

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Veronika Spišská

**Sledování rytmu melatoninu monozygotních dvojčat jako markeru
genetické kontroly cirkadiánní rytmicity.**

**The monitoring of melatonin rhythm in monozygotic twins as a marker
of genetic control of circadian rhythmicity.**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Zdeňka Bendová Ph. D.

Praha, 2016

Prohlášení:

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

V Praze, 15.8.2016

Podpis.....

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat především Doc. RNDr. Zdeňce Bendové Ph. D. za velkou pomoc, ochotu a trpělivost při vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Dominice Pačesové a Mgr. Kateřině Červené za velkou pomoc a podporu. Také bych chtěla poděkovat rodinám, které se dobrovolně zúčastnily naší studie. A nemalý dík patří samozřejmě mé rodině za podporu a zázemí.

Abstrakt

V lidské populaci existují individuální rozdíly v délce endogenní periody, která je generovaná transkripčně-translačními smyčkami hodinových genů v suprachiasmatických jádrech hypotalamu (SCN). Na základě těchto rozdílů členíme osoby do ranního, nevyhraněného či večerního chronotypu. Chronotypy se mezi sebou liší především v rytmu hormonu melatoninu, který se používá jako marker vnitřní periody a také v rytmu pohybové aktivity. Cílem této práce bylo popsat, pomocí dotazníku CCTQ, metody melatoninové radioimunoeseje a aktigrafie, rozdíl ve fázi cirkadiálního rytmu u tří párů monozygotních dvojčat ve věku 8 až 10 let, která spolu žijí a mají společný denní režim. V naší studii byl dotazníkem jeden chlapec určen jako ranní chronotyp (A3), jedna dívka jako večerní chronotyp (B3) a ostatní děti jako nevyhraněný chronotyp (A2, B2, C2, C3). Mezi dvojčaty byly patrné rozdíly jak v rytmu melatoninu, tak v ranní pohybové aktivitě. Tyto rozdíly potvrdily u chlapce A3 a dívky B3 chronotyp určený dotazníkem. Naopak rozdíly v rytmu melatoninu nepotvrdily nevyhraněný chronotyp u sourozenců C2 a C3 a ukazují, že tito sourozenci mají spíše rozdílný chronotyp. Naše výsledky naznačují, že děti s chronotypem blížším večernímu jsou více ovlivněny tzv. sociálním jet lagem než děti s ranním chronotypem. Zjistili jsme, že při popisu cirkadiálních rytmů je spolehlivý pouze ranní aktigrafický záznam. Naše výsledky jednoznačně ukázaly, že monozygotní dvojčata žijící ve stejném prostředí a dle stejného režimu, vykazují rozdíly ve fyziologických a behaviorálních parametrech souvisejících s rozdílným chronotypem.

Klíčová slova: chronotyp, monozygotní dvojčata, melatonin, aktigrafie

Abstract

In human population, there are individual differences in the length of endogenous period which is generated by transcriptional-translational loops of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus (SCN). On the basis of these differences we divide people into the early, late or neither chronotype. Chronotypes differ from each other mainly in the rhythm of the hormone melatonin, which is used as a marker of endogenous period. They also differ in rhythm of locomotor activity. The aim of this study was to describe a difference in the phase of the circadian system in three pairs of monozygotic twins aged 8-10 years who live together and share the same daily routine. To describe these differences, we used a questionnaire CCTQ, melatonin radioimmunoassay and actigraphy. According to the questionnaire, one boy was determined as early chronotype (A3), one girl was determined as late chronotype (B3) and the other children were determined as neither chronotype (A2, B2, C2, C3). Among the twins there were marked differences both in the rhythm of melatonin and in the morning activity. These differences confirmed the chronotype assessed by questionnaire in the boy A3 and the girl B3. On the contrary, differences in melatonin rhythm did not confirm neither chronotype in siblings C2 and C3, and show that these siblings have different chronotype. Our results suggest that children with later chronotype are more influenced by social jet lag than children with morning chronotype. We found that for the description of circadian rhythms only the morning actigraphy record is reliable. Our results clearly showed that monozygotic twins living in the same environment and under the same regime show differences in physiological and behavioral characteristics associated with different chronotype.

Keywords: chronotype, monozygotic twins, melatonin, actigraphy

Obsah

Seznam použitých zkratk	1
1. Úvod	2
2. Literární přehled	3
2.1. Cirkadiánní rytmy	3
2.1.1. Suprachiasmatická jádra	3
2.1.2. Molekulární mechanismus generování cirkadiánní rytmicity	4
2.2. Melatonin	6
2.2.1. Syntéza melatoninu	7
2.2.2. Regulace syntézy melatoninu	7
2.3. Lidské chronotypy	7
2.3.1. Metody výzkumu chronotypů	8
2.3.2. Charakteristika chronotypů	9
2.3.3. Vznik chronotypů	12
2.4. Ontogeneze lidských chronotypů	14
2.5. Monozygotní dvojčata	15
3. Cíle práce	17
4. Metodický přístup	17
4.1. Subjekty	17
4.2. Dotazník	18
4.3. Stanovení melatoninu	18
4.3.1. Sběr vzorků slin	18
4.3.2. Stanovení koncentrace melatoninu	19
4.3.2.1. Příprava kalibrační řady	19
4.3.2.2. Příprava a měření vzorků slin	20
4.4. Měření aktivity probandů	21
4.4.1. Měření aktivity v létě	21
4.4.2. Měření aktivity v zimě	21
4.5. Pilotní pokus z roku 2013	22
4.6. Analýza Dat	22
4.6.1. Analýza výsledků stanovení melatoninu metodou RIA	22
4.6.2. Analýza záznamů pohybové aktivity	22
4.6.3. Statistické zpracování	23
5. Výsledky	23
5.1. Rytmus melatoninu ve slinách dvojčat rodiny A z roku 2013	23

5.2. Stanovení chronotypů dětí dle dotazníků CCTQ	24
5.3. Výsledky měření hladiny melatoninu	25
5.3.1. Srovnání rytmu melatoninu mezi dvojčaty.....	25
5.3.2 Srovnání rytmu melatoninu mezi létem a zimou.....	29
5.3.3. Korelace parametrů rytmu melatoninu s výsledky dotazníku CCTQ.....	30
5.4. Výsledky měření pohybové aktivity	34
5.4.1. Srovnání aktivity mezi dvojčaty	34
5.4.2. Srovnání aktivity mezi školním a víkendovým dnem	37
5.4.3. Srovnání pohybové aktivity mezi létem a zimou	40
7. Diskuze.....	43
8. Závěr	50
Seznam literatury	51
Přílohy	62

Seznam použitých zkratek

AA – adenin-adenin
ARNT – aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
bHLH – basic helix-loop-helix
Bmal1/ BMAL1 – brain and muscle ARNT-like gen/ protein
cAMP – cyklický adenosinmonofosfát
CCTQ – „The Children’s Chronotype Questionnaire“
CKI ϵ/δ – kasein kináza I ϵ /I δ
CLOCK/ CLOCK – clock circadian regulator gen/ protein
CpG – cytosinfosfát-guanosin
CREB – cAMP response element binding protein
Cry/ CRY – kryptochrom gen/ protein
DLMO – dim light melatonin onset
DNA – deoxyribonukleová kyselina
EEG – elektroencefalografie
GABA – kyselina γ -aminomáselná
GG – guanin-guanin
H3 – histon 3
H4 – histon 4
MB – maximální vazba
MCTQ – „Munich Chronotype Questionnaire“
MEQ – „Morningness-Eveningness Questionnaire“
MESC – „Morningness and Eveningness Scale for Children“
mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina
MT 1-3 – melatoninový receptor 1-3
Npas2 – neuronal PAS domain protein 2
NR1D1 – jaderný receptor podrodiny 1 skupiny D člen 1
NREM – non rapid eye movement stádium spánku
NSB – nescifická vazba
NÚDZ – Národní ústav duševního zdraví
Per1-3/PER1-3 – Period1-3 gen/ protein
PKA – proteinkináza A
REM – rapid eye movement stádium spánku
RHT – retinohypotalamický trakt
Rora – retinoic acid receptor-related orphan receptor
rpm – otáčky za minutu
SCN – suprachiasmatická jádra
S.E.M. – střední chyba průměru
SNP – jednonukleotidový polymorfismus („single nucleotide polymorphism“)
VLPO – ventrolaterální preoptická oblast
VNTR – variabilní počet tandemových repetice („variable number tandem-repeat“)

1. Úvod

Periodicky opakující se změny ve vnějším prostředí, vnikající rotací Země kolem své osy, jsou příčinou vzniku endogenních mechanismů tzv. cirkadiánních rytmů, které napomáhají organismům přizpůsobovat se těmto změnám. Podstata cirkadiánních rytmů se nachází ve zpětnovazebných smyčkách tzv. hodinových genů, které generují endogenní periodu blízkou 24 hodinám. V lidské populaci se vyskytují individuální rozdíly v délce endogenní periody, a dochází tak k rozdělení lidské populace na tzv. chronotypy.

V lidské populaci rozlišujeme osoby s ranním chronotypem, které oproti ostatním vstávají v brzkých ranních hodinách a také chodí brzy spát. Další část lidské populace je zařazena k večernímu chronotypu. Tito lidé jsou aktivní dlouho do noci a vstávají v pozdních dopoledních hodinách. Největší zastoupení má chronotyp nevyhraněný, tj. jedinci, kteří neinklinují ani k rannímu, ani k večernímu chronotypu. Mezi chronotypy se vyskytují rozdíly na příklad v rytmu tělesné teploty, v rytmu produkce hormonu melatoninu či v diurnální preferenci v pohybové a mentální aktivitě.

Příčina vzniku lidských chronotypů není zcela objasněna. Za jednu z nejčastějších příčin vzniku rozdílného chronotypu jsou považovány polymorfismy hodinových genů. Mezi další možné příčiny se řadí epigenetické změny v genetické informaci. Právě rozdíly v metylaci DNA byly objeveny u monozygotních dvojčat s rozdílným chronotypem. U mladých monozygotních dvojčat žijících spolu byly ovšem tyto rozdíly v epigenetických změnách minimální.

Cílem této práce je popsat rozdíly ve fázi cirkadiánního rytmu monozygotních dvojčat, které mohou formovat jejich odlišný chronotyp. Zaměřili jsme se na děti ve věku 8 až 10 let, které spolu žijí ve stejných podmínkách dle stejného životního režimu, a jsou tak vystaveny minimálním rozdílům působení vnějšího prostředí, které může epigeneticky zasáhnout jejich molekulární cirkadiánní mechanismus.

2. Literární přehled

2.1. Cirkadiánní rytmy

Veškeré organismy jsou ovlivňovány periodickými změnami abiotických faktorů ve vnějším prostředí. Jedním z nejdůležitějších abiotických faktorů je světlo dané slunečním zářením. Aby organismy mohly lépe předvídat střídání světla a tmy dané rotací Země kolem své osy a lépe se k němu přizpůsobovat, vznikl u všech organismů během evoluce endogenní mechanismus, tzv. cirkadiánní systém. Díky němu mohou organismy měnit své chování i fyziologické procesy v předstihu před světelnými změnami v prostředí. Cirkadiánní rytmy fyziologických procesů řízené cirkadiánním systémem vykazují periodu, která je vždy specifická pro každý druh organismu (Bruce, 1972; Feldman et Hoyle, 1974). Ve stálém prostředí, např. stálé tmě, cirkadiánní rytmy oscilují s periodou kratší či delší než je 24 hodin. Ovšem v přirozených podmínkách je cirkadiánní systém synchronizován na přesných 24 hodin zejména díky pravidelnému střídání dne a noci, popřípadě i díky některým nefotickým stimulům, které umožňují organismům adaptovat se na změny okolního prostředí.

Nejznámějším a nejstudovanějším synchronizátorem je světlo. Mechanismus světelné synchronizace je studován pomocí světelných pulzů aplikovaných v různých časových bodech během 24 h cyklu. Jediný světelný pulz v časně noci způsobí zpožďující posun fáze cirkadiánních rytmů. Světelný pulz v pozdní noci způsobí naopak předběhnutí cirkadiánní fáze (van der Pol et al., 1998). Cirkadiánní rytmy jsou ovšem ovlivňovány i nefotickými stimuly, jako je vynucená pohybová aktivita či časově omezený příjem potravy (Maywood et al., 1999; Damiola et al., 2000). Generátorem cirkadiánních rytmů jsou suprachiasmatická jádra (SCN) hypotalamu (Moore et Eichler, 1972). Tato jádra vytvářejí časové signály, kterými synchronizují periferní cirkadiánní oscilátory, jež jsou součástí většiny tělních buněk a tedy i orgánů, jako jsou např. srdce, játra, nadledviny, a také ostatních částí mozku (Maler et al., 1992; Zylka et al., 1998). Světelné pulzy v noci spouští expresi některých genů v SCN (Rusak et al., 1990).

2.1.1. Suprachiasmatická jádra

SCN jsou bilaterální struktura uložená v anteriorním hypotalamu na bázi třetí mozkové komory, dorzálně nad optickým chiasmatem (Moore et al., 2002). SCN jsou tvořena přibližně 20 000 neurony, které vykazují individuální autonomní cirkadiánní rytmy s periodou blízkou 24 hodinám. Neurony SCN jsou spojeny do neuronální sítě, což jim

umožňuje vykazovat společnou cirkadiánní fázi, podle které synchronizují periferní oscilátory (Guo et al., 2006).

SCN se rozděluje na dorsomediální a ventrolaterální část (Moore et al., 2002). Ventrolaterální oblast SCN získává informace přímou drahou ze sítnice, která se nazývá retinohypotalamický trakt (RHT). V retině jsou uloženy speciální gangliové buňky obsahující ftopigment melanopsin, které mohou transdukovat světelný signál bez účasti klasických fotoreceptorů, tyčinek a čípků (Qiu et al., 2005). Melanopsin rozpoznává světlo pouze mezi 460 – 480 nm vlnové délky (Provencio et al., 2000). Jako neurotransmitter RHT slouží zejména glutamát (Castel et al., 1993; Hannibal et al., 2000).

Do SCN vedou také přímé i nepřímé dráhy z jiných mozkových struktur a jejich aktivita může modifikovat odpovědi SCN na informace o světle. Nepřímou informaci o světle vede genikulohypotalamická dráha, která vede z intergenikulárního lústku talamu do ventrolaterálního SCN. Hlavním neuropřenašečem této dráhy je neuropeptid Y a kyselina γ -aminomáselná (GABA) (Shinohara et al., 1993; Morin et Blanchard, 2001).

V neuronech SCN, stejně jako v jiných buňkách organismu, zajišťují endogenní rytmus autoregulační transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky tzv. hodinových genů (obr. č. 1).

2.1.2. Molekulární mechanismus generování cirkadiánní rytmicity

Generování endogenních oscilací s periodou přibližně 24 hodin zajišťují transkripčně-translační smyčky, v nichž dochází k zpětnovazebným interakcím hodinových genů a jejich proteinů. Délka trvání periody je posttranslačně ovlivňována fosforylací a ubiquitinací proteinů hodinových genů (Ko et Takahashi, 2006). Lidé mohou mít odlišnou délku těchto endogenních cyklů, a proto se u části populace vyskytují ranní a večerní chronotypy (viz. kapitola 2.2.).

2.1.2.1 Primární smyčka

Primární smyčku vytváří pozitivní elementy, geny *Bmal1* (brain and muscle ARNT – like protein 1) a *Clock* (clock circadian regulator)/*Npas2* (neuronal PAS domain protein 2) (Honma et al., 1998; Gekakis et al., 1998; Reick et al., 2001). Tyto dva geny náleží do rodiny basic helix – loop – helix (bHLH) transkripčních faktorů. Proteiny BMAL 1 a CLOCK spolu v jádře tvoří heterodimery a aktivují transkripci genů *Period 1, 2* (*Per 1, 2*) a genů *Krytochrom 1, 2* (*Cry 1, 2*) tím, že se váží na E-box cis-regulační sekvenci v promotoru

těchto genů (Kume et al., 1999). Proteiny PER a CRY spolu tvoří v cytoplazmě heterodimery a translokují do jádra, kde zpětně inaktivují transkripci *Bmal1* a *Clock* (Ye et al., 2011).

2.1.2.2. Sekundární smyčka

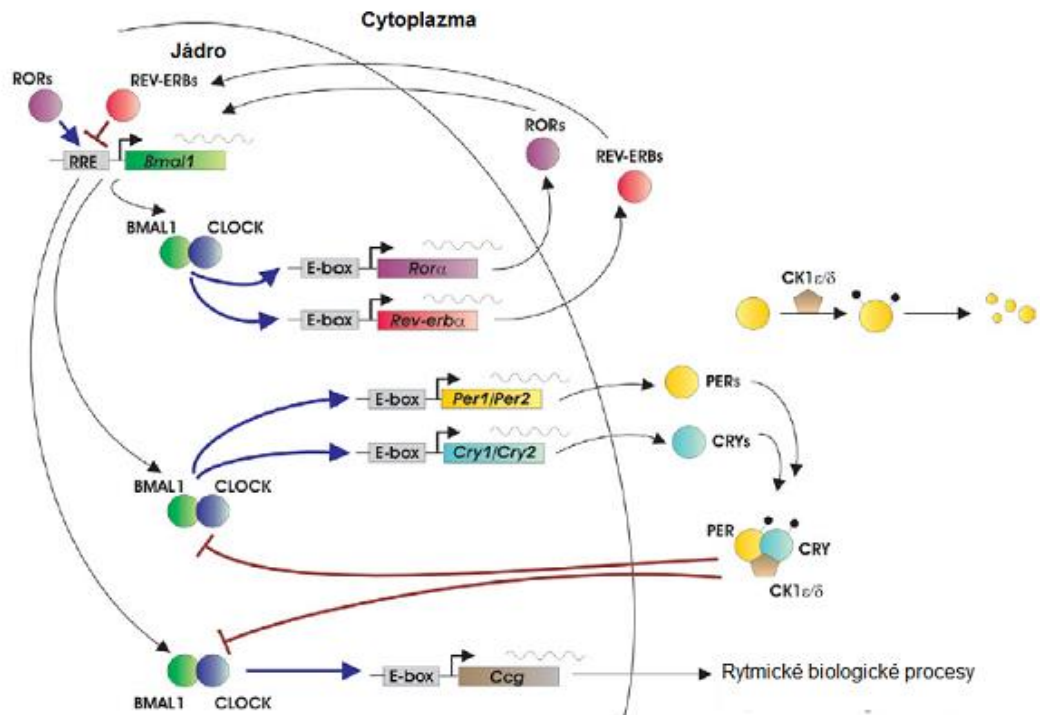
Heterodimery BMAL1/CLOCK iniciují také transkripci jaderných genů *Rora* (z anglického „retinoic acid receptor-related orphan receptor“) a *Rev-Erba*, jenž patří do rodiny sirotčích jaderných receptorů. REV-ERB α se rychle hromadí a inaktivuje transkripci *Bmal1*. Naopak ROR α , který se hromadí pomaleji, transkripci *Bmal1* aktivuje (Preitner et al., 2002; Sato et al., 2004).

2.1.2.3. Posttranslační regulace cirkadiálních oscilací

Kromě regulace cirkadiálního rytmu na úrovni transkripce, dochází také k regulaci posttranslační. Tyto posttranslační modifikace proteinů hodinových genů jsou důležité pro lepší udržení správné cirkadiální periody. Mezi tyto posttranslační mechanismy patří především fosforylace a histonové acetylace.

Fosforylaci zajišťují kasein kináza I ϵ (CKI ϵ) a kasein kináza I δ (CKI δ) (Lee et al., 2001). Cytoplazmatická CKI ϵ fosforyluje PER1/2, po fosforylaci dochází k narušení stability těchto proteinů a ty se stávají náchylnější k ubiquitinaci a následné degradaci v proteasomu (Keesler et al., 2000; Miyazaki et al., 2004; Eide et al., 2005).

Histonové acetylace způsobují zvýšenou míru transkripce. Acetylaci zajišťují histonacetylázy. V kontextu cirkadiálních rytmů dochází k acetylaci histonu 3 (H3) a histonu 4 (H4) v promotorových oblastech hodinových genů *Per1/2* a *Cry*. Tyto acetylace vykazují cirkadiální rytmus (Etchegaray et al., 2003). Acetylace H3 a H4 v promotorech genů *Per1* a *Per2* nastává v SCN také po vystavení světlu během noci (Naruse et al., 2004). Hodinový gen *Clock* má vlastní histonacetylázovou aktivitu, díky které acetyluje svého vazného partnera *Bmal1*, a tím dochází k usnadnění inaktivace komplexu *Bmal1/Clock* dimerem PER/CRY (Doi et al., 2006; Hirayama et al., 2007).



Obr. č. 1: Schéma transkripčně – translační zpětnovazebné smyčky. V jádře spolu tvoří proteiny CLOCK a BMAL1 heterodimery, které nasedají na E-box promotoru genu *Per1,2,3* a *Cry*, a aktivují tak jejich transkripci. Proteiny PER a CRY v cytoplasmě tvoří heterodimery, které se poté translokují zpět do jádra kde zpětně inaktivují aktivitu genů *Bmal1* a *Clock*. Tento mechanismus tvoří tzv. primární smyčku. Sekundární smyčku tvoří *RORα* a *REV-ERBα*, které pozitivně a negativně ovlivňují transkripci *Bmal1*. Důležitou roli v regulaci cirkadiánních rytmtů mají CKIε a CKIδ, které fosforylují protein PER a upevňují tak délku cirkadiánní periody. Převzato a upraveno podle *Ko et Takahashi, 2006*.

2.2. Melatonin

Hormon melatonin je jeden z nejdůležitějších hormonů v těle, který moduluje mnoho fyziologických procesů, od reprodukční aktivity, přes imunitní odpovědi organismu až po reakci buněk na oxidativní stres (He et al., 2016; Kaur et Ling, 1999; Vargas et al., 2011). Je to lipofilní molekula, známá také pod svým chemickým názvem 5 – methoxy – N – acetyltryptamin, kterou objevil v roce 1954 Lerner a kolegové. V organismu působí přes dva typy membránových vysokoafinitních receptorů označovaných MT1 a MT2 (Reppert et al., 1994; Reppert et al., 1995). Tyto receptory patří do rodiny receptorů spřažených s inhibičními G-proteiny. Dalším vazebným místem pro melatonin je MT3 vazebné místo na enzymu chinon reduktáze 2 (Nosjean et al., 2000; Tan et al., 2007). Melatonin primárně inhibuje aktivitu adenylátcyklázy a tím snižuje hladinu cyklického adenosimonofosfátu (cAMP) (Carlson et al., 1989; Sumová et Vaněček, 1997). Cirkadiánní změny v produkci tohoto hormonu se používají jako indikátor změn cirkadiánního systému člověka a lze je využít i pro určení a potvrzení lidských chronotypů jak u dětí, tak u dospělých osob (Nováková et al., 2011; Kantermann et al., 2015).

2.2.1. Syntéza melatoninu

Hormon melatonin je tvořen především v pinealocytech, buňkách epifýzy neboli pineální žlázy. Jeho prekurzorem je aminokyselina tryptofan, ze které se pomocí enzymu tryptofan hydroxylázy tvoří 5 – hydroxytryptofan. Z něj se dále tvoří serotonin v důsledku aktivity enzymu 5 – hydroxytryptofan dekarboxylázy. Přeměna serotoninu na N-acetylserotonin je katalyzována enzymem N-acetyltransferázou. Z N-acetylserotoninu vzniká melatonin činností enzymu hydroxyindol-O-methyltransferázy (Bernard et al., 1999). Po své syntéze je melatonin vyplavován z epifýzy do krve, ale najdeme ho i ve slinách či v jiných tělních tekutinách (Lynch et al., 1975; McIntyre et al., 1987).

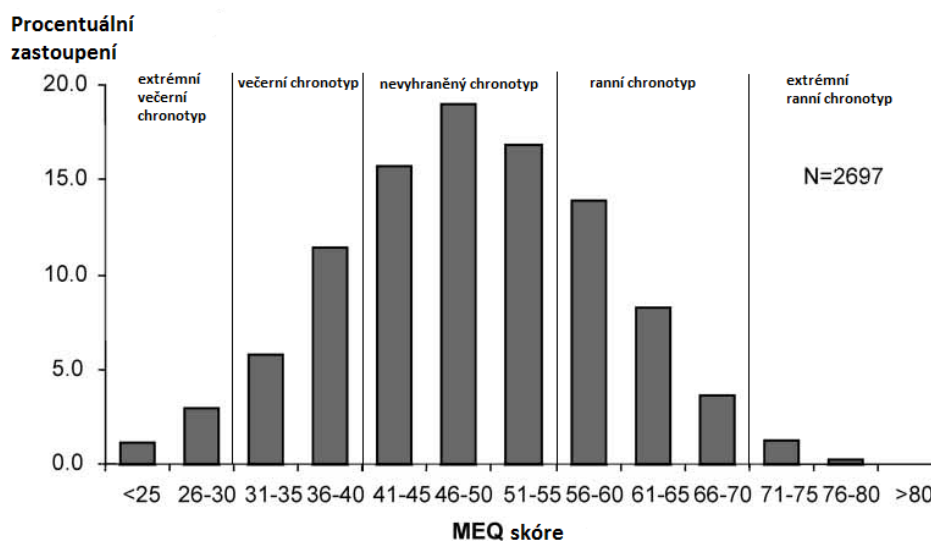
2.2.2. Regulace syntézy melatoninu

Syntéza melatoninu je řízena z SCN. SCN vysílá rytmické signály do paraventriculárního jádra hypotalamu. To následně stimuluje sympatické ganglium cervicale superior, jehož axony tvoří noradrenergní synapse s pinealocyty. Noradrenalin se váže na své β -adrenergní receptory a zvyšuje tím hladinu cAMP (Klein et al., 1970; Perreau-Lenz et al., 2005). cAMP aktivuje proteinkinázu A (PKA), která fosforyluje transkripční faktor cAMP response element binding protein (CREB), což vede k transkripci genu pro N-acetyltransferázu. Díky těmto změnám v hladině N-acetyltransferázy se během dne mění i hladina melatoninu (Hickman et al., 1999). Melatonin s postupem večera zvyšuje a naopak s ránem snižuje svou hladinu. Přes den je hladina melatoninu velmi nízká. Rytmus melatoninu je cirkadiánní a endogenní, jelikož přetrvává v konstantním prostředí, např. ve stálé tmě (Bernard et al., 1997). Při světelném stimulu dochází k poklesu hladiny melatoninu, a to díky okamžitému snížení aktivity N-acetyltransferázy. Nedochozí ovšem k okamžitému snížení mRNA tohoto enzymu (Illnerová et al., 1978; Roseboom et al., 1996).

2.3. Lidské chronotypy

Studium lidského cirkadiánního systému odhalilo mezi jedinci individuální rozdíly v délce endogenní periody a ve schopnosti synchronizace cirkadiánní fáze s vnějšími světelnými podmínkami. Tyto fenotypické rozdíly podmiňují rozdíly v tzv. diurnální preferenci chování, tedy v denní době, kdy jedinec vykonává různé aktivity dle svého přirozeného endogenního rytmu. Podle diurnální preference lze lidskou populaci rozčlenit do tzv. chronotypů. Chronotypy jsou v populaci distribuovány podle Gaussovy křivky (obr. č. 2; Lehnkering et Siegmund, 2007; Allebrandt et al., 2010). Nejčastěji se v populaci vyskytuje nevyhraněný chronotyp, který vědci dle znaků řadí na škálu mezi ranní a večerní

chronotyp. Oba konce Gaussovy křivky popisují populační zastoupení extrémních ranních či extrémních večerních chronotypů.



Obr. č. 2: Rozložení jednotlivých chronotypů ve vzorku populace (N = 2697). Chronotypy jsou v populaci distribuovány podle Gaussovy křivky. Převzato a upraveno dle *Lehnkering et Siegmund, 2007*.

2.3.1. Metody výzkumu chronotypů

Určení chronotypu člověka je nejčastěji založeno na metodě standardizovaných dotazníků vyplňovaných probandy. Dotazníky se postupem času přizpůsobily potřebám výzkumu orientovaného například na rozdílné věkové skupiny či na hodnocení lidí pracujících na směny (Werner et al., 2009; Juda et al., 2013).

Nejpoužívanějším dotazníkem pro dospělé lidi je „Morningness-Eveningness Questionnaire (MEQ)“ (Horne et Ostberg, 1976). Tento dotazník je nejčastěji upravovaný na míru konkrétnímu výzkumu (Taillard et al., 2004). Dalším dotazníkem používaným k určování chronotypů dospělých lidí je „Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ)“. Tento dotazník je validován pomocí spánkového deníku, který bývá veden pět týdnů po vyplnění dotazníku. Časy ukládání ke spánku a časy probouzení vyplněné v dotazníku a ve spánkovém deníku spolu musí významně korelovat (Roenneberg, 2004). Zavada a kol. (2005) ve své studii srovnávali dotazníky MEQ a MCTQ a zjistili, že určování chronotypů podle MCTQ výrazně korelovalo s výsledky získanými dotazníky MEQ. Nejvýznamnější korelací mezi oběma dotazníky je tzv. „mid-point sleep“, který znamená střední čas mezi usnutím a probuzením.

Validovaným dotazníkem určeným pro děti je „The Children’s Chronotype Questionnaire (CCTQ)“. Tento dotazník je validován metodou aktigrafie, která zaznamenává pohybovou aktivitu pomocí přístrojů aktigrafů. Spolehlivost tohoto dotazníku je určena pomocí metody test-retest, což znamená, že dotazníky jsou vyplňovány dvakrát v průběhu dvou až čtyř týdnů a výsledky obou dotazníků spolu musí signifikantně korelovat (Werner et al., 2009).

2.3.2. Charakteristika chronotypů

Ranní a večerní chronotypy se mezi sebou výrazně odlišují. Hlavní charakteristikou obou typů je doba, kdy jedinci uléhají ke spánku, a kdy vstávají. Ranní chronotyp vstává brzy z rána, ale také chodí spát výrazně dříve oproti většinové populaci. Naopak je tomu u chronotypu večerního, kdy je jedinec aktivní dlouho do noci a spánek si proto prodlužuje do dopoledních hodin (Roenneberg et al., 2003). Osoby s rozdílným chronotypem určují v subjektivních dotaznících také jiný čas v souvislosti s ospalostí. Lidé s večerním chronotypem se cítí ospalí až o dvě hodiny později než lidé s ranním chronotypem (Taillard et al., 2003).

Doba spánku je v lidské společnosti silně ovlivněna sociálními stimuly, především rodinnými a pracovními nároky. Tyto sociální vlivy mohou způsobovat u lidí nedostatek spánku a indukovat časový posun jejich spánkové fáze. Z dotazníkových studií vyplývá, že většina probandů si dobu spánku o víkendu prodlužuje, do postele sice uléhají v pozdější hodinu, ale vstávají také výrazně později než v pracovní den (Monk et al., 2000). U večerních chronotypů dochází v pracovních dnech k nedostatečnému spánku kvůli pracovním povinnostem, které ruší jejich přirozenou potřebu prodlouženého spánku do dopoledních hodin, a jedinci si tento nedostatek kompenzují ve volných dnech (Vitale et al., 2015). Naopak jedinci s ranním chronotypem mají nedostatek spánku o víkendu, kdy vlivem sociálního života chodí spát v pozdější dobu. Tento rozdíl v načasování spánku mezi pracovním a víkendovým dnem se nazývá tzv. sociální jet lag. U lidí ve věku 30-49 let, s ranním i večerním chronotypem, se doba spánku o víkendech prodlužuje, ovšem u večerních typů je toto prodloužení znatelnější než u ranních typů (Paine et Gander, 2016). Stejný posun v době spánku o víkendu oproti pracovnímu týdnu je zjevný i u adolescentů. Ti vstávají o víkendu až o tři hodiny později a chodí spát cca o 1,5 hodiny později (Crowley et Carskadon, 2010). Sociální jet lag může způsobovat narušení pravidelných cirkadiánních oscilací molekulárních i biochemických procesů v organismu, a podpořit tak riziko vzniku různých nemocí včetně některých typů rakoviny, dále diabetu a aterosklerotického

kardiovaskulárního onemocnění (Rabstein et al., 2014; Papantoniou et al., 2015; Wong et al., 2015a).

Při studiu chronotypů se používá také metoda elektroencefalografie (EEG), která slouží k potvrzení rozdílů způsobených cirkadiánní a homeostatickou regulací spánku u lidí s ranním a večerním chronotypem (Dijk et Czeisler, 1995). Homeostatická regulace spánku znamená kumulaci tzv. spánkových faktorů během dne, které indukují spánek působením na spánková centra v mozku. Při spánku jejich hladina klesá exponenciálně zpět na bazální hodnotu. Nejlépe popsany endogenní spánkový faktor je adenosin, který se v průběhu bdění akumuluje a přes své receptory A1 inhibuje aktivitu cholinergních neuronů v bazálním předním mozku a středním mozku, které jsou aktivní v bdělosti (Ticho et Radulovacki, 1991; Porkka-Heiskanen et al., 1997; Strecker et al., 2000). Hlavní mozkovou strukturou regulující spánek a bdění je ventrolaterální preoptická oblast (VLPO), která je naopak aktivní během spánku (Sherin et al., 1996). Další mozkové struktury účastnící se rovnováhy spánku a bdění jsou tuberomamilární jádra, locus coeruleus, ventrální periaquaduktální šed' a laterální hypothalamus (Sherin et al., 1998; Carter et al., 2010; Lu et al., 2006; Venner et al., 2016). Homeostatická regulace spánku je měřitelná změnami v záznamu EEG. Zvýšená potřeba spánku během doby bdělosti koreluje se zvyšováním theta-alfa aktivity (5-9 Hz) (Cajochen et al., 1995).

Cirkadiánní regulace spánku vychází z aktivity SCN, neboť léze SCN způsobily u řady animálních modelů poruchy v cyklu spánku a bdění (Ibuka et al., 1980; Edgar et al., 1991; Zhang et al., 2004). Cirkadiánní vliv na regulaci spánku ukázal také experiment zkoumající vliv vyřazeného genu *Rev-erba* u myši. U těchto myši byl spánek fragmentován do krátkých úseků a ze záznamu EEG byl patrný snížený výskyt spánkových delta vln (1-4 Hz) (Mang et al., 2016).

Během spánku se cyklicky opakuje NREM (non rapid eye movement) fáze, která se rozděluje na čtyři stádia, a REM (rapid eye movement) fáze. Tyto spánkové fáze lze rozlišit na základě záznamu EEG. Pro EEG záznam v NREM spánkové fázi jsou typické pomalé neboli delta vlny (Carskadon et Dement, 2011). Studie, které se zabývaly rozdíly v cirkadiánní a homeostatické spánkové regulaci u lidí s ranním a večerním chronotypem ukázaly, že u lidí s ranním chronotypem dochází v NREM spánku k prudšímu poklesu množství pomalých spánkových vln oproti jedincům s večerním chronotypem (Mongrain et al., 2006a). U ranních chronotypů se REM stádium spánku objevovalo v minutách i procentuálně méně než u chronotypů večerních. Naproti tomu lidé ranního chronotypu se oproti večernímu nacházeli častěji v prvním NREM spánkovém stádiu. Ranní chronotypy se

během dvou posledních hodin spánku probouzely častěji než osoby s večerním chronotypem (Carrier et al., 1997). Lidé s ranním chronotypem vykazují rychlejší akumulaci aktivity delta spánkových vln v nočním i denním spánku oproti lidem s večerním chronotypem (Kerkhof et Lancel, 1991). Výzkum změny kvality spánku chronotypů po vystavení předchozímu přerušovanému spánku ukazuje vyšší pomalou spánkovou aktivitu, která se zvyšuje po spánkovém deficitu u ranních chronotypů výrazněji než u osob s večerním chronotypem (Knoblauch et al., 2002; Mongrain et Dumont, 2007). Chronotypy se mezi sebou liší také v časovém průběhu zvyšování a vymizení spánkové potřeby. U ranních chronotypů dochází v obou procesech k postupnému zvyšování či snižování potřeby spánku. Naopak u večerních chronotypů se zvýšení potřeby spánku objevuje dříve a ke snižování potřeby spánku dochází až po druhém spánkovém cyklu (Taillard et al., 2003).

Další zkoumání rozdílů mezi chronotypy umožňuje metoda aktigrafie. Tato metoda používá záznamová zařízení umístěná na těle (obvykle na zápěstí), která zaznamenávají pohybovou aktivitu jedince díky zabudovanému akcelerometru zachycujícímu zrychlení způsobené pohybem. Ze získaných dat lze určit nejen míru aktivity v určitou denní dobu, ale i efektivitu spánku či pohyby v době spánku. Efektivita spánku určuje kvalitu spánku a znamená dobu strávenou na lůžku, kdy jedinec spí. Efektivita spánku se určuje z aktigrafického záznamu pomocí počítačového programu, který dokáže rozlišit uvědomělé pohyby od klidu, který ve spánku nastává. Lidé s večerním chronotypem vykazují během pracovního týdne sníženou efektivnost spánku, která se o víkendu dostává na stejnou úroveň jako u osob s ranním a nevyhraněným chronotypem. Tyto výsledky potvrzují teorii, že večerní chronotypy kompenzují ztrátu spánku z pracovního týdne o víkendu (Martin et al., 2015; Vitale et al., 2015). Aktigrafické záznamy také ukazují, že mezi osobami s ranním a večerním chronotypem je rozdíl v akrofázi, době, kdy jedinec dosahuje maximální denní aktivity. Ranní chronotyp má akrofázi aktivity až o dvě hodiny dříve než večerní typ. Nevyhraněný chronotyp je svou akrofází aktivity mezi ranním a večerním chronotypem (Vitale et al., 2015).

Ranní a večerní chronotypy se liší v endogenním rytmu teploty a v rytmu výlevu hormonu melatoninu. U večerních chronotypů nastává minimální denní teplota těla v průměru o hodinu později než u ranních chronotypů. Po dosažení minima stoupá teplota strměji u ranních chronotypů (Taillard et al., 2003). Výzkum cirkadiálních rytmů u lidí se často provádí v tzv. konstantní rutině v laboratorních podmínkách, kdy jsou jedinci během experimentu v prostředí bez jakýchkoli podnětů z vnějšího okolí, které by mohly způsobit nežádoucí maskování endogenního rytmu. Toto prostředí umožňuje lépe studovat endogenní

cirkadiánní systém člověka (Goel et al., 2013)*. Časový rozdíl v teplotním minimu mezi extrémními chronotypy dosahuje v tomto prostředí dvou až tří hodin (Lack et al., 2009).

Endogenní cirkadiánní fáze člověka se nejčastěji stanovuje pomocí tzv. „dim light melatonin onset“ (DLMO). Probandi jsou po celých 24 hodin ve stálém šeru a podmínkách konstantní rutiny a v pravidelných časových bodech během 24 hodin se jim odebírá krev či sliny. DLMO je stanoveno jako časový bod, ve kterém přesáhne koncentrace melatoninu 3 nebo 4 pg/ml (Lewy et al., 1999; Kijzer et al., 2011). U osob s ranním chronotypem nastává DLMO dříve než u lidí s večerním chronotypem (Simpkin et al., 2014). U adolescentů je hodnota DLMO o víkendu opožděna vůči hodnotám z pracovních dnů, což podporuje výše zmíněné tvrzení o kompenzaci spánku o víkendu vlivem sociálního jet lagu (Crowley et Carskadon, 2010). Ve své studii Mongrainová a kol. (2004) určovali fázový úhel mezi DLMO a dobou minima tělesné teploty, které sloužily jako marker cirkadiánní fáze, a průměrnou dobou probouzení. Menší fázový úhel mezi parametry byl asociován s pozdějším chronotypem. U osob s večerním chronotypem bylo tedy minimum tělesné teploty blíže době probuzení než u lidí s ranním chronotypem. To ukazuje, že večerní chronotypy se probouzí vlivem sociálních tlaků v dřívější fázi svého cirkadiánního rytmu. Světelný stimul při probuzení u nich tedy dopadá hlouběji do subjektivní noci a způsobuje větší předběhnutí cirkadiánní fáze, než kdyby se probandi probouzeli díky svému přirozenému rytmu o něco později (Duffy et al., 1999; Baehr et al., 2000).

Jedinci s rozdílným chronotypem se liší i v expresi hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Rev-erba* stanovovaných v buňkách bukové sliznice. Tyto geny jsou u lidí s ranním chronotypem exprimovány dříve než u osob s chronotypem večerním. Cirkadiánní fáze genu *Per1* koreluje s fází melatoninového rytmu. Tyto výsledky jsou důkazem, že i periferní cirkadiánní systém přizpůsobuje svůj rytmus centrálně nastavenému chronotypu (Nováková et al., 2013).

2.3.3. Vznik chronotypů

Přesné příčiny vzniku odlišných chronotypů v lidské populaci zatím nejsou známy. Základní teorie hovoří o různé délce vnitřní periody mezi jednotlivci. U mladých dospělých osob, určených dotazníkem jako ranní chronotyp, byla měřením rytmu jejich tělesné teploty objevena zkrácená vnitřní perioda, která korelovala s jejich časnějším vstáváním (Duffy et al., 2001). U starších osob dochází ke změně ve vztahu mezi cirkadiánním systémem a cyklem spánku a bdění a tato jasná korelace již není zřetelná (Duffy et al., 1998; Duffy et Czesler, 2002). Rozdíly v délce periody mezi extrémními chronotypy jsou nejčastěji

přisuzovány polymorfismu centrálních hodinových genů např. *Rev-Erba* a *Per3* (Kang et al., 2015; Johansson et al., 2003). Dále se ve spojitosti se vznikem chronotypů mluví o epigenetických vlivech prostředí. Někteří vědci se domnívají, že chronotyp může být ovlivněn fotoperiodou při porodu a v časném vývoji organismu (Mongrain et al., 2006b; Vitale et al., 2015).

2.3.3.1. Chronotypy a polymorfismus hodinových genů

S výskytem různých chronotypů je asociován variabilní počet tandemových repetitiv (VNTR; z anglického „variable number tandem-repeat“) v genu *Per3*. Tento hodinový gen se vyskytuje v lidské populaci ve dvou alelách. Kratší varianta alely *Per3(4)* se vyskytuje u lidí s večerním chronotypem a má pouze 4 tandemové repetice. Naopak delší alela *Per3(5)* s pěti tandemovými repeticemi je spojována s chronotypem ranním. Polymorfismus genu *Per3* je také spojován se syndromem zpožděné spánkové fáze (Archer et al., 2003; Kunorozva et al., 2012). V lidské populaci se vyskytují dva haplotypy genu *Per3*, které způsobují změnu délky cirkadiánní periody. Tyto haplotypy jsou definovány dvěma smysl měnícími (missense) jednonukleotidovými polymorfismy (SNP; z anglického „single nucleotide polymorphism“) (Ebisawa et al., 2001; Johansson et al., 2003). Smysl měnící mutace znamenají změnu jednoho páru bází, která znamená v proteinu záměnu stávající aminokyseliny za jinou (Berger et al., 1968).

Dalším genem, který patří mezi hodinové geny, a u kterého byl také objeven polymorfismus, je *Rev-Erba*. Jeho polymorfismus byl spojen také s bipolární poruchou u lidí (Severino et al., 2009). V genu *NR1D1* (jaderný receptor podrodiny 1 skupiny D člen 1) pro *Rev-Erba* mohou existovat tři SNP. Polymorfismus rs12941497 obsahuje u večerních chronotypů relativně menší poměr basí guanin-guanin (GG) a relativně větší poměr basí adenin-adenin (AA) než chronotyp ranní a nevyhraněný. Je tedy možné, že i tento polymorfismus může ovlivňovat diurnální preferenci u lidí (Kang et al., 2015).

Další hodinový gen, který je spojen s diurnální preferencí a délkou trvání spánku je gen *Clock*. Jedinci sledovaní v americké populaci s evropskými předky, nesoucí alespoň jednu alelu genu *Clock* s SNP 3111C mají větší tendenci stát se večerním chronotypem (Katzenberg et al., 1998). Jiný polymorfismus tohoto genu (rs12649507) je také asociován s delší dobou spánku a možným vznikem večerního chronotypu, tentokrát ve východoevropské populaci (Allebrandt et al., 2010).

V genu *Per2* se může vyskytovat SNP (S662G) ovlivňující fosforylační místo proteinu. Fosforylační místo je klíčové pro CKIε, která tento protein fosforyluje a reguluje

tak délku vnitřní cirkadiánní periody (viz. kapitola 2.1.). Tato mutace se objevuje u lidí se syndromem předběhnuté spánkové fáze, kdy je zkrácená cirkadiánní perioda (Toh et al., 2001).

2.3.3.2. Chronotypy a epigenetické změny

Epigenetické mechanismy, mezi které patří metylace deoxyribonukleové kyseliny (DNA), histonové modifikace a remodelace chromatinu, mění stabilitu transkripčně-translační smyčky a mohou tak přenášet vlivy vnějšího prostředí na molekulární mechanismus generující cirkadiánní periodu a měnit její délku.

Metylace DNA ovlivňují transkripci jak pozitivně tak i negativně. Pozitivní vliv na transkripci má hypometylace na promotorech genů a metylace v downstreamových oblastech, tedy oblastech ležících blíže 3' konci DNA. Naopak snížení transkripce je způsobeno metylací promotorů (Ball et al., 2009). Rozdíly v DNA metylaci byly objeveny u monozygotních dvojčat, která vykazují odlišný chronotyp (viz. kapitola 2.5.) (Wong et al., 2015). U dalších epigenetických mechanismů nebyla zatím dokázána žádná korelace se vznikem chronotypu člověka.

Epigenetické mechanismy jsou často spojovány s vlivy vnějšího prostředí na změnu v genové expresi. Některé vnější vlivy, např. délka fotoperiody při porodu, se zkoumají v souvislosti s rozdíly v pozdější diurnální preferenci u lidí a se vznikem chronotypu (Mongrain et al., 2006). Je zajímavé, že lidé narození v ročním období s dlouhou fotoperiodou, tedy na jaře a v létě, byli určeni bodovou škálou dotazníku jako večerní či spíše večerní chronotypy. Naopak osoby narozené v době krátké fotoperiody byly určeny dotazníkem jako spíše ranní až ranní chronotypy (Natale et Adan, 1999; Tonetti et al., 2011; Harada et al., 2011).

2.4. Ontogeneze lidských chronotypů

Během ontogeneze dochází v diurnálních preferencích člověka k výrazným posunům. V Japonsku se pomocí dotazníkové studie zjistilo, že batolata a děti předškolního věku mají tendenci směřovat k rannímu chronotypu spíše než k večernímu. Ovšem stejně jako v dospělé populaci mělo největší procento dětí chronotyp nevyhraněný (Doi et al., 2015). Jiný dotazníkový výzkum však ukázal, že děti ve věku 2,5 až 3 roky mohou být výhradně řazeny mezi ranní či spíše ranní chronotyp. V této studii nebylo žádné dítě rodiči zařazeno k večernímu chronotypu (Simpkin et al., 2014).

U adolescentů se z ranního chronotypu postupně stává spíše chronotyp večerní. Z dotazníkové studie Giannottiové a kolegů (2002) vyplynulo, že adolescenti s večerním chronotypem ve věku 14 až 18 let spí ve školní dny kratší dobu, subjektivně uvádějí zhoršenou kvalitu spánku a častěji si chodí ve školních dnech během dne zdřímnout. Adolescenti s ranním chronotypem spí o víkendy kratší dobu než jejich vrstevníci s večerním chronotypem (Koscec et al., 2014). Pozdější usínání u adolescentů pozitivně koreluje se stupněm pubertálního vývoje během adolescence (Sadeh et al., 2009). Vědci nedávno objevili, že tento rozdíl může být zapříčiněn silnější odpovědí vnitřních fotoreceptorů sítnice obsahujících melanopsin, který informuje SCN o intenzitě světla. Lidé ve věku 16 až 35 let, kteří usínají později než jejich vrstevníci, vykazují signifikantně silnější odpověď gangliových buněk retiny obsahujících melanopsin, na modré světlo (430-500 nm). Tyto rozdíly v citlivosti k modrému světlu tak mohou přispívat k opožděnému usínání u lidí s večerním chronotypem (van der Meijden et al., 2016). U adolescentů lze předpokládat, že jejich tendence přibližovat se večernímu chronotypu podporují i sociální faktory. Ovšem při experimentech v laboratorních podmínkách bez vlivu vnějšího okolí, tendence k večernímu chronotypu u této věkové skupiny přetrvávaly (Sadeh et al., 2009).

Starší lidé postupně s věkem směřují k rannímu chronotypu (Carrier et al., 1997; Duffy et Czesler, 2002; Luca et al., 2015). Ovšem tento posun není způsoben zkrácením vnitřní periody. Autoři navrhují hypotézu, že změna v chronotypu u starších lidí může vycházet ze změny ve vztahu mezi cirkadiánním systémem a spánkem, kdy starší lidé mohou mít problémy s udržením spánku v některých cirkadiánních fázích (Duffy et Czesler, 2002).

2.5. Monozygotní dvojčata

Monozygotní dvojčata vznikají z dceřiných buněk jedné zygoty. Tyto dceřiné buňky se samostatně mitoticky dělí, což vede k samostatnému vývoji. Právě kvůli svému vzniku jsou monozygotní dvojčata považována za geneticky identická. Navzdory tomu se však mezi nimi nachází rozmanité fenotypické odlišnosti. Z patologického hlediska jsou tyto rozdíly patrné hlavně u vzniku psychiatrických poruch, jako jsou bipolární porucha či schizofrenie (Dempster et al., 2011; Cardno et al., 2012). Monozygotní dvojčata se stala důležitým zdrojem poznání vlivu okolního prostředí na fenotyp organismu. I po mnoha letech studování tohoto mechanismu není tento proces zdaleka objasněn. Jedním z nejstudovanějších témat u monozygotních dvojčat jsou epigenetické rozdíly. Právě epigenetika může být spojením mezi okolním prostředím a mnohými fenotypickými rozdíly. Je dokázáno, že čím jsou monozygotní dvojčata starší, tím jsou jejich epigenetické rozdíly větší (Fraga et al., 2005).

Fraga a kol. (2005) se ve své studii zabývali hlavními epigenetickými mechanismy, kterými jsou metylace DNA, acetylace histonů a u žen inaktivace jednoho z chromozomů X. Mezi sourozenci se lišily metylované sekvence DNA. Tyto rozdílné sekvence obsahovaly cytosinfosfát-guanosinové (CpG) ostrovy, tedy kumulované shluky CpG dinukleotidů, na promotorech jednokopiových genů, které se vyskytují v genomu pouze jednou. U starších monozygotních dvojčat se rozdíl v metylaci v CpG úsecích DNA jednokopiových genů vyskytovaly několikanásobně častěji než u dvojčat mladších. U monozygotních dvojčat nízkého věku, která spolu žila většinu svého života a sdílela podobný životní styl, byly změny v DNA metylaci na chromosomech minimální oproti dvojčatům starším, která spolu žila krátce k poměru svého života. U 19% monozygotních dvojčat ženského pohlaví ve věku 3 až 55 let našli rozdíl v inaktivaci chromozomu X a ve vzorci metylace DNA mezi sourozenci. Tento výsledek ukazuje na možnost vzniku těchto rozdílů již v brzkém věku monozygotních dvojčat. U 35% monozygotních dvojčat v této studii se lišily také acetylace histonů H3 a H4 mezi sourozenci. Ta dvojčata, která měla mezi sebou největší rozdíly v acetylaci, spolu žila kratší dobu nebo měla výrazně odlišnou historii nemocí. V této studii vědci sledovali také celkovou míru genové exprese, která byla u tříletých monozygotních dvojčat téměř identická a u padesátiletých dvojčat byla výrazně odlišná. Stejně výsledky byly nalezeny v různých tkáních (Fraga et al., 2005).

Diurnální preference neboli chronotyp je u lidí pravděpodobně také ovlivňován epigenetickými mechanismy. V poslední době se objevují studie dospělých monozygotních dvojčat, u kterých se sleduje vliv prostředí na vznik odlišného chronotypu. U monozygotních dvojčat ve věku 18-22 let se sice nejčastěji vyskytují chronotypy stejné, ovšem nezanedbatelné procento dvojčat má chronotyp rozdílný. Tento rozdíl je vysvětlován právě vlivem epigenetických změn v DNA člověka indukovaných vnějším prostředím (Barclay et al., 2013). Proto se vědci zajímají o podíl dědičné genetické informace a vlivu nesdíleného prostředí na vývoj chronotypu dvojčat. Nesdílené prostředí je takové, které se liší mezi sourozenci (např. škola, zaměstnání, koníčky). U mladých dospělých dvojčat mezi 19 a 35 lety a starších nad 65 let, je průměrný genetický příspěvek vzniku chronotypu 44%. Příspěvek nesdíleného prostředí činí 56%. U osob středního věku mezi 36-64 lety činí genetický příspěvek pouze 34% a vliv nesdíleného okolního prostředí je 66% (Barclay et al., 2014). Tyto výsledky podporují teorii o vlivu vnějšího prostředí na vznik chronotypu, je ale třeba tyto vnější vlivy identifikovat přesněji (Barclay et al., 2014). Podobné výsledky, kde genetický příspěvek ke vzniku diurnální preference činí méně než 50%, prezentuje ve své studii Koskenvuo a kol. (Koskenvuo et al., 2007). U monozygotních dvojčat vykazujících

rozdílný fenotyp diurnální preference není signifikantní rozdíl v celkovém počtu DNA metylací v genomu. Jsou ovšem úseky související s cirkadiánními rytmy, kde se vyskytují ostrovy CpG, které vykazují značné rozdíly v DNA metylacích u většiny sourozenců s odlišným chronotypem. Mezi tyto úseky patří například první intron genu *SRRM4*. Tento gen je hypometylovaný u dvojčat s větší tendencí k večernímu chronotypu než u jejich sourozenců (Wong et al., 2015). Nesprávná regulace exprese tohoto genu se objevuje u autistů, kteří mimo jiné často vykazují poruchy cirkadiánního rytmu (Irimia et al., 2014; Tordjman et al., 2012).

3. Cíle práce

Cílem této práce je popsat cirkadiánní fenotyp tří párů monozygotních dvojčat ve věku 8-10 let žijících ve stejném prostředí a ve sdíleném denním režimu. Děti byly pozvány do studie na základě rozhovoru s jejich rodiči, ze kterého vyplynulo, že i takto mladá dvojčata mohou vykazovat některé odlišnosti v diurnálních preferencích. Nalezení rozdílu v cirkadiánním fenotypu takových dvojčat může zúžit interval hledání možných vlivů na vznik chronotypu člověka na prenatální a raně postnatální období, a může tak být zajímavým příspěvkem k poznání podstaty vývoje různých lidských chronotypů.

4. Metodický přístup

4.1. Subjekty

V únoru roku 2013 byl proveden experiment s párem sedmiletých chlapců, jehož cílem bylo zjistit, zda rytmus melatoninu měřený ve slině, koreluje svou fází s rozdílnou diurnální preferencí obou chlapců dle výpovědi matky. Stejný pár monozygotních dvojčat byl pozván do experimentu v roce 2015 spolu s další dvojicí chlapců a jednou dvojicí dívek. Věkové rozmezí dvojic v tomto experimentu bylo 8-10 let. Rodiče dětí podepsali informovaný souhlas (viz. příloha č. 1), ve kterém byly uvedeny základní informace o výzkumu včetně možných rizik. Tato studie byla schválena etickou komisí Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy (číslo 2015/23).

U všech dětí byl sledován rytmus v hladině melatoninu ve slině jako markeru fáze cirkadiánního pacemakeru, a aktivita dětí byla měřena náramkovým aktigrafickým zařízením. Rozdíl v diurnální preferenci, zjišťovaný dotazníkem, byl korelován s fází cirkadiánního pacemakeru. Pro kontrolu synchronizace jejich cirkadiánního systému s vnějším prostředím byl testován také jeden z rodičů.

4.2. Dotazník

Pro předběžné určení chronotypů u probandů byl zvolen dotazník „The Children’s Chronotype Questionnaire (CCTQ)“ (příloha č. 2; Werner et al., 2009), jehož základem jsou dotazníky „Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ)“ (Roenneberg, 2004) a „Mornigness and Eveningness Scale for Children (MESOC)“ (Carscadon et al., 1993). CCTQ je určen pro děti od 4 do 11 let. Dotazník byl vyplněn rodiči dětí před prvním odebráním vzorků slin.

Základní otázky dotazníku jsou rozříděny do dvou kategorií, a to na ty, které zjišťují aktivitu a spánek dítěte ve školní den a ve volných dnech. Další otázky jsou spíše kontrolní a dotazník poskytuje rodičům také možnost subjektivního zhodnocení chronotypu svých dětí. Bodová škála dotazníku rozděluje děti do tří kategorií. Ranní chronotyp je určen 23 a méně body, od 24 bodů do 32 bodů je rozmezí pro nevyhraněný chronotyp a od 33 bodů výše je určován chronotyp večerní.

4.3. Stanovení melatoninu

4.3.1. Sběr vzorků slin

Vzorky slin se odebíraly do plastových 5 ml zkumavek. Tyto zkumavky byly nadepsány písmenem abecedy A až C, číslem 1, 2 a 3 a časem odběru. Písmena rozlišovala jednotlivé rodiny mezi sebou. Číslo 1, 2 a 3 byla označením jednotlivých členů rodiny. Matka měla pokaždé číslo 1 a svým dětem určila číslo 2 a 3. Tato čísla zůstávala po celou dobu studie stejná.

Probandi odebírali vzorky slin po dobu 24 hodin, a to v létě, v posledních dvou týdnech v červnu, a v zimě, ve druhém a třetím týdnu v prosinci. Odběry probíhaly v domácím prostředí rodin. V létě byly vzorky sbírány v osmi časových bodech (19, 21, 23, 01, 03, 06, 09, 14). Oproti tomu v zimě bylo časových bodů devět (19, 21, 23, 01, 03, 06, 08, 14, 17). Vzorky slin se odebíraly od matky a od obou dětí. Během 24 hodin odběru vzorků nesměli účastníci pít kávu, jíst banány a čistit si zuby zubní pastou. Při nočních odběrech se nesmělo svítit umělým osvětlením. Zkumavky se vzorky byly po každém sběru pečlivě uzavřeny parafilmem a okamžitě dány do mrazáku. Po skončení odběrů se zkumavky převážely v suchém ledu a byly uloženy v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby dalšího zpracování.

4.3.2. Stanovení koncentrace melatoninu

Pro stanovení koncentrace melatoninu ve vzorcích slin byla použita metoda radioimunoeseje (RIA) značky Bühlman (Direct Saliva RIA).

Zkumavky pro vzorky byly nadepsány čísla od 1 do 345, zkumavky pro kalibrační řadu byly popsány písmeny A až E. Písmenem T byly nadepsány zkumavky s totálním množstvím radioaktivity. Zkumavky označeny písmeny NSB určovaly nespecifickou vazbu a ve zkumavkách označených MB byla měřena maximální vazba. Dále byly nadepsány zkumavky se specifickou koncentrací melatoninu CL (nízká koncentrace) či CH (vysoká koncentrace).

4.3.2.1 Příprava kalibrační řady

Jako první krok bylo třeba rozpustit lyofilizované vzorky kalibrační řady a lyofilizované vzorky s nízkou a vysokou hladinou melatoninu. Tyto vzorky byly součástí zakoupeného kitu. Do každé lahvičky s lyofilizovaným vzorkem jsme přidali 5 ml inkubačního pufru. Vzorky kalibrační řady se inkubovaly minimálně třicet minut. Vzorky se specifickou koncentrací melatoninu se inkubovaly nejméně dvě hodiny. Takto rozpuštěné vzorky se po inkubaci a těsně před použitím řádně promíchaly pomocí vortexu.

Kalibrační vzorky byly dány do zkumavek (A-E) v objemu 400 μ l. Poté byla přidána anti-melatoninová protilátka (100 μ l). Dále bylo přidáno 100 μ l 125 I – melatoninu. Do zkumavek označených NSB bylo přidáno 500 μ l inkubačního pufru a poté 100 μ l značeného melatoninu. Do zkumavek MB bylo dáno 400 μ l inkubačního pufru, poté byla přidána anti-melatoninová protilátka v objemu 100 μ l a nakonec bylo dodáno 100 μ l značeného 125 I – melatoninu. Do zkumavek s nízkou a vysokou koncentrací melatoninu bylo přidáno 400 μ l odpovídajícího vzorku, dále bylo přidáno 100 μ l anti – melatoninové protilátky a nakonec byl přidán značený melatonin v objemu 100 μ l. Do zkumavek, kde byla následně měřena totální radioaktivita, byl dán pouze 125 I – melatonin v množství 100 μ l. Tyto zkumavky označeny písmenem T se poté uzavřely parafilmem, jelikož u nich další kroky metody neprobíhaly a vzorky byly použity až k měření. Ostatní zkumavky se promíchaly pomocí vortexu a poté se všechny zkumavky daly spolu se vzorky slin inkubovat na 20 ± 1 hodin při teplotě $2 - 8$ °C.

Do kalibračních zkumavek se po inkubaci přidávalo 100 μ l sekundární protilátky, která se promíchávala pomocí magnetického míchadla po celou dobu odebrání. Sekundární protilátka se nepřidávala do zkumavek s totální radioaktivitou (T zkumavky). Po přidání sekundární protilátky se vzorky promíchaly pomocí vortexu. Následně se vzorky inkubovaly

po dobu 15 minut ve 2 – 8 °C. Po inkubaci byl do všech vzorků, kromě zkumavek označených T, přidán 1 ml deionizované vody ochlazené na 2 – 8 °C.

Kalibrační zkumavky se, stejně jako vzorky slin, stáčely v chlazené centrifuze po dobu 4 minut při teplotě 2 – 8 °C při 2000 x g. Po stočení, kdy se vytvořila pevná peleta, se supernatant odsál vodní vývěvou. Supernatant se neodsával u zkumavek s totální radioaktivitou. Kalibrační řada se měřila po dobu 2 minut na přístroji zaznamenávajícím gama záření (Berthold LB2111; Beckman Coulter).

4.3.2.2. Příprava a měření vzorků slin

Zkumavky se vzorky slin, které byly do této doby uloženy v teplotě – 80 °C, se nechaly roztát. Aby tání probíhalo rychleji, zkumavky se vzorky byly uloženy do vodní lázně vyhřáté na 35 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Zkumavky ve vodní lázni zůstaly dostatečně dlouho, aby se vzorek rozpustil, ale zároveň se neohříval. Proto byly všechny zkumavky po celý čas kontrolovány. Roztáté vzorky byly postavené do stojánek uložených na ledu.

Vzorky byly stočeny v chlazené centrifuze (5 °C) po dobu pěti minut na 3340 otáček za minutu (rpm). Některé vzorky musely být stáčeny dvakrát kvůli vysoké viskozitě. Po stočení bylo z každé zkumavky odebráno dvakrát 400 μl . Vzorky se měřily v dubletech. V některých zkumavkách, hlavně z nočních odběrů dětí, bylo menší množství slin, a proto se odebíralo místo 400 μl i 200 μl , 150 μl nebo 100 μl . Vzorky byly uloženy ve stojáncích na ledu až do dalšího postupu.

Do zkumavek se vzorky slin bylo přidáno 100 μl antiséra neboli anti – melatoninové protilátky. Objem 100 μl byl platný pro vzorky slin s objemem 400 μl . Do vzorků s jiným objemem (200 μl , 150 μl , 100 μl) byl přidán přepočtený objem 50 μl , 37,5 μl a 25 μl antiséra. Dále bylo přidáno 100 μl melatoninu označeného ^{125}I do vzorků o objemu 400 μl . Pro změněné objemy platily stejné přepočty jako u antiséra. Aby se obsah správně smísil, vzorky byly důkladně promíchány pomocí vortexu. Melatonin ve vzorku a ^{125}I -melatonin spolu kompetovaly o vazbu k protilátce. Aby tato reakce mohla proběhnout, po přidání antiséra a značeného melatoninu se vzorky inkubovaly 20 ± 1 hodin při teplotě 2 – 8 °C.

Po inkubaci vzorků byla přidána sekundární protilátka. Sekundární protilátka se nejdříve promíchala pipetou a poté byla po celou dobu tohoto kroku míchána pomocí magnetického míchadla, aby se její pevná složka neusazovala na dně a mohla být rovnoměrně odebírána pipetou. Vzorky byly opět uloženy na ledu. Sekundární protilátka byla přidávána za stálého míchání v množství 100 μl k 400 μl vzorku slin. Pokud byl objem menší, tedy 200 μl , 150 μl a 100 μl , bylo i množství sekundární protilátky přepočteno.

Objemy sekundární protilátky pro zmenšené objemy vzorků slin byly stejné jako v případě anti – melatoninové protilátky (50 μ l, 37,5 μ l a 25 μ l). Tato sekundární protilátka na sebe vázala pevnou fázi, proto se vytvořila pevná peleta, ze které se poté mohla měřit radioaktivita vázaného 125 I-melatoninu. Po přidání sekundární protilátky se každý vzorek řádně promísil pomocí vortexu. Dále se veškeré vzorky inkubovaly po dobu 15 minut v 2 – 8 °C. Po inkubaci se do zkumavek se vzorky přidal 1 ml deionizované vody chlazené na 2 – 8 °C. Množství 1 ml platilo pro výchozí vzorky slin o objemu 400 μ l. Pro menší objemy (200 μ l, 150 μ l a 100 μ l) bylo množství deionizované vody přepočítáno na 500 μ l, 375 μ l a 250 μ l.

Všechny vzorky se poté stáčely v chlazené centrifuze (2 – 8 °C) po dobu 4 minut a 2000 x g. Tímto krokem se vytvořila na dně pevná peleta a nad ní supernatant, který byl následně odsán vodní vývěvou. Získaná peleta byla měřena pomocí přístroje měřícího gama záření (Berthold LB2111; Beckman Coulter).

4.4. Měření aktivity probandů

Aktivita u dvojčat a jejich matek se měřila pomocí aktigrafů. Aktivita byla měřena v létě po dobu jednoho týdne a v zimě dva týdny včetně víkendů.

4.4.1. Měření aktivity v létě

V červnu byly zapůjčeny aktigrafy ACTIWATCH z Národního ústavu duševního zdraví (NÚDZ). Probandi nosili aktigraf na zápěstí nedominantní ruky po dobu jednoho týdne a dvou víkendů. Aktigrafy typu ACTIWATCH nejsou vodě odolné, proto děti přístroje odkládaly před koupáním a sprchováním. Aktivita probanda byla měřena piezoelektrickým akcelerometrem. Ten obsahoval piezoelektrický krystal, který vytvářel náboj úměrný síle, která působila na objekt a která vznikala akcelerací. Do přístroje se ukládaly informace o intenzitě pohybu ve všech směrech a o jeho trvání. Maximální vzorkovací frekvence byla 32 Hz. Citlivost přístroje umožňuje zaznamenávat veškerý pohyb nad 0.05 g. Záznam aktivity byl ukládán po 30 sekundách. Záznamy z těchto aktigrafů byly stahovány do počítače pomocí čtecí jednotky (Cambridge Neurotechnology Ltd). U chlapeckého páru dvojčat rodiny C záznam letního měření aktivity chybí z důvodu poškození aktigrafů.

4.4.2. Měření aktivity v zimě

V prosinci byly zapůjčeny z NÚDZ aktigrafy verze 1.2 vyrobené firmou Mindpax. Rodiny dostaly náramky a dokovací stanice, které stahovaly data z náramků bezdrátovou technologií bluetooth jednou za čtyři hodiny, pokud byl náramek v dosahu stanice. Tuto

komunikaci obstarával čip v náramku a přijímač v dokovací stanici. Náramek zaznamenává aktivitu pomocí akcelerometru LIS3DH, který zaznamenává pohyb ve třech osách v rozmezí frekvence od 1Hz až do 5kHz. Záznam aktivity probíhal po cca 30 sekundách. Náramky byly voděodolné.

4.5. Pilotní pokus z roku 2013

V roce 2013 jsme stanovovali hladinu hormonu melatoninu u rodiny A pomocí metody RIA (postup viz. kap. 4.3.2.). Odběry vzorků slin probíhaly v devíti časových bodech (19, 22, 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19). Rodiče dvojčat nevyplňovali žádný dotazník a dětem nebyla měřena aktivita.

4.6. Analýza Dat

4.6.1. Analýza výsledků stanovení melatoninu metodou RIA

Přístroj Berthold LB2111 změřil ve vzorcích slin hodnotu radioaktivního záření v jednotkách cpm (z anglického counts per minute). Nejdříve jsme od všech čísel odečetli hodnotu nespecifické vazby NSB (vzorec č. 1). Dále jsme z těchto upravených hodnot x pomocí maximální vazby MB vypočetli vazbu melatoninu v procentech v každém vzorku (vzorec č. 2). Dále jsme v programu GraphPad Prism 6 spočítali logaritmovanou koncentraci. V programu jsme použili logaritmované hodnoty vazby v kalibračních vzorcích a přiřadili k nim jejich hodnoty cpm. Dále jsme dosadili dříve vypočítané vazby ve vzorcích a pomocí lineární regrese jsme našli interpolované logaritmované hodnoty koncentrace c, ze kterých jsme stanovili koncentraci C (pg/ml) (vzorec č. 3), ze které jsme v každém časovém bodě vypočetli aritmetický průměr z dubletů a poté vynesli do grafů uvedených níže na obr. č. 3 – 9. Pro kosinorovou analýzu byla vypočítána procenta z maximální hodnoty.

$$x = \text{cpm} - \text{NSB cpm} \quad (\text{vzorec č. 1})$$

$$\% \text{ vazby} = (x/\text{MB cpm} - \text{NSB cpm}) * 100 \quad (\text{vzorec č. 2})$$

$$C = 10 * \log c \quad (\text{vzorec č. 3})$$

4.6.2. Analýza záznamů pohybové aktivity

Aktigrafický záznam byl snímán po 30 vteřinách. Tento původní záznam (viz. příloha 3) byl převeden do číselné formy a tyto hodnoty byly sečteny tak, abychom získali záznam po 15 minutách. Poté jsme vypočetli aritmetický průměr z každé čtvrt hodiny ze

všedních dnů a zvláště z víkendových dnů a vypočetli střední chybu průměru (S.E.M.). Z těchto vypočítaných hodnot jsme poté vypracovali grafy uvedené níže na obr. č. 13 - 20. Pro kosinorovou analýzu byla vypočítána procenta z maximální hodnoty každého dne.

4.6.3. Statistické zpracování

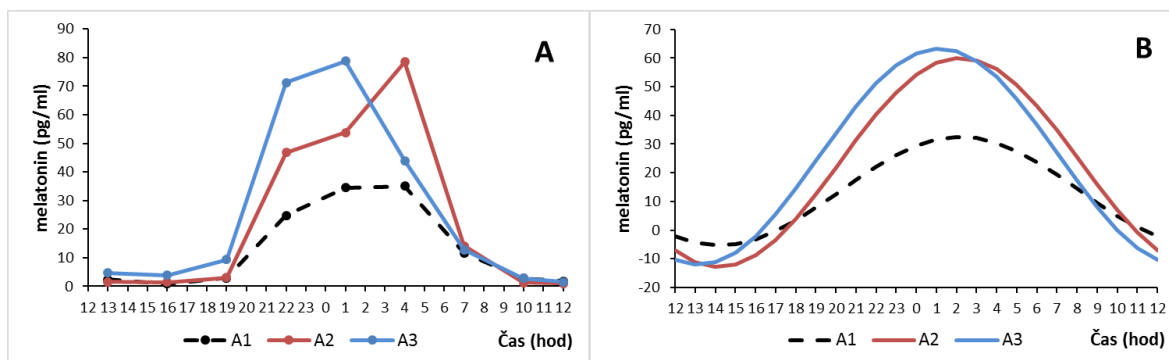
Fázový rozdíl v rytmu melatoninu ve slině mezi dvojčaty a mezi létem a zimou byl stanoven na základě porovnání akrofáze získané kosinorovou analýzou dat. Profily byly analyzovány dvoucestnou ANOVA. Lineární závislosti mezi srovnávanými parametry byly ověřeny Pearsonovým korelačním koeficientem.

Statistická analýza aktigrafických záznamů byla prováděna multiple t-testem se Sidak-Bonferonni post-hoc testem. Záznamy, které se signifikantně lišily alespoň v jednom bodě, byly porovnávány Wilcoxonovým nepárovým testem.

5. Výsledky

5.1. Rytmus melatoninu ve slinách dvojčat rodiny A z roku 2013

V únoru roku 2013 bylo provedeno stanovení rytmu melatoninu ve slinách u sedmiletých dvojčat, jejichž matka uváděla, že chlapec A2 má tendenci chodit spát později než jeho bratr a bývá ráno unavenější. Jinými slovy, uváděla fázový rozdíl v subjektivní ospalosti mezi dvojčaty žijícími ve stejném prostředí a ve stejném časovém režimu. Z našich měření vyplynulo, že hladina melatoninu se u obou dvojčat lišila v době své akrofáze. Kosinorová analýza ukázala, že u dvojčete A2 byla akrofáze rytmu melatoninu ve 2:12 hod a u jeho sourozence A3 byla akrofáze rytmu melatoninu v 1:09 hod. Fázový posun mezi těmito dvěma akrofázemi byl 1,03 hod. Akrofáze rytmu melatoninu jejich matky nastala ve 2:11 hod, blížila se tedy svou fází výrazně k chlapci A2. Mesor rytmu melatoninu ve slině ukázal také přibližně hodinový rozdíl mezi oběma dětmi, u chlapce A2 nastal v 8 hodin a 11 minut a u chlapce A3 v 7 hodin a 9 minut. Mesor rytmu melatoninu matky byl stejně jako u chlapce A2 v 8 hodin a 11 minut. Ačkoliv dvoucestná ANOVA nenalezla významný rozdíl mezi rytmy melatoninu u obou chlapců, fázové posuny mezi akrofázemi a časy, kdy bylo dosaženo střední hodnoty rytmu melatoninu, naznačily, že časnější chronotyp pozorovaný u chlapce A3 může být podpořen i fázovým předběhnutím jeho rytmu v produkci melatoninu oproti jeho bratru. Matka se blížila svou akrofází melatoninu i dobou jeho mesoru dítěti s nevyhraněným chronotypem A2 (obr. č. 3).



Obr. č. 3: Rytmus melatoninu u rodiny A v únoru 2013. V grafu A jsou vyneseny koncentrace melatoninu (pg/ml) během 24 hodin. Graf B znázorňuje data z grafu A analyzovaná kosinorovou metodou. Hodnoty melatoninu v grafu B jsou vyneseny jako procenta z maximální koncentrace melatoninu u každého subjektu. Akrofáze melatoninového rytmu subjektu A3 (ranní chronotyp) nastává dříve než u subjektu A2 (nevyhraněný chronotyp). Akrofáze rytmu melatoninu matky A1 byla blíže dítěti s nevyhraněným chronotypem.

5.2. Stanovení chronotypů dětí dle dotazníků CCTQ

Validovaný dotazník CCTQ určuje děti s body v rozmezí mezi 10 – 23 jako ranní chronotyp, v rozmezí mezi 24 – 32 jako nevyhraněný chronotyp a v rozmezí bodů mezi 33 – 49 jako večerní chronotyp. U monozygotních dvojčat rodiny A, vyšlo v dotazníku dítě A3 jako ranní chronotyp s počtem bodů 23, jeho sourozenec A2 byl zařazen s 28 body do nevyhraněného chronotypu. Děti rodiny B se ve výsledcích dotazníku také lišily. Dítě B2 bylo dotazníkem zařazeno do nevyhraněného chronotypu s počtem 31 bodů. Jeho sourozenec, dítě B3, bylo určeno jako chronotyp večerní s 37 body. Obě děti rodiny C byly určeny jako chronotyp nevyhraněný, s tím, že dítě C2 s 30 body bylo na jednom konci bodového spektra pro tento chronotyp oproti dítěti C3, které bylo se svými 25 body na opačném konci bodovací škály než jeho sourozenec. Součástí dotazníku bylo vymezení obvyklého času usínání a probouzení jednotlivých dětí, rozdělené na školní a víkendový den (tab. č. 1).

Tab. č. 1: Parametry uvedené v dotazníku CCTQ.

Subjekt	A2	A3	B2	B3	C2	C3
Věk	10	10	9	9	8	8
Pohlaví	M	M	Ž	Ž	M	M
Body z „CCTQ“	28	23	31	37	30	25
	<i>Školní den</i>					
Čas usínání	20:30	20:30	20:30	20:30	20:30	20:30
Čas vstávání	07:00	07:00	07:00	07:00	06:30	06:30
	<i>Víkend</i>					
Čas usínání	22:00	22:00	21:45	21:45	21:30	21:30
Čas vstávání	07:20	07:20	07:45	08:00	08:30	08:30

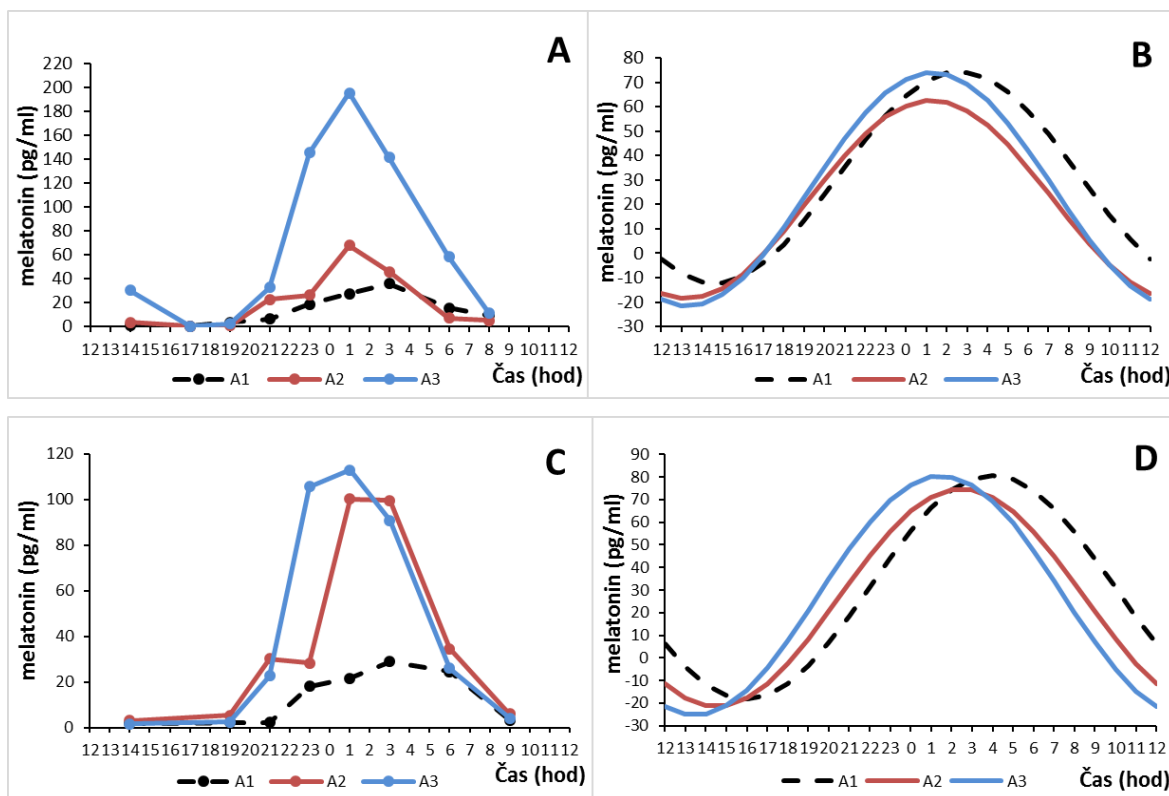
5.3. Výsledky měření hladiny melatoninu

Hladina melatoninu byla stanovena pomocí metody RIA u dvojčat a jejich matek v létě a v zimě. Naměřené hodnoty byly srovnávány:

- A) mezi sourozenci v obou ročních obdobích
- B) mezi létem a zimou ve školním dnu a o víkendu
- C) s výsledky dotazníku CCTQ

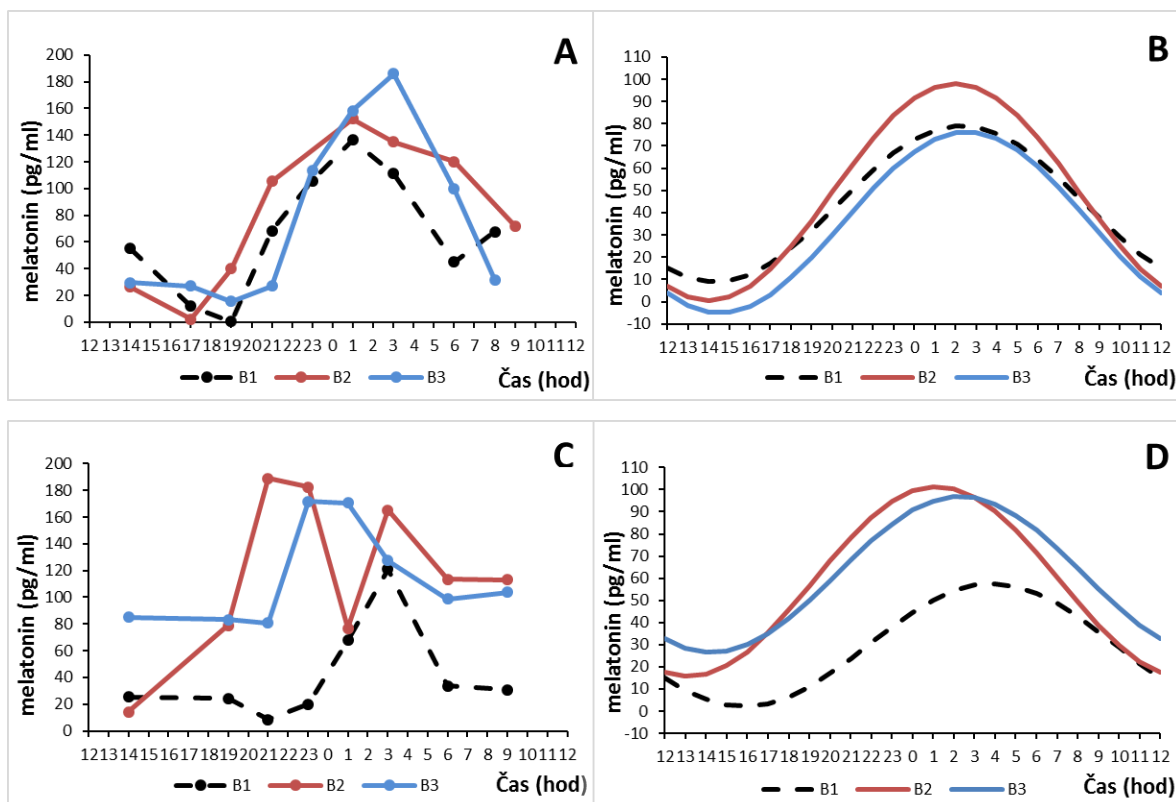
5.3.1. Srovnání rytmu melatoninu mezi dvojčaty

U rodiny A se dvojčata A2 a A3 lišila jak v akrofázi melatoninu, tak v době jeho mesoru. Dvoucestná ANOVA odhalila signifikantní rozdíl rytmu v produkci melatoninu v obou ročních obdobích ($P < 0,0001$), a rozdíl mezi profily obou dětí v létě ($P = 0,0009$). Doba mesoru probanda A3 byla v zimě fázově předběhnuta o 0,408 hodiny před sourozencem A2. Rozdíl mezi akrofázemi činil pouze 0,052 hodiny a v tomto případě byl předběhnutý proband s nevyhraněným chronotypem A2 vůči probandovi s ranním chronotypem A3 (obr. č. 4 A, B; tab. č. 2). V létě byl v obou parametrech předběhnutý proband A3, jakožto ranní chronotyp, vůči svému sourozenci s nevyhraněným chronotypem A2. Rozdíl mezi probandem A2 a A3 v mesoru melatoninu činil 1,038 hodiny a v akrofázi melatoninu byl rozdíl 1,025 hodiny (obr. č. 4 C, D; tab. č. 2). Matka A1 se svou akrofází a časem mesoru přibližovala, podobně jako v experimentu v roce 2013, spíše k dítěti s nevyhraněným chronotypem, a to v obou ročních obdobích (obr. č. 4; tab. č. 2).



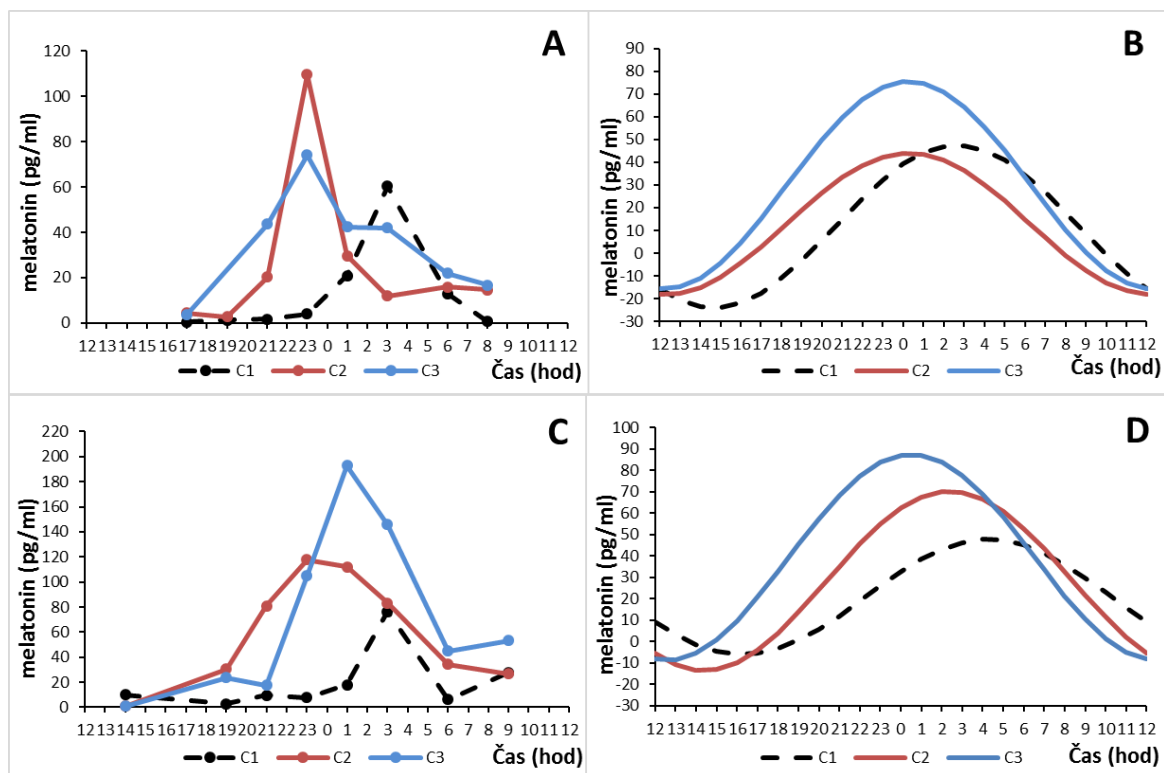
Obr. č. 4: Rytmus melatoninu v zimě (A, B) a v létě (C, D) u rodiny A. Grafy A a C znázorňují koncentraci melatoninu (pg/ml) během 24 hodin. Grafy B a D reprezentují data z grafů A a C analyzovaná kosinorovou metodou. Hodnoty grafů B a D představují procenta z maximální hodnoty koncentrace melatoninu u každého subjektu v danou roční dobu. Akrofáze melatoninu se mezi dvojčaty A2 a A3 lišila v zimě i v létě (B, D). Větší rozdíl mezi probandem s ranním chronotypem A3 a probandem s nevyhraněným chronotypem A2 byl v létě (C, D). Akrofáze melatoninu u matky A1 byla v létě i v zimě blíže k akrofázi dítěte s nevyhraněným chronotypem A2.

Mezi dvojčaty B2 a B3 byl také rozdíl v čase mesuru i v akrofázi melatoninu v létě i v zimě. Dvoucestná ANOVA odhalila signifikantní rozdíl rytmu v produkci melatoninu v obou ročních obdobích ($P < 0,0001$), avšak žádný rozdíl mezi profily obou dětí v létě a v zimě. Přesto měl v zimě subjekt s večerním chronotypem B3 čas mesuru i akrofázi melatoninu fázově opožděné oproti jeho sourozenci s nevyhraněným chronotypem B2. Rozdíl v čase mesuru melatoninu byl 1,412 hodiny a rozdíl v době akrofáze melatoninu činil 0,525 hodiny (obr. č. 5 A, B; tab. č. 2). V létě byl rozdíl v čase mesuru rytmu melatoninu 0,643 hodiny, kdy subjekt s večerním chronotypem B3 byl opět opožděný vůči svému sourozenci s nevyhraněným chronotypem. V létě měl subjekt B3 akrofázi melatoninu opožděnou o 0,643 hodiny než jeho sourozenec B2 (obr. č. 5 C, D; tab. č. 2). Matka B1 byla v létě svou akrofázi a dobou mesuru melatoninu blíže dítěti s večerním chronotypem B3, naopak v zimě byla parametry svého melatoninového rytmu blíže dítěti s nevyhraněným chronotypem B2 (obr. č. 5; tab. č. 2).



Obr. č. 5: Rytmus melatoninu v zimě (A, B) a v létě (C, D) u rodiny B. Grafy A a C znázorňují koncentraci melatoninu (pg/ml) během 24 hodin. Grafy B a D znázorňují data z grafů A a C analyzovaná kosinorovou metodou. Hodnoty vynesené v grafech B a D vyjadřují procenta z maximální hodnoty koncentrace melatoninu u každého subjektu v danou roční dobu. Subjekt s večerním chronotypem B3 má v zimě i v létě akrofázi melatoninu opožděnou oproti svému sourozenci s nevyhraněným chronotypem B2.

I u páru dvojčat rodiny C byly zaznamenány v létě i v zimě rozdíly v akrofázi melatoninu i v době mesoru melatoninu. Dvoucestná ANOVA odhalila signifikantní rozdíl rytmu v produkci melatoninu v obou ročních obdobích ($P < 0,0001$), a rozdíl mezi profily obou dětí v létě ($P = 0,0036$) i v zimě ($P < 0,0001$). V zimě měl akrofázi melatoninu i jeho mesor zpožděn proband C3 se spíše ranním chronotypem. Rozdíl však činil pouze 0,02 hodiny (obr. č. 6 A, B; tab. č. 2). V létě měl naopak proband se spíše večerním chronotypem C2 akrofázi melatoninu i jeho mesor o 1,853 hodinu fázově předběhnoutou oproti sourozenci C3 (obr. č. 6 C, D; tab. č. 2). V zimě měla matka C1 čas mesoru melatoninu i jeho akrofázi blíže k dítěti se spíše ranním chronotypem C3. Naopak v létě měla matka C1 akrofázi melatoninu i dobu jeho mesoru blíže k dítěti se spíše večerním chronotypem C2 (obr. č. 6; tab. č. 2).



Obr. č. 6: Rytmus melatoninu v zimě (A, B) a v létě (C, D) u rodiny C. Grafy A a C znázorňují koncentraci melatoninu (pg/ml) během 24 hodin. Grafy B a D vyjadřují data z grafů A a C analyzovaná kosinorovou metodou. Hodnoty v grafech B a D jsou vyneseny v procentech z maximální hodnoty koncentrace melatoninu každého subjektu v danou roční dobu. V zimě byl rozdíl mezi probandem C2 a C3 v akrofázi melatoninu i v jeho době mesoru pouze minimální. Naopak v létě byl mezi těmito dvojčaty rozdíl v akrofázi melatoninu i v době jeho mesoru znatelný. Matka se těmito měřenými parametry v zimě blížila k dítěti C3 a v létě k dítěti C2.

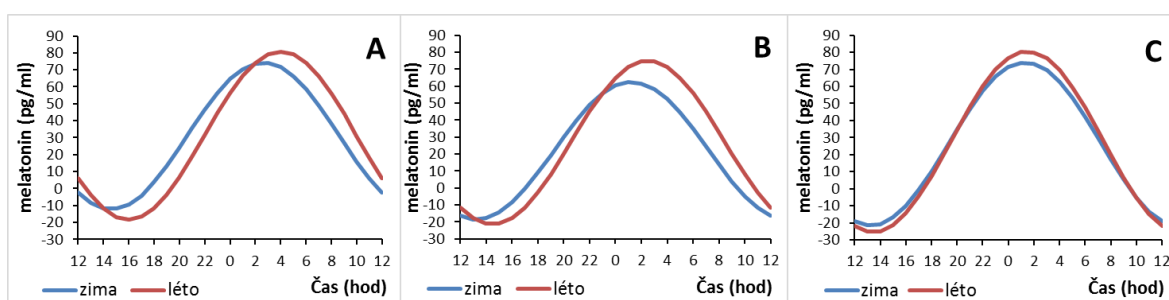
Tab. č. 2: Parametry rytmu melatoninu stanovené kosinorovou analýzou.

	A1-léto	A2-léto	A3-léto	$\Delta\Phi$ A3(A2)	A1-zima	A2-zima	A3-zima	$\Delta\Phi$ A3(A2)
Mesor	31,23	26,72	27,50		31,07	21,99	26,26	
čas mesoru (hod)	9,98	8,50	7,46	1,04	8,63	7,24	6,84	0,41
Amplituda	49,58	48,14	53,03		43,26	40,57	47,80	
Akrofáze	3,98	2,50	1,47	1,03	2,62	1,24	1,29	-0,05
	B1-léto	B2-léto	B3-léto	$\Delta\Phi$ B3(B2)	B1-zima	B2-zima	B3-zima	$\Delta\Phi$ B3(B2)
Mesor	29,84	58,56	61,72		43,94	49,24	35,67	
čas mesoru (hod)	9,85	7,17	7,82	-0,64	8,30	8,01	9,43	-1,41
Amplituda	27,67	42,90	22,35		35,16	48,85	40,58	
Akrofáze	3,85	1,17	1,82	-0,64	2,30	2,02	2,54	-0,53
	C1-léto	C2-léto	C3-léto	$\Delta\Phi$ C3(C2)	C1-zima	C2-zima	C3-zima	$\Delta\Phi$ C3(C2)
Mesor	22,81	28,47	39,40		11,66	12,86	29,97	
čas mesoru (hod)	2,94	8,38	6,53	1,85	8,65	6,26	6,28	-0,02
Amplituda	11,93	41,91	48,15		35,70	31,07	45,47	
Akrofáze	4,28	2,38	0,53	1,85	2,65	0,26	0,28	-0,02

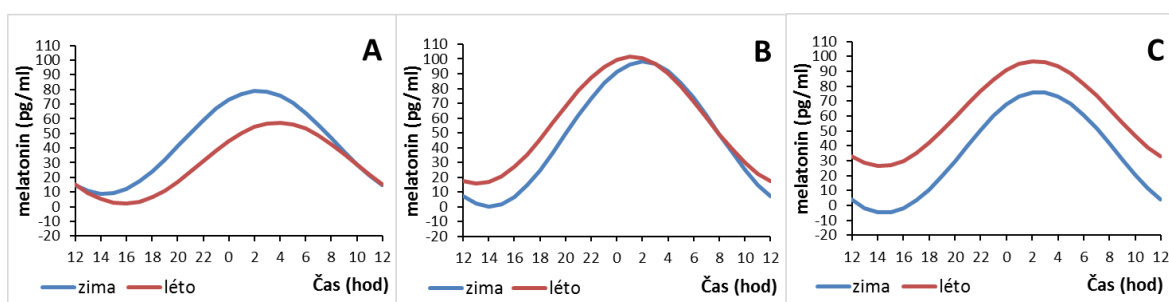
Mesor (střední hodnota rytmu) je vyjádřen v % maximální naměřené hladiny. Čas mesoru – doba nalezená interpolací procentuální hodnoty mesoru proti časové ose v kosinorové analýze. Amplituda rytmu je vyjádřena v % maximální naměřené hladiny melatoninu, akrofáze je doba maximální hladiny melatoninu. $\Delta\Phi$ = fázový posun (hod); pozitivní hodnoty $\Delta\Phi$ znamenají fázové předběhnutí probanda 3 vůči probandovi 2, negativní hodnoty znamenají fázové zpoždění probanda 3 vůči probandovi 2.

5.3.2 Srovnání rytmu melatoninu mezi létem a zimou

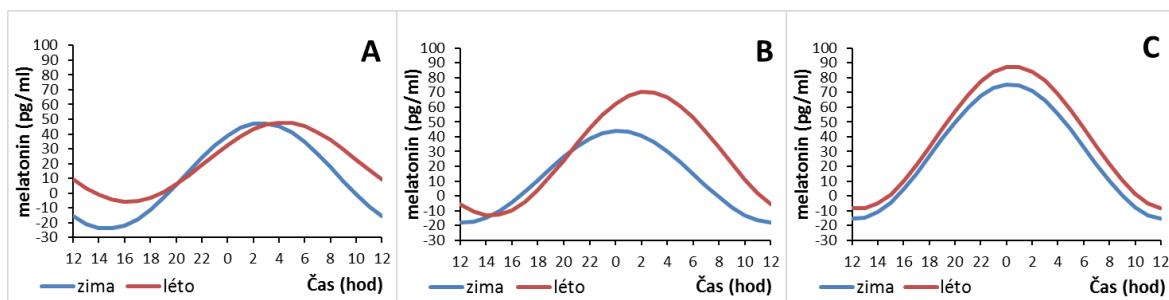
Ze srovnání rytmů melatoninu mezi létem a zimou vyplývá, že profily téměř všech pokusných subjektů se liší. Dvoucestná ANOVA odhalila významný rozdíl v letním a zimním profilu chlapce A2 ($P = 0,0489$) (obr. č. 7 B), dvou členů rodiny B (B1: $P < 0,0001$; B2: $P < 0,0001$) (obr. č. 8 A, B) a všech členů rodiny C (C1-C3: $P < 0,0001$) (obr. č. 9). Tento rozdíl je daný zejména fázovými posuny mezi rytmy a amplitudou rytmů, překvapivě nikoliv délkou melatoninového signálu. Z fázových posunů akrofáze i doby mesoru zobrazených v tabulce č. 3 vyplývá, že u většiny subjektů je rytmus melatoninu v létě fázově opožděn oproti rytmu melatoninu v zimě. Výjimku tvoří pouze děti rodiny B, u nichž je profil melatoninu v létě extrémně široký.



Obr. č. 7: Srovnání rytmu melatoninu mezi létem a zimou u rodiny A. V grafech jsou hodnoty koncentrace melatoninu analyzované kosinorovou metodou vyneseny v procentech z maximální koncentrace melatoninu u každého jedince v určitou roční dobu. Graf A znázorňuje rytmus melatoninu matky A1, graf B znázorňuje rytmus melatoninu dítěte s nevyhraněným chronotypem A2 a graf C znázorňuje rytmus melatoninu dítěte s ranním chronotypem A3. Dvoucestná ANOVA prokázala signifikantní rozdíl pouze u probanda A2 ($P = 0,0489$).



Obr. č. 8: Srovnání rytmu melatoninu mezi létem a zimou u rodiny B. V grafech jsou hodnoty koncentrace melatoninu analyzované kosinorovou metodou vyneseny v procentech z maximální koncentrace melatoninu u každého jedince v určitou roční dobu. V grafu A je zobrazen rytmus melatoninu matky B1, v grafu B je zobrazen rytmus melatoninu probanda s nevyhraněným chronotypem B1 a v grafu C je zobrazen rytmus melatoninu probanda s večerním chronotypem B3. Dvoucestná ANOVA prokázala signifikantní rozdíl u probandů B1 ($P < 0,0001$) a B2 ($P < 0,0001$).



Obr. č. 9: Srovnání rytmu melatoninu mezi létem a zimou u rodiny C. V grafech jsou hodnoty koncentrace melatoninu analyzované kosinorovou metodou vyneseny v procentech z maximální koncentrace melatoninu u každého jedince v určité roční době. Na grafu A je ukázán rytmus melatoninu u matky C1. Na grafu B je ukázán rytmus melatoninu probanda se spíše večerním chronotypem C2 a na grafu C je ukázán rytmus melatoninu probanda se spíše ranním chronotypem C3. U všech členů rodiny C prokázala dvoucestná ANOVA signifikantní rozdíl ($P < 0,0001$).

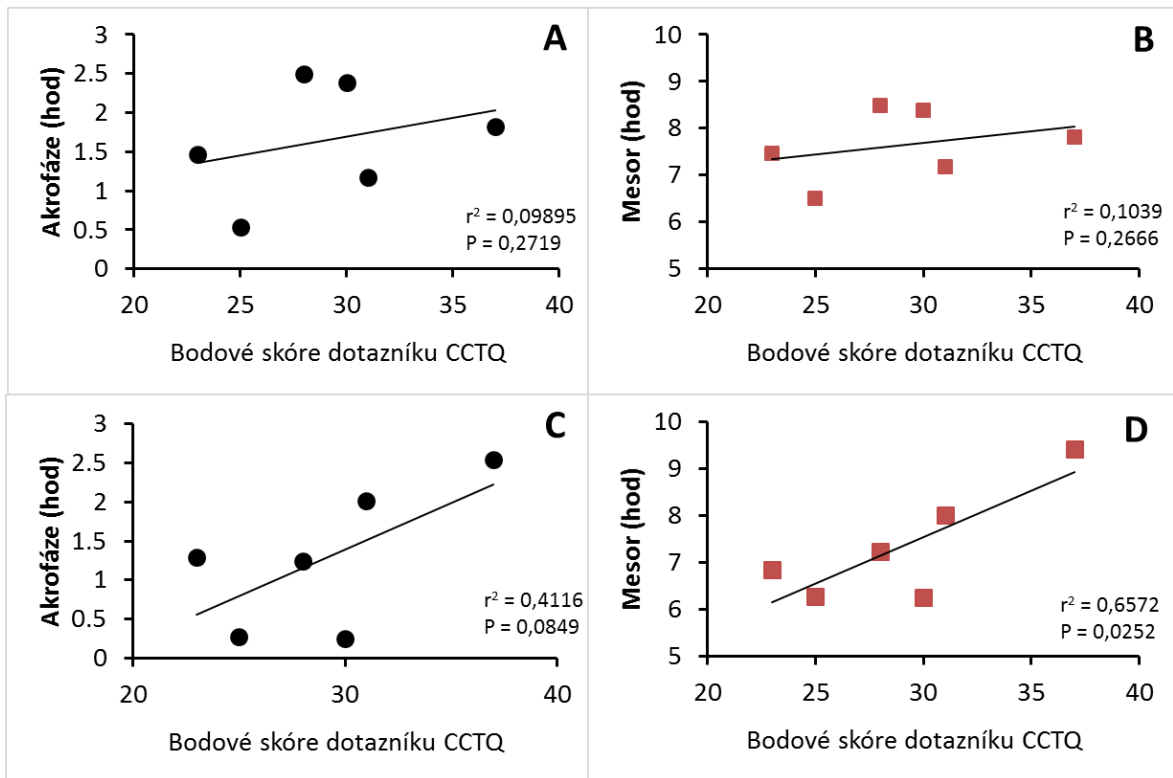
Tab. č. 3: Srovnání parametrů rytmu melatoninu mezi létem a zimou.

	$\Delta\Phi$ léto _(zima)								
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
Mesor (hod)	1.362	1.255	0.621	1.154	-0.841	-1.611	0.558	2.127	0.252
Akrofáze	1.356	1.256	0.173	1.154	-0.841	-0.723	0.558	2.127	0.252

$\Delta\Phi$ = fázový posun (hod); pozitivní hodnoty $\Delta\Phi$ znamenají fázové předběhnutí zimních hodnot vůči letním, negativní hodnoty znamenají fázové zpoždění zimních hodnot vůči letním. Výchozí hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 2.

5.3.3. Korelace parametrů rytmu melatoninu s výsledky dotazníku CCTQ

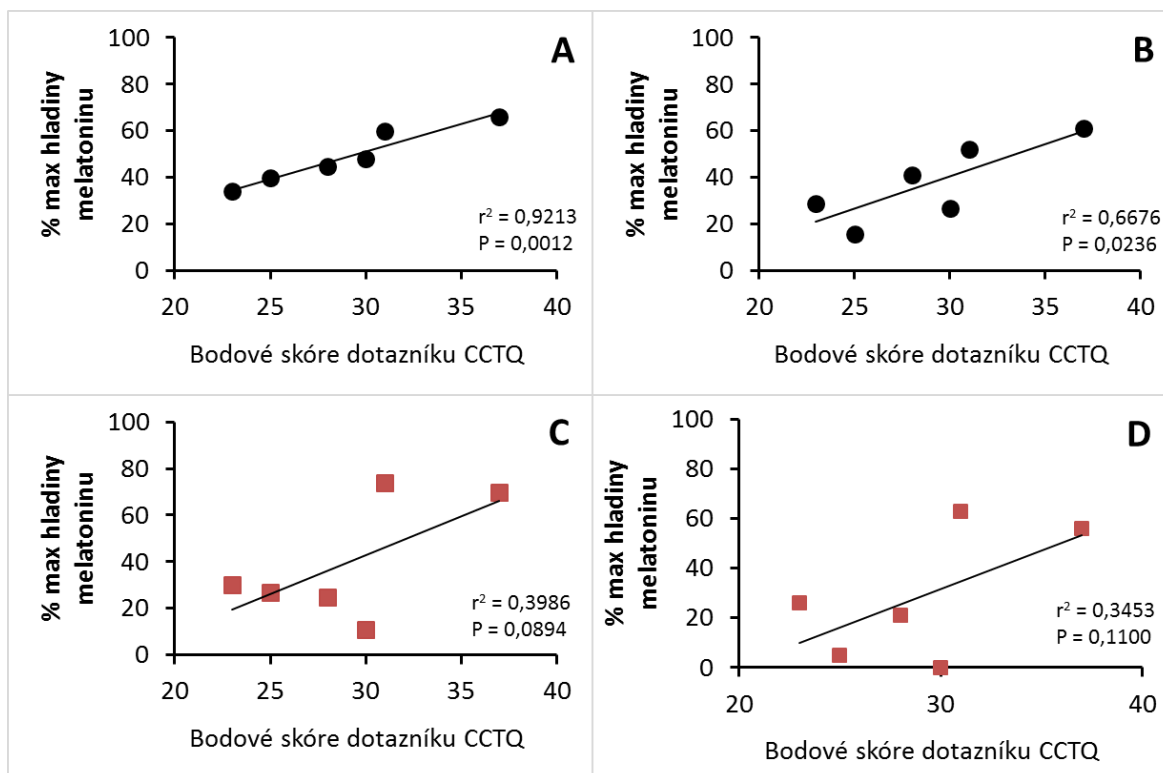
Ze studií chronotypů dospělých osob je známo, že akrofáze obvykle koreluje s mírou chronotypu určenou dotazníky. Proto jsme se rozhodli porovnat akrofázi rytmu melatoninu (obr. č. 10 A, C) a čas mesoru rytmu melatoninu (obr. č. 10 B, D) s bodovým skóre z dotazníku CCTQ (tab. č. 1). Přes velmi nízký počet subjektů a riziko odlišné synchronizace mezi rodinami, která výrazně ovlivňuje fázi melatoninu, Pearsonův korelační koeficient ukázal lineární závislost mezi časem mesoru rytmu melatoninu v zimě a bodovým skóre dotazníku CCTQ ($P = 0,0252$) (obr. č. 10 D).



Obr. č. 10: Srovnání akrofáze (A, C) a doby mesoru (B, D) rytmu melatoninu v červnu (A, B) a v prosinci (C, D) s bodovým skóre dotazníku CCTQ. Pearsonův korelační koeficient odhalil významnou lineární závislost mezi bodovým skóre dětí a dobou dosažení mesoru rytmu melatoninu v prosinci (D).

Pro detekci míry zátěže cirkadiálního systému dětí denním režimem jsme u našich probandů srovnávali bodové skóre dotazníku CCTQ s hladinou melatoninu v době probouzení ve školní den (obr. č. 11 A, C) a o víkendu (obr. č. 11 B, D) v červnu a v prosinci tak, jak byla uvedena v dotazníku CCTQ. Hodnoty hladin melatoninu jsou uvedeny v procentech z maximální hodnoty koncentrace melatoninu každého subjektu v daném ročním období (tab. č. 4). Pearsonův korelační koeficient odhalil lineární závislost mezi chronotypem a hladinou melatoninu v době probouzení v letním volném dnu ($P = 0,0236$) i v letním dnu školním ($p = 0,0012$) (obr. č. 11 A, B). Výsledek této korelace znamená, že čím pozdější chronotyp, tím vyšší hladinu melatoninu má při probouzení.

U našich subjektů jsme srovnávali také hladinu melatoninu v době usínání a jejich bodové skóre z dotazníku CCTQ (obr. č. 12). Hodnoty melatoninu jsou uvedeny v procentech z maximální hodnoty koncentrace melatoninu každého subjektu v daném ročním období (tab. č. 5). Pearsonův koeficient ovšem neukázal žádnou lineární závislost mezi chronotypem a hladinou melatoninu v době usínání v žádném dnu, ani v létě ani v zimě. To znamená, že i probandi s ranním chronotypem uléhají do postele, když je jejich hladina melatoninu relativně vysoko a cítí pravděpodobně i subjektivní ospalost.

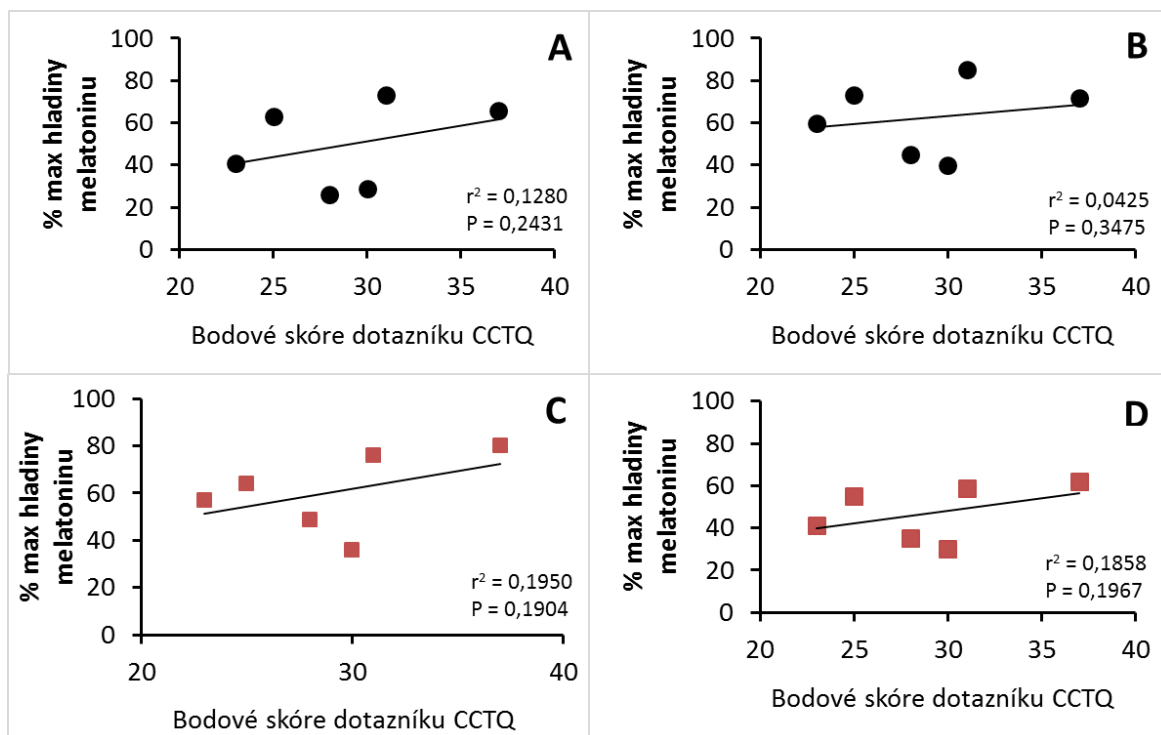


Obr. č. 11: Korelace bodového skóre dotazníku CCTQ a % maximální hladiny melatoninu v době probouzení v červnu (A, B) a v prosinci (C, D) ve školní den (A, C) a o víkendu (B, D). Pearsonův korelační koeficient odhalil lineární závislost mezi bodovým skóre dětí a hladinou melatoninu v době probouzení v obou letních dnech (A, B).

Tab. č. 4: Výpočet % maximální hladiny melatoninu v době probouzení ve všední den a o víkendu dle dotazníku CCTQ.

	červen				prosinec			
	Školní den	% melatoninu	Víkend	% melatoninu	Školní den	% melatoninu	Víkend	% melatoninu
A2	7:00	45	7:20	41	7:00	25	7:20	21
A3	7:00	34	7:20	29	7:00	30	7:20	26
B2	7:00	60	7:45	52	7:00	74	7:45	63
B3	7:00	66	8:00	61	7:00	70	8:00	56
C2	6:30	48	8:30	27	6:30	11	8:30	0
C3	6:30	40	8:30	16	6:30	27	8:30	5

Čas probouzení byl interpolován ke kosinorové křivce rytmu melatoninu zobrazené v % maximální hodnoty. Z tabulky vyplývá, že všechny děti vstávají ve školní den v době, kdy je jejich hladina melatoninu relativně vysoká. Nejvyšší hladinu melatoninu mají při probouzení obě dívky rodiny B. Nejnížší melatonin mají chlapci z rodiny C při probouzení po prodlouženém spánku o víkendu.



Obr. č. 12: Korelace bodového skóre dotazníku CCTQ a % maximální hladiny melatoninu v době uléhání ke spánku v červnu (A, B) a v prosinci (C, D) ve školní den (A, C) a o víkendu (B, D). Pearsonův korelační koeficient neodhalil lineární závislost mezi bodovým skóre dětí a hladinou melatoninu v době uléhání ke spánku.

Tab. č. 5: Výpočet % maximální hladiny melatoninu v době ukládání ke spánku ve všední den a o víkendu dle dotazníku CCTQ.

	červen				prosinec			
	Školní den	% melatoninu	Víkend	% melatoninu	Školní den	% melatoninu	Víkend	% melatoninu
A2	20:30	26	22:00	45	20:30	35	22:00	49
A3	20:30	41	22:00	60	20:30	41	22:00	57
B2	20:30	73	21:45	85	20:30	59	21:45	76
B3	20:30	66	21:45	72	20:30	62	21:45	80
C2	20:30	29	21:30	40	20:30	30	21:30	36
C3	20:30	63	21:30	73	20:30	55	21:30	64

Čas ukládání ke spánku byl interpolován ke kosinorové křivce rytmu melatoninu zobrazené v % maximální hodnoty. Z tabulky vyplývá, že všechny děti uléhají ve školní den v době, kdy je jejich hladina melatoninu relativně vysoká.

5.4. Výsledky měření pohybové aktivity

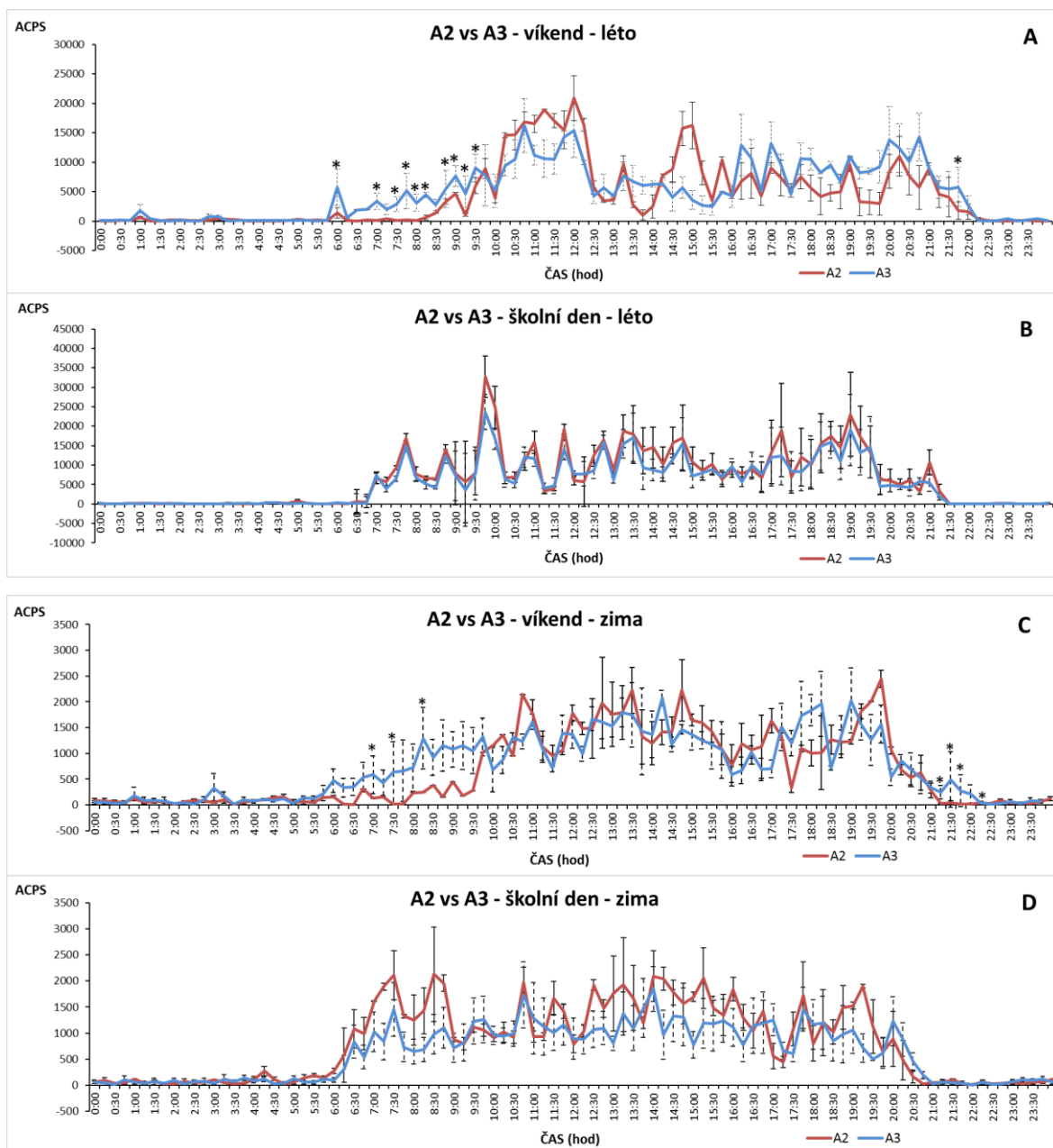
Aktivita byla měřena u dvojčat v letním a zimním měsíci. Záznamy byly srovnávány:

- A) mezi sourozenci ve školním dnu a o víkendu v obou ročních obdobích.
- B) u jednotlivých dětí mezi školním dnem a víkendem v obou ročních obdobích
- C) mezi létem a zimou ve školním dnu a o víkendu.

5.4.1. Srovnání aktivity mezi dvojčaty

Pohybová aktivita měřená v létě se mezi dvojčaty A2 (nevyhraněný chronotyp) a A3 (ranní chronotyp) významně lišila o víkendu v několika ranních časových bodech (6:00 $P < 0,01$; 7:00 $P < 0,05$; 7:30 $P < 0,05$; 7:45 $P < 0,001$; 8:00 $P < 0,05$; 8:15 $P < 0,01$; 8:45 $P < 0,05$; 9:00 $P < 0,01$; 9:15 $P < 0,01$; 9:30 $P < 0,001$) a také v jednom večerním bodě (21:45 $P < 0,05$). Wilcoxonův test odhalil významný rozdíl mezi oběma dětmi ($P < 0,0001$) (obr. č. 13 A). V aktivitě měřené během školního dne v létě se mezi sebou sourozenci významně nelišili (obr. č. 13 B).

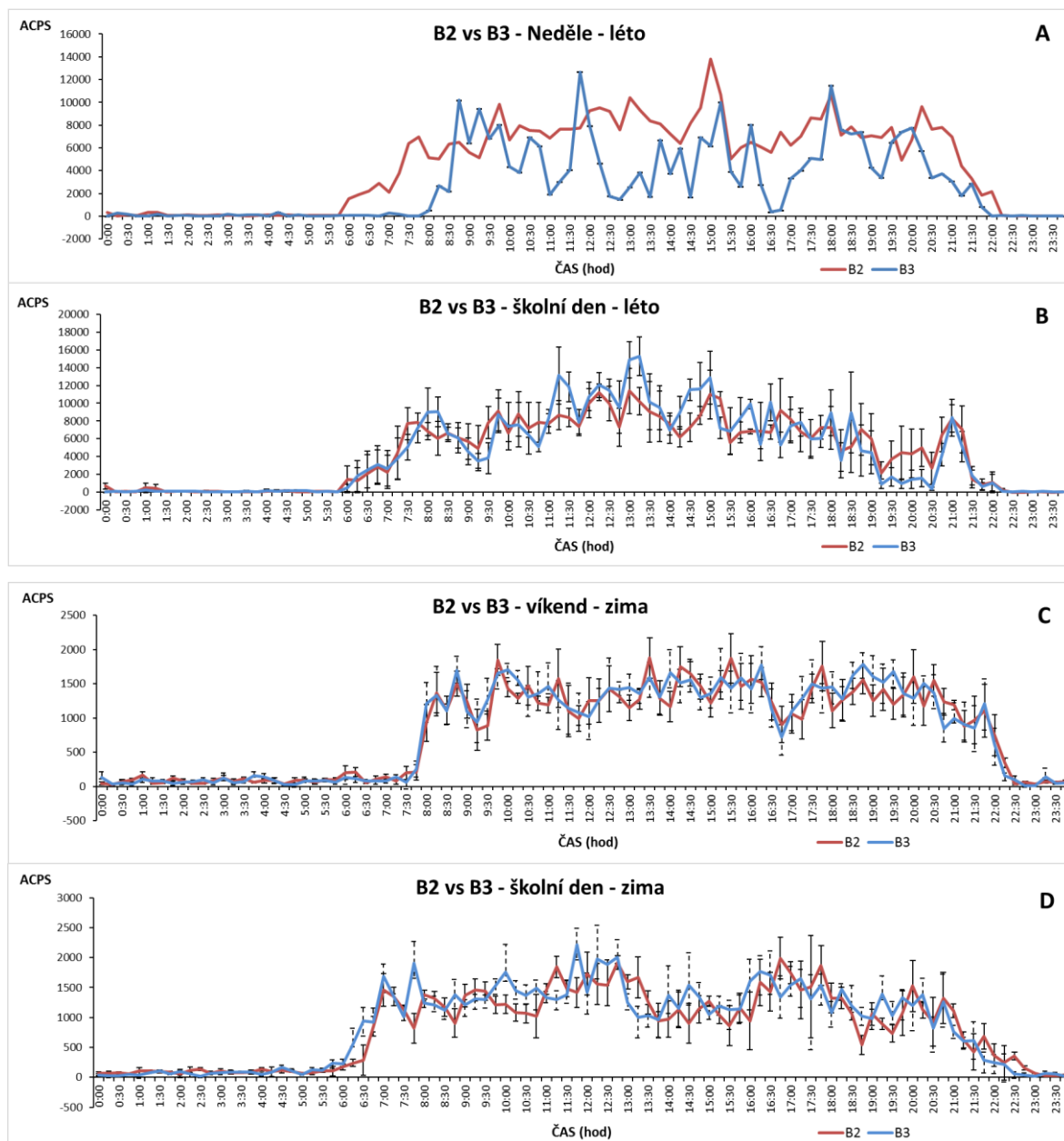
Významné rozdíly mezi sourozenci v pohybové aktivitě měřené v zimě byly také jen o víkendu. V ranní pohybové aktivitě se sourozenci lišili ve třech časových bodech (7:00 $P < 0,05$; 7:30 $P < 0,05$; 8:15 $P < 0,05$) a ve večerní aktivitě ve čtyřech časových bodech (21:15 $P < 0,05$; 21:30 $P < 0,05$; 21:45 $P < 0,05$; 22:15 $P < 0,05$). Wilcoxonův test odhalil významný rozdíl mezi oběma dětmi ($P < 0,05$) (obr. č. 13 C). Ani v zimním školním dnu nebyl mezi sourozenci žádný významný rozdíl (obr. č. 13 D).



Obr. č. 13: Srovnání pohybové aktivity mezi monozygotními dvojčaty A2 a A3 o víkendu (A, C) a o školním dnu (B, D), zaznamenané v červnu (A, B) a v prosinci (C, D). Signifikantní rozdíly v aktivitě mezi sourozenci byly pouze o víkendu a to jak v létě, tak i v zimě. Vyšší aktivitu ráno i večer mělo v obou ročních obdobích dítě A3. O všedním dnu nebyly mezi sourozenci v pohybové aktivitě žádné signifikantní rozdíly. Graf ukazuje průměr \pm S.E.M, ze tří víkendových a čtyř školních dnů. * $P < 0,05$. ACPS = activity counts per session.

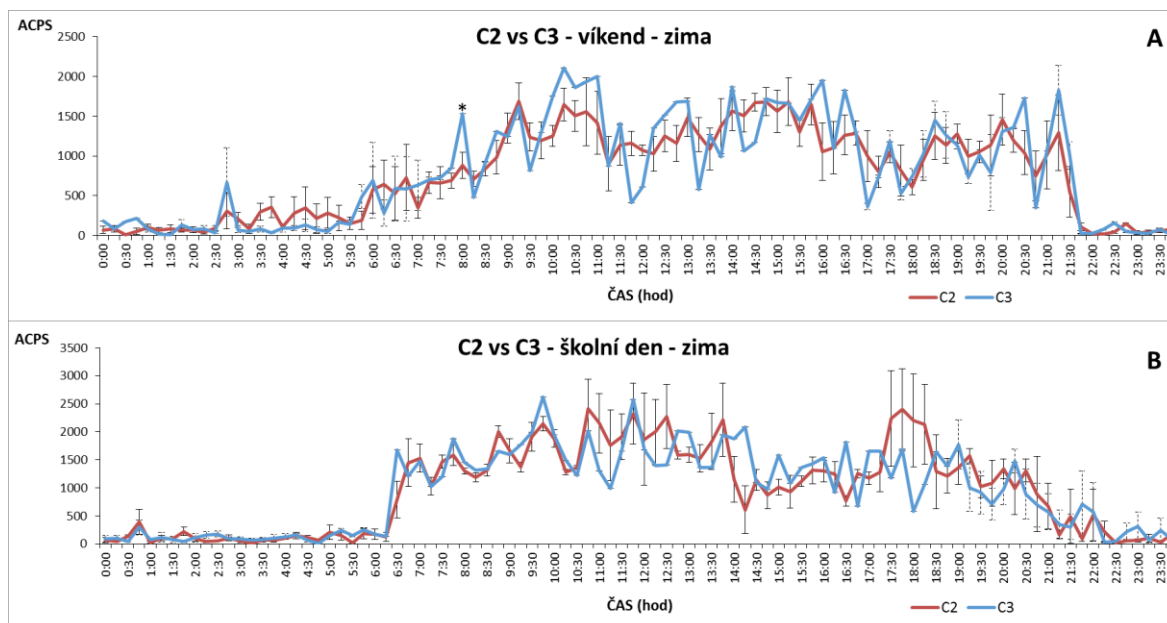
Měření aktivity sourozenců rodiny B v létě bylo z technických důvodů omezeno pouze na jeden víkendový den. Výsledky tohoto měření nelze vyhodnotit mnohočetným t -testem, avšak záznamy naznačují, že dívka B2 (nevyhraněný chronotyp) začíná svoji aktivitu o víkendu dříve než její setra B3 (večerní chronotyp). Dvoucestná ANOVA podpořila názor, že se křivky nedělního záznamu aktivity obou dívek významně liší

($P < 0,0001$) (obr. č. 14 A, B). Aktivita obou dívek rodiny B se ve školním dnu a o víkendů v zimě signifikantně nelišila (obr. č. 14 C, D).



Obr. č. 14: Srovnání pohybové aktivity mezi monozygotními dvojčaty B2 a B3 o víkendů (A, C) a školním dnu (B, D) zaznamenané v červnu (A, B) a v prosinci (C, D). Graf ukazuje průměr \pm S.E.M. ze čtyř víkendových a čtyř školních dnů s výjimkou víkendů v létě, kdy byl měřen pouze jeden den. Aktivita dětí rodiny B se mezi sourozenci signifikantně nelišila o víkendů v zimě ani o školním dnu v zimě a v létě. O víkendů v létě byla naznačena vyšší aktivita u dívky B2 v létě. ACPS = activity counts per session.

Mezi sourozenci C2 a C2 se aktivita srovnávala pouze v zimě, kvůli poškození aktigrafů v létě. Sourozenci se mezi sebou signifikantně lišili pouze o víkendů a to v jednom ranním časovém bodě (8:00 $P < 0,05$). V aktivitě měřené během školního dne nebyly nalezeny mezi dětmi žádné signifikantní rozdíly (obr. č. 15 B).

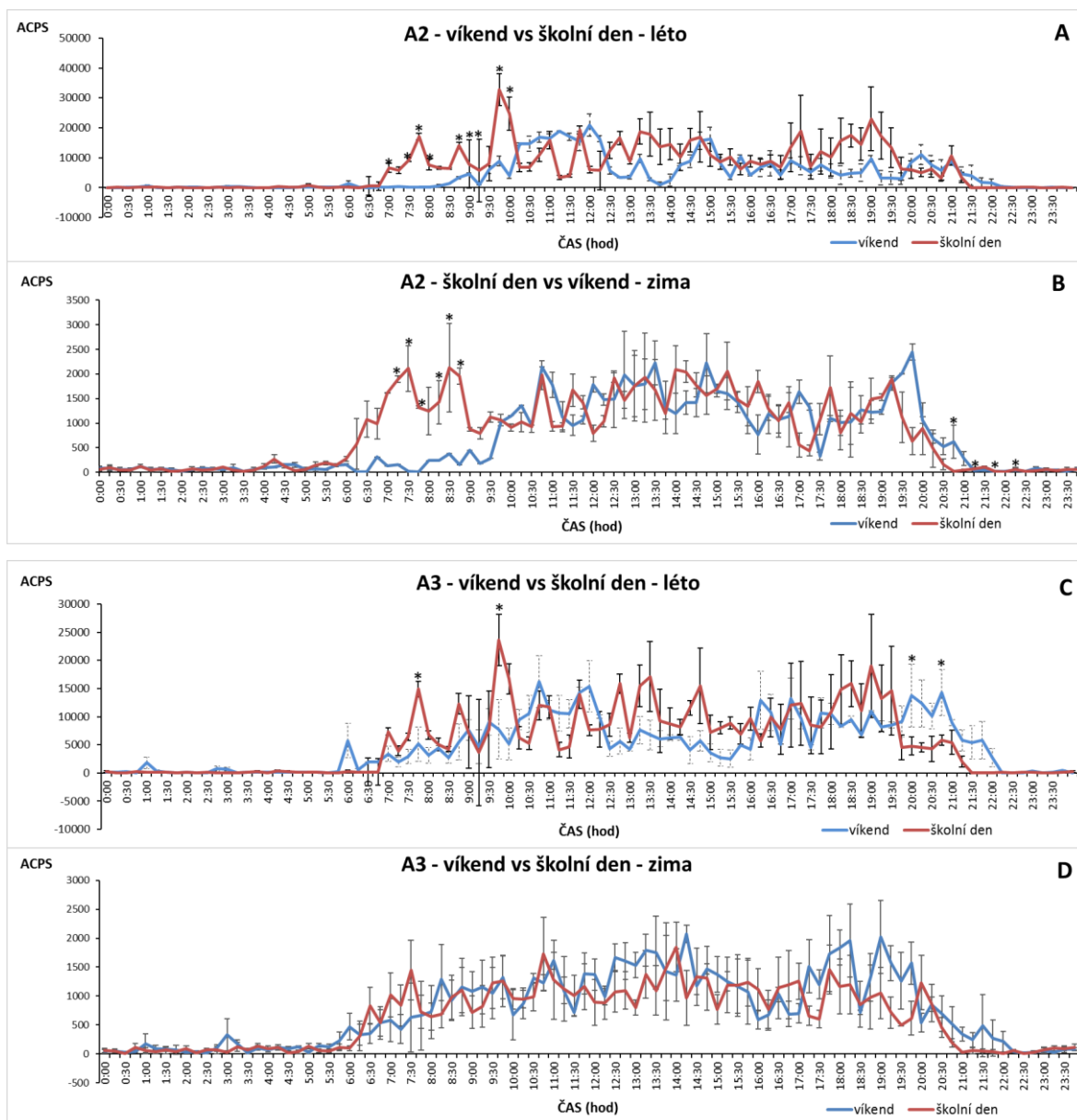


Obr. 15: Srovnání pohybové aktivity mezi monozygotními dvojčaty C2 a C3 víkendu (A) a školním dnem (B) zaznamenané v prosinci. Záznam aktivity se mezi sourozenci signifikantně lišil pouze v jednom časovém bodě o víkendu. V pohybové aktivitě o školním dnu nebyly mezi sourozenci nalezeny žádné signifikantní rozdíly. Graf ukazuje průměr \pm S.E.M. ze čtyř víkendových a čtyř školních dnů. * $P < 0,05$ ACPS = activity counts per session.

5.4.2. Srovnání aktivity mezi školním a víkendovým dnem

Denní pohybová aktivita měřená v létě přístrojem Actiwatch u probanda A2 (nevyhraněný chronotyp) se mezi školním dnem a víkendovým dnem signifikantně lišila pouze ráno v několika časových bodech (7:00 $P < 0,05$; 7:30 $P < 0,05$; 7:45 $P < 0,0001$; 8:00 $P < 0,05$; 8:45 $P < 0,01$; 9:00 $P < 0,01$; 9:15 $P < 0,001$; 9:45 $P < 0,0001$; 10:00 $P < 0,0001$). Wilcoxonův test odhalil signifikantní rozdíl mezi víkendem a školním dnem v červnu u chlapce A2 ($P < 0,001$) (obr. č. 16 A). Aktivita tohoto probanda měřená v zimě přístrojem Mindpax se mezi školním dnem a víkendem signifikantně lišila v několika ranních časových bodech (7:00 $P < 0,01$; 7:15 $P < 0,01$; 7:30 $P < 0,001$; 7:45 $P < 0,05$; 8:15 $P < 0,05$; 8:30 $P < 0,01$; 8:45 $P < 0,05$) a ve čtyřech časových bodech večerních (20:45 $P < 0,05$; 21:15 $P < 0,05$; 21:45 $P < 0,05$; 22:15 $P < 0,05$). Wilcoxonův test odhalil signifikantní rozdíl mezi víkendem a školním dnem v prosinci u chlapce A2 ($P < 0,001$) (obr. č. 16 B).

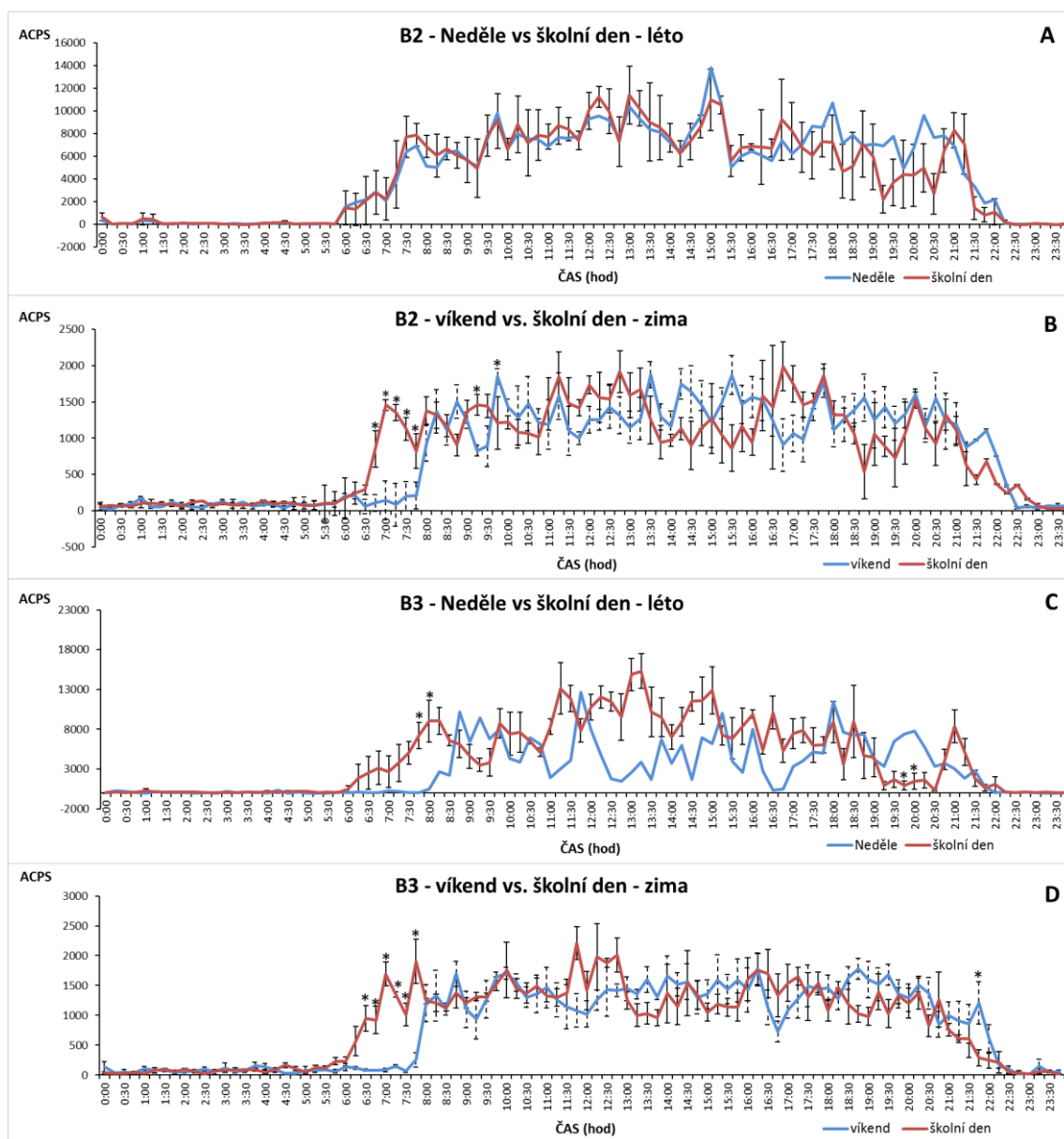
U probanda A3 (ranní chronotyp) se aktivita, měřená v létě pomocí aktigrafu značky Actiwatch, mezi školním dnem a víkendem signifikantně lišila ve dvou časových bodech ráno (7:45 $P < 0,01$; 9:45 $P < 0,001$) a ve dvou časových bodech večer (20:00 $P < 0,01$; 20:45 $P < 0,01$). Wilcoxonův test však nepotvrdil signifikantní rozdíl mezi oběma dny (obr. č. 16 C). Pohybová aktivita měřená přístrojem Mindpax. V zimě se mezi školním dnem a víkendem u dítěte A3 signifikantně nelišila (obr. č. 16 D).



Obr. 16: Srovnání pohybové aktivity mezi školním dnem a víkendem u dětí A2 (A, B) a A3 (C, D) zaznamenané v červnu (A, C) a v prosinci (B, D). U probanda A2 byly signifikantní rozdíly v aktivitě mezi školním dnem a víkendem prokázány jak v létě, tak i v zimě. U jeho sourozence A3 se pohybová aktivita mezi víkendem a školním dnem signifikantně lišila pouze v létě -měřeno multiple t-testem. Graf ukazuje průměr \pm S.E.M. ze tří víkendových a čtyř školních dnů. * $P < 0,05$. ACPS = activity counts per session.

Pohybová aktivita, měřená v létě přístrojem Actiwatch, se u probanda B2 (nevyhraněný chronotyp) signifikantně nelišila mezi školním dnem a víkendem v žádném časovém bodě (obr. č. 17 A). V zimě se pohybová aktivita (přístroj Mindpax) u tohoto probanda signifikantně lišila mezi víkendem a školním dnem pouze v několika ranních časových bodech (6:30 $P < 0,01$; 6:45 $P < 0,0001$; 7:00 $P < 0,0001$; 7:15 $P < 0,001$; 7:30 $P < 0,05$; 7:45 $p < 0,001$; 9:15 $P < 0,05$; 9:45 $P < 0,05$). Wilcoxonův test však nepotvrdil signifikantní rozdíl mezi oběma dny (obr. č. 17 B).

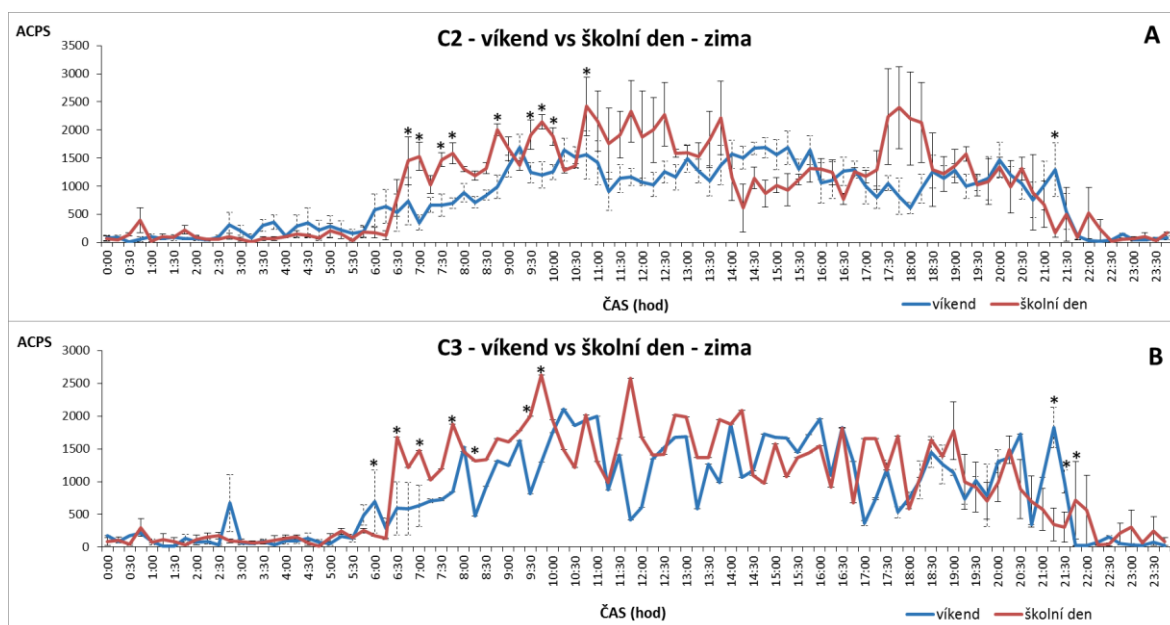
U dítěte B3 (večerní chronotyp) se aktivita měřená v létě pomocí aktigrafu značky Actiwatch lišila mezi víkendem a školním dnem pouze ve dvou ranních časových bodech (7:45 $P < 0,05$; 8:00 $P < 0,05$) a ve dvou časových bodech večer (19:45 $P < 0,05$; 20:00 $P < 0,05$). Wilcoxonův test odhalil signifikantní rozdíl mezi víkendem a školním dnem v červnu u dívky B3 ($P < 0,0001$) (obr. č. 17 C). Aktivita měřená v zimě (přístroj Mindpax) se u tohoto probanda lišila v několika ranních časových bodech (6:30 $P < 0,01$; 6:45 $P < 0,01$; 7:00 $P < 0,0001$; 7:15 $P < 0,0001$; 7:30 $P < 0,01$; 7:45 $P < 0,0001$). Večer byl rozdíl v aktivitě mezi školním dnem a víkendem pouze v jednom časovém bodě (21:45 $P < 0,01$), avšak Wilcoxonův test rozdíl mezi víkendem a školním dnem nepotvrdil (obr. č. 17 D).



Obr. 17: Srovnání pohybové aktivity mezi školním dnem a víkendem u monozygotních dvojčat B2 (A, B) a B3 (C, D) zaznamenané v červnu (A, C) a v prosinci (B, D). Nejvýznamnější rozdíl mezi víkendem a školním dnem byl potvrzen pro probanda B3 v letním měření. Graf ukazuje průměr \pm S.E.M. ze čtyř víkendových a čtyř školních dnů s výjimkou víkendu v létě, kdy byl měřen pouze jeden den. * $P < 0,05$ ACPS = activity counts per session.

Data lokomoční aktivity u sourozenců C2 a C3 z léta nebylo možné analyzovat kvůli poruše obou aktigrafů značky Actiwatch. Pohybová aktivita probanda C2 (nevyhraněný chronotyp) měřená v zimě aktigrafem Mindpax se mezi školním dnem a víkendem signifikantně lišila v několika časových bodech ráno (6:45 $P < 0,1$; 7:00 $P < 0,001$; 7:30 $P < 0,01$; 7:45 $P < 0,01$; 8:45 $P < 0,01$; 9:30 $P < 0,1$; 9:45 $P < 0,01$; 10:00 $P < 0,1$; 10:45 $P < 0,01$) a pouze v jednom bodě večer (21:15 $P < 0,001$) (obr. č. 18 A).

U probanda C3 (nevyhraněný chronotyp) se ranní pohybová aktivita měřená v zimě také signifikantně lišila mezi víkendem a školním dnem v několika ranních časových bodech (6:00 $P < 0,1$; 6:30 $P < 0,001$; 7:00 $P < 0,01$; 7:45 $P < 0,01$; 8:15 $P < 0,1$; 9:30 $P < 0,001$; 9:45 $P < 0,001$) a ve čtyřech bodech večerních (21:15 $P < 0,0001$; 21:30 $P < 0,01$; 21:45 $P < 0,01$; 22:00 $P < 0,1$) (obr. č. 18 B).



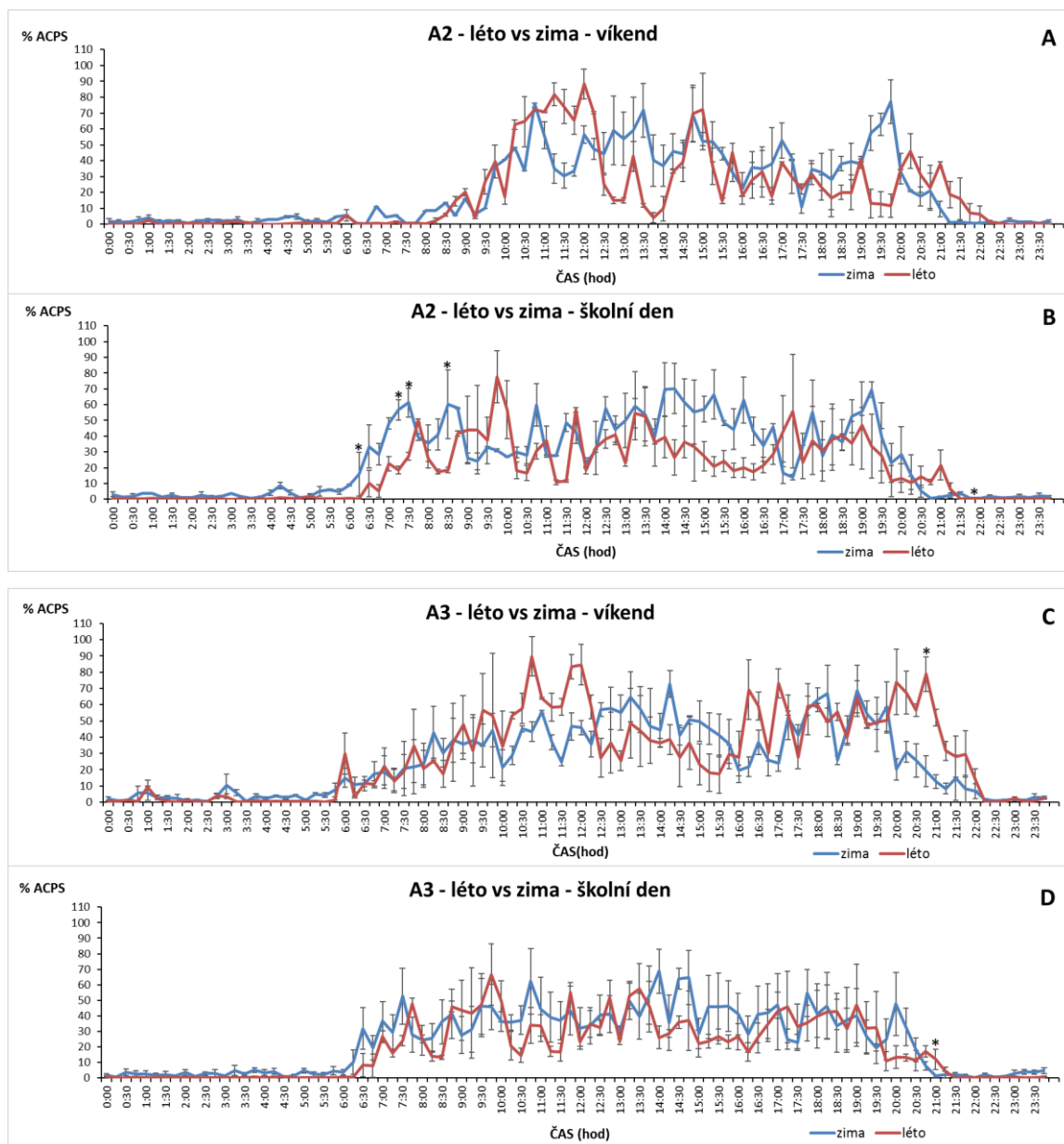
Graf č. 18: Srovnání pohybové aktivity mezi víkendem a školním dnem u monozygotních dvojčat C2 (A) a C3 (B) zaznamenaný v prosinci. U obou dětí byla pohybová aktivita signifikantně vyšší ráno o školním dnu než o víkendu. Naopak u obou sourozenců byly nalezeny rozdíly mezi víkendem a školním dnem ve večerní pohybové aktivitě, která byla vyšší o víkendu než ve školním dnu. Graf ukazuje průměr \pm S.E.M. ze čtyř víkendových a čtyř školních dnů. * $P < 0,1$ ACPS = activity counts per session.

5.4.3. Srovnání pohybové aktivity mezi létem a zimou

Pro srovnání míry aktivity dětí mezi létem a zimou musely být aktigrafické záznamy převedeny na procenta maximálních hodnot, neboť v obou sezónách byla aktivita zaznamenávána jinými typy přístrojů s jiným rozlišením.

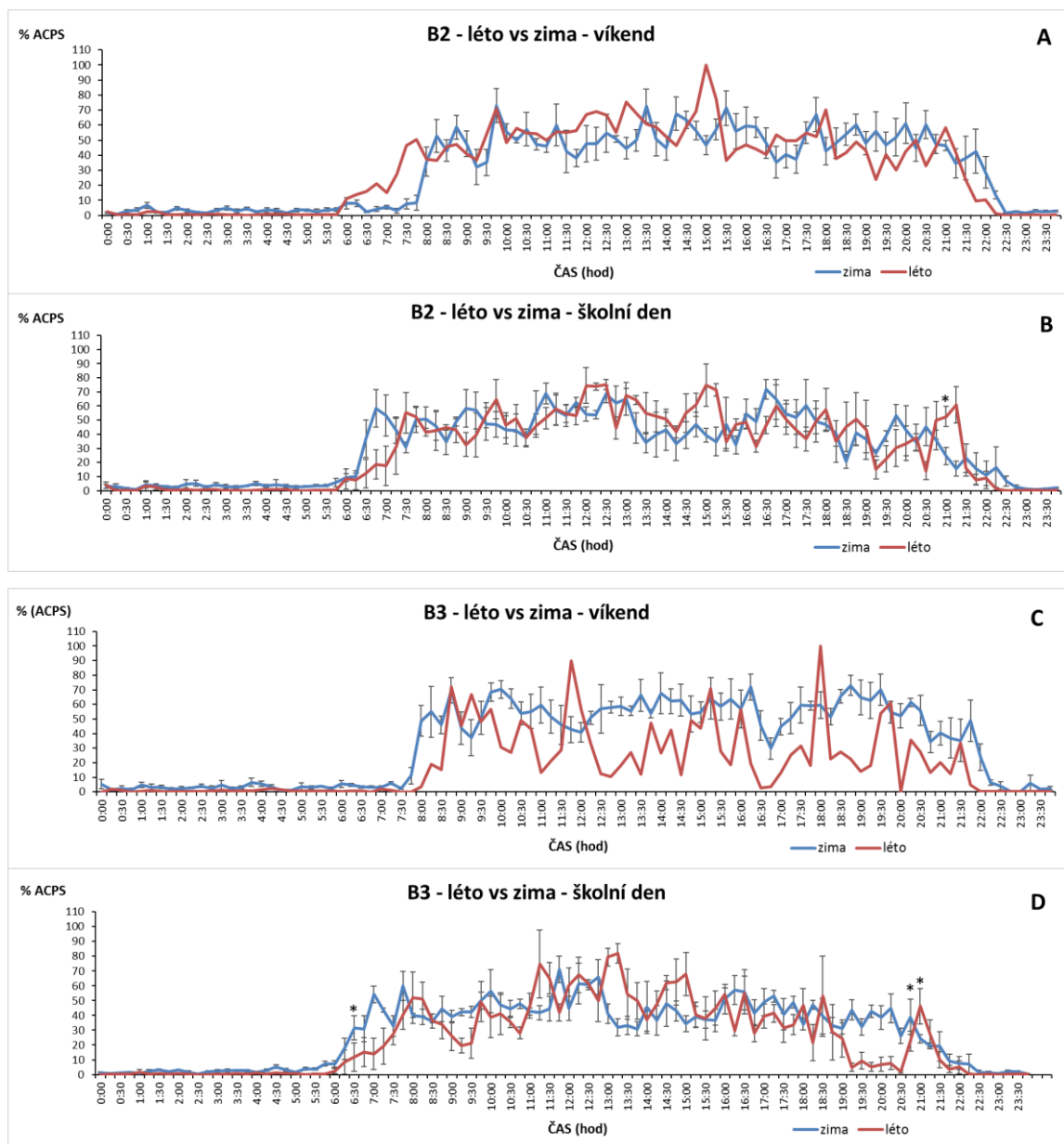
U probanda A2 (nevyhraněný chronotyp) se pohybová aktivita o víkendu mezi létem a zimou signifikantně nelišila (obr. č. 19 A). Ve školní den se aktivita chlapce A2 srovnávaná mezi létem a zimou signifikantně lišila v jednom časovém bodě večer (21:45 $P < 0,01$)

a v několika časových bodech ráno (6:15 $P < 0,0001$; 7:15 $P < 0,001$; 7:30 $P < 0,01$; 8:30 $P < 0,05$; Wilcoxonův test: $P < 0,0001$). S výjimkou večerní hodnoty, rozdíly mezi profily znamenají vždy vyšší hodnoty v zimním profilu (obr. č. 19 B). U dítěte A3 (ranní chronotyp) se pohybová aktivita o víkendu, srovnávaná mezi létem a zimou, signifikantně lišila pouze večer (20:45 $P < 0,05$), ale Wilcoxonův test signifikanci nepotvrdil. O školním dnu, se aktivita srovnávaná mezi létem a zimou, signifikantně lišila také pouze večer (20:45 $P < 0,05$; Wilcoxonův test: $P < 0,0001$) (obr. č. 19 C, D).



Obr. č. 19: Srovnání pohybové aktivity o víkendu (A, C) a školním dnu (B, D) mezi létem a zimou u monozygotních dvojčat A2 (A, B) a A3 (C, D). Obě děti se signifikantně nelišily v aktivitě mezi létem a zimou o víkendu, signifikantní rozdíl mezi létem a zimou byl však zjištěn ve školním dnu. Hodnoty vynesené v grafu jsou procenta z maximální hodnoty \pm S.E.M. aktivity každého dne (3 víkendové a 4 školní dny), ze kterých byl vypočítán aritmetický průměr. * $P < 0,05$ ACPS = activity counts per session.

Srovnání aktivity mezi létem a zimou o víkendu u dětí rodiny B nebylo možné statisticky vyhodnotit z důvodu malého počtu měření v létě (obr. č. 20 A, C). Ve všední den se aktivita, srovnávaná mezi létem a zimou, významně lišila a to zejména ve večerních časových bodech (B2: 21:00 $P < 0,05$; 21:15 $P < 0,05$; Wilcoxonův test-nesignifikantní; B3: 20:45 $P < 0,05$; 21:00 $P < 0,01$; 6:30 $P < 0,05$; Wilcoxonův test: $P < 0,05$) (obr. č. 20 B, D).



Obr. č. 20: Srovnání pohybové aktivity o víkendu (A, C) a školním dnu (B, D) mezi létem a zimou u monozygotních dvojčat A2 (A, B) a A3 (C, D). Srovnání aktivity mezi létem a zimou o víkendu nemohlo být statisticky zhodnoceno, neboť v létě byl změřen pouze jeden víkendový den. Obě děti se v létě a v zimě lišily ve večerní aktivitě. Hodnoty vynesené v grafech jsou procenta z maximální hodnoty \pm S.E.M. aktivity každého dne (4 volné a 4 školní dny), ze kterých byl vypočítán aritmetický průměr. * $P < 0,05$ ACPS = activity counts per session.

U dvojčat C2 a C3 nemohla být pohybová aktivita srovnávána, jelikož v letním měření došlo k poruše aktigrafů.

7. Diskuze

Cílem této práce bylo popsat rozdíly v cirkadiánním fenotypu u tří párů monozygotních dvojčat ve věku 8 – 10 let žijících spolu ve stejném prostředí a majících stejný životní režim.

K předběžnému určení chronotypu u našich probandů jsme použili dotazník CCTQ pro děti ve věku 4-11 let. Tento dotazník je validován pomocí záznamů z aktigrafických zařízení a srovnáním s MESC (Werner et al., 2009; Ishihara et al., 2014; Dursun et al., 2015) a je využíván ve studiích zabývajících se chronotypy u dětí (Simpkin et al., 2014; Ishihara et al., 2014; Doi et al., 2015). Validita dotazníku je podpořena shodou mezi tzv. střední dobou spánku (z angl. "mid sleep point") a záznamem aktigrafu. Tímto dotazníkem byl z našich probandů jeden určen jako ranní chronotyp (A3), jeden subjekt jako večerní (B3) a ostatní děti byly zařazeny do nevyhraněného chronotypu (A2, B2, C2, C3). V páru dvojčat, kde byl nalezen pomocí dotazníku rozdíl v chronotypu, bylo jedno z dětí vždy určeno jako nevyhraněný chronotyp. I přes malou skupinu subjektů v naší studii, toto rozčlenění proporcionálně souhlasí s rozdělením chronotypů ve větší zkoumané skupině dětí (Doi et al., 2015; Zimmermann, 2015), i ve skupině dospělých párů monozygotních dvojčat (Barclay et al., 2013).

Výsledný chronotyp navržený na základě bodového skóre dotazníku jsme dále ověřovali dvěma metodami: popisem rytmu v hladině melatoninu ve slině a záznamem rytmu v pohybové aktivitě dětí aktigrafickou metodou. Endogenní cirkadiánní fáze člověka se nejčastěji stanovuje z rytmu melatoninu jako časový bod DLMO (Lewy et al., 1999; Kijzer et al., 2011). Tento bod lze však stanovit pouze, pokud jsou pokusné osoby v podmínkách konstantní rutiny při velmi nízké intenzitě světla. Naše vzorky slin k měření hladiny melatoninu jsme však neodebírali v konstantních podmínkách, ale v přirozených podmínkách domova, a je tedy pravděpodobné, že DLMO byl z části maskován večerním i ranním osvětlením. Proto jsme k určení cirkadiánní fáze osob použili akrofázi rytmu melatoninu i dobu, kdy dosahuje hladina melatoninu mesoru. Mesor je střední hodnota mezi maximální a minimální hladinou melatoninu a jeho časové určení v sobě nese také informaci o délce melatoninového signálu. K definici akrofáze a mesoru jsme použili kosinorovou metodu. Při této analýze je vždy nalezena jedna křivka funkce sinusu s délkou periody 24

hodin a z té jsou stanoveny další parametry jako je mesor, akrofáze či amplituda daného rytmu.

Ze studií na dospělých subjektech je známo, že cirkadiánní rytmy ranních chronotypů se předbíhají ve fázi před chronotypy nevyhraněnými a analogicky se rytmy večerních chronotypů vůči nevyhraněným chronotypům zpožďují (Lack et al., 2009; Simpkin et al., 2014; Kantermann et al., 2015). Základním předpokladem naší studie tedy bylo, že rytmus melatoninu u probanda A3, určeného jako ranní chronotyp, bude fázově předbíhat rytmus melatoninu probanda A2 a analogicky, rytmus melatoninu subjektu B3 určeného jako večerní chronotyp, se bude zpožďovat oproti subjektu B2. Kosinorová metoda nám ukázala, že akrofáze i doba dosažení mesoru hladiny melatoninu odpovídají našemu předpokladu; akrofáze i mesor melatoninu subjektu A3, určeného jako ranní chronotyp, byly v létě více než o jednu hodinu fázově předběhnuty oproti rytmu melatoninu jeho sourozence A2. V zimě se tak významný rozdíl mezi oběma dětmi ale nepotvrdil. Přestože ve 23:00 dosahovala hladina melatoninu chlapce A2 pouze 39 % jeho maxima, a hladina melatoninu chlapce A3 celých 75 %, tento rozdíl se do fázových změn nepromítl. Hlavním důvodem je zřejmě výrazně vyšší amplituda, a tím až 3x vyšší hodnota mesoru subjektu A3, k jejímuž dosažení bylo zjevně zapotřebí disproporčně více času. Tomuto vysvětlení odpovídají i výsledky pokusu s oběma chlapci z února roku 2013. V tomto experimentu byla amplituda melatoninu obou chlapců velmi podobná a akrofáze i mesor melatoninu chlapce A3 předbíhal o více než jednu hodinu akrofázi i mesor melatoninu jeho bratra podobně, jako o dva roky později v létě.

I u druhého páru dvojčat B2 a B3 byl rozdíl jak v čase mesoru, tak v době akrofáze hormonu melatoninu. Proband s večerním chronotypem B3 měl vůči svému sourozenci s nevyhraněným chronotypem B2 zpožděnou dobu dosažení mesoru i akrofáze melatoninu v létě o 38 minut. V zimě bylo fázové zpoždění v mesoru u B3 větší než 1 hodinu a rozdíl mezi akrofázemi více než 30 minut. Přestože dvoucestná ANOVA nepotvrdila signifikantní rozdíl mezi rytmy melatoninu obou dívek, jednotné fázové zpoždění dívky B3 oproti její sestře ve všech parametrech potvrzuje její tendenci k večernímu chronotypu tak, jak bylo definováno dotazníkem CCTQ.

Zajímavé je, že dvojice C, která byla určena jako nevyhraněný chronotyp, měla největší rozdíl jak v době mesoru, tak v době akrofáze melatoninu, a to zejména v letním měření. Chlapec C3 byl oproti svému sourozenci předběhnutý v čase mesoru i akrofázi melatoninu o 1 hodinu a 51 minut. Obě děti jsou dle CCTQ na okrajích bodového spektra pro nevyhraněný typ; subjekt C2 je zařazen spíše k večernímu chronotypu, zatímco jeho

sourozenec C3 směřuje spíše k rannímu chronotypu (tab. č. 1). Naše výsledky z letního měření melatoninu však prokázaly větší fázový posun mezi oběma dětmi, než u dvojice s označením A, jejíž rozdílný chronotyp byl dotazníkem prokázán. Dvoucestná ANOVA potvrdila, že profily melatoninu obou dětí se signifikantně liší a podpořila tak představu, že navzdory výsledkům CCTQ, obě děti mají odlišný chronotyp.

Rozdíl v akrofázích melatoninového rytmu u námi testovaných dětí není tak výrazný jako ve studiích zkoumajících posun akrofázi rytmu melatoninu u dospělých lidí, kdy tento rozdíl mezi ranním a večerním chronotypem činil až tři hodiny (Nováková et al., 2013). Dospělí lidé však většinou přizpůsobují dlouhodobě svojí aktivitu a spánkový režim svému chronotypu, čímž posilují jeho extrémní fázi a je potom obtížnější rozlišit míru genetické příčiny od synchronizace životním stylem. Právě toto je důvod, proč jsme se ve své studii zaměřili na sledování dětí ve věku, který jim již umožní svědomitou spoluprací při odběru slin i měření aktivity, přesto je ještě příliš nízký na to, aby jim umožnil vlastní organizaci času. Získané rozdíly ve fázi melatoninu mezi našimi dětmi tedy odrážejí jejich endogenní rozdíly v cirkadiánní fázi a s největší pravděpodobností tedy jejich vrozené rozdíly v cirkadiánním systému. Pro kontrolu synchronizace cirkadiánní fáze dvojčat s vnějším prostředím jsme měřili koncentraci melatoninu také u jejich matek. Ty se v době mesoru a akrofáze melatoninu blížily spíše k dítěti s nevyhraněným chronotypem.

V souvislosti se studiem chronotypů se často spekuluje o tzv. sociálním jet lagu, kdy jsou lidé s vyhraněným chronotypem nuceni přizpůsobovat se časovému režimu práce, školy či rodinnému životu v míře, která je nad rámec možností jejich přirozené synchronizace. Sociální jet lag může narušovat správné fungování cirkadiánních oscilací a tím podporovat vznik některých chorob (Rabstein et al., 2014; Papantoniou et al., 2015). Tímto fenoménem jsou výrazně ovlivněni hlavně lidé s večerním chronotypem. Několik studií ukazuje, že osoby s večerním chronotypem si svůj nedostatek spánku během pracovních dní do velké míry kompenzují ve volných dnech (Monk et al., 2000; Vitale et al., 2015; Paine et Gander, 2016). Abychom zjistili míru zátěže cirkadiánního systému dětí školním režimem, provedli jsme korelaci hladiny melatoninu s časy usínání a probouzení ve všední dny a o víkendy uvedenými v dotazníku CCTQ. Dle výše zmíněných výzkumů, jsme očekávali, že subjekt s večerním chronotypem B3 bude mít nejvyšší hladinu melatoninu při probouzení ve školním dni, která bude nasvědčovat tomu, že jeho organismus není v té době ještě připraven na denní aktivitu. Naše výsledky ukázaly, že dívka B3 se vskutku denně probouzí v době, kdy je hladina jejího melatoninu kolem 70%, avšak její sestra nemá hladinu melatoninu při probouzení o mnoho nižší, ve všedním dni v zimě dokonce ještě vyšší. Všechny děti vstávají

v době, kdy je hladina jejich melatoninu vyšší než 25%. Podobné výsledky našly ve své studii Painová a Ganderová (2016). V této studii autorky zkoumaly fázový úhel mezi DLMO a časem usínání a vstávání, ten byl širší v pracovním dnu u dospělých lidí jak s večerním chronotypem tak i s chronotypem ranním. V naší studii jsme našli lineární závislost mezi hladinou melatoninu v době probuzení a bodovým skóre z dotazníku CCTQ jak ve školním dnu, tak během víkendového dne v létě. Z výsledků vyplývá, že proband s ranním chronotypem A3 a proband se spíše ranním chronotypem C3 mají, dle předpokladu, ze všech dětí nejnižší koncentraci melatoninu při vstávání jak ve školním dnu, tak o víkendu a zdá se tedy, že jejich organismus je nejlépe připraven na ranní aktivitu. Odpovědi rodičů na otázku 4, 26 v dotazníku CCTQ tento předpoklad potvrzují a uvádějí, že děti jsou ráno veselejší a aktivnější než jejich sourozenci. U probandů rodiny C je nejzřetelnější role kompenzačního spánku o víkendu. V prosinci se posunutou dobou vstávání o víkendu na 8:30 dostávají až na nulové hodnoty hladiny melatoninu a lze tedy předpokládat, že vstávají již zcela bdělí.

Analogicky k době probouzení, jsme vytvořili korelační závislost mezi hladinami melatoninu dětí v době uléhání ke spánku a bodovým skóre dotazníku CCTQ. Pearsonův korelační koeficient nepotvrdil žádnou lineární závislost mezi těmito dvěma parametry (obr. č. 12) a zdá se, že doba ukládání ke spánku se řídí spíše sociálními požadavky každé rodiny. Přesto lze z analýzy vyčíst, že obě děti s ranním chronotypem (A3) a se spíše ranním chronotypem (C3) uléhají ve všední den s hladinou melatoninu vyšší než jejich sourozenci s nevyhraněným (A2) a spíše večerním chronotypem (C2) a mohou se tedy cítit subjektivně ospalejší a připravenější ke spánku.

Aktigrafické záznamy naší studie lze považovat pouze za orientační. Vlivem řady technických problémů způsobených vývojem nové aplikace jsou v záznamech mezery a je zaznamenán nestejný počet dnů u jednotlivých dětí. To je také důvod, proč ke statistickému porovnání dat byl použit Wilcoxonův test, který dokáže, na rozdíl od testu ANOVA, porovnávat nerovnoměrné skupiny dat.

Aktigrafické záznamy jsme porovnávali mezi dvojčaty, abychom mezi nimi potvrdily rozdíly v diurnální preferenci. Rozdíly v pohybové aktivitě mezi sourozenci byly patrné pouze o víkendech, ve všední dny byla aktivita mezi dětmi logicky synchronizovaná režimem školy. Nejprokazatelnější rozdíl v diurnální preferenci byl naměřen u dvojčat rodiny A. Proband A3 měl signifikantně vyšší ranní aktivitu o víkendu než jeho sourozenec A2, a to v létě i v zimě, a potvrdil tak jednoznačně svůj ranní chronotyp. Proband s večerním chronotypem B3 měl při letním měření o víkendovém dni nižší ranní pohybovou aktivitu než jeho sourozenec s nevyhraněným chronotypem B2. Signifikance nemohla být testována,

Jelikož byla pohybová aktivita měřena pouze během jednoho víkendového dne. V zimním měření se lokomoční aktivita mezi dívkami o víkendu nijak nelišila, důvodem však mohla být společná rodinná aktivita, která obě dívky synchronizovala. U páru dvojčat rodiny C s nevyhraněným chronotypem se pohybová aktivita lišila o víkendu pouze v jednom ranním časovém bodě. Chlapec C3 měl, jako „spíše ranní chronotyp“ vyšší aktivitu v 7 hodin ráno než jeho bratr, „spíše večerní chronotyp“. Celkově byla ale aktivita obou chlapců rodiny C spíše synchronizovaná.

Nejasné výsledky ukazují rozdíly v akrofázi rytmu aktivity mezi našimi subjekty získané kosinorovou analýzou. V případě páru dvojčat A2 a A3 byl rozdíl v akrofázi aktivity měřené v létě 37 minut, kdy dřívější akrofázi měl chlapec s nevyhraněným chronotypem A2. Naopak tomu bylo v zimním měření, kdy chlapec s ranním chronotypem A3 byl svou akrofází předběhnutý oproti svému sourozenci A2 o 1 hodinu a 34 minut. U dívek B2 a B3 se akrofáze aktivity měřené v létě lišila o 7 minut, kdy dívka s večerním chronotypem B3 byla akrofází aktivity opožděna vůči své sestře s nevyhraněným chronotypem B2. V zimě měla naopak opožděnou akrofázi aktivity dívka s nevyhraněným chronotypem B2. Rozdíl mezi ní a její sestrou byl ovšem pouze 3 minuty. U páru dvojčat C2 a C3 činil rozdíl v akrofázi pohybové aktivity v zimním měření 10 minut, kdy subjekt se spíše večerním chronotypem měl akrofázi aktivity dříve než jeho sourozenec se spíše ranním chronotypem. Rozdíly v době akrofáze pohybové aktivity mezi našimi probandy nebyly tak velké jako v případě rozdílu u dospělých lidí s rozdílným chronotypem (Vitale et al., 2015). Lze předpokládat, že u dětí, které si neorganizují vlastní čas, budou rozdíly v akrofázích rytmu aktivity mezi sourozenci maskovány sociální synchronizací. Naopak rozdíly v ranní aktivitě o víkendu se ukazují jako dobrý ukazatel diurnální preference. Ze záznamů je zjevné, že obě děti jsou vzhůru ve stejnou dobu, avšak ranní typ je pohybově aktivnější téměř hned po probuzení, zatímco druhý sourozenec začíná být aktivní až v průběhu dopoledne.

Markeru míry ranní aktivity jsme využili k testování hypotézy, že proband s ranním chronotypem bude vykazovat menší rozdíl v ranní aktivitě mezi školním dnem a víkendem než nevyhraněný, či večerní typ. Srovnání záznamů všedního dne a víkendu probanda A3 vskutku ukázalo, že ranní aktivita tohoto chlapce zůstává i o víkendu stejná a není u něho patrná tendence ke kompenzačnímu víkendovému klidu. Jinak řečeno, zdá se, že školní režim odpovídá diurnální preferenci probanda A3, kterou zachovává i ve volných víkendových dnech. Stejně malý rozdíl mezi pracovním dnem a víkendem byl nalezen také u dospělých lidí s ranním chronotypem (Paine et Gander, 2016). Rozdíl mezi ranní aktivitou ve všední den a o víkendu chlapce A2 se naopak významně liší a jeho víkendová aktivita je

signifikantně snížena až do 10:00 v létě a do 9:45 v zimě. Podobně se lišila víkendová ranní aktivita dívky B3 od aktivity školního dne v létě. Dívka B3 určená jako večerní chronotyp začínala být aktivní o víkendu až o 2 hodiny později než ve všední den, zatímco u její sestry byl zjevný jen nevýznamný rozdíl mezi 7:00 a 7:30 hodinou. V zimě byl zřetelný rozdíl mezi školním dnem a víkendem u obou dívek, rozdíl mezi nimi na základě chronotypu však nelze s jistotou diskutovat, neboť jejich víkendová aktivita je překvapivě vyrovnaná a nasvědčuje sociální synchronizaci (viz. výše). Obě děti rodiny C vykazují také zřetelný rozdíl v míře ranní aktivity mezi všedním dnem a víkendem, který se v létě liší až téměř do 10:00.

Ačkoliv z výsledků našich aktigrafických měření nelze udělat definitivní závěr, data přesto naznačují zajímavou skutečnost a totiž, že školní režim, který nutí děti k aktivitě již v 7:00, nepřináší problém pouze večernímu chronotypu, ale i dětem, které mají chronotyp spíše nevyhraněný.

Nedílnou částí naší studie bylo porovnání cirkadiánní fáze stanovené parametry rytmu melatoninu a pohybové aktivity v období s největším a nejmenším slunečním osvitem v našich zeměpisných šířkách. Měření byla prováděna v červnu, tj. minimálně tři měsíce po změně času, a v prosinci, tedy přibližně dva měsíce po změně času. Předpokládáme, že toto je doba, kdy již došlo k plné synchronizaci organismu ke změnám životního režimu s tím spojeného, a že možné změny tedy odráží spíše změnu vnějších světelných podmínek, či cirkaduální nastavení.

Z literatury je známo, že organismy adaptované k dlouhé letní fotoperiodě mají noční pík melatoninu komprimovaný tak, aby se vtěsnil do krátké noci a naopak, v zimě je pík melatoninu dekomprimovaný a má vyšší amplitudu (Illnerová et al., 1984). V domácích podmínkách, při kterých probíhaly odběry vzorků, nelze uvažovat o různých světelných podmínkách mezi létem a zimou z pohledu délky osvit, ale spíše z pohledu intenzity světla, která na člověka v každé sezóně působí. Umělé osvětlení v zimě nedosahuje takových intenzit jako sluneční osvit ve stejném reálném čase v létě. Přesto existuje řada studií, které dokládají vliv umělého osvětlení v noci na produkci melatoninu člověka, který tak ztrácí sezónní rozdíl v délce trvání i amplitudě (Grundy et al., 2009; Kozaki et al., 2016). Naše výsledky spíše potvrzují, že délka melatoninového signálu se mezi létem a zimou nemění ani u dětí, ani u jejich matek. Je však překvapivé zjištění, že akrofáze rytmu melatoninu v létě se fázově zpožďuje za rytmem melatoninu v zimě téměř u všech pokusných subjektů s výjimkou dětí rodiny B. To pravděpodobně odráží pomalejší vzestup hladiny melatoninu v létě, který může být přeci jenom brzděn silnější intenzitou světla zvečera, než kterou dává umělé osvětlení domácností.

Ze srovnání záznamů aktivity dětí rodiny A a B mezi létem a zimou vyplývá, že se pro popis sezónních rozdílů cirkadiálního systému spíše nehodí a výsledky jsou maskovány sociálními interakcemi dětí a jednotně nastaveným životním režimem. Rozdíl mezi létem a zimou ve všedním dnu lze snadno vysvětlit rozdílnými ranními aktivitami, jako je ranní družina a podobně.

8. Závěr

Přestože se naší studii účastnil relativně malý počet subjektů, výsledky pozitivně korelovaly s několika hypotézami:

- 1) ověřili jsme předpoklad, že rytmus melatoninu probanda určeného dotazníkem CCTQ jako ranní chronotyp, nebo večerní chronotyp se fázově předbíhá, resp. zpožďuje vůči rytmu melatoninu jeho sourozence určeného jako nevyhraněný typ.
- 2) ověřili jsme předpoklad, že ranní aktivita probanda určeného dotazníkem CCTQ jako ranní chronotyp bude o víkendu, kdy se mohou děti řídit vlastní časovou preferencí, vyšší oproti sourozenci s nevyhraněným chronotypem.
- 3) ověřili jsme předpoklad, že ranní aktivita probanda určeného dotazníkem CCTQ jako ranní chronotyp se bude nejméně lišit mezi víkendem a školním dnem.
- 4) naše výsledky spíše souhlasí s předpokladem, že děti s pozdějším chronotypem vstávají ve školní dny v době, kdy je hladina jejich melatoninu ještě vysoká.

Naše výsledky také ukázaly, že rytmus melatoninu dětí i jejich matek v létě a v zimě se spíše liší svojí fází než délkou signálu. Z metodického hlediska jsme zjistili, že záznamy pohybové aktivity dětí lze pro použití popisu jejich cirkadiálního rytmu použít jen omezeně a jediným relativně spolehlivým markerem z těchto měření je záznam ranní aktivity, který je zřejmě závislý na míře ospalosti, jež je u člověka řízená cirkadiálním systémem.

Přes malý počet účastníků této studie, výsledky jednoznačně prokázaly, že u monozygotních dvojčat žijících ve stejném prostředí a jednotném režimu lze identifikovat fyziologické i behaviorální parametry definující vyvíjející se rozdílný chronotyp.

Seznam literatury

Allebrandt K. V., Teder-Laving M., Akyol M., Pichler I., Müller-Myshok B., Pramstaller P., Mellow M., Meitinger T., Metspalu A., Roenneberg T. (2010) CLOCK Gene Variants Associate with Sleep Duration in Two Independent Populations. *Biological Psychiatry*. 67(11): 1040-1047.

Archer S. N., Robillard D. L., Skene D. J., Smits M., Williams A., Arendt J., von Shantz M. (2003) A length polymorphism in the circadian clock gene *Per3* is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. *Sleep*. 26(4): 413-415.

Baehr E. K., Revelle W., Eastman C. I. (2000) Individual differences in the phase and amplitude of the human circadian temperature rhythm: with an emphasis on morningness – eveningness. *Journal of Sleep Research*. 9: 117-127.

Ball M. P., Li J. B., Gao Y., Lee J., LeProust E., Park I., Xie B., Daley G. Q., Church G. M. (2009) Targeted and genome-scale methylomics reveals gene body signatures in human cell lines. *Nature Biotechnology*. 27(4): 361-368.

Barclay N. L., Eley T. C., Parsons M. J., Willis T. A., Gregory A. M. (2013) Monozygotic Twin Differences in Non-shared Environmental Factors Associated with Chronotype. *Journal of Biological Rhythms*. 28(1): 51-61.

Barclay N. L., Watson N. F., Buchwald D., Goldberg J. (2014) Moderation of genetic and environmental influences on diurnal preference by age in adult twins. *Chronobiology International*. 31(2): 222-231.

Berger H., Brammar W. J., Yanofsky C. (1968) Analysis of amino acid replacements resulting from frameshift and missense mutations in the tryptophan synthetase A Gene of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*. 32(2): 219-238.

Bernard M., Iuvone P. M., Cassone V. M., Roseboom P. H., Coon S. L., Klein D. C. (1997) Avian melatonin synthesis: photic and circadian regulation of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the chicken pineal gland and retina. *Journal of Neurochemistry*. 68(1): 213-224.

Bruce V. G. (1972) Mutants of the Biological Clock in *Chlamydomonas Reinhardi*. *Genetics*. 70(4): 537-548.

Cajochen C., Brunner D. P., Kräuchi K., Graw P., Wirz-Justice A. (1995) Power density in theta/alpha frequencies of the waking EEG progressively increases during sustained wakefulness. *Sleep*. 18(10): 890-894.

Cardno A. G., Rijdsdijk F. V., West R. M., Gottesman I. I., Craddock N., Murray R. M., McGuffin P. (2012) A twin study of schizoaffective-manía, schizoaffective-depression, and other psychotic syndromes. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 159B(2): 172-182.

Carlson L. L., Weaver D. R., Reppert S. M. (1989) Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Endocrinology*. 125(5): 2670-2676.

- Carrier J.**, Monk T. H., Buysse D. J., Kupfer D. J. (1997) Sleep and morningness-eveningness in the 'middle' years of life (20-59 y). *Journal of Sleep Research*. 6(4): 230-237.
- Carter M. E.**, Yizhar O., Chikahisa S., Nguyen N., Adamantidis A., Nishino S., Deisseroth K., de Lecea L. (2010) Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nature Neuroscience*. 13(12): 1526-1533.
- Carskadon M. A.**, Dement W. C. (2011) Chapter 2- Normal Human Sleep: An Overview. Principles and practice of sleep medicine. 5th edition. 16-20.
- Castel M.**, Belenky M., Cohen S., Ottersen O. P., Strom-Mathisen J. (1993) Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*. 5(4): 368-381.
- Crowley S. J.**, Carskadon M. A. (2010) Modifications to weekend recovery sleep delay circadian phase in older adolescents. *Chronobiology international*. 27(7): 1469-1492.
- Damiola F.**, Le Minh N., Preitner N., Kornmann B., Fleury-Olela F., Schibler U. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & Development*. 14(23): 2950-2956.
- Dempster E. L.**, Pidsley R., Schalkwyk L. C., Owens S., Georgiades A., Kane F., Kalidindi S., Picchioni M., Kravariti E., Touloupoulou T., Murray R. M., Mill J. (2011) Disease-associated epigenetic changes in monozygotic twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder. *Human Molecular Genetics*. 20(24): 4786-4796.
- Dijk D. J.**, Czeisler C. A. (1995) Contribution of the circadian pacemaker and the sleep homeostat to sleep propensity, sleep structure, electroencephalographic slow waves, and sleep spindle activity in humans. *The Journal of Neuroscience*. 15(5): 3526-3538.
- Doi Y.**, Ishihara K., Uchiyama M. (2015) Associations of chronotype with social jetlag and behavioral problems in preschool children. *Chronobiology International*. 32(8): 1101-1108.
- Duffy J. F.**, Dijk D. J., Klerman E. B., Czeisler C. A. (1998) Later endogenous circadian temperature nadir relative to an earlier wake time in older people. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 275(5): 1478-1487.
- Duffy J. F.**, Dijk D. J., Hall E. F., Czeisler C. A. (1999) Relationship of endogenous circadian melatonin and temperature rhythms to self-reported preference for morning or evening activity in young and older people. *Journal of Investigative Medicine*. 47: 141-150.
- Duffy J. F.**, Rimmer D. W., Czeisler C. A. (2001) Association of intrinsic circadian period with morningness-eveningness, usual wake time, and circadian phase. *Behavioral Neuroscience*. 115(4): 895-899.
- Duffy J. F.**, Czeisler C. A. (2002) Age-related change in the relationship between circadian period, circadian phase, and diurnal preference in humans. *Neuroscience Letters*. 318(3): 117-120.
- Dursun O. B.**, Oqutlu H., Esin I. S. (2015) Turkish Validation and Adaptation of Children's Chronotype Questionnaire (CCTQ). *Eurasian Journal of Medicine*. 47(1): 56-61.

- Ebisawa T.**, Uchiyama M., Kajimura N., Mishima K., Kamie Y., Katoh M., Watanabe T., Sekimoto M., Shibui K., Kim K., Kudo Y., Ozeki Y., Sugishita M., Toyoshima R., Inoue Y., Yamada N., Nagase T., Ozaki N., Ohara O., Ishida N., Okawa M., Takahashi K., Yamauchi T. (2001) Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Reports*. 2(4): 342-346.
- Edgar D. M.**, Seidel W. F., Martin C. E., Sayeski P. P., Dement W. C. (1991) Triazolam fails to induce sleep in suprachiasmatic nucleus-lesioned rats. *Neuroscience Letters*. 125(5): 125-128.
- Eide E. J.**, Woolf M. F., Kang H., Woolf P., Hurst W., Camacho F., Vielhaber E. L., Giovanni A., Virshup D. M. (2005) Control of Mammalian Circadian Rhythm by CKIε-Regulated Proteasome-Mediated PER2 Degradation. *Molecular and cellular biology*. 25(7): 2795-2807.
- Etchegaray J.-P.**, Lee Ch., Wade P. A., Reppert S. M. (2003) Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature*. 421: 177-182.
- Feldman J. F.**, Hoyle M. N. (1974) A Direct Comparison between Circadian and Noncircadian Rhythms in *Neurospora crassa*. *Plant Physiology*. 53(6): 928-930.
- Fraga M. F.**, Ballestar E., Paz M. F., Ropero S., Setien F., Ballestar M. L., Heine-Suñer D., Cigudosa J. C., Urioste M., Benitez J., Boix-Chornet M., Sanchez-Aguilera A., Ling C., Carlsson E., Poulsen P., Vaag A., Stephan Z., Spector T. D., Wu Y. Z., Plass C., Esteller M. (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *PNAS*. 102(30): 10604-10609.
- Gekakis N.**, Staknis D., Nguyen H. B., Davis F. C., Wilsbacher L. D., King D. P., Takahashi J. S., Weitz J. C. (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*. 280(5369): 1564-1569.
- Giannotti F.**, Cortesi F., Sebastiani T., Ottaviano S. (2002) Circadian preference, sleep and daytime behaviour in adolescence. *Journal of Sleep Research*. 11: 191-199.
- Goel N.**, Basner M., Rao H., Dinges D. F. (2013) Circadian Rhythms, Sleep Deprivation, and Human Performance. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 119: 155-190. REVIEW
- Grundy A.**, Sanchez M., Richardson H., Tranmer J., Borugian M., Graham C. H., Aronson K. J. (2009) Light intensity exposure, sleep duration, physical activity, and biomarkers of melatonin among rotating shift nurses. *Chronobiology International*. 26(7): 1443-1461.
- Guo H.**, McKinley Brewer J., Lehman M. N., Bittman E. L. (2006) Suprachiasmatic regulation of circadian rhythms of gene expression in hamster peripheral organs: effects of transplanting the pacemaker. *The Journal of Neuroscience*. 26(24): 6406-6412.
- Hannibal J.**, Møller M., Ottersen O. P., Fahrenkrug J. (2000) PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. *Journal of Comparative Neurology*. 418(2): 147-155.

- Harada T.**, Kobayashi R., Wada K., Nishihara R., Kondo A., Akimitsu O., Noji T., Taniwaki N., Nakade M., Krejci M., Takeuchi H. (2011) Effect of birth season on circadian typology appearing in Japanese young children aged 2 to 12 years disappears in older students aged 18 to 25 years. *Chronobiology International*. 28(7): 638-642.
- He Y. M.**, Deng H. H., Shi M. H., Bodinga B. M., Chen H. L., Han Z. S., Jiang Z. L., Li Q. W. (2016) Melatonin modulates the functions of porcine granulosa cells via its membrane receptor MT2 in vitro. *Animal Reproduction Science*. ARTICLE IN PRESS.
- Hickman A. B.**, Klein D. C., Dyda F. (1999) Melatonin biosynthesis: the structure of serotonin N-acetyltransferase at 2.5 Å resolution suggests a catalytic mechanism. *Molecular Cell*. 3(1): 23-32.
- Hirayama J.**, Sahar S., Grimaldi B., Tamaru T., Takamatsu K., Nakahata Y., Sassone-Corsi P. (2007) CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature*. 450(7172): 1086-1090.
- Honma S.**, Ikeda M., Abe H., Tanahashi Y., Namihira M., Honma K., Nomura M. (1998) Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene Clock, in rat suprachiasmatic nucleus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 250(1): 83-87.
- Horne J. A.**, Ostberg O. (1976) A Self Assessment Questionnaire to Determine Morningness Eveningness in Human Circadian Rhythms. *International Journal of Chronobiology*. 4(2): 97-110.
- Ibuka N.**, Nihonmatsu I., Sekiguchi S. (1980) Sleep-wakefulness rhythms in mice after suprachiasmatic nucleus lesions. *Waking Sleeping*. 4(2): 167-173.
- Illnerová H.**, Backström M., Sääf J., Wetterberg L., Vangbo B. (1978) Melatonin in rat pineal gland and serum; rapid parallel decline after light exposure at night. *Neuroscience Letters*. 9(2-3): 189-193.
- Illnerová H.**, Hoffmann K., Vaněček J. (1984) Adjustment of pineal melatonin and N-acetyltransferase rhythms to change from long to short photoperiod in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. *Neuroendocrinology*. 38(3): 226-231.
- Irimia M.**, Weatheritt R. J., Ellis J. D., Parikshak N. N., Gonatopoulos-Pournatzis T., Babor M., Quesnel-Vallières M., Tapial J., Raj B., O'Hanlon D., Barrios-Rodiles M., Sternberg M. J., Cordes S. P., Roth F. P., Wrana J. L., Geschwind D. H., Blencowe B. J. (2014) A highly conserved program of neuronal microexons is misregulated in autistic brains. *Cell*. 159(7): 1511-1523.
- Ishihara K.**, Doi Y., Uchiyama M. (2014) The reliability and validity of the Japanese version of the Children's ChronoType Questionnaire (CCTQ) in preschool children. *Chronobiology International*. 31(9): 947-953.
- Johansson C.**, Willeit M., Smedh C., Ekholm J., Paunio T., Kiesepä T., Lichtermann D., Praschak-Rieder N., Neumeister A., Nilsson L. G., Kasper S., Peltonen L., Adolfsson R., Schalling M., Partonen T. (2003) Circadian clock-related polymorphisms in seasonal

affective disorder and their relevance to diurnal preference. *Neuropsychopharmacology*. 28(4): 734-739.

Juda M., Vetter C., Roenneberg T. (2013) The Munich Chronotype Questionnaire for Shift-Workers (MCTQShift). *Journal of Biological Research*. 28: 130-140.

Kang J. I., Park ch. I., Namkoong K., Kim S. J. (2015) Associations between polymorphisms in the NR1D1 gene encoding for nuclear receptor REV-ERBa and circadian typologies. *Chronobiology International*. 32(4): 568-572.

Kantermann T., Sung H., Burgess H. J. (2015) Comparing the Morningness-Eveningness Questionnaire and Munich ChronoType Questionnaire to the Dim Light Melatonin Onset. *Journal of Biological Rhythms*. 30(5): 449-453.

Katzenberg D., Young T., Finn L., Lin L., King D. P., Takahashi J. S., Mignot E. (1998) A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference. *Sleep*. 21(6): 569-576.

Kaur C., Ling E. A. (1999) Effects of melatonin on macrophages/microglia in postnatal rat brain. *Journal of Pineal Research*. 26(3): 158-168.

Keesler G. A., Camacho F., Guo Y., Virshup D., Mondadori C., Yao Z. (2000) Phosphorylation and destabilization of human period I clock protein by human casein kinase I epsilon. *NeuroReport*. 11(5): 951-955.

Kerkhof G. A., Lencel M. (1991) EEG Slow Wave Activity, REM Sleep, and Rectal Temperature During Night and Day Sleep in Morning-Type and Evening-Type Subjects. *Psychophysiology*. 28(6): 678-688.

Kijzer H., Smits M. G., Peeters T., Looman C. W., Endenburg S. C., Gunnewiek J. M. (2011) Evaluation of salivary melatonin measurements for Dim Light Melatonin Onset calculations in patients with possible sleep-wake rhythm disorders. *Clinica Chimica Acta*. 412(17-18): 1616-1620.

Klein D. C., Berg G. R., Weller J. (1970) Melatonin synthesis: Adenosin 3',5'-monophosphate and norepinephrine stimulate N-acetyltransferase. *Science*. 168(3934): 979-980.

Knoblauch V., Kräuchi K., Renz C., Wirz-Justice A., Cajochen C. (2002) Homeostatic control of slow-wave and spindle frequency activity during human sleep: effect of differentialsleep pressure and brain topography. *Cerebral Cortex*. 12(10): 1092-1100.

Ko C. H., Takahashi J. S. (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*. 15(2): 271-277.

Koskenvuo M., Hublin C., Partinen M., Heikkila K., Kaprio J. (2007) Heritability of diurnal type: a nationwide study of 8753 adult twin pairs. *Journal of Sleep Research*. 16: 156-162.

Koscec A., Radosevic-Vidacek B., Bakotic M. (2014) Morningness–eveningness and sleep patterns of adolescents attending school in two rotating shifts. *Chronobiology International*. 31(1): 52-63.

- Kozaki T.**, Kubokawa A., Taketomi R., Hatae K. (2016) Light-induced melatonin suppression at night after exposure to different wavelength composition of morning light. *Neuroscience Letters*. 616: 1-4.
- Kume K.**, Zylka M. J., Sriram S., Shearman L. P., Weaver D. R., Jin X., Maywood E. S., Hastings M. H., Reppert S. M. (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*. 98(2): 193–205.
- Kunorozva L.**, Stephenson K. J., Rae D. E., Roden L. C. (2012) Chronotype and PERIOD3 variable number tandem repeat polymorphism in individual sports athletes. *Chronobiology International*. 29(8): 1004-1010.
- Lack L.**, Bailey M., Lovato N., Wright H. (2009) Chronotype differences in circadian rhythms of temperature, melatonin, and sleepiness as measured in a modified constant routine protocol. *Journal of Nature and Science of Sleep*. 4(1): 1-8.
- Lee C.**, Etchegaray J.-P., Cagampang F. R. A., Loudon A. S. I., Reppert S. M. (2001) Posttranslational Mechanisms Regulate the Mammalian Circadian Clock. *Cell*. 107: 855-867.
- Lehnkering H.**, Siegmund R. (2007) Influence of chronotype, season, and sex of subject on sleep behavior of young adults. *Chronobiology International*. 24(5): 875-888.
- Lewy A. J.**, Cutler N. L., Sack R. L. (1999) The endogenous melatonin profile as a marker for circadian phase position. *Journal of Biological Rhythms*. 14: 227-236.
- Lu J.**, Jhou T. C., Saper C. B. (2006) Identification of wake-active dopaminergic neurons in the ventral periaqueductal gray matter. *Journal of Neuroscience*. 26(1): 193-202.
- Luca G.**, Haba Rubio J., Andries D., Tobback N., Vollenweider P., Waeber G., Margues Vidal P., Preisig M., Heinzer R., Tafti M. (2015) Age and gender variations of sleep in subjects without sleep disorders. *Annal of Medicine*. 47(6): 482-491.
- Lynch H. J.**, Wurtman R. J., Moskowitz M. A., Archer M. C., Ho M. H. (1975) Daily rhythm in human urinary melatonin. *Science*. 187(4172): 169-171.
- Maler T.**, Ralph M. R., Gorczynski R. M., Moldofsky H., O'Dowd B. F., Du D. C. (1992) The *Drosophila* per gene homologs are expressed in mammalian suprachiasmatic nucleus and heart as well as in molluscan eyes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 184(2): 1082-1087.
- Mang G. M.**, La Spada F., Emmenegger Y., Chappuis S., Ripperger J. A., Albrecht U., Franken P. (2016) Altered Sleep Homeostasis in Rev-erb α Knockout Mice. *Sleep*. 39(3): 589-601.
- Martin J. S.**, Laberge L., Sasseville A., Bérubé M., Alain S., Houle J., Hébert M. (2015) Day and night shift schedules are associated with lower sleep quality in Evening-types. *Chronobiology International*. 32(5): 627-636.

- Maywood E. S.**, Mrosovsky N., Field M. D., Hastings M. H. (1999) Rapid down-regulation of mammalian Period genes during behavioral resetting of the circadian clock. *Science*. 291: 490-493.
- McIntyre I. M.**, Norman T. R., Burrows G. D., Armstrong S. M. (1987) Melatonin rhythm in human plasma and saliva. *Journal of Pineal Research*. 4(2): 177-183.
- Miyazaki K.**, Nagase T., Mesaki M., Narukawa J., Ohara O., Ishida N. (2004) Phosphorylation of clock protein PER1 regulates its circadian degradation in normal human fibroblasts. *Biochemical Journal*. 380(1): 95-103.
- Mongrain V.**, Lavoie S., Selmaoui B., Paquet J., Dumont M. (2004) Phase relationships between sleep-wake cycle and underlying circadian rhythms in Morningness-Eveningness. *Journal of Biological Research*. 19(3): 248-257.
- Mongrain V.**, Carrier J., Dumont M. (2006a) Difference in sleep regulation between morning and evening circadian types as indexed by antero-posterior analyses of the sleep EEG. *European Journal of Neuroscience*. 23(2): 497-504.
- Mongrain V.**, Paquet J., Dumont M. (2006b) Contribution of the photoperiod at birth to the association between season of birth and diurnal preference. *Neuroscience Letters*. 406(1-2): 113-116.
- Mongrain V.**, Dumont M. (2007) Increased homeostatic response to behavioral sleep fragmentation in morning types compared to evening types. *Sleep*. 30(6): 773-780.
- Monk T. H.**, Buysse D. J., Rose L. R., Hall J. A., Kupfer D. J. (2000) The sleep of healthy people – a diary study. *Chronobiology International*. 17: 49-60.
- Moore R. Y.**, Eichler V. B. (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*. 42(1): 201-206.
- Moore R. Y.**, Speh J. C., Leak R. K. (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and Tissue Research*. 309: 89-98.
- Morin L. P.**, Blanchard J. H. (2001) Neuromodulator content of hamster intergeniculate leaflet neurons and their projection to the suprachiasmatic nucleus or visual midbrain. *Journal of Comparative Neurology*. 437(1): 79-90.
- Naruse Y.**, Oh-hashi K., Iijima N., Naruse M., Yoshioka H., Tanaka M. (2004) Circadian and Light-Induced Transcription of Clock Gene Per1 Depends on Histone Acetylation and Deacetylation. *Molecular and Cellular Biology*. 24(14): 6278-6287.
- Natale V.**, Adan A. (1999) Season of birth modulates morningness-eveningness preference in humans. *Neuroscience Letters*. 274: 139-141.
- Nosjean O.**, Ferro M., Coge F., Beauverger P., Henlin J. M., Lefoulon F., Fauchere J. L., Delagrangre P., Canet E., Boutin J. A. (2000) Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *Journal of Biological Chemistry*. 275(40): 31311-31317.

- Nováková M.**, Paclt I., Ptáček R., Kuželová H., Hájek I., Sumová A. (2011) Salivary melatonin rhythm as a marker of the circadian system in healthy children and those with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Chronobiology International*. 28(7): 630-637.
- Nováková M.**, Sládek M., Sumová A. (2013) Human Chronotype Is Determined in Bodily Cells Under Real-Life Conditions. *Chronobiology International*. 30(4): 607-617.
- Paine S.**, Gander P. H. (2016) Differences in circadian phase and weekday/weekend sleep patterns in sample of middle-aged morning types and evening types. *Chronobiology International*. 15: 1-9.
- Papantoniou K.**, Castaño-Vinyals G., Espinosa A., Aragonés N., Pérez-Gómez B., Burgos J., Gómez-Acebo I., Llorca J., Peiró R., Jimenez-Moleón J. J., Arredondo F., Tardón A., Pollán M., Kogevinas M. (2015) Night shift work, chronotype and prostate cancer risk in the MCC-Spain case-control study. *International Journal of Cancer*. 137(5): 1147-1157.
- Perreau-Lenz S.**, Kalsbeek A., Van Der Vliet J., Pévet P., Buijs R. M. (2005) In vivo evidence for a controlled offset of melatonin synthesis at dawn by the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Neuroscience*. 130(3): 979-803.
- Porkka-Heiskanen T.**, Strecker R. E., Thakkar M., Bjorkum A. A., Greene R. W., McCarley R. W. (1997) Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science*. 276(5316): 1265-1268.
- Preitner N.**, Damiola F., Lopez-Molina L., Zakany J., Duboule D., Albrecht U., Schibler U. (2002) The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB α Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell*. 110: 251-260.
- Provencio I.**, Rodriguey I. R., Jiang G., pār Hayes W., Moreira E. F., Rollag M. D. (2000) A Novel Human Opsin in the Inner Retina. *The Journal of Neuroscience*. 20(2): 600-605.
- Qiu X.**, Kumbalasisri T., Carlson S. M., Wong K. Y., Krishna V., Provencio I., Berson D. M. (2005) Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature*. 433(7027): 745-749.
- Rabstein S.**, Harth Y., Justenhoven C., Pesch B., Plöttner S., Heinze E., Lotz A., Baisch C., Schiffermann M., Brauch H., Hamann U., Ko Y., Brüning T., GENICA Consortium (2014) Polymorphisms in circadian genes, night work and breast cancer: results from the GENICA study. *Chronobiology International*. 31(10): 1115-1122.
- Reick M.**, Garcia J. A., Dudley C., McKnight S. L. (2001) NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science*. 293(5529): 506-509.
- Reppert S. M.**, Weaver D. R., Ebisawa T. (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*. 13(5): 1177-1185.
- Reppert S. M.**, Godson C., Mahle C. D., Weaver D. R., Slaugenhaupt S. A., Gusella J. F. (1995) Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *PNAS*. 92(19): 8734-8738.

- Roenneberg T.**, Wirz-Justice A., Mellow M. (2003) Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. *Journal of Biological Rhythms*. 18(1): 80-90.
- Roseboom P. H.**, Coon S. L., Baler R., McCune S. K., Weller J. L., Klein D. C. (1996) Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology*. 137(7): 3033-3045.
- Rusak B.**, Robertson H. A., Wisden W., Hunt S. P. (1990) Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Science*. 248(4960): 1237-1240.
- Sadeh A.**, Dahl R. E., Shahar G., Rosenblat-Stein S. (2009) Sleep and the Transition to Adolescence: A Longitudinal Study. *Sleep*. 32(12): 1602-1609.
- Sato T. K.**, Panda S., Miraglia L. J., Reyes T. M., Rudic R. D., McNamara P., Naik K. A., FitzGerald G. A., Kay S. A., Hogenesch J. B. (2004) A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*. 43(4): 527-537.
- Severino G.**, Manchia M., Contu P., Squassina A., Lampus S., Ardu R., Chillotti C., Del Zompo M. (2009) Association study in a Sardinian sample between bipolar disorder and the nuclear receptor REV-ERB α gene, a critical component of the circadian clock system. *Bipolar Disorders*. 11(2): 215-220.
- Sherin J. E.**, Shiromani P. J., McCarley R. W., Saper C. B. (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science*. 271(5246): 216-219.
- Sherin J. E.**, Elmquist J. K., Torrealba F., Saper C. B. (1998) Innervation of Histaminergic Tubero-mammillary Neurons by GABAergic and Galaninergic Neurons in the Ventrolateral Preoptic Nucleus of the Rat. *The Journal of Neuroscience*. 18(12): 4705-4721.
- Shinohara K.**, Tominaga K., Fukuhara C., Otori Y., Inouye S. I. (1993) Processing of photic information within the intergeniculate leaflet of the lateral geniculate body: assessed by neuropeptide Y immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of rats. *Neuroscience*. 56(4): 813-822.
- Simpkin C. T.**, Jenni O. G., Carskadon M. A., Wright K. P. Jr., Akacem L. D., Garlo K. G., LeBourgeois M. K. (2014) Chronotype is associated with the timing of the circadian clock and sleep in toddlers. *Journal of Sleep Research*. 23(4): 397-405.
- Strecker R. E.**, Morairty S., Thakkar M. M., Porkka-Heiskanen T., Basheer R., Dauphin L. J., Rainnie D. G., Portas C. M., Greene R. W., McCarley R. W. (2000) Adenosinergic modulation of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state. *Behavioural Brain Research*. 115(2): 183-204.
- Sumová A.**, Vaněček J. (1997) Melatonin inhibits GnRH-induced increase of cFOS immunoreactivity in neonatal rat pituitary. *Journal of Neuroendocrinology*. 9(2): 135-139.
- Taillard J.**, Philip P., Coste O., Sagaspe P., Bioulac B. (2003) The circadian and homeostatic modulation of sleep pressure during wakefulness differs between morning and evening chronotypes. *Journal of Sleep Research*. 12: 275-282.

- Taillard J.**, Philip P., Chastang J., Bioulac B. (2004) Validation of Horne and Ostberg Morningness-Eveningness Questionnaire in a Middle-Aged Population of French Workers. *Journal of Biological Rhythms*. 19(1): 76-86.
- Tan D. X.**, Manchester L. C., Terron M. P., Flores L. J., Tamura H., Reiter R. J. (2007) Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase-2, the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and significance. *Journal of Pineal Research*. 43(4): 317-320.
- Ticho S. R.**, Radulovacki M. (1991) Role of adenosine in sleep and temperature regulation in the preoptic area of rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 40(1): 33-40.
- Toh K. L.**, Jones Ch. R., He Y., Eide E. J., Hinz W. A., Virshup D. M., Ptáček L. J., Fu Y. (2001) An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*. 291(5506): 1040-1043.
- Tonetti L.**, Fabbri M., Martoni M., Natale V. (2011) Season of birth and sleep-timing preferences in adolescents. *Chronobiology International*. 28(6): 536-540.
- Tordjman S.**, Anderson G. M., Bellissant E., Botbol M., Charbuy H., Camus F., Graignic R., Kermarrec S., Fougerou C., Cohen D., Touitou Y. (2012) Day and nighttime excretion of 6-sulphatoxymelatonin in adolescents and young adults with autistic disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 37(12): 1990-1997.
- van der Pol A. N.**, Cao V., Heller H. C. (1998) Circadian System of Mice Integrates Brief Light Stimuli. *The American Journal of Physiology*. 275: 654-657.
- van der Meijden W. P.**, Van Someren J. L., te Lindert B. H. W., Bruijell J., van Oosterhout F., Coppens J. E., Kalsbeek A., Cajochen C., Bourgin P., Van Someren E. J. W. (2016) Individual Differences in Sleep Timing Relate to Melanopsin-Based Phototransduction in Healthy Adolescents and Young Adults. *Sleep*. 39(6): 1305-1310.
- Vargas A.**, Bustos-Obregón E., Hartley R. (2011) Effects of hypoxia on epididymal sperm parameters and protective role of ibuprofen and melatonin. *Biological Research*. 44(2): 161-167.
- Venner A.**, Anaclet C., Broadhurst R. Y., Saper C. B., Fuller P. M. (2016) A Novel Population of Wake-Promoting GABAergic Neurons in the Ventral Lateral Hypothalamus. *Current Biology*. 26: 1-7.
- Vitale J. A.**, Roveda E., Montaruli A., Galasso L., Weydahl A., Caumo A., Carandente F. (2015) Chronotype influences activity circadian rhythm and sleep: differences in sleep quality between weekdays and weekend. *Chronobiology International*. 32(3): 405-415.
- Werner H.**, LeBourgeois M. K., Geiger A., Jenni O. G. (2009) Assessment of chronotype in four- to eleven-year-old children: reliability and validity of the Children's Chronotype Questionnaire (CCTQ). *Chronobiology International*. 26(5): 992-1014.

- Wong P. M.**, Hasler B. P., Kamarck T. W., Muldoon M. F., Manuck S. B. (2015a) Social Jetlag, Chronotype, and Cardiometabolic Risk. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 100(12): 4612-4620.
- Wong C. C. Y.**, Parsons M. J., Lester K. J., Burrage J., Eley T. C., Mill J., Dempster E. L., Gregory A. M. (2015b) Epigenome-Wide DNA Methylation Analysis of Monozygotic Twins Discordant for Diurnal Preference. *Twin Research and Human Genetics*. 18(6): 662-669.
- Ye R.**, Selby C. P., Ozturk N., Annayev Y., Sancar A. (2011) Biochemical analysis of the canonical model for the mammalian circadian clock. *The Journal of Biological Chemistry*. 286(29): 25891-25901.
- Zavada A.**, Gordijn M. C., Beersma D. G., Daan S., Roenneberg T. (2005) Comparison of the Munich Chronotype Questionnaire with the Horne-Ostberg's Morningness-Eveningness Score. *Chronobiology International*. 22(2): 267-278.
- Zhang S.**, Zeitzer J. M., Yoshida Y., Wisor J. P., Nishino S., Edgar D. M., Mignot E. (2004) Lesions of the suprachiasmatic nucleus eliminate the daily rhythm of hypocretin-1 release. *Sleep*. 27(4): 619-627.
- Zimmermann L. K.** (2015) The influence of chronotype in the daily lives of young children. *Chronobiology International*. 33(3): 268-279.
- Zylka M. J.**, Shearman L. P., Weaver D. R., Reppert S. M. (1998) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*. 20(6): 1103-1110.

Přílohy

Příloha č. 1.: Dotazník CCTQ (Werner et al., 2009).

Dotazník dětských chronotypů

Prosím, odpovězte na následující otázky či vyberte nejlepší odpověď.

Osoba vyplňující dotazník: matka otec jiná osoba _____

Dnešní datum: ____ / ____ / ____ Pohlaví dítěte: muž žena

Datum narození dítěte: ____ / ____ / ____ Pořadí narození dítěte: _____

Věk dítěte: ____ let Je Vaše dítě jedináček? Ano Ne

Kolik dětí je ve Vaší nukleární rodině (matka, otec, děti): _____

Mají všechny děti stejné biologické rodiče? Ano Ne

Aktuální vzdělání dítěte:

Školka Základní škola –třída: _____ Nenavštěvuje žádnou školu

Pokud **ano**, kolik dní v týdnu ji navštěvuje? _____ Kolik hodin denně? _____

Chodí po škole do družiny nebo jej/ji hlídá chůva? Ano Ne

Pokud **ano**, kolikrát během týdne ji navštěvuje? _____ Kolik hodin denně? _____

Následující otázky se týkají rozvrhu spánku a bdění během školních dní v porovnání s dny volnými. Při vyplňování dotazníku se zamyslete nad chováním Vašeho dítěte během nedávné doby. U otázek, u kterých se mění podmínky (např. dítě navštěvuje družinu od 7:00 1x za týden a od 9:00 3x za týden), napište tyto změny nebo vyberte nejčastější odpověď.

Školní den

Rozvrh spánku a bdění je u dítěte přímo ovlivňován individuálními nebo rodinnými aktivitami (např. školou, návštěvou školní družiny, prací, atletikou, atd.)

Ve školním dnu (se) mé dítě:

1. probouzí v ____ : ____ hodin ráno.

2. pravidelně probouzí:

a) samo. b) s pomocí člena rodiny. c) pomocí budíku.

3. vstává z postele v ____:____ hodin ráno.

4. je plně probuzeno v ____:____ hodin ráno.

5. Chodí si pravidelně zdřímnout? Ano Ne

Pokud **ano**, chodí si zdřímnout _____ dnů v týdnu.

Pokud **ano**, spí _____ minut (na jedno zdřímnutí).

Pokud **ne**, proč? _____

Noc před školním dnem Vaše(mu) dítě(ti):

6. chodí spát (leží v posteli) v ____:____ hodin večer.

7. je připraveno usnout (jsou zhasnutá světla) v ____:____ hodin večer.

8. trvá usnout _____ minut po zhasnutí světel.

Volný den

Rozvrh spánku a bdění není u dítěte ovlivňován individuálními nebo rodinnými aktivitami (např. školou, návštěvou školní družiny, prací, atletikou, atd.)

Ve volném dni (se/si) Vaše dítě:

9. normálně probouzí v ____:____ hodin ráno.

10. probouzí ve stejný čas jako ve školním dni, ale po probuzení znovu usne.

Ano

Ne

Pokud **ano**, usne _____ minut po probuzení.

11. vstává z postele v ____:____ hodin ráno.

12. je plně probuzeno v ____:____ hodin ráno.

13. Chodí si pravidelně zdřímnout? Ano Ne

Pokud **ano**, chodí si zdřímnout _____ dnů v týdnu.

Pokud **ano**, spí _____ minut (na jedno zdřímnutí).

Pokud **ne**, proč? _____

Noc před volným dnem, Vaše(mu) dítě(ti):

14. chodí spát (leží v posteli) v ____:____ hodin večer.

15. je připraveno usnout (jsou zhasnutá světla) v ____:____ hodin večer.

16. trvá usnout _____ minut po zhasnutí světel.

U následujících otázek, prosím vyberte odpověď, která nejlépe popisuje Vaše dítě. Vezměte v potaz chování Vašeho dítěte v posledních týdnech. **Nejsou „správné“ ani „špatné“ odpovědi.**

17. * Pokud má být Vaše dítě vzbuzeno, jak těžké je, podle Vás, ho ráno vzbudit?

a. velmi těžké b. docela těžké c. mírně těžké d. málo těžké e. lehké/ mé dítě nemusí být buzeno

18. * Jak pozorné je Vaše dítě v první půl hodině po probuzení?

a. není pozorné b. málo pozorné c. mírně pozorné d. docela pozorné e. velmi pozorné

19. V kolik hodin by Vaše dítě vstávalo, kdyby se mohlo samo rozhodnout a kdyby si mohlo samo naplánovat den (např. o prázdninách) s přihlédnutím k jeho přirozenému rytmu?

a. před 6:30 b. 6:30 –7:14 c. 7:15 –9:29 d. 9:30 –10:14 e. po 10:15

20. V kolik hodin by šlo Vaše dítě spát, pokud by se mohlo samo rozhodnout a pokud by si mohlo samo naplánovat den (např. o prázdninách) s přihlédnutím k jeho přirozenému rytmu?

a. před 18:59 b. 19:00 –20:00 c. 20:00 –21:59 d. 22:00 –23:00 e. po 23:00

21. Předpokládejte, že Vaše dítě musí být na vrcholu svého výkonu kvůli náročnému dvouhodinovému testu. Pokud přihlédnete k jeho přirozenému rytmu a pokud máte svobodnou volbu naplánovat jeho den, jaký časový interval byste pro test zvolili?

a. 7:00 –11:00 b. 11:00 –15:00 c. 15:00 –20:00

22. Předpokládejte, že jste se rozhodli Vaše dítě zapsat do sportovního kroužku (např. plavání). Jediná volná hodina je od 7:00 do 8:00 hodin ráno dvakrát týdně. Jaký si myslíte, že bude mít Vaše dítě výkon?

- a. Bude ve velmi dobré formě
c. Bude v přiměřené formě
e. Bude to pro něj/ni velmi těžké
- b. Bude v dobré formě
d. Bude to pro něj/ni těžké

23. V kolik hodin večer se Vám zdá Vaše dítě unavené a má potřebu jít spát?

- a. dříve než v 18:30 b. v 18:30 –19:14 c. v 19:15 –21:29 d. v 21:30 –22:14 e. po 22:15

24. * Pokud by se Vaše dítě muselo budít každý den v 6 hodin ráno, jaké by to podle Vás pro něj/ni bylo?

- a. velmi obtížné
c. mírně obtížné
e. lehké
- b. docela obtížné
d. málo obtížné, ale nebyl by to problém

25. * Pokud by Vaše dítě muselo vždy chodit spát v _____, jaké by to podle Vás pro něj/ni bylo? (pro 2 roky v 18:00, pro 2 –4 roky v 18:30, pro 4-8 let v 19:00; pro 4 –8 let v 19:00; pro 8 –11 let v 19:30, pro 8 –11 let v 19:30)

- a. velmi obtížné
c. mírně obtížné
e. lehké
- b. docela obtížné
d. málo obtížné, ale nebyl by to problém

26. Když se Vaše dítě ráno probudí, jak dlouho mu trvá, než je zcela probuzeno?

- a. 0 minut (okamžitě) b. 1 –4 minuty c. 5 –10 minut d. 11 –20 minut e. více než 21 minut

Po zodpovězení výše uvedených otázek, můžete mít pocit jaký chronotyp nebo denní typ je Vaše dítě. Například, pokud si Vaše dítě o volném dni oproti dnu školnímu rádo spí, nebo jestliže je pro něj/ni obtížné v pondělí vstát, potom je Vaše dítě spíše večerní typ (sova). Naopak, pokud Vaše dítě vstává a cítí se energické/živé, jakmile vstane z postele, a pokud raději chodí spát dříve, tak je spíše ranní typ neboli skřivan. Prosím zařaďte své dítě k jedné z následujících možností. **Prosím vyberte pouze jednu kategorii.**

27. Vaše dítě je

- rozhodně ranní typ
 spíše ranní typ než večerní typ
 ani ranní ani večerní typ
- rozhodně večerní typ
 nevím
 spíše večerní typ než ranní typ

Chronotyp je určen sečtením bodů otázek 17-26 (a = 1; b = 2; c = 3; d = 4; e = 5). Výjimku tvoří otázky označené *, tam je pořadí bodů obráceno (a = 5; b = 4; c = 3; d = 2; e = 1).

Příloha č. 2.: Informovaný souhlas s podpisy rodičů.

Poučení a souhlas s účastí na projektu s názvem:

Sledování rytmu melatoninu monozygotních dvojčat jako markeru genetické kontroly cirkadiánní rytmicity

Vážení rodiče,

prosíme Vás o spolupráci na vědeckém výzkumu týkajícího se vývoje cirkadiánního systému člověka.

Cirkadiánní systém řídí nejrůznější fyziologické i psychologické procesy v našem těle. Řídí rytmus spánku a bdění, rytmus v tělesné teplotě, ve vylučování řady hormonů, ale i ve fyzické a psychické výkonnosti. Cirkadiánní systém má genetickou podstatu a fyziologické procesy se proto střídají i v prostředí, kde není zachované střídání dne a noci. Na rozdíl od většiny živočichů není cirkadiánní systém člověka úplně jednotný. Existují lidé, kteří jsou aktivní brzy zrána a chodí brzy spát a tito lidé mají tzv. ranní chronotyp. Naopak velká skupina lidí má tzv. večerní chronotyp, pro který je typické pozdní usínání a zvýšená večerní aktivita. Tyto chronotypy se liší i ve svých fyziologických parametrech, a je pro ně z fyziologického hlediska velmi obtížné přizpůsobit se většinové populaci a jejímu životnímu režimu synchronizovanému s 24 hodinovým dnem. V průběhu života mohou mít problémy se spánkem a větší náchylnost k některým tzv. civilizačním chorobám, jako je diabetes typu 2, obezita nebo deprese. Cirkadiánní systém člověka se doposud zkoumal pouze u dospělých lidí. Není proto zřejmé, do jaké míry jsou jeho odchylky dané přímou dědičností a do jaké míry jsou vytvořené již během vývoje působení nejrůznějších vlivů jako je stres, kouření, příjem drog a mnoho jiných vlivů o kterých se uvažuje zatím jen teoreticky.

Studium jednovaječných dvojčat nám umožní oddělit genetickou složku od vlivu prostředí. Pro naši studii potřebujeme, aby vaše děti žily společně a byly vystaveny obě stejnému životnímu rytmu. Pokud se přesto objeví mezi nimi rozdíl v cirkadiánní fázi nebo v amplitudě, můžeme uvažovat o tom, že odchylky cirkadiánního systému jsou utvářené ještě prenatálně. Zároveň vám napovíme, jestli se u vašich dětí vyvíjí ranní nebo večerní chronotyp a vy pak můžete zvážit např. výběr profese, který bude vyhovovat jejich ranní nebo noční aktivitě.

Výzkumný postup

1. Obdržíte od nás sadu zkumavek na sběr slin vašich dětí a toho rodiče, který s nimi lépe udržuje životní rytmus.
2. Požádáme vás o vzorky cca 2 ml slin do zkumavek (míra bude vyznačena ryskou na zkumavkách) ve 4-hodinových intervalech v průběhu dne a ve 2-hodinových intervalech v noci, tedy o 10 vzorků a jejich uložení do mrazáku.
3. Pokus proběhne 2x. Jednou v zimě, a podruhé v létě.

4. Pravidla pro odběr nejsou složitá. Je nutné pouze: nepít kávu dvě hodiny před odběrem, nečistit si zuby zubní pastou dvě hodiny před odběrem nebo raději vůbec, nejíst banány celý den a v době nočních odběrů nesvítit na sebe světlem silnějším než je zhruba světlo slabé baterky.

Rizika výzkumných postupů

Jedná se o neinvazivní odběry vzorků slin – rizikem je pouze zvýšená únava den po odběru v důsledku přerušovaného spánku. Experiment si ale můžete naplánovat sami v rozsahu jednoho měsíce na den, který vám bude nejlépe vyhovovat.

Odměna plynoucí z účasti v projektu

Účast v projektu není honorována.

Povinnost účasti na projektu

Účast na projektu je dobrovolná. Účastníci mohou svůj souhlas odvolat kdykoli v průběhu výzkumu nebo před jeho zahájením, a to i bez udání důvodů.

Důvěrnost osobních a jiných údajů získaných ve studii

Údaje o osobách zařazených do projektu jsou důvěrné. Výsledky tohoto projektu mohou být publikovány a/nebo prezentovány na vědeckých konferencích pouze v takové formě, aby nebylo možno přiřadit k jednotlivým výsledkům studie jména účastníků. Veškerý získaný biologický materiál bude zpracován pouze v rámci tohoto experimentu, nebude použit k jiným než výše zmíněným vědeckým účelům. Výzkumný projekt byl schválen Etickou komisí Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Děkujeme Vám za spolupráci

Pokud se rozhodnete s námi spolupracovat, potvrďte porozumění těmto informacím svým podpisem.

V případě potřeby můžete využít níže uvedené kontakty:

RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D: Katedra fyziologie Univerzity Karlovy v Praze,
zdenka.bendova@natur.cuni.cz; tel.: 221 951 796

Bc. Veronika Spišská: Katedra fyziologie Univerzity Karlovy v Praze,
spisskav@seznam.cz

Informovaný souhlas

Svým podpisem stvrzuji, že jsem si přečetl/a výše uvedené informace, těmto informacím rozumím a dobrovolně souhlasím se svou účastí ve studii. Zároveň převezmu podepsaný stejnopis tohoto formuláře.

BARBARA ELŠUICOVÁ

Jméno a příjmení účastníka studie

12.6.2015 B. E. C.

Datum, podpis

Informovaný souhlas

Svým podpisem stvrzuji, že jsem si přečetl/a výše uvedené informace, těmto informacím rozumím a dobrovolně souhlasím se svou účastí ve studii. Zároveň převezmu podepsaný stejnopis tohoto formuláře.

MICHAELA FIALOVÁ

Jméno a příjmení účastníka studie

19.6.2015 M. Fialová

Datum, podpis

Informovaný souhlas

Svým podpisem stvrzuji, že jsem si přečetl/a výše uvedené informace, těmto informacím rozumím a dobrovolně souhlasím se svou účastí ve studii. Zároveň převezmu podepsaný stejnopis tohoto formuláře.

Klára Zimová

Jméno a příjmení účastníka studie

26.6.2015 Klára Zimová

Datum, podpis

Příloha č. 3.: Příklad aktigrafického záznamu, který byl převeden do číselného formátu, který byl použit k dalším výpočtům (viz. kap. č. 4.6.2).

