obnoveny v duodenu a játrech, avšak nikoliv v kolonu, kde zůstala především arytmiická exprese genu *Per2*. Tento výsledek podpořil naši dříve formulovanou hypotézu o úloze genu *Per2* při synchronizaci periferních hodin v kolonu rytmickými, a na potravě nezávislými, signály z SCN (viz výše). Kromě toho, tento výsledek podporuje naši

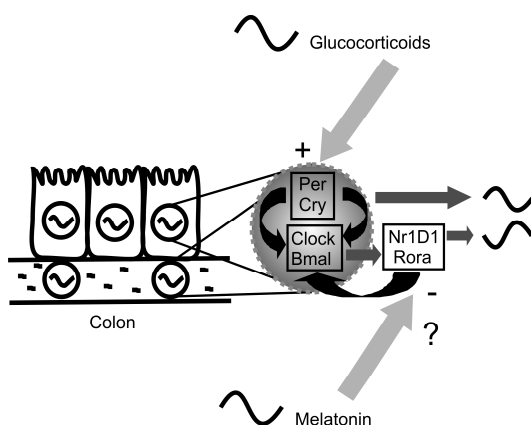
hypotézu, že narušení signálů z SCN může narušovat chod hodin nejvíce v kolonu, a vysvětlit tak proč právě kolon vykazuje nejčastěji patologii související s cirkadiánní desynchronizací.

Poté, co jsme prokázali, že signály z SCN přímo ovlivňují chod cirkadiánních hodin v GIT, jsme se dále věnovali mechanismům, které tuto signalizaci zprostředkovávají. Dosud byla publikována pouze jedna práce, která se zabývala regulací hodin v kolonu prostřednictvím autonomního nervového systému (Malloy a spol., 2012). V našich studiích jsme se věnovali zapojení hormonálních signálů, a to především těch, které jsou jakožto výstupní signály centrálních hodin v SCN regulovány rytmicky, tj. melatonin a glukokortikoidy. Oba hormony vykazují cirkadiánní rytmy v hladinách a mají receptory uložené v periferních tkáních (citace v příslušných publikacích). Úloha melatoninu při synchronizaci periferních hodin je obecně předpokládána (Pevet, 2014), avšak experimentální důkazy pro tento jeho účinek jsou velmi omezené. Ukázali jsme, že dlouhodobá absence melatoninu (cca 1 rok) v důsledku chirurgického odstranění epifyzy vede u potkana ke snížení amplitudy rytmické exprese hodinových genů v játrech a duodenu, přičemž amplituda exprese hodinových genů v SCN se nemění. Tento výsledek naznačil, že melatonin může být redundantním synchronizačním signálem pro oscilátory v některých částech GIT (Houdek a spol., 2016). Tkáňová specifická tohoto efektu byla ukázána v následující studii, kdy jsme zjistili, že na rozdíl od duodena a jater, melatonin pravděpodobně nepůsobí jako synchronizační signál pro hodiny v kolonu (Polidarova a spol., v tisku), jelikož dlouhodobá absence melatoninu zde na rozdíl od jater a duodena neovlivnila profily exprese hodinových genů. Aplikace melatoninu *in vivo* zvířatům vystaveným působení LL neměla vliv na geny tvořící základní molekulární smyčku hodinového mechanismu (*Per1*, *Per2*, *Bmal1*), ale mírně ovlivnila expresi genu *Nr1d1*, který tvoří přídatnou smyčku v tomto mechanismu a současně je zapojen do regulace dalších genů nezávisle na hodinách. Absenci vlivu melatoninu na hodiny v kolonu jsme pak potvrdili experimenty *in vitro*, kdy aplikace melatoninu na organotypické explanty kolonu transgenních *mPer2^{Luc}* myši neovlivnila rytmus v bioluminiscenci sledovaný po dobu 3 dnů po aplikaci. Zdá se tedy, že melatonin v kolonu nemá úlohu při synchronizaci hodin, ale může pravděpodobně svůj vliv uplatňovat nezávisle na hodinách např. prostřednictvím genu *Nr1d1*. Glukokortikoidy byly označeny jako hormony, které mají významný vliv při synchronizaci periferních hodin (Balsalobre a spol., 2000) a jejich účinek je podobně jako v případě melatoninu také tkáňově specifický. Odstranění glukokortikoidů pomocí ablace nadledvin měla po 7 dnech po operaci dopad na periferní hodiny v játrech, jejunu, kolonu, kůře ledvin, slezině a tukové tkáni a způsobila tkáňově specifické ovlivnění exprese různých hodinových (*Bmal1*, *Per1-3*, *Cry1*, *Rev-erba*, *Roraα*) a hodinami kontrolovaných (*Dbb*, *E4bp4*) genů (Sotak a spol., 2016, Polidarova a spol., v tisku). Společným efektem adrenalectomie bylo signifikantní snížení amplitudy denního profilu exprese hodinového genu *Per1* ve všech sledovaných tkáních. Opakovaná i.p. aplikace dexametazonu, tj. syntetického analogu glukokortikoidů, obnovila v kolonu potkanů s odebranými nadledvinami amplitudu rytmické exprese *Per1* (Polidarova a spol., v tisku), přičemž neměla vliv na expresi *Per2*. Navíc aplikace dexametazonu *in vitro* na organotypické explanty kolonu transgenních *mPer2^{Luc}* myši fázově posouvala rytmus v bioluminiscenci a tento efekt byl fázově specifický (Polidarova a spol., v tisku) (Obr. 7). Tyto výsledky potvrdily, že hodiny v kolonu mohou být seřizovány pomocí denního rytmu v hladinách glukokortikoidů a že tento synchronizační efekt je zprostředkován pomocí indukce exprese hodinového genu *Per1*. Vliv glukokortikoidů na expresi tohoto hodinového genu je umožněn díky vazebnému místu, tzv. "glucocorticoid response element" (GRE), v promotoru *Per1*, který reguluje jeho expresi (So a spol., 2009).



Obr. 7: (Polidarova a spol., v tisku) Vliv aplikace dexametazonu (DEX) a vehikula (VEH) na rytmus v bioluminiscenci, snímaný z organotypického explantu kolonu $mPer2^{Luc}$ myši in vitro. A) Aplikace v době minima hladiny PER2 nezpůsobí fázový posun rytmu, B) Aplikace v době maximální hladiny PER2 způsobí významné fázové zpoždění rytmu. Osa x označuje dny, po které byl signál snímán.

Výsledky z našich studií tedy ukazují, že úloha hormonů melatoninu a glukokortikoidů při synchronizaci periferních cirkadiánních hodin v GIT je tkáňově specifická a pro synchronizaci hodin v kolonu má větší roli rytmus v hladinách glukokortikoidů než melatoninu (Obr. 8).

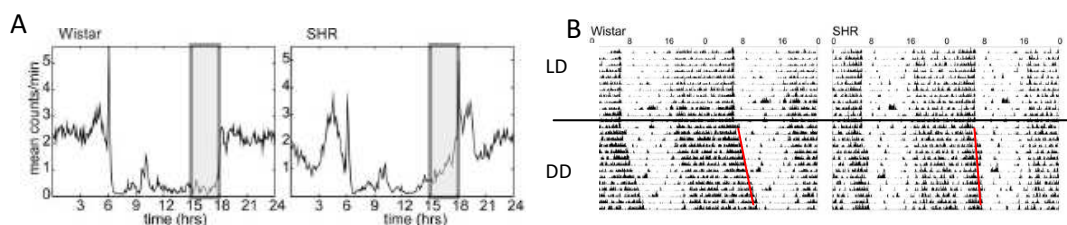


Obr. 8: Schematické znázornění výsledků práce Polidarova a spol., v tisku. Cirkadiánní oscilátory v kolonu jsou citlivé k rytmické změně hladin glukokortikoidů, které mohou seřizovat jejich fázi pomocí zvýšení exprese hodinového genu *Per1*. Naproti tomu, rytmické změny v hladinách melatoninu nemají přímý vliv na hodinový mechanismus těchto oscilátorů, mohou však pravděpodobně ovlivňovat procesy v kolonu prostřednictvím drah, které jsou "downstream" (např. pomocí genu *Nr1D1*, synonymum *Rev-erba*).

5.2. Funkční stav cirkadiánního systému u animálního modelu kardiovaskulárního a metabolické onemocnění – spontánně hypertenzního potkana (SHR)

Pro zkoumání příčinného vztahu mezi poruchou cirkadiánních regulací a vznikem různých chorob jsou často používány animální modely s delecí některého z hodinových genů, které významně ovlivňují funkci cirkadiánních hodin. Tento přístup umožňuje usuzovat na souvislost mezi poruchou cirkadiánní regulace a danou chorobou. Nevýhodou tohoto experimentálního přístupu však je, že z funkce vyřazené hodinové geny mohou mít účinky přesahující jejich funkci v hodinovém mechanismu, a také že při genetické delecí může docházet k zapojení kompenzačních mechanismů, které mohou maskovat efekt této delecí. Další nevýhodou je, že tento přístup je v převážné míře omezen pouze na myšičí modely. V naší práci jsme zvolili jiný přístup a pokusili jsme se charakterizovat cirkadiánní systém u dobře popsaného animálního modelu, u kterého dochází k rozvoji choroby spontánně během života, tzv. spontánně hypertenzního potkana (SHR). Tento potkan byl vyšlechtěn selekcí z kmene Wistar (Wistar-Kyoto) jakožto kmen, u kterého se během života vyvíjí hypertenze a metabolický syndrom (Okamoto and Aoki, 1963; Pravenec a spol., 2004). Jako první jsme u tohoto modelu provedli velmi detailní a komplexní analýzu cirkadiánního systému (Sladek a spol., 2012). Funkční vlastnosti centrálních hodin v SCN jsme zkoumali pomocí výstupního rytmu v pohybové aktivitě a rytmů v expresi hodinových genů v centrálních a periferních hodinách. Pomocí obou parametrů jsme zjistili, že v podmínkách LD12:12 jsou centrální hodiny v SCN u SHR fázově předběhnuty ve srovnání s kontrolními

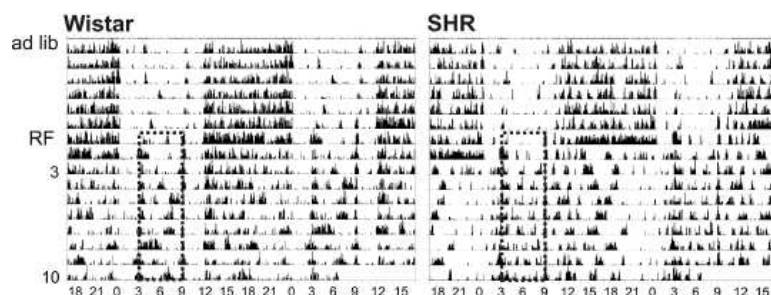
zvířaty kmene Wistar a také vzhledem k začátku tmavé fáze dne (Obr. 9). Z tohoto pohledu připomíná stav cirkadiálního systému SHR tzv. "časný chronotyp" s pozitivním fázovým úhlem synchronizace. Amplituda rytmu v pohybové aktivitě byla u SHR snížena. V konstantních podmínkách (DD) běžely hodiny v SCN u SHR s kratší periodou než u potkana Wistar (Obr. 9).



Obr. 9. (Sladek a spol., 2012) Srovnání denních rytmů v pohybové aktivitě u potkana kmene Wistar a spontánně hypertenzního potkana (SHR). A) Kumulované profily aktivity ("activity profiles") ukazují, že zatímco potkan kmene Wistar začíná být aktivní přesně v době začátku tmy (18:00), aktivita SHR začíná dříve (viz obdélník ohraničující interval 3 h před začátkem tmy). B) Ukázky aktogramů zvířat chovaných na režimu 12 h světla 12 h tmy (LD) a ve stálé tmě (DD). Výsledky ukázaly, že v DD je perioda rytmu u SHR významně kratší než u Wistar. Červená čára označuje dobu ukončení pohybové aktivity v DD, sklon odpovídá periodě rytmu.

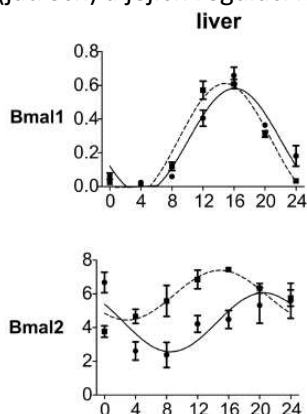
Chod a funkce periferních hodin u SHR byly ve srovnání s potkany Wistar ovlivněny tkáňově specifickým způsobem. Denní profily exprese hodinových genů byly významně potlačeny a fázově předběhnuty v kolonu, avšak v játrech ovlivněny nebyly. Tento výsledek opět podporuje naši hypotézu, že hodiny v kolonu jsou více závislé na hodinách v SCN než hodiny v ostatních částech GIT (viz 5.1.). Podobně jako hodinové geny, byla v kolonu ovlivněna i řada genů, které mají vztah k hodinám (např. *Dbp*, *Wee1*, *E4bp4*, *Nampt*, *Ppar γ* , *Pgc1 α* , *Hdac3*, *Hif1*, *Ppp1*). Výsledkem tkáňově specifického ovlivnění periferních hodin dochází u SHR ke změně vnitřní synchronizace mezi hodinami v SCN, játrech a kolonu, což může potenciálně přispívat k patologickým projevům. Na základě našich výsledků však nemůžeme vyloučit ani možnost, že zjištěná desynchronizace je důsledkem této patologie. Nicméně, u SHR byly zjištěny změny rytmů v expresi hodinových genů také v kosterním svalstvu (Miyazaki a spol., 2011), srdci (Naito a spol., 2003), játrech, tuku a mediobazálním hypothalamu (Cui a spol., 2011). Zhoršená vzájemná synchronizace periferních oscilátorů u SHR by mohla být částečně způsobena mírně zvýšenou rezistencí těchto hodin vůči teplotním cyklům, jak bylo prokázáno na fázové odpovědi hodin ve fibroblastech SHR *in vitro*, i když rozdíl v této odpovědi byl ve srovnání s fibroblasty potkana Wistar jen velmi malý (Sladek a Sumova, 2013). Je tedy zřejmé, že deficit v synchronizaci periferních hodin u SHR není dán sníženou citlivostí pouze k jednomu z možných synchronizačních signálů, tj. teplotním cyklům, ale je způsoben komplexními mechanismy.

Kromě výše popsaných rozdílů ve funkčním stavu cirkadiálního systému u SHR chovaného ve standardních podmínkách (světelný režim LD12:12, potrava *ad libitum*) jsme u tohoto kmene zjistili významné zvýšení citlivosti cirkadiálního systému na situaci, kdy je změněn režim v příjmu potravy (Polidarova a spol., 2013). Po vystavení RF na režimu LD12:12 (přístup k potravě byl omezen na 6 hod. během světlé části dne) vykazovali SHR dříve než potkani Wistar anticipační chování, které předchází podání potravy (tzv. FAA z angl. "food anticipatory activity") a tato aktivita byla také významně výraznější. Navíc došlo u SHR na rozdíl od potkanů Wistar v důsledku RF k přesunu celkové aktivity do dřívějších hodin, odpovídajících době příjmu potravy (Obr. 10).



Obr. 10: (Polidarova a spol., 2013) Ukázky aktogramů (záznamů pohybové aktivity) potkanů Wistar a SHR chovaných na LD12:12 a krmených nejprve ad libitum (ad lib) a poté vystavených režimu s omezenou dostupností potravy (restricted feeding, RF), kdy potrava byla podávána pouze v době označené obdélníkem. Zatímco aktivita potkana Wistar byla i na RF seřizena pomocí SCN (synchronizována s LD12:12), u SHR došlo k synchronizaci aktivity s dobou dostupnosti potravy.

Tato zvýšená odpověď na behaviorální úrovni korelovala s většími posuny a větší amplitudou denních rytmů v expresi hodinových genů v játrech. Kromě profilů exprese hodinových genů byly v důsledku RF změněny v játrech SHR profily v expresi genů majících vztah k hodinám a/nebo metabolismu (*Wee1*, *Dbp*, *Nampt*, *Ppara*, *Pgc1α*, *Prkab2*). V kolonu se efekt RF u obou kmenů potkana nelišil. Dále naše výsledky naznačily, že za zvýšenou reakcí jaterních hodin na RF u SHR může stát vyšší citlivost genu *Bmal2* (paralogu genu *Bmal1*) ke změně metabolického stavu, jelikož na rozdíl od potkana Wistar byl rytmus v expresi tohoto genu fázově posunut společně s genem *Bmal1* (Obr. 11). Poprvé jsme tak poukázali na korelaci mezi intenzitou FAA, fázovými posuny hodin v periferních tkáních (játrech) a jejich regulací metabolických drah.



Obr.11: (Polidarova a spol., 2013) Srovnání denních profilů exprese hodinových genů *Bmal1* a *Bmal2* v játrech potkanů Wistar (plná čára) a SHR (čerchovaná čára) vystavených režimu s omezenou dostupností potravy ("restricted feeding", RF). Zatímco u potkana Wistar byl vlivem RF seřizen pouze hodinový gen *Bmal1* (*Bmal1* byl po vystavení RF ve stejné fázi u obou kmenů potkana), u SHR byl vlivem RF seřizen kromě *Bmal1* také hodinový gen *Bmal2* (*Bmal2* je ve stejné fázi jako *Bmal1* pouze u SHR, nikoliv u potkana Wistar).

Souhrnně naše výsledky ukazují na komplexitu cirkadiálního fenotypu u SHR, projevující se nejen změnou funkčního stavu cirkadiálního systému ve standardních podmínkách, ale také ve vyšší citlivosti ke změnám těchto vnějších podmínek, a to konkrétně těch, které souvisí se změnou příjmu potravy.

5.3. Funkční stav cirkadiálního systému u člověka ve zdraví a při různých neuropsychiatrických onemocněních

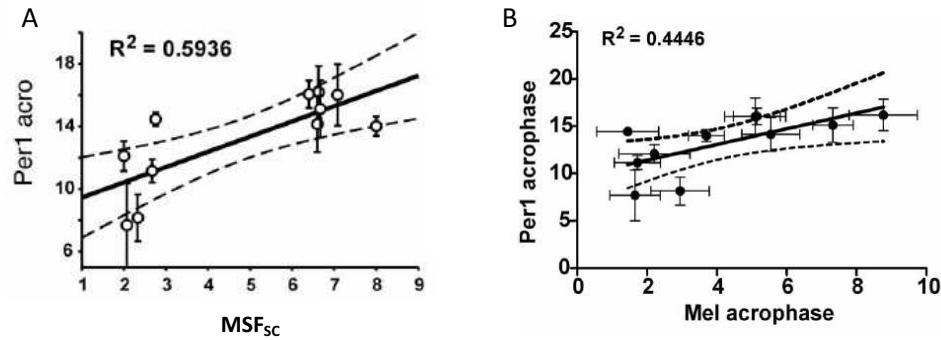
Pro určení funkčního stavu cirkadiálního systému člověka je k dispozici řada metod, které poskytují informaci o funkci centrálních a periferních hodin (pro přehled Novakova and Sumova, 2014). Stav centrálních hodin v SCN lze v současnosti zkoumat u člověka pouze nepřímo, pomocí tzv. výstupních rytmů, které tyto hodiny řídí, jako je např. rytmus v aktivitě a spánku či hladinách některých hormonů (melatoninu, kortizolu). V případě periferních hodin lze sledovat jejich funkci přímo na úrovni molekulárního mechanismu. V naší studii jsme zavedli novou metodu pro určení stavu periferních hodin v buňkách ústní

sliznice člověka (Novakova a spol., 2012; Novakova a spol., 2013) a ověřili její reprodukovatelnost a vhodnost pro využití v klinice. Hlavní výhodou námi zavedené metody je možnost stanovení exprese hodinových genů ve vzorcích, které jsou člověku odebírány zcela neinvazivně, což je důležitý předpoklad pro provádění studií u lidí exponovaných faktorům reálného života ("field studies").

Lidé se značně liší v preferenci doby, která je pro ně optimální k výkonu určitých aktivit či k ukládání se ke spánku. Obecně tuto preferenci označujeme jako **chronotyp**. Většinu lidí lze označit jako střední chronotyp, existují však i značné odchylky. Lidé s tzv. časným chronotypem se mohou probouzet v době, která je pro lidi s tzv. pozdním chronotypem optimální pro usínání. Tento velký časový rozdíl v preferencích může nepříznivě ovlivnit nejen soužití párů tvořených z extrémně rozdílných chronotypů, ale především může působit velké potíže při nutnosti podávání pracovního výkonu v době určené majoritní společností. Například, člověk s extrémně pozdním chronotypem má těžkosti se začátkem pracovní činnosti kolem 6. a 7. hod ráno, jelikož pro mnohé z nich tato doba odpovídá době optimální pro spánek (mají v tuto dobu tzv. subjektivní noc). Otázkou tedy bylo, zda je chronotyp nastaven vnitřními mechanismy tak, že skutečně odráží odlišné načasování subjektivní noci mimo noční hodiny a to na úrovni jak centrálních tak i periferních hodin. Odpověď na tuto otázku jsme hledali pomocí námi nově zavedené metody pro určení fáze cirkadiálních hodin v periferních hodinách člověka, umožňující porovnání fáze těchto hodin s hodinami centrálními.

V naší studii (Novakova a spol., 2013) jsme zkoumali skupinu zdravých dobrovolníků, kteří byli na základě dotazníku MCTQ ("Munich chronotype questionnaire") pro určení chronotypu (Roenneberg a spol., 2003) vybráni jako lidé s extrémně časným (věk $44,8 \pm 13,0$; $n = 7$) a extrémně pozdním (věk $24,7 \pm 2,4$; $n = 7$) chronotypem. Dotazník umožňuje určit tzv. střední dobu spánku (MSF_{SC} , z angl. „*mid-sleep phase*“, přepočítanou s korekcí na spánkový dluh nahromaděný během pracovních dní), která je používána pro rozlišení chronotypu. V naší studii byly hodnoty MSF_{SC} u lidí s časným chronotypem $02:18 \pm 0:19$ a s pozdním chronotypem $06:54 \pm 0:35$. Tyto hodnoty pro časný a pozdní chronotyp byly v souladu s hodnotami zjištěnými ve dřívějších studiích prováděných v populaci lidí žijících v Německu, Švýcarsku, Holandsku a Rakousku (Roenneberg a spol., 2007). Dříve bylo popsáno, že u lidí s extrémním chronotypem je ovlivněna fáze rytmu v hladinách melatoninu (Duffy a spol., 1999; Duffy a spol., 2001). Proto jsme pro ověření subjektivního ukazatele chronotypu, získaného z dotazníků, stanovili u všech jedinců také denní profily hladin melatoninu ve vzorcích slin a vypočítali jejich akrofáze (pomocí kosinové analýzy). Zjistili jsme, že u účastníků naší studie spolu akrofáze rytmu v hladinách melatoninu a hodnoty MSF_{SC} významně korelují, čímž jsme potvrdili správnost určení jejich chronotypu. Následné stanovení denních profilů v expresi hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Rev-erba* ve vzorcích ústní sliznice prokázalo, že akrofáze těchto rytmů je významně předběhnuta u skupiny lidí s časným chronotypem ve srovnání s lidmi s pozdním chronotypem ($P < 0,001$), a že významně koreluje s hodnotou MSF_{SC} . Navíc, akrofáze rytmu v expresi jednoho z hodinových genů (*Per1*) významně korelovala nejen s MSF_{SC} , ale i s akrofází rytmu v hladinách melatoninu ($P < 0,05$) (Obr. 12).

Tyto výsledky jako první ukázaly, že chronotyp člověka není určen pouze fází centrálních hodin v SCN (které řídí rytmus v hladinách melatoninu), ale že v závislosti na chronotypu člověka je nastaven a modulován také chod lidských periferních hodin. Navíc, tento vliv lze prokázat i při vystavení podmínkám reálného života. Tento výsledek zaujal redaktoři **New York Times** natolik, že jej citovali 20. října 2013 ve svém článku "Everyday Jet Lag" (http://well.blogs.nytimes.com/2013/10/17/everyday-jet-lag/?_r=0).

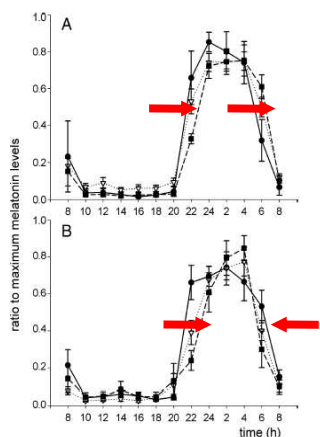


Obr. 12: (Novakova a spol., 2013) Korelace fáze (měřeno pomocí akrofáze, tj. doby piku) individuálního denního profilu exprese hodinového genu *Per1* v bukální sliznici člověka s A) fází jeho spánkového rytmu (MSF_{SC}) a B) s fází jeho rytmu v hladinách melatoninu ve slině. Výsledek ukazuje, že lidé s pozdním chronotypem (pozdější MSF_{SC} a akrofáze melatoninu) mají také fázově zpožděný rytmus v expresi hodinových genů v periferních oscilátorech.

Současně s tím naše studie jako první prokázala, že exprese hodinových genů v bukální sliznici může sloužit jako hodnotný a reprodukovatelný ukazatel aktuálního stavu cirkadiálního systému u člověka (viz další data v publikaci Novakova a spol., 2013).

Správná synchronizace mezi fází vnitřního časového systému s denní dobou je nezbytná pro zdraví člověka (pro přehled viz Takahashi a spol., 2008) a nesoulad mezi vnitřním a vnějším časem u jedinců s extrémním chronotypem, pokud jsou nuceni se přizpůsobit svým denním režimem majoritní společnosti, může vést ke zdravotním komplikacím. Například, extrémně pozdní chronotyp byl označen za nespecifický rizikový faktor, který může zvyšovat náchylnost k duševním poruchám (Kitamura a spol., 2010). V našich dalších studiích jsme se proto zaměřili na sledování funkčního stavu cirkadiálního systému u pacientů trpících různými neuro-psychiatrickými chorobami.

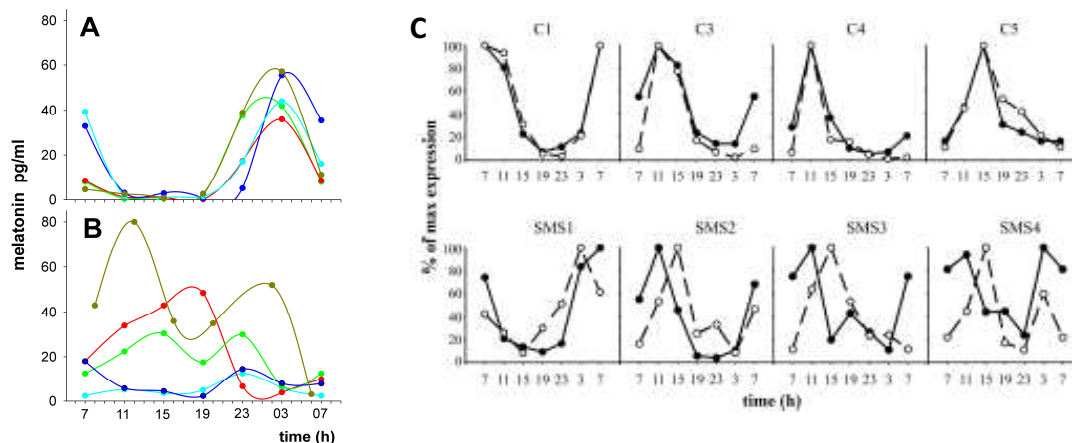
Porucha pozornosti spojená s hyperaktivitou (**ADHD**; attention-deficit/hyperactivity disorder) je poměrně častým onemocněním u dětí (cca 5%), které se projevuje především poruchami jejich chování (Polanczyk a Rohde, 2007). Na mechanismu této choroby se podílí porucha neurotransmitterové signalizace (Banaschewski a spol., 2010). V naší studii (Novakova a spol., 2011) jsme ve spolupráci s klinickým pracovištěm (Psychiatrická klinika, 1. LF UK Praha) zkoumali funkční stav cirkadiálního systému u dětí s kombinovanou formou ADHD s pomocí sledování denních profilů melatoninu jako ukazatele funkce centrálních hodin v SCN. Porovnávali jsme denní profily hladin melatoninu u 34 pacientů a 43 zdravých kontrol ve věku 6 - 12 let. Zjistili jsme, že již u dětí v tomto věku existuje značná inter-individuální variabilita v maximálních hladinách melatoninu, která byla dříve opakovaně popsána u dospělých jedinců. Dále jsme zjistili, že se denní profily hladin melatoninu významně nelišily mezi chlapci a dívkami, a proto jsme pro srovnání mezi pacienty a zdravými kontrolami použili data od obou pohlaví. Při srovnání mezi skupinou zdravých kontrol a pacientů jsme zjistili, že zatímco se denní profily nelišily pro věkovou skupinu 6 - 12 let, významné rozdíly byly přítomny při srovnání mezi pacienty a kontrolami v kategorii mladších dětí (6 - 7 let) a starších dětí (10 - 12 let). U starších dětí, na rozdíl od mladších, byl melatoninový signál u pacientů signifikantně kratší než u kontrol. Tento efekt byl způsoben tím, že zatímco u zdravých dětí ve věku mezi 6. a 12. rokem se doba večerního nárůstu i ranního poklesu melatoninu postupně zpožďovala a děti se tak stávají pozdějšími chronotypy, u ADHD pacientů se s věkem opožďovala pouze doba večerního nárůstu, avšak doba ranního poklesu zůstala stejná (Obr. 13).



Obr. 13: (Novakova a spol., 2011) Denní profily hladin melatoninu ve slinách u zdravých kontrolních dětí (A) a dětí s ADHD (B). Výsledky ukázaly, že u kontrol je doba večerního nárůstu i ranního poklesu hladin melatoninu u 10-12 letých dětí (čerchovaná čára) fázově opožděna oproti 6-7 letým dětem (plná čára). U 10-12 letých dětí s ADHD je však opožděn pouze večerní nárůst a nikoliv ranní pokles. Následkem toho je u dětí s ADHD subjektivní noc s větším postupně zkracována. Červené šipky ukazují směr posunu nárůstu a poklesu hladin melatoninu.

Výsledky ukázaly na rozdílný vývoj regulace denních profilů hladin melatoninu v období před nástupem puberty u pacientů s ADHD a naznačily, že zkrácená délka melatoninového signálu může odrážet zkrácení subjektivní noci u těchto pacientů, což může vést ke zhoršení kvality spánku a v důsledku může přispívat k některým symptomům této nemoci, jako je zhoršení pozornosti a hyperaktivita.

V další studii jsme se dále zabývali otázkou stavu cirkadiálního systému u velmi vzácného genetického onemocnění zvaného **Smith-Magenis syndrom (SMS)** (Novakova a spol., 2012). Onemocnění je způsobeno delecí na chromozomu 17p11.2 (Greenberg a spol., 1991) a pacienti trpí závažnými poruchami, včetně poruchy v režimu střídání spánku a bdění. Ve spolupráci s klinickým pracovištěm (Neurologická klinika, 1. LF UK) jsme zkoumali denní profily hladin melatoninu ve slinách a exprese hodinových genů v buňkách ústní sliznice celkem u 5 pacientů (věk 3 - 17 let), tj. u všech, kteří byli v té době v České Republice diagnostikováni na SMS, a u 5 věkově odpovídajících kontrol. Již dříve bylo prokázáno, že pacienti s SMS mají významně narušenu regulaci rytmické produkce melatoninu a tyto práce popisovaly, že denní profil je u SMS pacientů převrácený, tj., s vysokými hladinami melatoninu během dne a nízkými hladinami v noci (Potocki a spol., 2000, De Leersnyder a spol., 2001). Naše výsledky ukázaly, že inverze rytmu v hladinách melatoninu není specifickým znakem této choroby, jelikož u našich pacientů jsme pozorovali různý stupeň poruchy regulace rytmů a pouze u 1 z 5 pacientů byl rytmus skutečně invertován (Obr. 14). Sledování rytmů v expresi hodinových genů (*Per1*, *Per2* a *Rev-erba*) v buňkách ústní sliznice u těchto pacientů přispělo k objasnění otázky, jakým mechanismem k narušení rytmické produkce melatoninu dochází. Dříve byly zvažovány jak mechanismy související s poruchou časového mechanismu řídícího tento rytmus, tak poruchy produkce na úrovni epifyzy. Zjistili jsme, že na rozdíl od zdravých kontrol, je u pacientů s SMS exprese hodinových genů významně desynchronizována (Obr. 14).

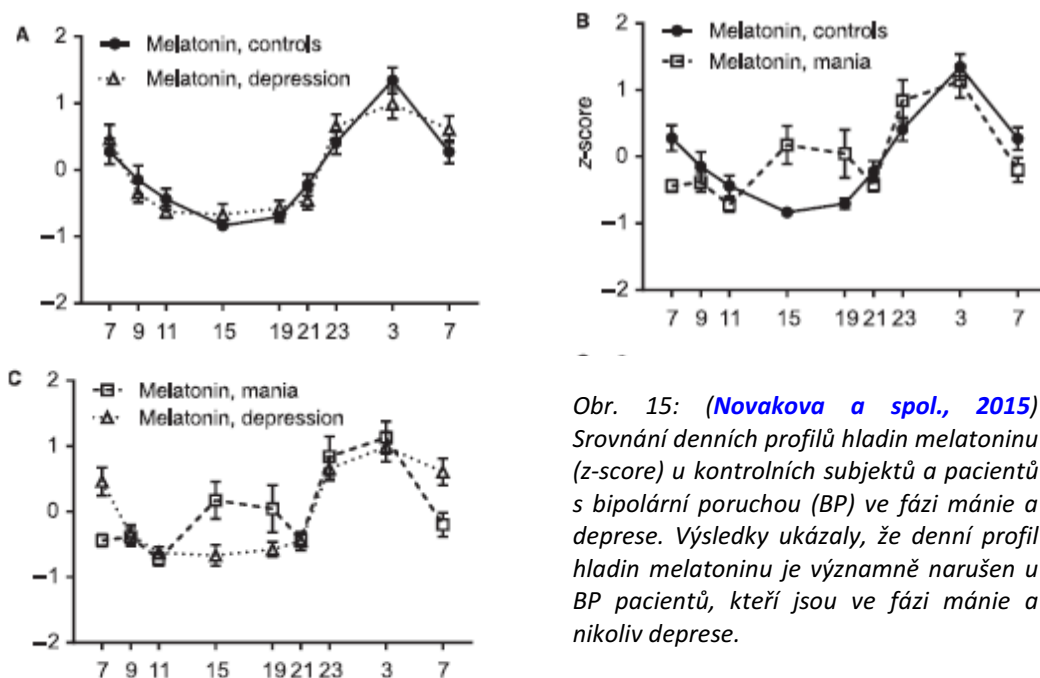


Obr. 14: (Novakova a spol., 2012) Denní profily hladin melatoninu ve slinách A) kontrolních subjektů a B) pacientů se Smith-Magenis syndromem (SMS). Profily u kontrol a pacientů odpovídajícího věku a pohlaví jsou v A a B znázorněny stejnou barvou. Zatímco u kontrolních subjektů jsou hladiny melatoninu vysoké v noci a nízké ve dne, u SMS pacientů jsou tyto denní rytmy výrazně narušené. C) Denní profily exprese hodinových genů *Per1* (plná čára) a *Per2* (čerchovaná čára) v buukálních stěrech u kontrol (C1, C3, C4, C5) a SMS pacientů (SMS1, SMS2, SMS3, SMS4). Zatímco u kontrolních subjektů jsou rytmy v expresi obou hodinových genů ve stejné fázi, u pacientů jsou tyto rytmy vzájemně desynchronizované.

Výsledky naznačily, že chod cirkadiálních hodin v periferních buňkách SMS pacientů je narušen, což může souviset se zhoršenou signalizací centrálních hodin v SCN k periferním hodinám. Porucha signalizace z centrálních hodin by tak velmi pravděpodobně mohla být příčinou narušené cirkadiální regulace uvolňování melatoninu z epifyzy. Naše výsledky jako první přispěly k objasnění mechanismu poruchy cirkadiálního systému u pacientů s SMS.

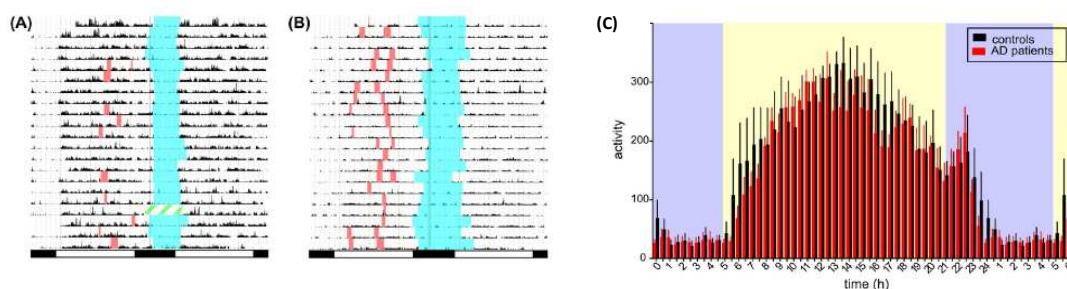
Bipolární porucha (BP) je poměrně časté psychiatrické onemocnění projevující se změnami nálad se střídajícími se epizodami, kdy je pacient v depresi a v mánii (Boland a Alloy, 2013). BP pacienti mají narušený spánek, během epizody mánie mají potřebu spánku sníženou a během deprese trpí buď insomnií nebo hypersomnií (Kripke a spol., 1978). V naší práci (Novakova a spol., 2015) jsme ve spolupráci s klinickým pracovištěm (Psychiatrická klinika, FN Olomouc) sledovali stav cirkadiálního systému u BP pacientů s cílem porovnat jej během epizody mánie (16 pacientů) a deprese (22 pacientů) mezi sebou navzájem a se zdravými kontrolními subjekty (19 kontrol). V dřívějších studiích nebyl dosud cirkadiální systém selektivně v jednotlivých epizodách u BP pacientů zkoumán. Zjistili jsme, že během epizody mánie jsou denní profily v hladinách melatoninu u BP pacientů významně odlišné od profilů u zdravých kontrol, a to především díky zvýšeným hladinám melatoninu během dne. Na rozdíl od toho u pacientů, kteří prožívali epizodu deprese, se denní profily od kontrol nelišily (Obr. 15). Podobně jako melatonin, také denní profily exprese hodinových genů (*Per1* a *Nr1d1* = synonymum *Rev-erba*) v buňkách ústní sliznice byly u pacientů signifikantně odlišné v epizodě mánie (fázově předběhnuté a s vyšší amplitudou), avšak během deprese se od kontrol nelišily.

Naše výsledky poprvé odhalily rozdíly ve funkčním stavu cirkadiálního systému u pacientů s BD v závislosti na tom, zda se nacházejí v epizodě mánie či deprese.



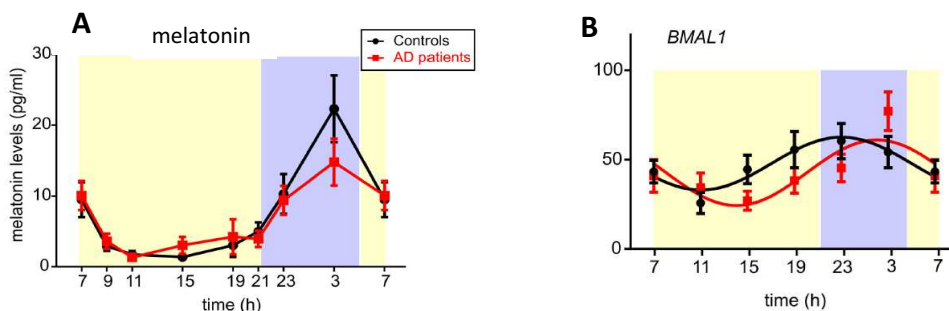
Obr. 15: (Novakova a spol., 2015) Srovnání denních profilů hladin melatoninu (z-score) u kontrolních subjektů a pacientů s bipolární poruchou (BP) ve fázi mánie a deprese. Výsledky ukázaly, že denní profil hladin melatoninu je významně narušen u BP pacientů, kteří jsou ve fázi mánie a nikoliv deprese.

Neurodegenerativní onemocnění **Alzheimerova choroba (AD)**, z angl. Alzheimer's disease), která se projevuje především kognitivním deficitem, je v centru zájmu cirkadiálního výzkumu již delší dobu, jelikož různé studie již dříve naznačily možnou souvislost mezi poruchou cirkadiální regulace a rozvojem AD (shrnuto v práci Bedrosian a Nelson, 2012). Cílem naší studie (Weissova a spol., 2016) bylo zjistit, zda je cirkadiální systém ovlivněn již u pacientů s mírnou formou AD, tj. těch kteří nemusí být hospitalizováni. Studii jsme provedli ve spolupráci s klinickým pracovištěm (3. LF UK Praha a NÚDZ Klecany). Sledovali jsme pacienty v jejich domácím prostředí a jako kontroly jsme využili partnery těchto pacientů, kteří s nimi sdíleli domov a současně o ně pečovali (13 párů pacient/pečovatel, průměrný věk 78 - 80 let). Zjistili jsme, že ve srovnání s kontrolami vykazovali AD pacienti odlišný profil v aktivitě, především byli během 24 hod déle ve stavu klidu a měli signifikantně větší počet zdřímnutí (angl. naps) během dne (Obr. 16). Analýza spánkových parametrů neodhalila statisticky významné rozdíly, i když jsme zaznamenali náznak zhoršení kvality spánku u AD pacientů (častější probouzení trvající delší dobu, kratší skutečnou délku spánku, vyšší index fragmentace spánku apod.) ve srovnání se zdravými kontrolami.



Obr 16: (Weissova a spol., 2016) Pohybová aktivita měřená pomocí Aktiwatch u zdravých subjektů a pacientů s Alzheimerovou chorobou (AD). Ukázka aktogramů A) u kontroly a B) AD pacienta, kteří spolu sdíleli domácnost a byli tak vystaveni stejným vnějším světelným podmínkám. Modře je označena doba nočního spánku a oranžově doba denního zdřímnutí. C) Kumulovaný denní profil aktivity pro skupinu kontrol (černě) a AD pacientů (červeně). Žlutá oblast označuje den a modrá oblast noc. Z výsledků je patrné, že AD pacienti začínají být ráno aktivní později než kontroly.

Denní profily hladin melatoninu nebyly signifikantně odlišné mezi skupinami pacientů a kontrol, ale bylo naznačeno snížení amplitudy rytmu u AD pacientů (Obr. 17). Analýza individuálních profilů hladin melatoninu ukázala, že AD pacienti měli častěji než kontroly tyto rytmy narušené, buď s nízkou amplitudou, atypickým průběhem, nebo byly zcela arytmičné. AD pacienti měli též naznačený fázový posun denních profilů exprese hodinových genů ve smyslu zpoždění (Obr. 17), které odpovídalo pozdějšímu začátku jejich ranní aktivity.



Obr. 17: (Weissova a spol., 2016) Denní profily hladin melatoninu ve slinách (A) a exprese hodinového genu *Bmal1* v buňkách ústní sliznice (B) u kontrolních subjektů (černě) a AD pacientů (červeně). Žlutá oblast označuje den a modrá oblast noc. Výsledky naznačily nižší amplitudu rytmu v hladinách melatoninu a fázový posun exprese *Bmal1* u AD pacientů vzhledem ke zdravým kontrolním subjektům.

Naše výsledky prokázaly, že v podmínkách reálného života vykazuje cirkadiánní systém pacientů s mírnou formou AD pouze malé odlišnosti ve srovnání s kontrolami vystavenými shodným podmínkám vnějšího prostředí.

6. Shrnutí a závěr

6.1. Popsali jsme detailně cirkadiánní hodiny v GIT, se zaměřením na hodiny v epitelu kolonu. Prokázali jsme, že hodiny v různých částech střeva jsou přesně načasovány na určitou denní dobu a toto načasování odpovídá směru pohybu tráveniny trávicím traktem. Ukázali jsme, že tyto hodiny se účastní regulace fyziologických funkcí střeva, např. transportu molekul přes membránu epitelu nebo regulace buněčného cyklu kolonocyty. Přispěli jsme k poznání hormonálních a molekulárních mechanismů synchronizace hodin v GIT pomocí signálů vysílaných z centrálních hodin v SCN a signálů zprostředkovaných režimem v příjmu potravy. Výsledky naznačily, že na změny signalizace z SCN jsou významně citlivé především cirkadiánní hodiny v kolonu. Tento výsledek může souviset se skutečností, že u lidí s dlouhodobě narušenou cirkadiánní regulací (např. v důsledku práce na směny) je z GIT nejčastěji pozorována patologie právě v kolonu. Poznání zapojení poruchy časových regulačních mechanismů při vzniku těchto onemocnění může v budoucnu významně přispět k jejich cílené terapii. Stejně tak i naopak, náš poznatek o významném vlivu glukokortikoidů na hodiny v kolonu může vnést nový pohled na jejich terapeutické působení, jelikož glukokortikoidy jsou v současnosti používány při léčbě některých onemocnění GIT a přitom jejich možný vliv na cirkadiánní hodiny v kolonu nebyl dosud zvažován.

6.2. Jako první jsme komplexně popsali funkční stav cirkadiánního systému u SHR, tj., animálního modelu, u kterého se spontánně rozvíjí hypertenze a metabolické poruchy. Na rozdíl od široce používaných genetických animálních modelů s cílenou delecí jednoho nebo více známých genů se jedná o multi-genové ovlivnění vedoucí ke spontánnímu rozvoji choroby, tedy situaci více podobnou u člověka. Význam těchto studií má experimentální rozměr, jelikož zavádí nový model pro zkoumání cirkadiánního systému a jeho souvislostí s

patofyziologickými procesy. Poznatek, že SHR je kmen, který vykazuje zvýšenou citlivost k RF by mohl pomoci k odhalení mechanismů, jakými pracují domnělé oscilátory, které řídí FAA. Ještě větší význam má však výzkum tohoto animálního modelu pro zkoumání souvislostí mezi cirkadiánní poruchou, která má podklad ve vnitřní desynchronizaci mezi jednotlivými složkami cirkadiánního systému, a rozvojem civilizačních nemocí u člověka.

6.3. Zavedli jsme a ověřili v experimentech novou metodu pro posouzení funkčního stavu cirkadiánních hodin na molekulární úrovni u člověka. Naše studie ukázala, že zdraví jedinci s extrémním chronotypem mají odlišně nastavenou fázi nejen centrálních, ale i periferních hodin. V našich studiích jsme ve spolupráci s klinickými pracovišti přispěli k odhalení mechanismu poruchy funkčního stavu cirkadiánního systému u pacientů s různými neuropsychiatrickými chorobami, tj. ADHD, SMS, BD a AD. Zjistili jsme, že změna funkčního stavu je pro každé onemocnění specifická. Poznání těchto mechanismů může v budoucnu pomoci k cílené chronoterapii těchto chorob, nebo alespoň některých jejich závažných symptomů.

7. Literární odkazy

- Abrahamson EE, and Moore RY (2001) Suprachiasmatic nucleus in the mouse: Retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res* 916:172-191.
- Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, Smith AG, Gant TW, Hastings MH, and Kyriacou CP (2002) Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol* 12:540-550.
- Asher G, Gatfield D, Stratmann M, Reinke H, Dibner C, Kreppel F, Mostoslavsky R, Alt FW, and Schibler U (2008) Sirt1 regulates circadian clock gene expression through per2 deacetylation. *Cell* 134:317-328.
- Asher G, and Sassone-Corsi P (2015) Time for food: The intimate interplay between nutrition, metabolism, and the circadian clock. *Cell* 161:84-92.
- Asher G, and Schibler U (2011) Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles in mammals. *Cell Metab* 13:125-137.
- Balsalobre A (2002) Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res* 309:193-199.
- Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G, and Schibler U (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289:2344-2347.
- Banaschewski T, Becker K, Scherag S, Franke B, and Coghill D (2010) Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: An overview. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 19:237-257.
- Barnard AR, and Nolan PM (2008) When clocks go bad: Neurobehavioural consequences of disrupted circadian timing. *PLoS Genet* 4:e1000040.
- Bedrosian TA, Fonken LK, Walton JC, Haim A, and Nelson RJ (2011) Dim light at night provokes depression-like behaviors and reduces ca1 dendritic spine density in female hamsters. *Psychoneuroendocrinology* 36:1062-1069.
- Bedrosian TA, and Nelson RJ (2012) Pro: Alzheimer's disease and circadian dysfunction: Chicken or egg? *Alzheimers Res Ther* 4:25.
- Bedrosian TA, and Nelson RJ (2013) Influence of the modern light environment on mood. *Mol Psychiatry* 18:751-757.
- Bennie J, Davies TW, Duffy JP, Inger R, and Gaston KJ (2014) Contrasting trends in light pollution across Europe based on satellite observed night time lights. *Sci Rep* 4:3789.

- Boland EM, and Alloy LB (2013) Sleep disturbance and cognitive deficits in bipolar disorder: Toward an integrated examination of disorder maintenance and functional impairment. *Clin Psychol Rev* 33:33-44.
- Cui H, Kohsaka A, Waki H, Bhuiyan ME, Gouraud SS, and Maeda M (2011) Metabolic cycles are linked to the cardiovascular diurnal rhythm in rats with essential hypertension. *PLoS One* 6:e17339.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, and Schibler U (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14:2950-2961.
- De Leersnyder H, De Blois MC, Claustrat B, Romana S, Albrecht U, Von Kleist-Retzow JC, Delobel B, Viot G, Lyonnet S, Vekemans M, and Munnich A (2001) Inversion of the circadian rhythm of melatonin in the smith-magenis syndrome. *J Pediatr* 139:111-116.
- Dibner C, Schibler U, and Albrecht U (2010) The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol* 72:517-549.
- Duffy JF, Dijk DJ, Hall EF, and Czeisler CA (1999) Relationship of endogenous circadian melatonin and temperature rhythms to self-reported preference for morning or evening activity in young and older people. *J Investig Med* 47:141-150.
- Duffy JF, Rimmer DW, and Czeisler CA (2001) Association of intrinsic circadian period with morningness-eveningness, usual wake time, and circadian phase. *Behav Neurosci* 115:895-899.
- Eckel-Mahan K, and Sassone-Corsi P (2009) Metabolism control by the circadian clock and vice versa. *Nat Struct Mol Biol* 16:462-467.
- Falchi F, Cinzano P, Elvidge CD, Keith DM, and Haim A (2011) Limiting the impact of light pollution on human health, environment and stellar visibility. *J Environ Manage* 92:2714-2722.
- Filipski E, King VM, Li X, Granda TG, Mormont MC, Liu X, Claustrat B, Hastings MH, and Levi F (2002) Host circadian clock as a control point in tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 94:690-697.
- Froy O, and Chapnik N (2007) Circadian oscillation of innate immunity components in mouse small intestine. *Mol Immunol* 44:1954-1960.
- Gerber A, Esnault C, Aubert G, Treisman R, Pralong F, and Schibler U (2013) Blood-borne circadian signal stimulates daily oscillations in actin dynamics and srf activity. *Cell* 152:492-503.
- Golombek DA, and Rosenstein RE (2010) Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev* 90:1063-1102.
- Greenberg F, Guzzetta V, Montes de Oca-Luna R, Magenis RE, Smith AC, Richter SF, Kondo I, Dobyns WB, Patel PI, and Lupski JR (1991) Molecular analysis of the smith-magenis syndrome: A possible contiguous-gene syndrome associated with del(17)(p11.2). *Am J Hum Genet* 49:1207-1218.
- Hoogerwerf WA, Hellmich HL, Cornelissen G, Halberg F, Shahinian VB, Bostwick J, Savidge TC, and Cassone VM (2007) Clock gene expression in the murine gastrointestinal tract: Endogenous rhythmicity and effects of a feeding regimen. *Gastroenterology* 133:1250-1260.
- Hoogerwerf WA, Sinha M, Conesa A, Luxon BA, Shahinian VB, Cornelissen G, Halberg F, Bostwick J, Timm J, and Cassone VM (2008) Transcriptional profiling of mrna expression in the mouse distal colon. *Gastroenterology* 135:2019-2029.
- Houdek P, Novakova M, Polidarova L, Sladek M, and Sumova A (2016) Melatonin is a redundant entraining signal in the rat circadian system. *Horm Behav* 83:1-5.
- Houdek P, and Sumova A (2014) In vivo initiation of clock gene expression rhythmicity in fetal rat suprachiasmatic nuclei. *PLoS One* 9:e107360.

- Hughes ME, Hong HK, Chong JL, Indacochea AA, Lee SS, Han M, Takahashi JS, and Hogenesch JB (2012) Brain-specific rescue of clock reveals system-driven transcriptional rhythms in peripheral tissue. *PLoS Genet* 8:e1002835.
- Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM, and Zhou QY (2002) Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417:405-410.
- Cho K (2001) Chronic 'jet lag' produces temporal lobe atrophy and spatial cognitive deficits. *Nat Neurosci* 4:567-568.
- Illnerova H (1999) The suprachiasmatic nucleus and the rhythmic pineal melatonin production. In *Book*, DC Klein, Moore, R.J., Reppert, S.M.s, eds, pp 197-216, Oxford University Press, New York.
- Illnerova H, Travnickova Z, and Sumova A (1998) Entrainment of intrinsic rhythmicity of the rat suprachiasmatic nucleus and of an overt rhythm controlled by the nucleus. In *Book*, K Honma and S Honmas, eds, pp 71-88, Hokkaido Univ. Press, Sapporo.
- Karatsoreos IN (2014) Links between circadian rhythms and psychiatric disease. *Front Behav Neurosci* 8:162.
- Kitamura S, Hida A, Watanabe M, Enomoto M, Aritake-Okada S, Moriguchi Y, Kamei Y, and Mishima K (2010) Evening preference is related to the incidence of depressive states independent of sleep-wake conditions. *Chronobiol Int* 27:1797-1812.
- Kornmann B, Schaad O, Bujard H, Takahashi JS, and Schibler U (2007) System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol* 5:e34.
- Kramer A, Yang FC, Snodgrass P, Li X, Scammell TE, Davis FC, and Weitz CJ (2001) Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic egf receptor signaling. *Science* 294:2511-2515.
- Kraves S, and Weitz CJ (2006) A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity. *Nat Neurosci* 9:212-219.
- Kripke DF, Mullaney DJ, Atkinson M, and Wolf S (1978) Circadian rhythm disorders in manic-depressives. *Biol Psychiatry* 13:335-351.
- Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DF, Vasquez DS, Juguilon H, Panda S, Shaw RJ, Thompson CB, and Evans RM (2009) Ampk regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science* 326:437-440.
- Looby P, and Loudon AS (2005) Gene duplication and complex circadian clocks in mammals. *Trends Genet* 21:46-53.
- Lowrey PL, and Takahashi JS (2011) Genetics of circadian rhythms in mammalian model organisms. *Adv Genet* 74:175-230.
- Malloy JN, Paulose JK, Li Y, and Cassone VM (2012) Circadian rhythms of gastrointestinal function are regulated by both central and peripheral oscillators. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303:G461-473.
- Mazzoccoli G, Panza A, Valvano MR, Palumbo O, Carella M, Paziienza V, Biscaglia G, Tavano F, Di Sebastiano P, Andriulli A, and Piepoli A (2011) Clock gene expression levels and relationship with clinical and pathological features in colorectal cancer patients. *Chronobiol Int* 28:841-851.
- Meijer JH, and Schwartz WJ (2003) In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 18:235-249.
- Miyazaki M, Schroder E, Edelmann SE, Hughes ME, Kornacker K, Balke CW, and Esser KA (2011) Age-associated disruption of molecular clock expression in skeletal muscle of the spontaneously hypertensive rat. *PLoS One* 6:e27168.
- Moghekar A, and O'Brien RJ (2012) Con: Alzheimer's disease and circadian dysfunction: Chicken or egg? *Alzheimers Res Ther* 4:26.

- Moore RY (2013) The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. *Prog Mol Biol Transl Sci* 119:1-28.
- Moore RY, and Eichler VB (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42:201-206.
- Moore RY, Speh JC, and Leak RK (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res* 309:89-98.
- Morf J, and Schibler U (2013) Body temperature cycles: Gatekeepers of circadian clocks. *Cell Cycle* 12:539-540.
- Naito Y, Tsujino T, Kawasaki D, Okumura T, Morimoto S, Masai M, Sakoda T, Fujioka Y, Ohyanagi M, and Iwasaki T (2003) Circadian gene expression of clock genes and plasminogen activator inhibitor-1 in heart and aorta of spontaneously hypertensive and wistar-kyoto rats. *J Hypertens* 21:1107-1115.
- Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, Sahar S, Hirayama J, Chen D, Guarente LP, and Sassone-Corsi P (2008) The nad⁺-dependent deacetylase sirt1 modulates clock-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* 134:329-340.
- Novakova M, Nevsimalova S, Prihodova I, Sladek M, and Sumova A (2012) Alteration of the circadian clock in children with smith-magenis syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E312-318.
- Novakova M, Paclt I, Ptacek R, Kuzelova H, Hajek I, and Sumova A (2011) Salivary melatonin rhythm as a marker of the circadian system in healthy children and those with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Chronobiol Int* 28:630-637.
- Novakova M, Prasko J, Latalova K, Sladek M, and Sumova A (2015) The circadian system of patients with bipolar disorder differs in episodes of mania and depression. *Bipolar Disord*
- Novakova M, Sladek M, and Sumova A (2013) Human chronotype is determined in bodily cells under real-life conditions. *Chronobiol Int* 30:607-617.
- Novakova M, and Sumova A (2014) New methods to assess circadian clocks in humans. *Indian J Exp Biol* 52:404-412.
- Obayashi K, Saeki K, Iwamoto J, Ikada Y, and Kurumatani N (2014a) Association between light exposure at night and nighttime blood pressure in the elderly independent of nocturnal urinary melatonin excretion. *Chronobiol Int* 31:779-786.
- Obayashi K, Saeki K, and Kurumatani N (2014b) Association between light exposure at night and insomnia in the general elderly population: The heijo-kyo cohort. *Chronobiol Int* 31:976-982.
- Ohta H, Yamazaki S, and McMahan DG (2005) Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat Neurosci* 8:267-269.
- Okamoto K, and Aoki K (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27:282-293.
- Pacha J, and Sumova A (2013) Circadian regulation of epithelial functions in the intestine. *Acta Physiol (Oxf)* 208:11-24.
- Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, and Hogenesch JB (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 109:307-320.
- Parkanova D, Novakova M, Sosniyenko S, and Sumova A (2012) Photoperiodic modulation of the hepatic clock by the suprachiasmatic nucleus and feeding regime in mice. *Eur J Neurosci* 35:1446-1457.
- Pevet P (2014) The internal time-giver role of melatonin. A key for our health. *Rev Neurol (Paris)* 170:646-652.
- Pietrojusti A, Neri A, Somma G, Coppeta L, Iavicoli I, Bergamaschi A, and Magrini A (2010) Incidence of metabolic syndrome among night-shift healthcare workers. *Occup Environ Med* 67:54-57.

- Pittendrigh CL (1981) Circadian systems: Entrainment. In *Book*, J Aschoffs, eds, pp 95-124, Plenum, New York.
- Polanczyk G, and Rohde LA (2007) Epidemiology of attention-deficit/hyperactivity disorder across the lifespan. *Curr Opin Psychiatry* 20:386-392.
- Polidarova L, Sladek M, Novakova M, Parkanova D, and Sumova A (2013) Increased sensitivity of the circadian system to temporal changes in the feeding regime of spontaneously hypertensive rats - a potential role for *bmal2* in the liver. *PLoS One* 8:e75690.
- Polidarova L, Sladek M, Sotak M, Pacha J, and Sumova A (2011) Hepatic, duodenal, and colonic circadian clocks differ in their persistence under conditions of constant light and in their entrainment by restricted feeding. *Chronobiol Int* 28:204-215.
- Polidarova L, Sotak M, Sladek M, Pacha J, and Sumova A (2009) Temporal gradient in the clock gene and cell-cycle checkpoint kinase *wee1* expression along the gut. *Chronobiol Int* 26:607-620.
- Polidarova L., Houdek P., Sladek M., Novosadova Z., Pacha J., Sumova A.: Mechanisms of hormonal regulation of the peripheral circadian clock in the colon. *Chronobiol. Int.* in press
- Potocki L, Glaze D, Tan DX, Park SS, Kashork CD, Shaffer LG, Reiter RJ, and Lupski JR (2000) Circadian rhythm abnormalities of melatonin in smith-magenis syndrome. *J Med Genet* 37:428-433.
- Pravenec M, Zidek V, Landa V, Simakova M, Mlejnek P, Kazdova L, Bila V, Krenova D, and Kren V (2004) Genetic analysis of "metabolic syndrome" in the spontaneously hypertensive rat. *Physiol Res* 53 Suppl 1:S15-22.
- Ralph MR, Foster RG, Davis FC, and Menaker M (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247:975-978.
- Reddy AB, Karp NA, Maywood ES, Sage EA, Deery M, O'Neill JS, Wong GK, Chesham J, Odell M, Lilley KS, Kyriacou CP, and Hastings MH (2006) Circadian orchestration of the hepatic proteome. *Curr Biol* 16:1107-1115.
- Reinke H, Saini C, Fleury-Olela F, Dibner C, Benjamin IJ, and Schibler U (2008) Differential display of DNA-binding proteins reveals heat-shock factor 1 as a circadian transcription factor. *Genes Dev* 22:331-345.
- Reppert SM (2000) Cellular and molecular basis of circadian timing in mammals. *Semin Perinatol* 24:243-246.
- Roenneberg T, Kuehnele T, Juda M, Kantermann T, Allebrandt K, Gordijn M, and Mrosovsky M (2007) Epidemiology of the human circadian clock. *Sleep Med Rev* 11:429-438.
- Roenneberg T, Wirz-Justice A, and Mrosovsky M (2003) Life between clocks: Daily temporal patterns of human chronotypes. *J Biol Rhythms* 18:80-90.
- Rosenfeld P, Van Eekelen JA, Levine S, and De Kloet ER (1988) Ontogeny of the type 2 glucocorticoid receptor in discrete rat brain regions: An immunocytochemical study. *Brain Res* 470:119-127.
- Sahar S, and Sassone-Corsi P (2009) Metabolism and cancer: The circadian clock connection. *Nat Rev Cancer* 9:886-896.
- Schibler U, Gotic I, Saini C, Gos P, Curie T, Emmenegger Y, Sirtorel F, Gosselin P, Gerber A, Fleury-Olela F, Rando G, Demarque M, and Franken P (2015) Clock-talk: Interactions between central and peripheral circadian oscillators in mammals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 80:223-232.
- Sladek M, Polidarova L, Novakova M, Parkanova D, and Sumova A (2012) Early chronotype and tissue-specific alterations of circadian clock function in spontaneously hypertensive rats. *PLoS One* 7:e46951.
- Sladek M, Rybova M, Jindrakova Z, Zemanova Z, Polidarova L, Mrnka L, O'Neill J, Pacha J, and Sumova A (2007) Insight into the circadian clock within rat colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 133:1240-1249.

- Sladek M, and Sumova A (2013) Entrainment of spontaneously hypertensive rat fibroblasts by temperature cycles. *PLoS One* 8:e77010.
- So AY, Bernal TU, Pillsbury ML, Yamamoto KR, and Feldman BJ (2009) Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:17582-17587.
- Sosniyenko S, Parkanova D, Illnerova H, Sladek M, and Sumova A (2010) Different mechanisms of adjustment to a change of the photoperiod in the suprachiasmatic and liver circadian clocks. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298:R959-971.
- Sotak M, Bryndova J, Ergang P, Vagnerova K, Kvapilova P, Vodicka M, Pacha J, and Sumova A (2016) Peripheral circadian clocks are diversely affected by adrenalectomy. *Chronobiol Int* 33:520-529.
- Sotak M, Polidarova L, Ergang P, Sumova A, and Pacha J (2013) An association between clock genes and clock-controlled cell cycle genes in murine colorectal tumors. *Int J Cancer* 132:1032-1041.
- Sotak M, Polidarova L, Musilkova J, Hock M, Sumova A, and Pacha J (2011) Circadian regulation of electrolyte absorption in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301:G1066-1074.
- Sotak M, Sumova A, and Pacha J (2014) Cross-talk between the circadian clock and the cell cycle in cancer. *Ann Med* 46:221-232.
- Stephan FK, and Zucker I (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:1583-1586.
- Stevens RG, Brainard GC, Blask DE, Lockley SW, and Motta ME (2014) Breast cancer and circadian disruption from electric lighting in the modern world. *CA Cancer J Clin* 64:207-218.
- Storch KF, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC, Wong WH, and Weitz CJ (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 417:78-83.
- Sumova A, and Illnerova H (1998) Photic resetting of intrinsic rhythmicity of the rat suprachiasmatic nucleus under various photoperiods. *Am J Physiol* 274:R857-863.
- Sumova A, Jac M, Sladek M, Sauman I, and Illnerova H (2003) Clock gene daily profiles and their phase relationship in the rat suprachiasmatic nucleus are affected by photoperiod. *J Biol Rhythms* 18:134-144.
- Sumova A, Sladek M, Jac M, and Illnerova H (2002) The circadian rhythm of *per1* gene product in the rat suprachiasmatic nucleus and its modulation by seasonal changes in daylength. *Brain Res* 947:260-270.
- Sumova A, Travnickova Z, Peters R, Schwartz WJ, and Illnerova H (1995) The rat suprachiasmatic nucleus is a clock for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7754-7758.
- Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, and McDearmon EL (2008) The genetics of mammalian circadian order and disorder: Implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet* 9:764-775.
- Tamaru T, Hattori M, Honda K, Benjamin I, Ozawa T, and Takamatsu K (2011) Synchronization of circadian *per2* rhythms and *hsf1-bmal1*: Clock interaction in mouse fibroblasts after short-term heat shock pulse. *PLoS One* 6:e24521.
- Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, and Mori H (2003) A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci* 94:965-973.
- Um JH, Yang S, Yamazaki S, Kang H, Viollet B, Foretz M, and Chung JH (2007) Activation of 5'-amp-activated kinase with diabetes drug metformin induces casein kinase Iepsilon (ckIepsilon)-dependent degradation of clock protein *mper2*. *J Biol Chem* 282:20794-20798.

- Weissova K, Bartos A, Sladek M, Novakova M, and Sumova A (2016) Moderate changes in the circadian system of alzheimer's disease patients detected in their home environment. *PLoS One* 11:e0146200.
- Welsh DK, Takahashi JS, and Kay SA (2010) Suprachiasmatic nucleus: Cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol* 72:551-577.
- Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Siepkka SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, and Takahashi JS (2004) *Period2:Luciferase* real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5339-5346.

Seznam zkratk

ACTH	-adrenokotrikotropní hormon
AOM	-azoxymetan
B2M	- β -2-mikroglobulin
<i>Bmal</i>	-hodinový gen <i>Bmal</i>
ccg	-z angl. clock controlled gene, hodinami kontrolovaný gen
CLC	-z angl. cardiotrophin-like cytokine
<i>Clock</i>	-hodinový gen <i>Clock</i>
<i>Cry</i>	-hodinový gen <i>Cryptochrome</i>
CT	-cirkadiánní čas (z angl. circadian time).
DBP	-albumin D-element vázající protein (z angl. albumin D-element binding protein)
DD	-světelný režim stálá tma (z angl. dark-dark)
DEX	-dexametazon
DMH	-dorsomediální jádro hypothalamu (z angl. dorsomedial hypothalamic nucleus)
<i>E4bp4</i>	-transkripční faktor, hodinami kontrolovaný gen <i>E4bp4</i>
FAA	-z angl. food anticipatory activity
FEO	- oscilátor synchronizovatelný příjmem potravy (z angl. food-entrainable oscillator)
<i>Gapdh</i>	-z angl., glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GIT	-gastrointestinální trakt
GR	-glukokortikoidní receptor
IČ	- infračervený
GRE	-z angl. glucocorticoid responsive element
IETFs	- z angl. immediate early transcription factors
LD	-světelný režim světlo-tma (z angl. light-dark)
LL	-světelný režim stálé světlo (z angl. light-light)
NAD(P) ⁺	-oxidované formy nikotinamid adenin dinukleotidů
NAD(P)H	-reduované formy nikotinamid adenin dinukleotidů
<i>Nhe3</i>	-gen který kóduje elektroneutrální přenašeč Na ⁺ a H ⁺ iontů
<i>Nr1d1</i>	- označení hodinového genu, ekvivalent <i>Rev-erba</i>
PCR	-z angl. polymerase chain reaction
<i>Per</i>	- hodinový gen <i>Period</i>
PVN	-paraventrikulární jádro hypothalamu (z angl. paraventricular nucleus of the hypothalamus)
<i>Rev-erba</i>	- hodinový gen, ekvivalent <i>Nr1d1</i>
RF	-z angl. restricted feeding
RORE, RRE	-z angl. Rev/ROR response element
RT	-reverzní transkriptáza
SCN	-suprachiasmatická jádra (z angl. suprachiasmatic nucleus)
SHR	-z angl. spontaneously hypertensive rat
SRF	-z angl. serum response factor
<i>Tbp</i>	-transkripční faktor, z angl. TATA-binding protein
TGF	-z angl. transforming growth factor
<i>Wee1</i>	- gen kódující jadernou kinázu účastnící se inhibice vstupu do mitózy

8. Seznam vybraných publikací autorky s IF

*(pozn. práce tvořících součást habilitační práce jsou vyznačeny *)*

- 1/ Sumová A., Ebling F.J.P., Maywood E.S., Herbert J., Hastings M.H. : Non-photocircadian entrainment in the Syrian hamster is not associated with phosphorylation of the transcriptional regulator CREB within the suprachiasmatic nucleus, but is associated with adrenocortical activation. *Neuroendocrinology*, 59: 579-589, 1994
- 2/ Sumová A., Ebling F.J.P., Herbert J., Maywood E.S., Moore E.M., Hastings M.H.: Non-photocircadian entrainment of circadian rhythms. In: *Adv. Pineal Res.* 8, Chapter 14, Moller M and Pevet P (eds.), John Libbey & Comp. Ltd., London, Paris, Rome, pp. 117-131, 1994
- 3/ Hastings M.H., Ebling F.J.P., Grosse J., Herbert J., Maywood E.S., Mikkelsen J.D., Sumová A.: Immediate-early genes and the neural bases of photic and non-photocircadian entrainment. In: *Circadian clocks and their adjustment*, Chadwick DJ and Ackill K (eds.), Wiley, Chichester, London, Ciba Foundation Symposium 183, pp. 175-197, discussion 190-7, 1995.
- 4/ Sumová A., Trávníčková Z., Peters R., Schwartz W.J., Illnerová H.: The rat suprachiasmatic nucleus is a clock for all seasons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7754-7758, 1995
- 5/ Sumová A., Trávníčková Z., Illnerová H.: Memory on long but not short days is stored in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Lett.*, 200(3): 191-194, 1995
- 6/ Sumová A., Maywood E.S., Selva D., Ebling F.J.P., Hastings M.H.: Serotonergic antagonists impair arousal-induced phase shifts of the circadian system of the Syrian hamster. *Brain Research*, 709: 88-96, 1996
- 7/ Trávníčková Z., Sumová A., Peters R., Schwartz W.J., Illnerová H.: Photoperiod-dependent correlation between light-induced SCN of c-fos expression and resetting of circadian phase. *Am. J. Physiol.*, 271 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 40): R825-R831, 1996
- 8/ Sumová A., Illnerová H.: Endogenous melatonin signal does not mediate the effect of photoperiod on the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, 725: 281-283, 1996
- 9/ Sumová A., Illnerová H.: Melatonin instantaneously resets intrinsic circadian rhythmicity in the rat suprachiasmatic nucleus, *Neuroscience Lett.*, 218(3): 181-184, 1996
- 10/ Sumová A., Vaněček J.: Melatonin inhibits GnRH-induced increase of cFos immunoreactivity in neonatal rat pituitary, *J. Neuroendocrinol.*, 9: 135-139, 1997
- 11/ Illnerová H., Sumová A.: Photic entrainment of the mammalian rhythm in melatonin production. *J. Biol. Rhythms*, 12(6): 547-555, 1997
- 12/ Sumová A., Illnerová H.: Photic resetting of intrinsic rhythmicity of the rat suprachiasmatic nucleus under various photoperiods. *Am. J. Physiol.*, 274 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 43): R857-R863, 1998
- 13/ Sumová A., Trávníčková Z., Mikkelsen J.D., Illnerová H.: Spontaneous rhythm in cFos immunoreactivity in the dorsomedial part of the rat suprachiasmatic nucleus, *Brain Research*, 801: 254-258, 1998
- 14/ Illnerová H., Trávníčková Z., Sumová A.: Entrainment of intrinsic rhythmicity of the rat suprachiasmatic nucleus and of an overt rhythm controlled by the nucleus. In: *Circadian System and Entrainment*, Honma K. and Honma S. (eds.), Hokkaido University Press, Sapporo 1998, pp. 71-88.
- 15/ Illnerová H., Trávníčková Z., Jáč M., Sumová A.: Comparison of the pineal and SCN rhythmicity: effect of photic and non-photocircadian stimuli, photoperiod and age. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 460: 247-260, 1999

- 16/ Jelínková D., Illnerová H., Sumová A.: Gate for photic resetting of intrinsic rhythmicity of the rat suprachiasmatic nucleus under a long photoperiod. *Neurosci. Lett.*, 280 (2): 143-146, 2000
- 17/ Illnerová H., Sumová A., Trávníčková Z., Jáč M., Jelínková D.: Hormones, Subjective Night and Season of the Year. Review. *Physiol. Research*, 49:Suppl. 1: S1- S10, 2000
- 18/ Sumová A., Trávníčková Z., Illnerová H.: Spontaneous cFos rhythm in the rat suprachiasmatic nucleus: location and effect of photoperiod. *Am. J. Physiol. (Regul Integr Comp Physiol)*, 279 (6): R2262-R2269, 2000
- 19/ Jáč M., Sumová A., Illnerová H.: cFos rhythm in subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus under arteficial and natural photoperiods. *Am. J. Physiol. . (Regul Integr Comp Physiol)*, 279 (6): R2270-R2276, 2000
- 20/ Jáč M., Kiss A., Sumová A., Illnerová H., Ježová D.: Daily profiles of arginine vasopressin mRNA in the suprachiasmatic, supraoptic and paraventricular nuclei of the rat hypothalamus under various photoperiods. *Brain Research*, 887 (2): 472-476, 2000
- 21/ Sumová A., Sládek M., Jáč M., Illnerová H.: The circadian rhythm of Per1 gene product in the rat suprachiasmatic nucleus and its modulation by seasonal changes in daylength. *Brain Research*, 947 (2): 260-270, 2002
- 22/ Sumová A., Jáč M., Sládek M., Šauman I., Illnerová H.: Clock gene daily profile and their phase-relationship in the rat suprachiasmatic nucleus are affected by photoperiod. *J. Biol. Rhythms*, 18 (2): 134-144, 2003
- 23/ Bendová Z., Sumová A., Illnerová H.: Development of circadian rhythmicity and photoperiodic response in subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus. *Dev Brain Res.* 148(1):105-112, 2004
- 24/ Sumová A., Bendová Z., Sládek M., Kováčiková Z., Illnerová H.: Seasonal molecular timekeeping within the rat circadian clock. *Physiol. Res. (Suppl. 1)*: S167-S176, 2004
- 25/ Sládek M., Sumová A., Kováčiková Z., Bendová Z., Laurinová K., Illnerová H.: Insight into core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 6231-6236, 2004
- 26/ Sumová A. and Illnerová H.: Effect of photic stimuli disturbing overt circadian rhythms on the dorsomedial and ventrolateral SCN rhythmicity. *Brain Res.*, 1048: 161-169, 2005
- 27/ Kováčiková Z., Sládek M., Laurinová K., Bendová Z., Illnerová H., Sumová A.: Ontogenesis of photoperiodic entrainment of the molecular core clockwork in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.*, 1064: 83-89, 2005
- 28/ Bendová Z., Sumová A.: Photoperiodic regulation of PER1 and PER2 protein expression in the rat peripheral tissues. *Physiol. Res.* 55: 623-632, 2006
- 29/ Sumová A., Bendová Z., Sládek M., Kováčiková Z., El-Hennamy R., Laurinová K., Illnerová H. The rat circadian clockwork and its photoperiodic entrainment during development. *Chronobiol. Int.* 23: 237-243, 2006
- 30/ Sumová A., Bendová Z., Sládek M., El-Hennamy R., Laurinová K., Jindráková Z., Illnerová H.: The setting the biological time in central and peripheral clocks during ontogenesis. Minireview. *FEBS Letters* 580: 2836-2842, 2006
- 31/ Kováčiková Z., Sládek M., Bendová Z., Illnerová H., Sumová A.: Expression of clock and clock-driven genes in the rat suprachiasmatic nucleus during late fetal and early postnatal development *J. Biol. Rhythms* 21: 140-148, 2006

32/ Sládek M., Jindráková Z., Bendová Z., Sumová A.: Postnatal ontogenesis of the circadian clock within the rat liver. *Am. J. Physiol. (Regul Integr Comp Physiol)* 292: R1224-R1229, 2007

33/ Sumová A., Kováčiková Z., Illnerová H.: Dynamics of the adjustment of clock gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus to an asymmetrical change from a long to a short photoperiod, *J. Biol. Rhythms* 22: 259-267, 2007

***34/ Sládek M., Rybová M., Jindráková Z., Zemanová Z., Polidarová L., Mrnka L., O'Neil J., Pácha J., Sumová A.: Insight into circadian clock within the rat colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 133: 1240-1249, 2007**

35/ El-Hennamy R., Matějů K., Bendová Z., Sosniyenko S., Sumová A.: Maternal control of the fetal and neonatal rat suprachiasmatic nucleus. *J. Biol. Rhythms*, 23: 435-444, 2008

36/ Sumová A., Bendová Z., Sládek M., El-Hennamy R., Matějů K., Polidarová L., Sosniyenko S., Illnerová H.: Circadian molecular clocks ticking along ontogenesis. *Physiol. Research*, 57 (Suppl. 3): S139-S148, 2008

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

38/ Bendová Z., Sumová A., Mikkelsen JD: Circadian and developmental regulation of N-methyl-D-aspartate-receptor 1 mRNA splice variants and N-methyl-D-aspartate-receptor 3 subunit expression within the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 159: 599-609, 2009

***39/ Polidarová L., Soták M., Sládek M., Pácha J. and Sumová A.: Temporal gradient in the clock gene expression and cell cycle checkpoint kinase *Wee1* expression along the gut. *Chronobiol. Int.*, 26: 607-620, 2009**

40/ Sosniyenko S., Hut R., Daan S., Sumová A.: Influence of photoperiod duration and light-dark transitions on entrainment of *Per1* and *Per2* gene and protein expression in subdivisions of the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 30: 1802-1814, 2009

***41/ Sosniyenko S., Parkanová D., Illnerová H., Sládek M., Sumová A.: Different mechanisms of adjustment to a change of the photoperiod in the suprachiasmatic and liver circadian clocks. *Am. J. Physiol. (Regul Integr Comp Physiol)*, 298: R959-R971, 2010**

42/ Matějů K., Sumová A., Bendová Z.: Expression and light sensitivity of clock genes *Per1* and *Per2* and immediate-early gene *c-fos* within the retina of early postnatal Wistar rats. *J. Comp. Neurol.* 518: 3630-3644, 2010

43/ Nováková M., Sládek M., Sumová A.: 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* 25(5): 350- 360, 2010

***44/ Polidarová L., Sládek M., Soták M., Pácha J., Sumová A.: Hepatic, duodenal and colonic circadian clocks differ in their persistence under conditions of constant light and in their entrainment by restricted feeding. *Chronobiol. Int.* 28: 204-215, 2011**

***45/ Nováková M., Paclt I., Ptáček R., Kuželová H., Hájek I., Sumová A.: Salivary melatonin rhythm as a marker of the circadian system in healthy children and those with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Chronobiol. Int.*, 28(7):630-637, 2011**

46/ Nováková M., Polidarová L., Sládek M., Sumová A.: Restricted feeding regime affects clock gene expression profiles in the suprachiasmatic nucleus of rats exposed to constant light. *Neuroscience*, 197: 65-71, 2011

- *47/ Soták M., Polidarová L., Musílková J., Hock M., Sumová A., Pácha J.: Circadian regulation of electrolyte absorption in the rat colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 301(6): G1066-74, 2011
- *48/ Nováková M., Nevšimalová S., Příhodová I., Sládek M., Sumová A.: Alteration of the circadian clock in children with Smith-Magenis syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 97(2): E312-8, 2012
- *49/ Parkanová D., Nováková M., Sosniyenko S., Sumová A.: Photoperiodic modulation of the hepatic clock by the suprachiasmatic nucleus and feeding regime in mice. *Eur. J. Neurosci.*, 35: 1446-1457, 2012
- 50/ Sumová A., Sládek M., Polidarová L., Nováková M., Houdek P.: Circadian system from conception till adulthood. In A. Kalsbeek, Martha Merrow, Till Roenneberg, Russell G. Foster, editors: *The Neurobiology of Circadian Timing*, 199, PBR, Chennai: Elsevier, 2012, pp. 83-104.
- *51/ Sládek M., Polidarová L., Nováková M., Parkanová D., Sumová A.: Early chronotype and tissue-specific alterations of circadian clock function in spontaneously hypertensive rats. *PLoS One*. 2012;7(10):e46951. doi: 10.1371/journal.pone.0046951. Epub 2012 Oct 2.
- *52/ Soták M., Polidarová L., Ergang P., Sumová A., Pácha J.: An association between clock genes and clock-controlled cell cycle genes in murine colorectal tumors. *Int J Cancer*. 132(5):1032-41, 2013 (doi: 10.1002/ijc.27760)
- *53/ Nováková M., Sládek M., Sumová A.: Human chronotype is determined in bodily cells under real life conditions. *Chronobiol. Int.* 30(4): 607-617, 2013
- *54/ Pácha J, Sumová A.: Circadian regulation of epithelial functions in the intestine. *Acta Physiol. (Oxf.)*. 208 (1): 11-24, 2013
- *55/ Polidarová L., Sládek M., Nováková M., Parkanová D., Sumová A.: Increased Sensitivity of the Circadian System to Temporal Changes in the Feeding Regime of Spontaneously Hypertensive Rats - a Potential Role for *Bmal2* in the Liver. *PLoS One*. 2013;8(9): e75690. doi: 10.1371/journal.pone.0075690
- 56/ Sládek M., Sumová A.: Entrainment of spontaneously hypertensive rat fibroblasts by temperature cycles. *PLoS One*. 2013;8(10): e77010. doi:10.1371/journal.pone.0077010
- 57/ Polidarová L., Olejníková L., Paušlyová L., Sládek M., Soták M., Pácha J., Sumová A.: Development and entrainment of the colonic circadian clock during ontogenesis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 306(4): G346-356, 2014
- 58/ Petrášek T., Prokopová I., Sládek M., Weisssová K., Vojtěchová I., Bahník S., Zemanová A., Schonig K., Berger S., Tews B., Bartsch D., Schwab M.E., Sumová A., Stuchlík A.: Nogo-A-deficient transgenic rats show deficits in higher cognitive functions, decreased anxiety, and altered circadian activity patterns. *Front. Behav. Neurosci.* Vol. 8: 90, p. 1-15, 2014, doi: 10.3389/fnbeh.2014.00090
- 59/ Nováková M., Sumová A.: New methods to assess circadian clocks in humans. *Indian J. Exp. Biol.* 52: 404 - 412, 2014
- *60/ Soták M., Sumová A., Pácha J.: Cross-talk between the circadian clock and the cell cycle in cancer. *Ann. Med.* 46: 221-232, 2014
- 61/ Houdek P., Sumová A.: In vivo initiation of clock gene expression rhythmicity in fetal rat suprachiasmatic nuclei. *PLoS One* 2014; 9(9):e107360. doi: 10.1371/journal.pone.0107360.

62/ Houdek P., Polidarová L., Nováková M., Matějů K., Kubík Š., Sumová A.: Melatonin administered during the fetal stage affects circadian clock in the suprachiasmatic nucleus but not in the liver. *Dev. Neurobiol.* 75(2): 131-144, 2015

*63/ **Nováková M., Praško J., Látalová K., Sládek M., Sumová A.: The circadian system of patients with bipolar disorder differs in episodes of mania and depression. *Bipolar Disorders*, 17: 303-3014, 2015**

64/ Olejníková L., Polidarová L., Paušlyová L., Sládek M., Sumová A.: Diverse development and higher sensitivity of the circadian clocks to changes in maternal feeding regime in a rat model of cardio-metabolic disease. *Chronobiol. Int.*, 32(4): 531-47, 2015

*65/ **Weissová K., Bartoš A., Sládek M., Nováková M., Sumová A.: Moderate Changes in the Circadian System of Alzheimer's Disease Patients Detected in their Home Environment. *PLoS One*. 2016; 11(1):e0146200. doi: 10.1371/journal.pone.0146200.**

*66/ **Soták M., Bryndová J., Ergang P., Vagnerová K., Kvapilová P., Vodička M., Pácha J., Sumová A.: Peripheral circadian clocks are diversely affected by adrenalectomy. *Chronobiol Int*, 33: 520-529, 2016**

*67/ **Houdek P., Nováková M., Polidarová L., Sládek M., Sumová A.: Melatonin is a redundant entraining signal in the rat circadian system. *Hormones and Behavior*, 83: 1 -5, 2016.**

*68/ **Polidarová L., Houdek P., Sládek M., Novosadová Z., Pácha J., Sumová A.: Mechanisms of hormonal regulation of the peripheral circadian clock in the colon. *Chronobiol. Int.* in press**

9. Seznam příloh - chronologické členění publikací

Příloha 1

Sládek M., Rybová M., Jindráková Z., Zemanová Z., Polidarová L., Mrnka L., O'Neil J., Pácha J., Sumová A.: Insight into circadian clock within the rat colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 133: 1240-1249, 2007

Příloha 2

Polidarová L., Soták M., Sládek M., Pácha J. and Sumová A.: Temporal gradient in the clock gene expression and cell cycle checkpoint kinase Wee1 expression along the gut. *Chronobiol. Int.*, 26: 607-620, 2009

Příloha 3

Sosniyenko S., Parkanová D., Illnerová H., Sládek M., Sumová A.: Different mechanisms of adjustment to a change of the photoperiod in the suprachiasmatic and liver circadian clocks. *Am. J. Physiol. (Regul Integr Comp Physiol)*, 298: R959-R971, 2010

Příloha 4

Polidarová L., Sládek M., Soták M., Pácha J., Sumová A.: Hepatic, duodenal and colonic circadian clocks differ in their persistence under conditions of constant light and in their entrainment by restricted feeding. *Chronobiol. Int.* 28: 204-215, 2011

Příloha 5

Nováková M., Paclt I., Ptáček R., Kuželová H., Hájek I., Sumová A.: Salivary melatonin rhythm as a marker of the circadian system in healthy children and those with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Chronobiol. Int.*, 28(7):630-637, 2011

Příloha 6

Soták M., Polidarová L., Musílková J., Hock M., Sumová A., Pácha J.: Circadian regulation of electrolyte absorption in the rat colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 301(6): G1066-74, 2011

Příloha 7

Nováková M., Nevšimalová S., Příhodová I., Sládek M., Sumová A.: Alteration of the circadian clock in children with Smith-Magenis syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 97(2): E312-8, 2012

Příloha 8

Parkanová D., Nováková M., Sosniyenko S., Sumová A.: Photoperiodic modulation of the hepatic clock by the suprachiasmatic nucleus and feeding regime in mice. *Eur. J. Neurosci.*, 35: 1446-1457, 2012

Příloha 9

Sládek M., Polidarová L., Nováková M., Parkanová D., Sumová A.: Early chronotype and tissue-specific alterations of circadian clock function in spontaneously hypertensive rats. *PLoS One*. 2012;7(10):e46951. doi: 10.1371/journal.pone.0046951. Epub 2012 Oct 2.

Příloha 10

Soták M., Polidarová L., Ergang P., Sumová A., Pácha J.: An association between clock genes and clock-controlled cell cycle genes in murine colorectal tumors. *Int J Cancer*. 132(5):1032-41, 2013 (doi: 10.1002/ijc.27760)

Příloha 11

Nováková M., Sládek M., Sumová A.: Human chronotype is determined in bodily cells under real life conditions. *Chronobiol. Int.* 30(4): 607-617, 2013

Příloha 12

Pácha J, Sumová A.: Circadian regulation of epithelial functions in the intestine. *Acta Physiol. (Oxf.)*. 208 (1): 11-24, 2013

Příloha 13

Polidarová L., Sládek M., Nováková M., Parkanová D., Sumová A.: Increased Sensitivity of the Circadian System to Temporal Changes in the Feeding Regime of Spontaneously Hypertensive Rats - a Potential Role for *Bmal2* in the Liver. *PLoS One*. 2013;8(9): e75690. doi: 10.1371/journal.pone.0075690

Příloha 14

Nováková M., Sumová A.: New methods to assess circadian clocks in humans. *Indian J. Exp. Biol.* 52: 404 - 412, 2014

Příloha 15

Soták M., Sumová A., Pácha J.: Cross-talk between the circadian clock and the cell cycle in cancer. *Ann. Med.* 46: 221-232, 2014

Příloha 16

Nováková M., Praško J., Látalová K., Sládek M., Sumová A.: The circadian system of patients with bipolar disorder differs in episodes of mania and depression. *Bipolar Disorders*, 17: 303-3014, 2015

Příloha 17

Weissová K., Bartoš A., Sládek M., Nováková M, Sumová A.: Moderate Changes in the Circadian System of Alzheimer's Disease Patients Detected in their Home Environment. *PLoS One*. 2016; 11(1):e0146200. doi: 10.1371/journal.pone.0146200.

Příloha 18

Soták M., Bryndová J., Ergang P., Vagnerová K., Kvapilová P., Vodička M., Pácha J., Sumová A.: Peripheral circadian clocks are diversely affected by adrenalectomy. *Chronobiol Int*, 33: 520-529, 2016

Příloha 19

Houdek P., Nováková M., Polidarová L., Sládek M., Sumová A.: Melatonin is a redundant entraining signal in the rat circadian system. *Hormones and Behavior*, 83: 1 -5, 2016.

Příloha 20

Polidarová L., Houdek P., Sládek M., Novosadová Z., Pácha J., Sumová A.: Mechanisms of hormonal regulation of the peripheral circadian clock in the colon - v tisku

10. Přílohy