

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Barbora Černá

Mechanismy mateřské synchronizace fetálních cirkadiálních hodin

Mechanisms of maternal entrainment of the fetal circadian clock

Diplomová práce

Školitel: PharmDr. Alena Sumová, DSc.

Praha, 2017

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 dne:

Podpis:

Poděkování

Chtěla bych poděkovat celému oddělení neurohumorálních regulací Fyziologického ústavu AV ČR za pomoc, zejména své školitelce PharmDr. Aleně Sumové, DSc. za trpělivost a čas, který mi věnovala a Mgr.Vendule Čečmanové za asistenci u celého projektu. Moje poděkování dále patří Mgr. Pavlu Houdkovi a Evě Suchanové za pomoc kdykoliv jsem potřebovala. V neposlední řadě chci také poděkovat celé své rodině za podporu.

Abstrakt

Naše tělo je vystavené velkému množství cyklických změn ve svém okolí, jako je například střídání dne a noci nebo ročních období. Aby mohl organismus tyto změny předvídat a včas na ně reagovat, je vybaven vnitřními hodinami, které rytmicky ovlivňují fyziologické procesy, jako jsou spánek nebo metabolické rytmy. Vzhledem k tomu, že narušení naší vnitřní rytmicity na molekulární i behaviorální úrovni přispívá k mnoha závažným onemocněním, je nezbytné, aby byly všechny mechanismy těchto vnitřních hodin správně vyvinuty a seřízeny. Za prvotní nastavení našich cirkadiánních hodin je odpovědná matka, která za pomoci nejrůznějších signálů předává embryu rytmickou informaci o střídání dne a noci. Ačkoliv je tato synchronizace mezi matkou a mládětem tématem, kterému se věnuje čím dál více pozornosti, dosud není znám její přesný mechanismus.

Tato práce si klade za cíl přispět k aktuálnímu poznání této problematiky. Experimenty, realizované v této práci, se týkají zkoumání schopnosti mateřských signálů synchronizovat centrální cirkadiánní hodiny embrya s okolními podmínkami. Březím samicím bylo manipulováno se světelným i potravním režimem a následně byl pozorován efekt těchto změn na neuronální aktivitu v suprachiasmatických jádrech 19ti denních embryí, měřený pomocí exprese genu *c-fos*.

Klíčová slova:

cirkadiánní hodiny, suprachiasmatická jádra, *c-fos*, ontogeneze, mateřská synchronizace

Abstract

Our body is influenced by many cyclical changes in the environment, such as day and night or seasons. To predict these changes and react to them in time, the organism is equipped with inner clock, which rhythmically influences many physiological processes, such as sleep or metabolic rhythms. Disrupting our inner rhythms at molecular and behavioral levels contributes to many serious disorders. It is necessary that all mechanisms of the inner circadian clock are developed and set up properly. Circadian clocks are set up by the mother, who passes rhythmical information about day and night cycle on to her embryo. Though a great attention is devoted to revealing the nature of this synchronization between the mother and her pup, the mechanisms of this process have not been fully understood yet.

The aim of this thesis is to contribute to actual understanding of this synchronization. Experiments, performed in this thesis, relate to studying the ability of maternal signals to synchronize embryos with the environment. Feeding and light regime of pregnant rats was manipulated and the effect of these changes on the neuronal activity within the suprachiasmatic nuclei of 19-day embryos was analyzed.

Key words:

circadian clock, suprachiasmatic nucleus, *c-fos*, ontogenesis, maternal synchronization

Obsah

1.	Úvod	11
2.	Literární přehled	13
2.1.	Biologické rytmy	13
2.2.	Cirkadiánní systém	13
2.2.1.	Cirkadiánní oscilátory v těle	13
2.2.2.	Centrální hodiny	14
2.2.2.1.	Stavba SCN.....	15
2.2.2.1.	Vstupní dráhy do SCN	15
2.2.2.2.	Výstupní dráhy SCN	17
2.2.2.2.1.	Melatonin	18
2.2.3.	Periferní hodiny	18
2.2.3.1.	Synchronizace v periférii	20
2.2.1.	Poruchy cirkadiánního systému	20
2.3.	Cirkadiánní hodiny na molekulární úrovni.....	22
2.4.	Hodinami kontrolované geny	23
2.5.	Ontogeneze SCN a jejich rytmů	25
2.5.1.	Ontogeneze SCN.....	25
2.5.2.	Vývoj rytmů v SCN	26
2.5.2.1.	Vývoj rytmů v SCN u myši	26
2.5.2.2.	Vývoj rytmů u křečka	26
2.5.2.3.	Vývoj rytmů u potkana	26
2.6.	Synchronizace mezi mládětem a matkou	29
2.6.1.	Mateřská signalizace	30
2.6.1.1.	Příjem potravy.....	30
2.6.1.2.	Melatonin.....	30

2.6.1.3. Dopamin.....	32
3. MATERIÁL A METODIKA	34
3.1. Zvířata.....	34
3.2. Uspořádání pokusů	34
3.2.1. Vliv posunu světelného režimu na embryonální SCN.....	34
3.2.1.1. Experimentální schéma.....	35
3.2.1. Vliv omezení příjmu potravy na embryonální SCN	36
3.2.1.1. Experimentální schéma.....	37
3.3. Zpracování vzorků.....	37
3.3.1. Krájení a laserová mikrodisekce.....	37
3.3.1. Sonikace.....	38
3.3.2. Izolace RNA	38
3.3.3. Reverzní transkripce	38
3.3.4. RT-PCR	39
3.3.4.1. Analýza dat RT-PCR	40
3.4. Statistická analýza	41
4. Výsledky.....	43
4.1. Vliv posunutí světelného režimu o 6 hodin ve směru fázového zpoždění na expresi genu <i>c-fos</i> u potkaních embryí.....	43
4.2. Vliv posunutí světelného režimu o 6 hodin ve směru fázového předběhnutí na expresi genu <i>c-fos</i> u potkaních embryí.....	45
4.3. Vliv příjmu potravy na expresi genu <i>c-fos</i> v SCN 19-denních embryí	47
5. Diskuze.....	49
5.1. Vliv posunutí světelného režimu na expresi genu <i>c-fos</i> u 19ti denních potkaních embryí.....	50
5.2. Vliv manipulace s příjmem potravy na expresi genu <i>c-fos</i> u 19ti denních potkaních embryí.....	51
6. Závěr.....	54

Citace..... 55

Seznam zkratek

AA NAT	aralkylamine N-acetyl transferáza
AVP	arginin vasopresin
B2M	r β -2-mikroglobulin
<i>B2m</i>	gen pro r β -2-mikroglobulin
BMAL1	brain a muscle Arnt-like 1
<i>Bmal1</i>	brain a muscle Arnt-like 1 gen
CCG	clock controlled protein
<i>Ccg</i>	clock controlled gen
CLOCK	circadian locomotor output cycles kaput
<i>Clock</i>	circadian locomotor output cycles kaput gen
CREB	cAMP response element binding protein
CRY1	cryptochrome 1
<i>Cry1</i>	cryptochrome 1 gen
CT	circadian time
DBP	albumin D-site-binding protein
DM	dorzomediální
E	embryonální den
GABA	gama aminomáselná kyselina
IGL	intergenikulární listek

LD	light : dark
LL	light : light
NPAS2	neuronal PAS domain 2
<i>Npas2</i>	neuronal PAS domain 2 gene
OC	optické chiasma
P	postnatální den
PER 1	period 1
<i>Per 1</i>	period 1 gen
PER 2	period 2
<i>Per 2</i>	period 2 gen
PH	periferní hodiny
PVN	paraventriculární jádro hypothalamu
RF	restricted feeding
ROR	retinoid related orphan receptor
RTH	retinohypothalamický trakt
RT-PCR	real time-PCR
SCN	suprachiasmatic nucleus
SPO	soběstačné periferní oscilátory
V3	třetí mozková komora
VIP	vasoaktivní intestinální peptid
VL	ventrolaterální

ZPO závislé periferní oscilátory

1. Úvod

Většina živých organismů vykazuje rytmicitu na behaviorální a fyziologické úrovni, jakou je spánek a bdění, tělesná teplota nebo metabolické procesy. Tyto vnitřní rytmy živočichů vznikly jako odpověď na pravidelně se měnící podmínky okolního prostředí, zahrnující především střídání dne a noci, a pomáhají je předvídat a přizpůsobit se jim.

Rytmické změny vnitřního prostředí živých organismů probíhají s různou periodou. Jedny z nejdůležitějších jsou tzv. cirkadiánní rytmy (lat. circa = okolo; dies = den), které se opakují přibližně každých 24 hodin. Tyto rytmy jsou u savců řízené centrálním endogenním oscilátorem v suprachiasmatických jádrech hypothalamu (SCN). Na molekulární úrovni vznikají v každé buňce jader pomocí rytmické exprese tzv. hodinových genů, které se vzájemně ovlivňují pomocí transkripčně translačních zpětnovazebných smyček.

Vnitřní cirkadiánní hodiny podléhají hierarchickému uspořádání. Nejvýše jsou postavena SCN, která přijímají informace z retiny o světelném stavu okolního prostředí a tuto informaci poté předávají periférii prostřednictvím rytmické sekrece hormonů, nebo pomocí vegetativního nervového systému. Stejně jako v neuronech SCN, jednotlivé buňky periferních orgánů, jako jsou například játra, střevo nebo pankreas, vykazují vlastní expresi cirkadiánních genů. Tyto periferní oscilace jsou však závislé na SCN, které je synchronizují s okolním prostředím.

Nyní se začíná čím dál více pozornosti věnovat vývoji cirkadiánních rytmů. Ty vznikají v SCN postupně a jejich vývoj začíná již na fetální úrovni, kde je za správné nastavení rytmicity odpovědná matka. Mateřské rytmy jsou shodné s rytmy embrya, což předpokládá synchronizační signál mezi matkou a plodem. Do této doby však není znám přesný mechanismus tohoto signálu, ani způsob, jakým jej embryo přijímá. Cílem této práce je přispět k poznání těchto mechanismů synchronizace mezi matkou a mládětem. Zaměřila jsem se na 19ti denní embrya a způsob, jak je jejich vyvíjející se SCN ovlivněno manipulací s příjmem potravy a posunutím světelného režimu, jimž je vystavena jejich matka.

Cíle této diplomové práce jsou:

1. Zjistit, zda posunutí světelného režimu ve směru fázového zpoždění nebo předběhnutí, realizované v embryonálním věku 14 (E14) ovlivní denní profil exprese genu *c-fos* v SCN u 19ti denních embryí potkana
2. Zjistit, zda omezení doby příjmu potravy (restricted feeding, RF) na 6 hod během dne od prvního dne březosti samicím vystaveným stálému světlu (LL) ovlivní denní profil exprese genu *c-fos* v SCN 19ti denních embryí potkana

2. Literární přehled

2.1. Biologické rytmy

Většina procesů v našem těle probíhá rytmicky. Tyto biologické rytmy mají různě dlouhou periodu. Podle délky periody je můžeme rozdělit na ultradiánní, infradiánní a cirkadiánní. Ultradiánní rytmy se opakují častěji než jednou za den. Jako příklad může být uveden rytmus v neuronální aktivitě, nebo dýchání. U infradiánních rytmů, mezi které patří menstruační cyklus, nebo migrace, je perioda dlouhá více dní a někdy i déle než rok. Posledním a zároveň nejdůležitějším typem jsou rytmy cirkadiánní, které se opakují přibližně jednou za den a mezi které spadají spánkové cykly, rytmus v tělesné teplotě nebo tvorbě hormonů.

Cirkadiánní rytmy vznikly jako evoluční adaptace. Další příklady rytmů, které se řídí kosmickými cykly, jsou semilunární (jednou za 14,7 dní) cirkalunární (jednou za 29,5 dní) a cirkaanuální (jednou za 365 dní) rytmy.

2.2. Cirkadiánní systém

2.2.1. Cirkadiánní oscilátory v těle

V evoluci se u téměř všech organismů žijících v periodickém prostředí vyvinul systém cirkadiánních oscilátorů. Místo, uspořádání a molekulární mechanismus těchto oscilátorů se mezi jednotlivými organismy liší, avšak jejich podstata, tedy synchronizace organismu s vnějším světem, je stejná (Zordan et al., 2000). U savců podléhá cirkadiánní systém hierarchickému uspořádání (Yamazaki et al., 2000).

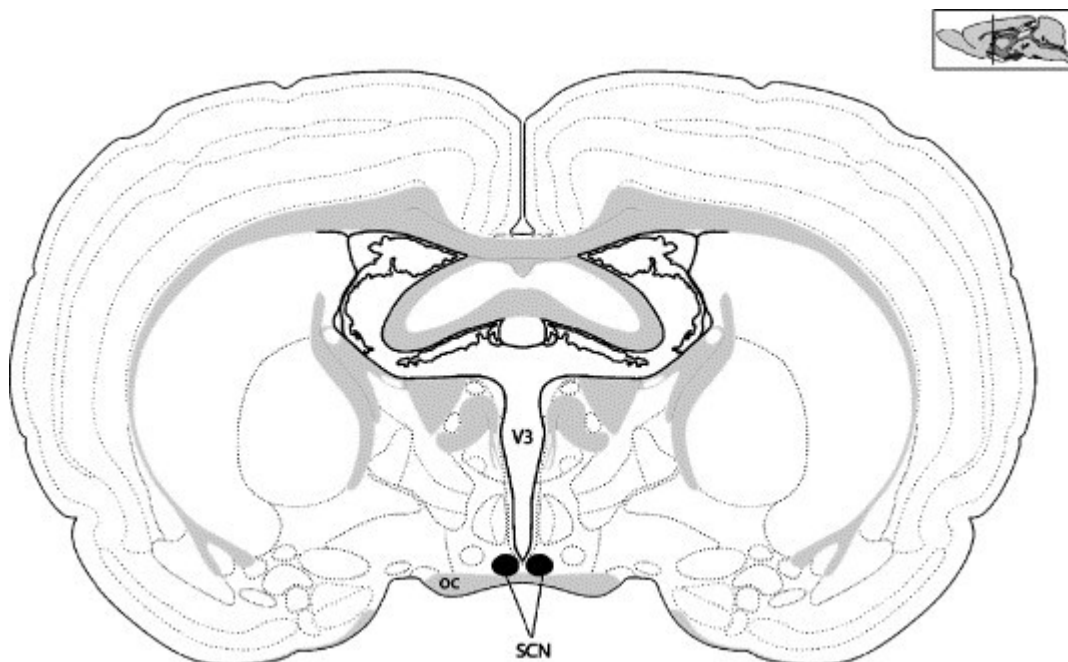
Nejvýše postavený je tzv. centrální pacemaker. Jedná se o oscilátor, který je schopen samostatné tvorby cirkadiánních rytmů bez snížení jejich amplitudy v čase. Tento pacemaker je endogenní povahy, dokáže tedy indukovat tvorbu rytmů nezávisle i bez přítomnosti vnějších vlivů.

Centrální pacemaker synchronizuje tzv. semiautonomní oscilátory. Jedná se o buňky v našem těle, které jsou sice schopné samostatně generovat rytmy v expresi hodinových genů, nedokáží však tuto rytmicitu udržet dlouhodobě synchronizovanou v rámci jednoho orgánu a bez působení centrálního pacemakeru dochází k jejich desynchronizaci.

Posledním typem oscilátorů je tzv. "slave" oscilátor. Zde se jedná o buňky, které nejsou schopné tvořit rytmy v cirkadiálních genech samy od sebe a vyžadují iniciaci tvorby oscilací od nějakého výše postaveného oscilátoru.

2.2.2. Centrální hodiny

Centrálním pacemakerem v těle savců jsou suprachiasmatická jádra (Moore and Eichler, 1972; Stephan and Zucker, 1972). Jedná se o párovou strukturu, složenou v mozku potkana zhruba z 10 000 neuronů. Tato jádra se nacházejí v anteriorní části hypothalamu nad křížením optických nervů a v těsné blízkosti třetí komory (viz obr. 1).



Obr. 1: Řez mozkiem potkana s vyobrazenými suprachiasmatickými jádry (SCN), které se u potkana nachází těsně nad optickým chiasmatem (OC) a přiléhají k třetí mozkové komoře (V3) (Kriegsfeld and Silver, 2006)

Jak zde již bylo zmíněno, centrální pacemaker je endogenní povahy a proto mohou v buňkách SCN vznikat rytmy v expresi genů i bez přítomnosti vnějších vlivů. Lokalizace centrálního oscilátoru u savců byla zjištěna na základě několika experimentů, kdy jedním z nich byla například izolace těchto jader od okolní tkáně (Inouye and Kawamura, 1979), vypořádání ztráty rytmicity v těle při lézi SCN (Moore and Eichler, 1972) a nebo důkaz přenosu funkčních hodin transplantací z dárce na příjemce (Lehman et al., 1987; Ralph et al., 1990)

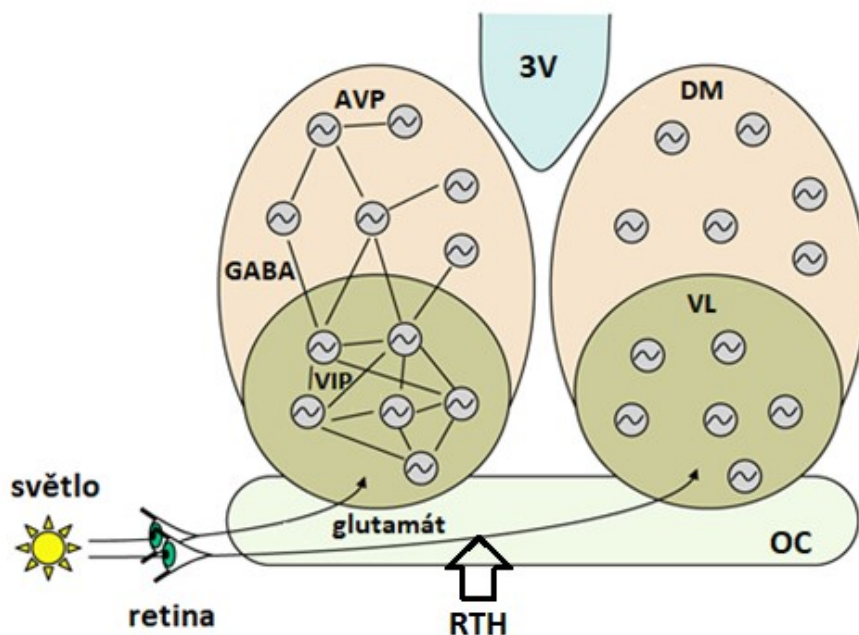
2.2.2.1. Stavba SCN

Každé suprachiasmaické jádro se dělí na dvě části, které jsou schopné tvořit vlastní vnitřní rytmicitu nezávisle na sobě (Shinohara et al., 1995). Jedná se o část ventrolaterální (VL) a dorzomediální (DM) (viz obr. 2). VL substruktura SCN obsahuje neurony, které jsou schopné odpovědět na světelný stimul (Jiao and Rusak, 2003; Shibata et al., 1984) a je v přímém kontaktu s chiasmatem, tudíž přijímá informaci o světelném stavu z optických nervů. Dále je charakteristická přítomností neuronů, syntetizujících vasoaktivní intestinální peptid (VIP), který je odpovědný za synchronizaci a sílu rytmicity v rámci všech buněk SCN. Pokud nedochází k správně signalizaci přes VIP receptory, neurony se stávají desynchronizovanými a mizí rytmus v jejich elektrické aktivitě (Maywood et al., 2006). DM SCN přijímá informace z kortexu a hypothalamu a vykazuje rytmus v tvorbě arginin-vasopresinu (AVP) (Cagampang et al., 1994; Moore et al., 2002). Obě tyto substrukтуры jsou propojené četnými neurálními spoji a vzájemně komunikují. Pokud dojde k jejich rozdělení, pouze VL část SCN si zachová synchronizované rytmy (Yamaguchi et al., 2003).

Další látkou, které se podílí na funkci SCN je například inhibiční neurotransmitter-kyselina gama amino máselná (GABA) (Albus et al., 2005).

2.2.2.1. Vstupní dráhy do SCN

SCN přijímá světelné signály z retiny a signály nesvětelné povahy z jiných mozkových struktur. Hlavním vstupem do SCN je retinohypothalamický trakt (RTH), který za pomoci výlevu glutamátu vede informaci o aktuálním světelném stavu okolního prostředí (Ding et al., 1997; Gooley et al., 2001). RTH začíná u světločivných buněk v retině, pokračuje



Obr. 2: SCN se dělí na dvě substruktury: ventrolaterální (VL) a dorzomediální (DM). VL část SCN naléhá na optické chiasma (OC) a přijímá vstupy z RHT, který pro mezibuněčnou komunikaci využívá aminokyselinu glutamát. VL i DM tvoří specifické signální látky. Pro VL je charakteristický VIP a v DM se tvoří převážně AVP. VIP i AVP jsou buňkami SCN tvořeny rytmicky. (upraveno podle Hafner et al., 2012)

optickými nervy a končí ve VL části SCN, kde informace o světelném pulzu indukuje tvorbu specifických hodinových genů (Akiyama et al., 1999).

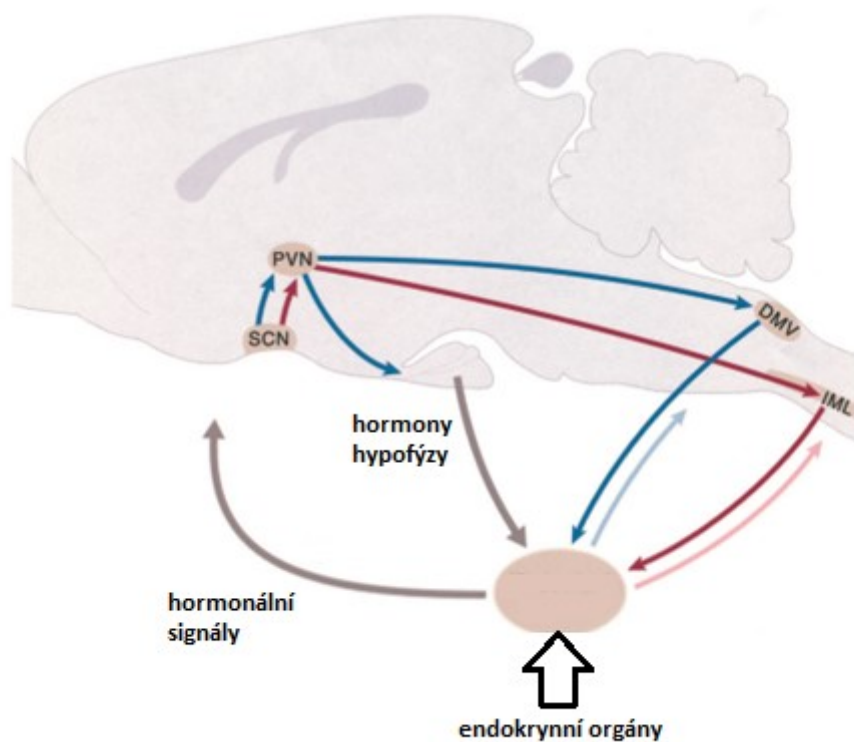
Dalším nepřímým vstupem z retiny do VL SCN je genikulohypothalamický trakt, který vede sekundární vizuální informaci přes intergenikulární lístek thalamu (IGL), ve kterém dochází k začlenění informací nesvětelného charakteru (Abe and Rusak, 1992; Moore and Card, 1994).

Poslední vstup do SCN vychází z raphe nuclei, které vede hlavně nesvětelné podněty (Moga and Moore, 1997).

2.2.2.2. Výstupní dráhy SCN

Výstupní dráhy z SCN míří do dalších oblastí mozku, a poté nepřímo do míchy a periferních orgánů. Tyto dráhy synchronizují semiautonmní a "slave" oscilátory za cílem synchronizovat procesy v celém těle se světelnými podmínkami okolního prostředí (Buijs et al., 2003).

SCN projikuje např. do paraventriculárního jádra hypothalamu (PVN), které je důležitým přepojovacím centrem. PVN dále vysílá signály do hypofýzy, čímž moduluje rytmus v sekreci hormonů, spinální míchy a bloudivého nervu (viz obr. 3)



Obr. 3: Znáornění základních cest, kterými je SCN propojeno s periferií těla. První výstup z SCN, vede přes neuroendokrinní neuroy paraventriculárního jádra hypothalamu (PVN) do hypofýzy, kde ovlivňuje tvorbu hormonů. Druhý výstup vede opět přes PVN a končí v dorzálním motorickém jádre bloudivého nervu (DMV). I třetí výstup z SCN vede přes PVN a míří do preganglionických neuronů intermediolaterálního sloupce páteřní míchy (IML) (upraveno podle Buijs et al., 2003)

2.2.2.2.1. Melatonin

Nepřímým neurohumorálním výstupem z SCN je melatonin. Jedná se o molekulu, která je rytmicky tvořena v buňkách epifyzy z aminokyseliny tryptofanu. Epifyza podléhá regulaci SCN (Perreau-Lenz et al., 2005) a sekrece melatoninu představuje dobře čitelnou zprávu pro periferii těla o aktuálním světelném stavu okolí. Mezi další orgány, které tvoří melatonin, patří např. retina, kostní dřeň a gastrointestinální trakt.

Pro tvorbu melatoninu je limitujícím enzymem aralkylamine N-acetyl transferáza (AA NAT) (Baler et al., 1997). Tento enzym je u savců regulován na úrovni transkripce a jeho stabilita je ovlivněna i postranlačními modifikacemi, jako je fosforylace (Klein et al., 1997). Všechny tyto regulace napomáhají tvorbě cirkadiánní rytmicity v množství enzymu. V průběhu noci je hladina AA NAT nejvyšší a během dne klesá. Tento rytmus v množství enzymu přirozeně kopíruje i rytmická hladina melatoninu v těle (Illnerova and Vanecek, 1988).

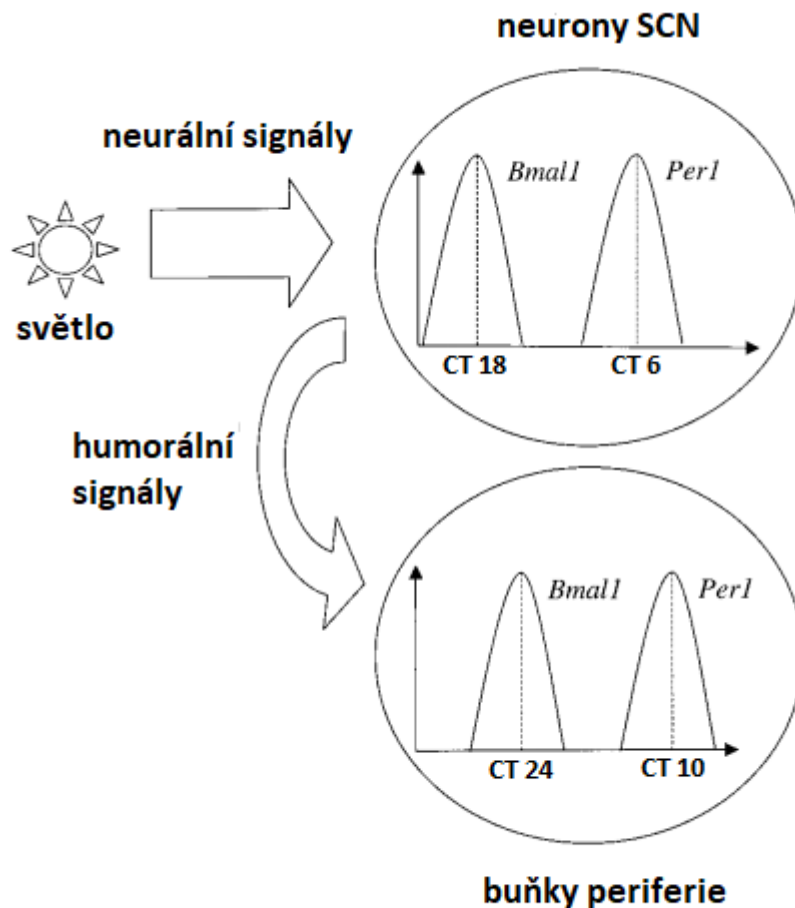
Melatonin hraje důležitou roli v mnoha fyziologických procesech, jako je sezónní reprodukce (Carter and Goldman, 1983), regulace spánku (Monti et al., 1999) nebo ovlivnění krevního tlaku (Scheer et al., 2004). Nedostatečná sekrece, nebo změna v rytmu melatoninu doprovázela změny v duševním stavu a byla prokázána např. u pacientů trpících depresí (Claustrat et al., 1984; Tuunainen et al., 2002).

2.2.3. Periferní hodiny

Stejně jako SCN, i buňky periferních orgánů jsou schopné generovat rytmy. Tyto periferní oscilátory však vyžadují synchronizaci ze strany centrálního pacemakeru, tedy z SCN. Podobně jako SCN, i buňky periferie jsou schopné po určitou dobu generovat pravidelné rytmy bez vnějšího signálu, jejich amplituda však postupně klesá a rytmy v jednotlivých buňkách se stávají v rámci jednoho orgánu desynchronizované (Yoo et al., 2004). Současně dochází k rozpadu behaviorální rytmicity (Stephan and Zucker, 1972).

Ačkoliv neurony SCN a buňky periferních orgánů jsou schopny vytvářet rytmy v expresi hodinových genů, liší se vzájemně v načasování těchto oscilací, kdy v periferii jsou

o tyto rytmy několik hodin fázově opožděny (Balsalobre et al., 1998; Oishi et al., 1998a, b) (viz obr. 4).



Obr.4: Exprese cirkadiálních genů v periferních orgánech je oproti SCN fázově opožděna o několik hodin. Toto zpoždění je pravděpodobně způsobeno časem, který je potřeba vynaložit na tvorbu a transport humorálních signálů do periferie (upraveno podle Balsalobre, 2002).

Mezi periferní orgány, u kterých byla prokázána rytmicita v expresi hodinových genů patří například játra (Tahara et al., 2012), tuková tkáň (Ando et al., 2005), pankreas (Muhlbauer et al., 2004), kolon (Sladek et al., 2007) a kosterní sval (McCarthy et al., 2007).

2.2.3.1. Synchronizace v periférii

Periferní orgány nemají žádný přímý kontakt s retinou a proto jsou závislé na výstupech z SCN, které jsou popsány výše. Signály z centrálního pacemakeru však nejsou jediné, které periferie přijímá a které ji ovlivňují.

Pro orgány, jako jsou například játra nebo pankreas, je velmi silným synchronizačním signálem příjem potravy. Pokud jsou potkani, kteří jsou přirozeně nočními zvířaty, vystaveni možnosti přijímat potravu pouze přes den, rytmy v periférii zareagují na tuto situaci a jejich načasování se tomu přizpůsobí. Oscilace v SCN, synchronizované světlem však zůstanou nezměněné (Stokkan et al., 2001), což vede k vzájemné desynchronizaci centrálních a periferních hodin v organismu.

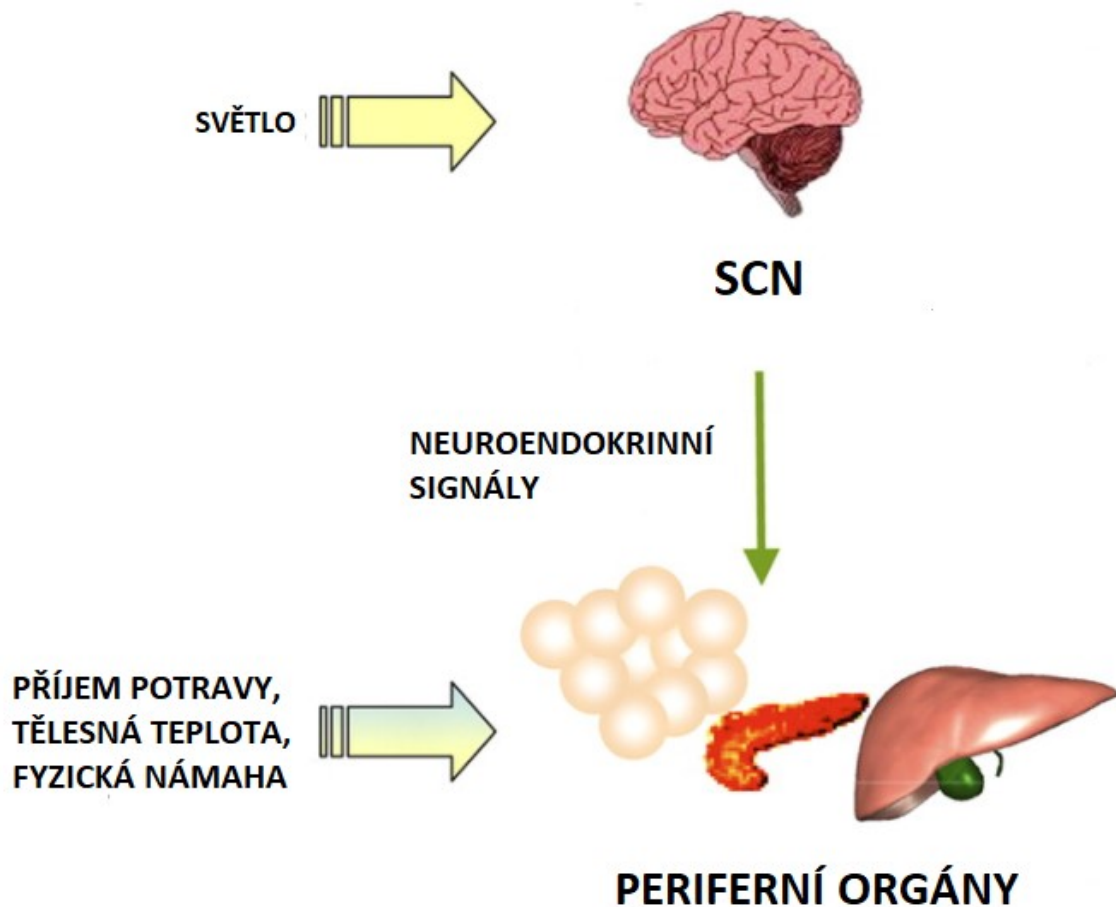
Stejného výsledku dosáhly i experimenty na myších, u kterých potrava, podávaná v průběhu dne posunula fázi exprese hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Cry1* v játrech o 12 hodin. Dostupnost potravy v noci měla jen malý efekt na transkripci hodinových genů, což se dá předpokládat vzhledem k tomu, že myši konzumují většinu potravy v noci (Damiola et al., 2000).

Omezená dostupnost potravy dokáže ovlivnit i aktivitu pokusných zvířat, která je zvýšená před očekávaným přístupem k potravě (Marchant and Mistlberger, 1997).

Mezi další signály nesevětelné povahy, které ovlivňují nastavení periferních hodin, patří tělesná teplota (Brown et al., 2002) a fyzická aktivita (Buxton et al., 2003) (viz obr. 5).

2.2.1. Poruchy cirkadiánního systému

Pokud náš životní styl nerespektuje přirozený cirkadiánní rytmus, může docházet k narušení cirkadiánních hodin a následně ke vzniku řady nemocí. Rizikovým faktorem jsou v tomto smyslu práce na směny, nebo časté přelety přes více časových pásem. Toto narušení přirozeného běhu rytmů v našem těle může přispívat k metabolickému syndromu (Jean-Louis et al., 2014; Karlsson et al., 2001) nebo rozvoji nádorového onemocnění. U žen, které pracují



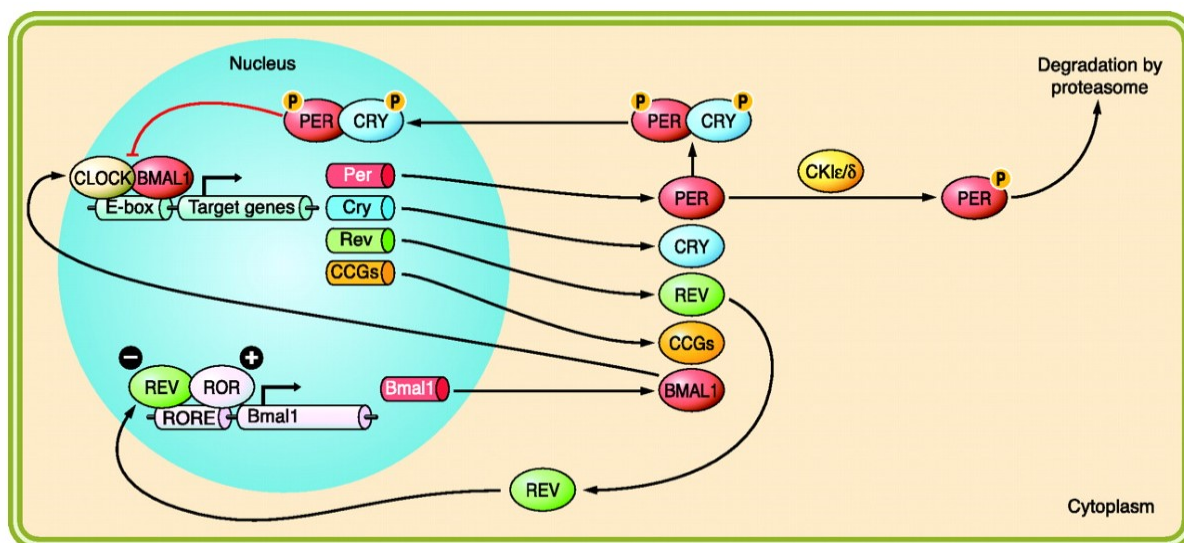
Obr. 5: Periferní orgány přijímají nejrůznější synchronizační signály, mezi které patří hormonální a neurální výstupy z SCN, fyzická aktivita, nebo příjem potravy (upraveno podle Duez and Staels, 2009).

na směny byla naměřena zvýšená hladina estrogenu (Schernhammer et al., 2004) a zároveň i zvýšený výskyt nádorů prsu (Schernhammer et al., 2001). Mezi další orgány, u kterých bylo naznačeno spojení mezi směnným provozem a zvýšeným výskytem rakoviny je prostata (Kubo et al., 2006), tlusté střevo a rectum (Schernhammer et al., 2003).

Jedním z možných vysvětlení zvýšeného výskytu rakoviny u osob, které pracují na směny je narušená rytmicita v tvorbě melatoninu, který má tumor-supresivní účinky (Cos et al., 2002; Kanishi et al., 2000).

2.3. Cirkadiánní hodiny na molekulární úrovni

Cirkadiánní hodiny jsou na molekulární úrovni tvořeny skupinou tzv. hodinových genů. Jedná se o geny, které se vyznačují rytmickou expresí a jejichž produkty se vzájemně ovlivňují pomocí zpětnovazebné smyčky (viz obr. 6). Tento princip tvorby rytmů byl pozorován nejen u savců, ale například i u rostlin a bakterií.



Obr. 6: Zpětnovazebná smyčka cirkadiánních genů (Golombek and Rosenstein, 2010)

Mezi základní hodinové proteiny u savců patří BMAL1 (Brain a muscle Arnt-like protein) a CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput), nebo jeho paralog NPAS2 (neuronal PAS domain protein 2). BMAL1 a CLOCK/NPAS2 tvoří heterodimery, které se mohou v buněčném jádře vázat na tzv. E-box elementy v promotorech dalších hodinových genů, kterými jsou *Per* (Period) (Shearman et al., 1997) a *Cry* (Cryptochrome) a aktivovat jejich transkripci. Produkty genů *Per* a *Cry* se hromadí v cytoplasmě a tvoří spolu heterodimery.

Komplex PER:CRY je ovlivněn pomocí posttranslačních modifikací, jako je například jejich fosforylace a následná degradace v proteasomu (Akashi et al., 2002; Camacho et al., 2001; Eide et al., 2002). Aktivní odstraňování proteinů PER a CRY přispívá ke zpoždění, s jakým se komplex PER:CRY dostává zpět do buněčného jádra, kde inhibuje transkripci genu *Bmal1* a *Clock/Npas2* (Akashi et al., 2002; Gekakis et al., 1998; Kume et al., 1999).

Tato základní zpětnovazebná smyčka hodinových genů je ovlivněna dalšími regulačními proteiny, kterými jsou například REV-ERB α a ROR (Retinoid related Orphan Receptor).

ROR a REV-ERB α kompetují o vazbu na tzv. RORE elementy v promotoru genu *Bmal1*. Zatímco protein REV-ERB α inhibuje syntézu mRNA genu *Bmal1*, ROR ji aktivuje (Guillaumond et al., 2005).

Hodinové proteiny, které se účastní tvorby zpětnovazebné smyčky dále ovlivňují expresi mnoha dalších genů (CCG, clock controlled genes), která díky tomu získává cyklický charakter.

2.4. Hodinami kontrolované geny

V jednotlivých buňkách nejsou rytmicky exprimované jen hodinové geny. Řada dalších genů je charakteristická svou rytmickou transkripcí, která je ovlivněná rytmicky tvořenými proteiny. Cílem těchto genů je předat rytmický signál vznikající na úrovni zpětnovazebné smyčky dál do celého těla.

Tvorba CCG v periférii je modulována signály z SCN a stejně tak i vlastními signalizačními drahami z periferních orgánů, což zajišťuje periferním tkáním určitou flexibilitu a schopnost reagovat na neobvyklé situace. Názorným příkladem je posunutí cirkadiánních hodin periférie do opačné fáze oproti rytmům v SCN, kterého bylo docíleno při krmení nočních hlodavců pouze ve světlou část dne (Damiola et al., 2000).

Mezi CCG patří již zmíněný AVP, což je peptid, tvořený neurony v hypothalamu, který ovlivňuje zpětné vychytávání vody ve sběrných kanálcích ledvin. AVP je produkován i v SCN, na rozdíl od ostatních částí hypothalamu je zde jeho tvorba rytmická a je situovaná převážně v DM SCN, kde má za cíl ovlivňovat elektrickou aktivitu buněk a amplifikovat výstupní signály z SCN (Ingram et al., 1998).

Pravidelná exprese *Avp* je řízená pomocí proteinů, které se podílí na tvorbě základní zpětnovazebné smyčky, BMAL1 a CLOCK. Promotor pro *Avp* totiž obsahuje E-box, na který se váže komplex BMAL1:CLOCK, stejně jako je tomu u genů *Per* a *Cry*, a indukuje jeho expresi (Jin et al., 1999).

Dalším CCG, který stojí za zmínku je DBP (albumin D-site-binding protein). Jedná se o protein, který stejně jako AVP, má ve svém promotoru E-box a je přímo řízen komplexem BMAL1:CLOCK (Ripperger et al., 2000). DBP je rytmicky exprimován v buňkách jater (Fonjallaz et al., 1996), kde působí jako transkripční faktor, který hraje důležitou roli v cirkadiánní transkripci cholesterol 7 alpha-hydroxylázy, což je limitující enzym pro tvorbu žlučových kyselin z cholesterolu (Lavery and Schibler, 1993; Lee et al., 1994)

2.5. Ontogeneze SCN a jejich rytmů

2.5.1. Ontogeneze SCN

SCN je tvořeno z ventrálního diencefalického germinálního epitelia a jeho ontogenetický vývoj neprobíhá stále stejnou rychlostí, ale přichází ve vlnách. První strukturou v rámci SCN, která je během vývoje tvořena, je dorzomediální část (Kabrita and Davis, 2008).

Laboratorní potkan je březí 22 dní, myš 19-20 dní a křeček 20-23 dní. Neurogeneze SCN odráží dobu březosti. U potkana se SCN objevuje mezi E14 a E15 a jeho vývoj je dokončen 5 dní před narozením (Altman and Bayer, 1986). U myši probíhá hlavně mezi E12 a E15 a končí stejně jako u potkana 5 dní před narozením (Kabrita and Davis, 2008). Neurogeneze SCN u křečka začíná u fetů už mezi E10,5 a E13 (Davis et al., 1990).

Ontogenezi v SCN prochází i jiné než neuronální typy buněk, jakými jsou například radiální glie, které se v SCN začínají u křečků objevovat v E13 a jsou nahrazovány neurony do postnatálního dne (P) 10 (Botchkina and Morin, 1995). U potkana se radiální glie objevují v E17, k jejich úbytku dochází hlavně v P3 a mizí v P6 ((Munekawa et al., 2000).

Dalším typem buněk v SCN jsou astrocyty, které se objevují u potkana v E20, jejich počet prudce vzrůstá okolo věku P4 a dále se zvyšuje až do dosažení P30 ((Munekawa et al., 2000). Astrocyty se u křečka objevují v P0 a jejich počet se v průběhu postnatálního vývoje zvyšuje až do P21 (Botchkina and Morin, 1995).

Další úroveň vývoje SCN je synaptogeneze. Ta u potkanů začíná v E19, kdy dosud nezralé SCN obsahuje pouze několik synapsí, pokračuje pomalou rychlostí do P4 a následně prudce vzrůstá až do P10 (Moore and Bernstein, 1989). U křečka jsou první synapse patrné až v den porodu. Po narození množství synapsí prudce vzrůstá a je kompletní v P4 (Speh and Moore, 1993).

Propojení retiny s SCN pomocí RTH vzniká okolo dne porodu a pokračuje postnatálně. SCN reaguje na osvětlení expresí genů *Per1* a *c-fos* v P1 (Mateju et al., 2009). Inervace mezi chiasmatem a SCN postupně sílí a je kompletní v P15 (Speh and Moore, 1993).

2.5.2. Vývoj rytmů v SCN

Cirkadiální hodiny v SCN se vyvíjí postupně (viz obr. 7). Jejich vývoj začíná už u fetů, u kterých je již poměrně dlouho známa rytmicita v syntéze AVP (Leake et al., 1986), tepové frekvenci (Devries et al., 1987) a elektrické aktivitě (Shibata and Moore, 1987).

2.5.2.1. Vývoj rytmů v SCN u myši

V SCN byla u myši prokázána rytmicita v expresi genu *Per1* v E17 se zvýšenou transkripcí na pomezí dne a noci (Shimomura et al., 2001). Stejný rytmus byl v množství proteinu PER1 prokázán v E18. Tento rytmus je shodný s rytmem samice což ukazuje na synchronizaci fetálních SCN pomocí mateřských signálů, protože RTH mláděte není dosud vyvinutý (Ansari et al., 2009).

Clock, *Bmal1* a *Cry* v E18 u myši ještě žádnou rytmicitu nevykazují a po narození mláděte dochází k nárůstu jejich produkce v SCN až do P10, kdy jsou oscilace exprese genů shodné s dospělcem (Ansari et al., 2009).

2.5.2.2. Vývoj rytmů u křečka

U křečka se exprese genu *Bmal1* objevuje už v E13,5, tedy ihned po ukončení neurogeneze, postrádá však v průběhu celého fetálního vývoje rytmicitu. Stejně je na tom i gen *Per1*, u kterého se rytmická exprese objevuje až postnatálně v P2. Jediný gen, u kterého se zdá, že by mohl prenatalně vykazovat podobnost v expresi s dospělcem, je *Cry1*, u kterého jsou v poslední den gestace patrné podobné oscilace, jako v SCN dospělé (Li and Davis, 2005).

Geny *Bmal1*, *Per1* a *Cry1* vykazují u křečka oscilace v expresi až po narození což ukazuje na možnost podílu porodu na iniciaci tvorby oscilací hodinových genů v SCN (Li and Davis, 2005).

2.5.2.3. Vývoj rytmů u potkana

U potkana se v SCN exprese hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Cry*, *Clock* a *Bmal1* objevuje v E19, není však v té době ještě rytmická, což podporuje hypotézu, že cirkadiální hodiny v SCN nejsou v tuto dobu ještě funkční (Houdek and Sumova, 2014; Sladek et al.,

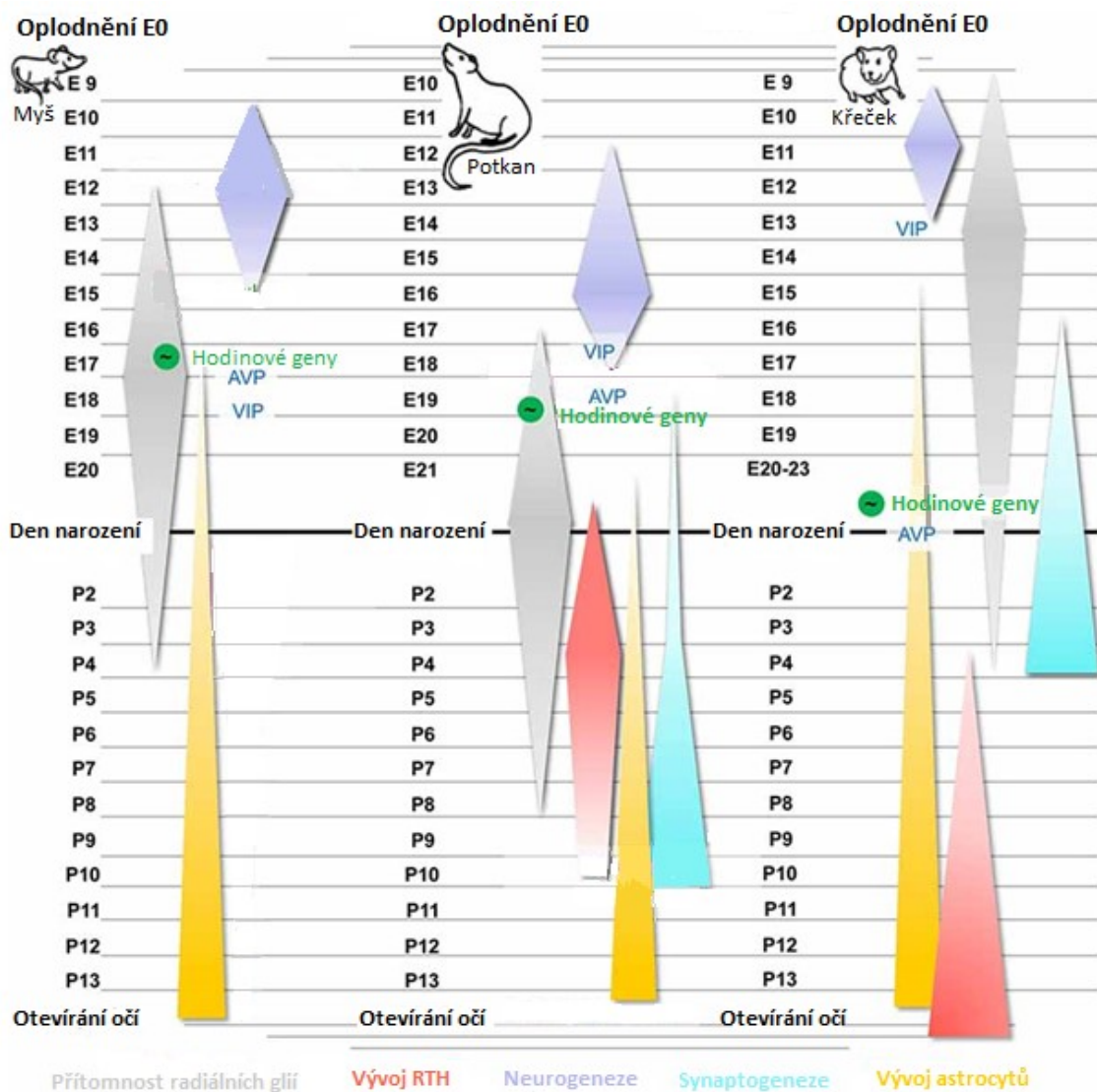
2004). Přesto se však v E19 objevuje ve fetálním SCN rytmus v metabolické aktivitě, který je narušen lézemi SCN matky (Reppert and Schwartz, 1986). Vzhledem k nedostatečné tvorbě vlastních rytmů u fétu v E19 zde přichází v potaz synchronizační signály od matky (Sumova et al., 2012).

Ačkoliv u potkana v E19 je z hodinových genů rytmický pouze regulační gen *Rev-erba*, pravidelné oscilace se objevily u genu *c-fos*, který je markerem neuronální aktivity (Sagar et al., 1988; Schwartz et al., 1995) a genu *Avp*. Exprese obou těchto genů je regulována pomocí fosforylací aktivovaného proteinu CREB (cAMP response element binding protein). Rytmus v *Avp* i *c-fos* je navíc shodný ve fázi i amplitudě, což ukazuje na společnou indukci jejich transkripce (Houdek and Sumova, 2014).

Dalším genem, který v SCN v E19 vykazuje rytmus s nízkou amplitudou je *Vip* (Houdek and Sumova, 2014), který je v SCN exprimovaný již v E18 (Ban et al., 1997). Jedná se o neurotransmitter, který je tvořen převážně v VL SCN a jehož úkolem je koordinovat rytmy v rámci SCN pomocí synchronizace pacemakerových buněk (Aton et al., 2005). Aktivace jeho receptorů navíc vede ke zvýšené hladině fosforylovaného proteinu CREB, který, jak již bylo popsáno, ovlivňuje expresi genů *Avp* a *c-fos*.

Rytmus ve *Vip* expresi v E19 je shodný ve fázi i amplitudě s geny *Avp* a *c-fos*, což jen podporuje domněnku, že už v embryonální fázi vývoje synchronizuje *Vip* SCN (Houdek and Sumova, 2014).

U potkana v E20 dochází k rytmu s velmi nízkou amplitudou pouze u exprese genu *Per1* (Kovacikova et al., 2006). Signifikantní rytmy v ostatních hodinových genech, jakými jsou *Bmal1*, *Per2* jsou detekovatelné až v E21 (Houdek and Sumova, 2014). K vývinu rytmů v hodinových genech nicméně dochází i postnatálně až do P10, kdy jsou jejich oscilace v SCN stejné jako u dospělců (Kovacikova et al., 2006; Sladek et al., 2004).



Obr. 7: Průběh vývoje cirkadiánních hodin v SCN u třech druhů hlodavců. Zelenými body jsou znázorněny embryonální dny, ve kterých dochází k první detekci exprese hodinových genů. Modrou barvou je u jednotlivých druhů znázorněna cytogeneze SCN. Šedá barva představuje přítomnost radiálních glií, červená postupné propojení SCN s retinou pomocí RTH, žlutá ukazuje průběh vývoje astrocytů a tyrkysová tvorbu synapsí v SCN (upraveno podle Landgraf et al., 2014)

2.6. Synchronizace mezi mládětem a matkou

Přítomnost synchronizace mezi matkou a mládětem je známa již poměrně dlouho (Davis and Gorski, 1985) a probíhá prenatálně i postnatálně. Zásadní význam v této synchronizaci má centrální pacemaker matky, který poskytuje embryu informace o světelných podmínkách okolního prostředí a je nezbytný pro správně nastavené cirkadiánní rytmy u mláďete.

Prenatální nastavení rytmů matkou je dokázáno u mláďete pomocí cross-foster experimentů, které zahrnují cílenou výměnu matek ve vrhu chovaných na opačném světelném režimu. Oscilace v aktivitě AA NAT v epifýze a hladině kortikosteronu v plasmě mláďat po narození prokázaly větší podobnost s rytmy biologické matky a byly proto nastavené již před narozením (Deguchi, 1975; Hiroshige et al., 1982).

Manipulace se světelným režimem u březí samice se odrazí jak v rytmicitě mateřského, tak i fetálního SCN. Vzhledem k tomu, že se rytmy u embryí vyvíjejí postupně, míra odpovědi ve fetálním SCN na posun světelného režimu se v průběhu času liší. Vystavení březích samic zpoždění světelného režimu o 6 hodin v E18 má za následek posunutí rytmu v expresi *Avp* a *c-fos* v SCN novorozených mláďat. Avšak vystavení stejným světelným podmínkám později během gestace, tj. v E20, již posun v rytmicitě *Avp* nezpůsobilo. Tento posun byl pozorovatelný až u tří a šestidenních mláďat, kdy byly posunuty rytmy v expresi *Per1* a *Per2* (El-Hennamy et al., 2008).

Pokud dojde k narušení centrálního pacemakeru v SCN u matky v průběhu její březosti, cirkadiánní hodiny novorozených mláďat jsou vzájemně desynchronizovány. Léze SCN již v sedmém dni březosti ovlivnily rytmicitu vrhu a dokázaly přítomnost synchronizačních signálů mezi matkou a mládětem i v tak raných fázích vývoje u křečků i u potkanů (Davis and Gorski, 1988; Reppert and Schwartz, 1986). Zatímco u křečka byla monitorována pouze pohybová aktivita mláďat (Davis and Gorski, 1988), u potkana byla prokázána desynchronizace na úrovni prenatálního SCN, a to jak ve využití glukózy tak i rytmu v expresi *c-fos* (Houdek et al., 2015), i v postnatálním období v rytmu v aktivitě AA NAT v epifýze (Reppert and Schwartz, 1986).

2.6.1. Mateřská signalizace

Na synchronizaci matky a fetu se podílí řada rytmických nesvětelných podnětů, které jsou řízené pomocí mateřského SCN.

2.6.1.1. Příjem potravy

Jedním z podnětů, které ovlivňují synchronizaci matky a fetu je příjem potravy. Experiment, který to dokázal u mláďat v postnatálním období, sestával ze skupiny březích samic, které podstoupily léze SCN a byly krmeny pouze v určitou část dne, nebo *ad libitum*. Synchronizované vrhy byly pouze u samic s rytmickým příjmem potravy (Weaver and Reppert, 1989). Další experiment pak prokázal, že k ovlivnění cirkadiálních hodin došlo v prenatalním období. Březí samice byly chovány na stálém světle a měly omezenou dobu dostupnosti potravy, která byla podávána během dne. Tyto manipulace se světelným a potravním režimem ovlivnily aktivitu matky, která se stala aktivní přes den a u jednodenních mláďat způsobily změnu rytmů do opačné fáze v porovnání s kontrolami, jejichž matky byly chovány na LD (Light : Dark) 12:12 (Novakova et al., 2010).

2.6.1.2. Melatonin

Dalším z kandidátů pro synchronizační signál mezi matkou a embryem, který byl popsán jako první je melatonin (Weaver and Reppert, 1986). U tohoto hormonu, který je rytmicky exprimován z epifyzy, bylo prokázáno, že prochází přes placentu (Yellon and Longo, 1988).

Pomocí *in vivo* autoradiografie u potkanů byly receptory pro melatonin objeveny už v E15 v hypofýze, což ukazuje na její možný potenciál reagovat na mateřské signály v tvorbě melatoninu v tak brzkém věku. Experimenty na části adenohipofýzy, kterou je pars tuberalis (PT) ukázaly, že rytmy v hodinových genech jsou u této tkáně přítomné již u 18denních embryí (Ansari et al., 2009). Tyto oscilace jsou výsledkem mateřského signálu v melatoninu, protože PT je tkání, jejíž rytmy jsou závislé na rytmech melatoninu v těle (Jilg et al., 2005).

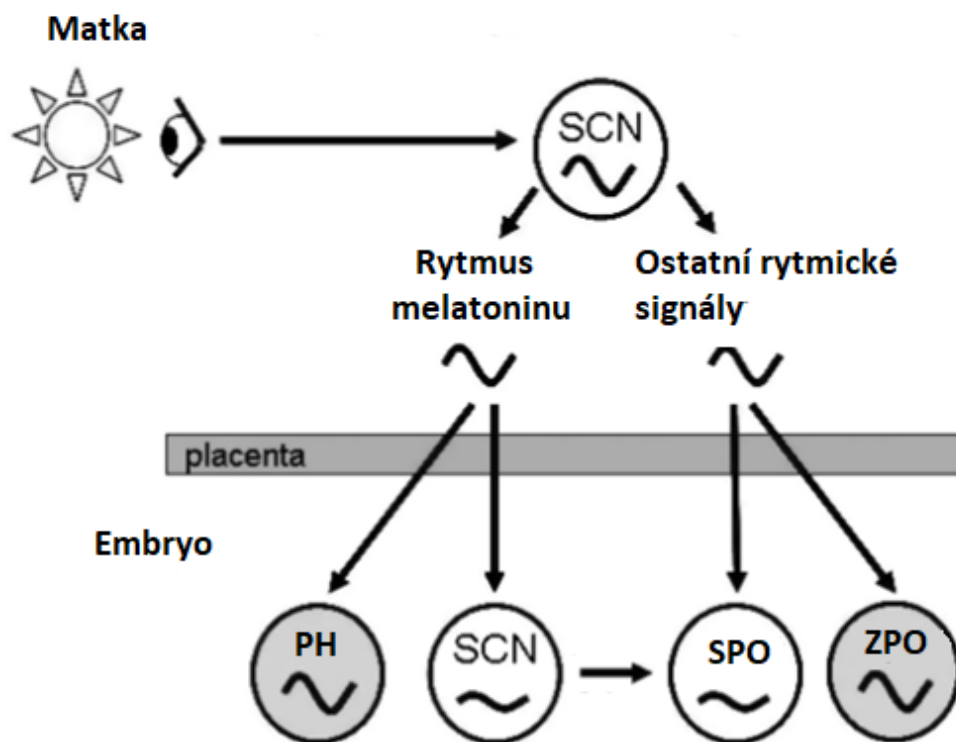
V mozku potkaního embrya dochází k tvorbě receptorů pro melatonin v E17 a v SCN se objevují hned po ukončení jejich morfologického vývoje, tedy v E18 (Williams et al., 1991).

Melatonin si mládě v průběhu fetálního vývoje není schopno vytvořit (Deguchi, 1975), přesto se ve fetální cirkulaci nachází a její rytmus kopíruje rytmus matky i za předpokladu, že dojde k manipulaci světelného režimu jeho úplným otočením. Pokud dojde k odstranění epifýzy (pinealektomii) u matky, je přirozeně narušen rytmus melatoninu i u embrya, u kterého se stává hladina tohoto hormonu téměř nedetekovatelnou a následně se odrazí po porodu ve ztrátě vzájemné synchronizace celého vrhu (Bellavia et al., 2006). Mláďata, která porodila pinealektomovaná matka si však dokáží po vývinu pineální žlázy rytmus melatoninu obnovit (Yellon and Longo, 1988).

Nastavení cirkadiálních hodin v periférii i v SCN je melatoninem silně ovlivněno (Torres-Farfan et al., 2011) (viz obr. 8). První experimenty o působení melatoninu na rytmy používaly jako marker posunu cirkadiálních rytmů pohybovou aktivitu mláďat po narození. V jednom z těchto experimentů docházelo k aplikaci subkutánní injekce melatoninu po 12 hodinách v průběhu několika dní březí samici, která podstoupila odstranění SCN v sedmém dni březosti. Je prokázáno, že léze SCN v tomto období březosti naruší synchronizaci celého vrhu (Davis and Gorski, 1988; Reppert and Schwartz, 1986). Při aplikaci melatoninových injekcí však došlo k synchronizaci celého vrhu v pohybové aktivitě, což ukazuje, že je melatonin schopen ovlivnit rytmy u embryí (Davis and Mannion, 1988).

Později bylo prokázáno, že injekce melatoninu arytmičkým matkám, držným po celou dobu březosti na stálém světle, působí na rytmy ve fetálním SCN na molekulární úrovni a to na oscilace ukazatelů embryonální hodin, genů *Avp* a *c-fos* (Houdek et al., 2015).

Přímé ovlivnění rytmů v SCN pomocí melatoninu bylo prokázáno u dospělých zvířat *in vitro* pomocí aplikace melatoninu na řezy SCN z potkaního mozku, což posunulo rytmus v jejich elektrické aktivitě (McArthur et al., 1991).



Obr. 8: Model přenosu signálů od matky k fetu pomocí melatoninu. Matka na základě světelných změn z okolí vykazuje rytmus v tvorbě melatoninu a ostatních rytmických signálů, jakými jsou například teplota, nebo hladiny jiných hormonů. Tyto signály mohou prostupovat placentou a ovlivnit fetální SCN a periferní hodiny (PH) SCN spolu s maternálními signály ovlivňují periferní oscilátory, které jsou soběstačné (SPO), nebo závislé na okolní signalizaci (ZPO) (upraveno podle Ansari et al., 2009)

2.6.1.3. Dopamin

Další mediátorem, který je schopen ovlivňovat cirkadiánní hodiny je dopamin. U dospělců reguluje tyto hodiny na molekulární i behaviorální úrovni (Gravotta et al., 2011) a nemalý vliv má zřejmě i na jejich synchronizaci mezi matkou a embryem (Weaver et al., 1992). Exprese genů pro dopaminergní receptory byla pomocí *in situ* hybridizace zaznamenána v SCN u křečků v E14 (Viswanathan et al., 1994). U potkaního embrya byly dopaminergní receptory pozorovány v E18. Zajímavé však je, že byly v tomto věku detekovány v rámci hypothalamu fetů pouze v embryonálních SCN (Weaver et al., 1992).

Schopnost fetálních SCN reagovat na aktivaci dopaminergních receptorů byla testována pomocí injekcí dopaminergních agonistů a antagonistů březím samicím. Vzhledem k tomu, že aplikace agonisty dopaminu indukovala ve fetálních SCN expresi genu *c-fos*, potkaní embrya již mají funkční dopaminergní systém (Weaver et al., 1992). Schopnost embryí, odpovědět na aktivaci dopaminergních receptorů byla prokázána i u myši (Bender et al., 1997). Tyto experimenty podporují hypotézu o synchronizaci mezi matkou a embryem pomocí dopaminergní signalizace (Viswanathan et al., 1994).

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Zvířata

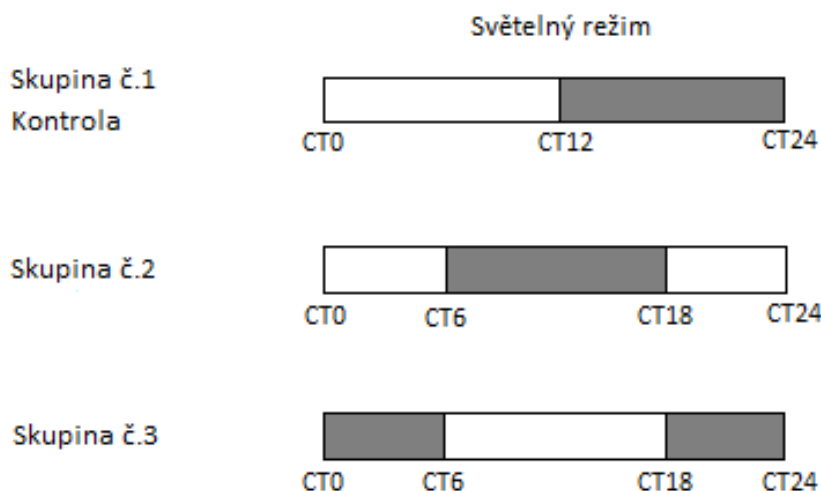
Pro pokus byli použiti potkani kmene Wistar (BioTest s.r.o., Konárovice, ČR). Zvířata byla chována ve zvěřinci, ve kterém byla udržována teplota 23 ± 2 °C a světlo bylo zajištěno pomocí 40W zářivek. Podle umístění klecí byla intenzita osvětlení 150 a 250 lux. Světelný režim byl LD 12:12 se světlem od 7:00 do 19:00. Zvířata byla krmena standardní krmnou směsí, kterou měla s vodou k dispozici *ad libitum*.

3.2. Uspořádání pokusů

3.2.1. Vliv posunu světelného režimu na embryonální SCN

Tři měsíce starým samicím byly provedeny vaginální výplachy, aby mohl být určen den proestru. Tento den je charakteristický zvýšeným počtem epiteliálních buněk kulatého tvaru s výraznými jádry ve výplachu. Během proestru byly jednotlivé samice připuštěny na noc k samci. Pokud byly následující den nalezeny ve výplachu samčí pohlavní buňky, tento den byl označen jako E0. Čas přechodu z tmavé do světlé fáze při původním nastavení světelného režimu (7:00) byl označen jako CT0 (circadian time) a čas přechodu ze světlé do tmavé fáze jako CT12 (19:00).

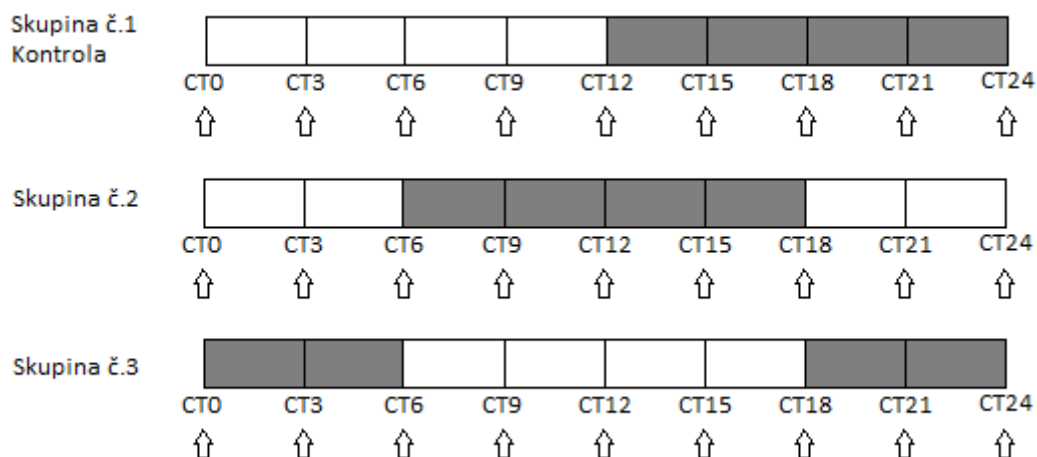
Březi samice byly rozděleny do tří skupin. Skupina č. 1 je skupinou kontrolní. Její světelný režim byl LD 12:12 se světlem od 7:00 do 19:00 a potrava i voda *ad libitum* po celou dobu experimentu. Skupiny č.2 a č.3 byly do E14 chovány na stejném světelném režimu jako skupina kontrolní, tedy LD 12:12 a od E14 jim byl posunut světelný režim. U skupiny č.2 byl světelný režim posunut o 6 hodin ve směru předběhnutí, tj. světlo zhasínalo v CT6 (13:00) a rozsvěcelo se v CT18 (1:00). U skupiny č.3 byl světelný režim posunutý o 6 hodin ve směru zpoždění, tj. světlo zhasínalo v CT18 (1:00) a rozsvěcelo se v CT6 (13:00) (viz obr. 9)



Obr. 9: Světelné režimy u jednotlivých skupin od E14. Zvířata v kontrolní skupině byla chována na standardním světelném režimu, kdy tma byla od CT12 (19:00) – CT24 (7:00) (šedá barva). Zvířata ve skupině č. 2 byly od E14 drženy na světelném režimu posunutém o 6 hodin. Světlo se ve zvěřinci, kde byla chována tato skupina rozsvěcelo v CT18 (1:00) a zhasínalo v CT6 (13:00) následující den. U skupiny č.3 došlo k posunu tohoto režimu o 6 hodin ve směru zpoždění a byla tak vystavena světlu od CT6 (13:00) do CT18 (1:00)

3.2.1.1. Experimentální schéma

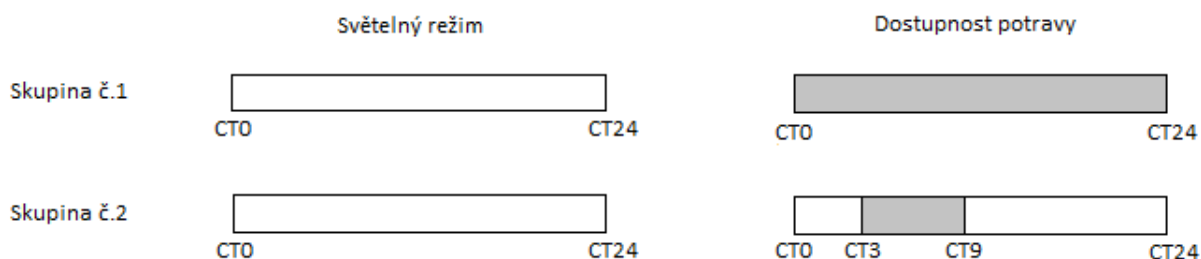
Embrya byla odebírána počínaje CT0 v E19. Odběry probíhaly po třech hodinách až do CT24 (viz obr. 10). Jednotlivé samice byly uspány pomocí intramuskulární aplikace směsi Narketanu a Xylazinu v poměru 2:1. Následně byla odebrána embrya a usmrcena rychlou dekapitací. Hlavy embryí byly ihned po odebrání zmrazeny v suchém ledu a zabaleny do parafilmů, aby bylo zabráněno jejich vysychání. Následně byly uchovány v -80 °C až do jejich zpracování.



Obr. 10: Odběry embryí u jednotlivých samic a světelný režim, za kterého byly odebírány.

3.2.1. Vliv omezení příjmu potravy na embryonální SCN

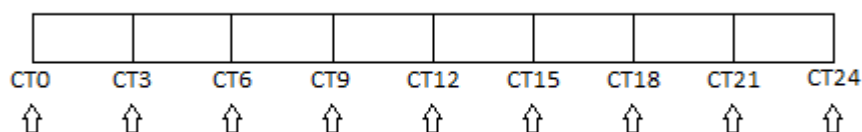
Samice byly zabřeznuty stejným způsobem, jako v předchozím experimentu. Od prvního dne březosti byly samice přemístěny na LL a krmené chovnou směsí. Zároveň byly rozdělené do dvou skupin po 9 zvířatech. Březí samice ve skupině č.1 byly krmeny *ad libitum*. Březí samice ve skupině č.2 měly potravu k dispozici pouze od CT3 (10:00) do CT9 (16:00) od prvního dne březosti až do konce experimentu (E19) (viz obr. 11).



Obr. 11: Přítomnost světla je vyznačena v průběhu 24 hodin bílou barvou. Zvířata z experimentální skupiny č.1 i č.2 byla chována ve zvěřinci, kde byl po celou dobu experimentu světelný režim LL. Dostupnost potravy je v průběhu 24 hodin šedou barvou. U skupiny č.1 byla potrava *ad libitum*. Skupina č.2 měla k dispozici chovnou směs pouze od CT3 (10:00) do CT9 (16:00).

3.2.1.1. Experimentální schéma

Schéma odběrů embryí u tohoto pokusu odpovídá schématu v kapitole 3.2.1.1.. V tomto případě se lišil se pouze světelný režim, za kterého byly odběry prováděny (viz obr. 12).



Obr. 12: Odběry embryí u jednotlivých samic probíhaly stejně u obou skupin. Na každý bod po třech hodinách byla odebrána jedna samice. Všechny odběry probíhaly na stálém světle.

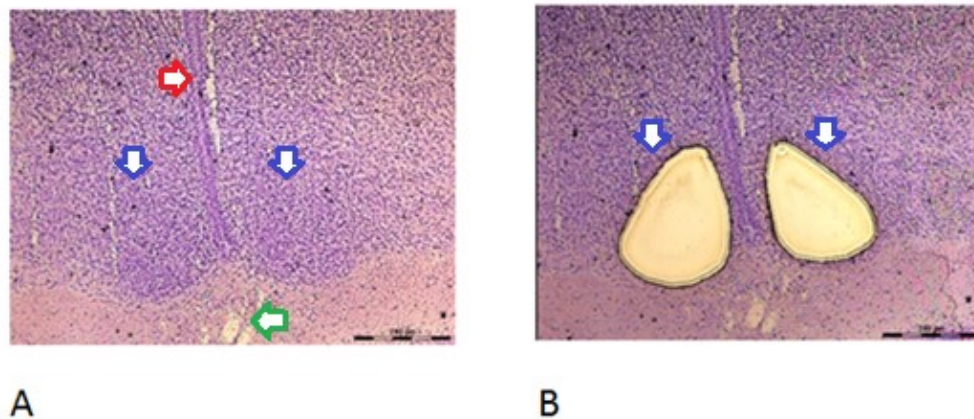
3.3. Zpracování vzorků

3.3.1. Krájení a laserová mikrodisekce

Mozky byly pomocí přístroje cryocut (Leica) krájeny na koronální řezy o tloušťce 20 μ m, které obsahovaly SCN. Tyto řezy byly následně obarveny kresylovou violetí a bylo z nich pomocí metody laserové mikrodisekce (Laser Microdissection 6000; Leica) (viz obr. 13) izolováno SCN. Izolované SCN byly uchovávány v RLT bufferu z RNeasy Micro kitu (Qiagen). Celková plocha SCN u jednoho embrya byla mezi 700 000 μ m - 850 000 μ m.

3.3.1. Sonikace

Po laserové disekci byl každý vzorek obsahující SCN ihned umístěn na 5 min do ultrazvukové lázně (Fisherbra FB 15049).



Obr. 13: Ukázka práce s laserovou mikrodisekcí. Na obrázku A jsou modrými šipkami ukázána SCN, červená šipka ukazuje třetí mozkovou komoru a zelená šipka optické chiasma. Druhý obrázek B zobrazuje stejný řez, jako obr. A, s tím rozdílem, že na obr. B jsou SCN vyříznuta pomocí laserové mikrodisekce.

3.3.2. Izolace RNA

Pro izolaci RNA z SCN byl použit Rneasy Micro kit (Qiagen). Pro izolaci byl použit postup, přiložený výrobcem kitu. Na eluaci bylo použito 13 μ l vody bez aktivity RNáz.

3.3.3. Reverzní transkripce

Izolovaná RNA byla přepsána do cDNA pomocí High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitu (Applied Biosystems). Množství použitých roztoků pro jednu cDNA reakci (viz tab. 1) a teplotní program, nastavený v termocycleru (Eppendorf) (viz tab. 2), odpovídá

protokolu, přiloženým výrobcem kitu. Po cDNA reakci byl každý vzorek naředěn vodou bez aktivity Rnáz v poměru 1:2 a uchováván v -20 °C.

10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10X RT Random Primers	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 µl
Nuclease-free H₂O	4,2 µl
Množství vzorku	10 µl

Tab.1: Složení roztoku pro jednu cDNA reakci

	Krok 1	Krok 2	Krok 3	Krok 4
Teplota	25	37	85	4
Čas	10 min	120 min	5 min	∞

Tab. 2: Rozpis teplotního programu, nastaveného na termocycleru

3.3.4. RT-PCR

Vzorky byly následně analyzovány pomocí RT PCR (Vii7 Real-Time PCR). Jako referenční konstitutivně exprimovaný gen (tzv. housekeeping gen) byl použit *B2m* (rβ-2-mikroglobulin). Jako negativní kontrola byla použita reakční směs, ve které množství vzorku nahradila PCR H₂O.

K detekci mRNA byly použity TaqMan próby (Life technologies) pro potkaní geny *c-fos* (Rn02396759) a *B2m* (Rn00560865). Do každé jamky PRC destičky byla napipetována reakční směs pro 14μl RT-PCR reakci (viz tab. 3).

FIREpol	2,8 μl
TaqMan proóba pro c-fos	0,7 μl
TagMan próba pro B2m	0,7 μl
cDNA	1,75 μl
PCR H₂O	8,05 μl

Tab.3: Reakční směs pro RT-PCR reakci

Detekce genu *c-fos* i *B2m* probíhala u všech vzorků v rámci jedné PCR jamky v duplexní reakci. U experimentů s časovými posuny byl na každé PCR destičce s experimentálním profilem zároveň znovu analyzován kontrolní profil kvůli větší přesnosti. Amplifikační protokol, použitý pro analýzu vzorků popisuje tab.4.

3.3.4.1. Analýza dat RT-PCR

Pro určení množství relativní cDNA koncentrace byla použita metoda $\Delta\Delta Ct$.

	Počáteční denaturace	Amplifikace			Melting (křivka tání)			Ochlazení
		Denaturace	Reasociace	Extenze				
Teplota (°C)	95	94	55-62	72	95	62	95	42
Čas (s)	900	15	20	10	0	30	0	30
Nárůst/pokles (°C/s)	20	20	20	20	20	20	0,1	20
Počet cyklů	1	50			1			1
Fluorescence		Měřena při každém cyklu				Měřena kontinuálně		

Tab.4: Amplifikační protokol

3.4. Statistická analýza

Data byla nejprve vyhodnocena pomocí kosinorové analýzy, která má za cíl proložit 24 hodinové profily dvěma alternativními regresními modely, kterými jsou vodorovná přímka nebo kosinusoida. Vodorovná přímka znázorňuje, že profil nevykazuje žádný rytmus a kosinusoida, která je definována rovnicí $Y = \text{mesor} + [\text{amplitude} \cos(2\pi[X - \text{acrophase}] / \text{period})]$, prokazuje přítomnost rytmu v profilu.

Další použitou statistickou metodou je jednoduchá a dvojná analýza variance, která má za cíl zjistit statistickou významnost jak rozdílů hladin mRNA v jednotlivých časech denního profilu, tak i rozdíl mezi denními profily u experimentálních skupin.

4. Výsledky

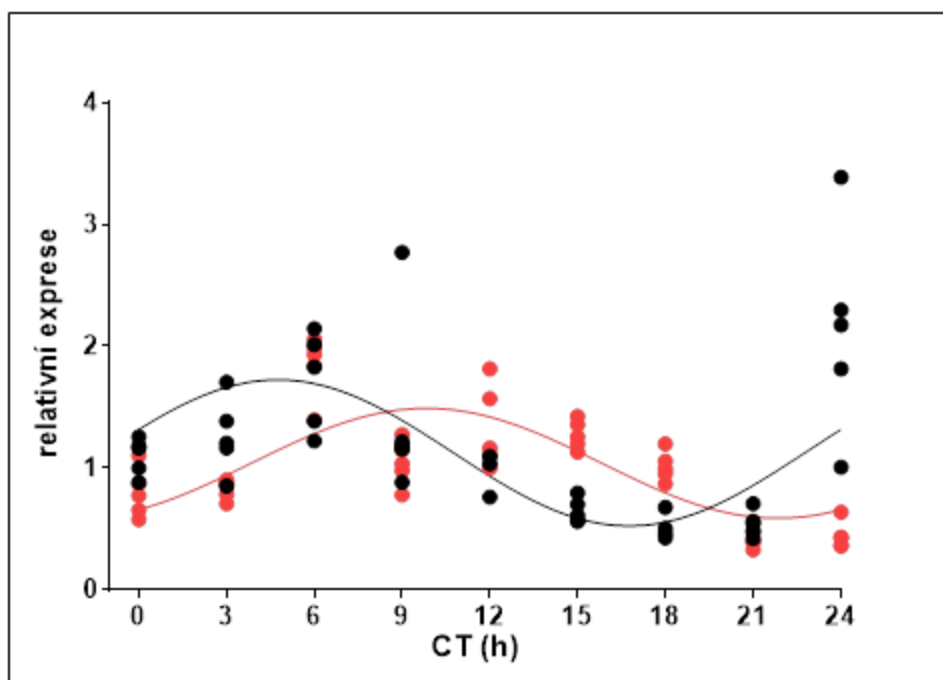
4.1. Vliv posunutí světelného režimu o 6 hodin ve směru fázového zpoždění na expresi genu *c-fos* u potkaních embryí

V tomto experimentu byly březí samice chovány od E0 na standardním světelném režimu LD12:12 se světlem od 7:00 do 19:00. Kontrolní skupina byla ponechána na tomto režimu do E19 a experimentální skupině byl od E14 světelný režim posunut o 6 hodin ve směru fázového zpoždění, světlo tedy bylo ve zvěřinci zapnuté od 1:00 do 13:00. Embrya z obou skupin byla odebírána v E19 během 24 h. Pomocí stanovení relativní exprese genu *c-fos* byl sledován vliv vystavení březích samic světelnému posunu na denní profil v neuronální aktivitě v SCN 19-denních fétů.

Jednoduchá analýza variance prokázala signifikantní rozdíly v expresi *c-fos* mezi jednotlivými časovými body jak u kontrolní skupiny ($F = 12,64$; $P < 0,0001$) tak i u skupiny vystavené 6-h zpoždění světelného režimu ($F = 20,87$; $P < 0,0001$). Kosinorová analýza dále prokázala, že denní profil v expresi *c-fos* vykazoval cirkadiánní rytmus jak u skupiny kontrolní ($P < 0,0001$, $R^2 = 0,3872$), tak i u skupiny s posunutým světelným režimem ($P < 0,0001$, $R^2 = 0,4984$). Pomocí kosinorové analýzy byla dále vypočtena akrofáze, která byla u kontrolní skupiny v $CT4,8 \pm 0,7h$ a experimentální skupiny v $CT9,9 \pm 0,6h$. Amplituda byla u experimentální skupiny nižší ($0,4509 \pm 0,0701$) než u skupiny kontrolní ($0,5997 \pm 0,1193$).

Při porovnání denních profilů obou skupin pomocí dvojnásobné analýzy variance byl prokázán statisticky významný vliv času ($P < 0,0001$), interakce ($P < 0,0001$) i skupin ($P = 0,0395$). Post hoc analýza pomocí Holm-Šídákova testu odhalila signifikantní rozdíl mezi oběma profily v CT15 ($P = 0,0332$) a CT24 ($P < 0,0001$) (viz obr. 14).

Na základě statistického porovnání obou skupin bylo prokázáno, že denní profily v expresi genu *c-fos* v SCN 19ti denních embryí, které vykazovaly u obou skupin cirkadiánní rytmy, byly vlivem vystavení březích samic 6 h fázovému opoždění světelného režimu významně ovlivněny. Posun světelného režimu březím samicím o 6 hodin vyvolal posun rytmu v expresi genu *c-fos* v SCN fétů přibližně o 5 hodin oproti skupině kontrolní, přičemž došlo k ovlivnění amplitudy tohoto rytmu.



Obr. 14: Denní profil relativní exprese genu *c-fos* v SCN 19 denních potkaních fětů. Černá barva představuje relativní expresi genu *c-fos* v SCN embryí, jejichž matky patří do kontrolní skupiny. Červená barva znázorňuje relativní expresi genu *c-fos* v SCN embryí, jejichž matky byly podrobeny od E14 6h fázovému zpoždění světelného režimu.

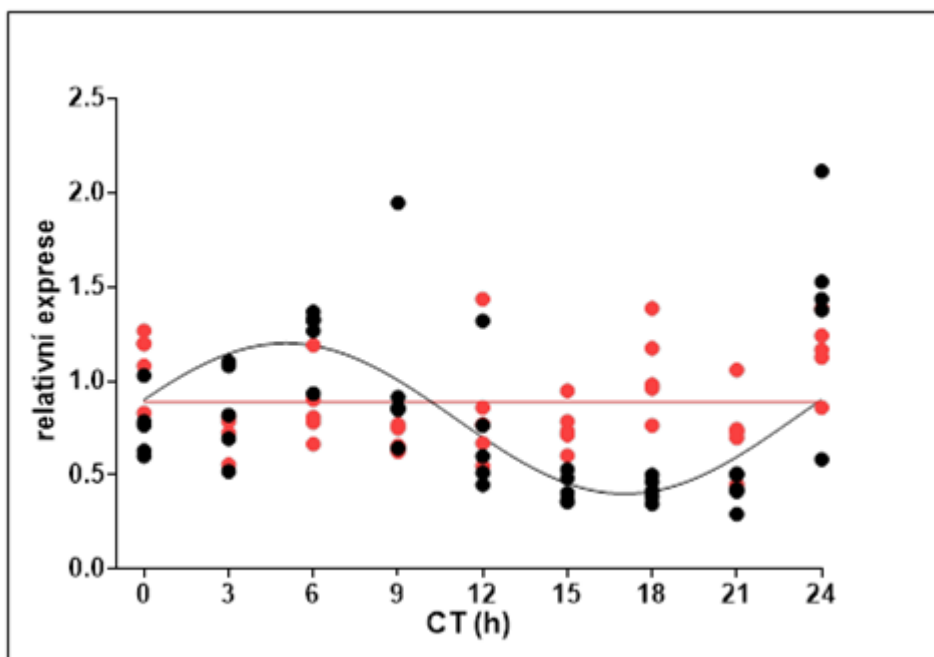
4.2. Vliv posunutí světelného režimu o 6 hodin ve směru fázového předběhnutí na expresi genu *c-fos* u potkaních embryí

V tomto experimentu byly březí samice chovány od E0 do E14 na standardním světelném režimu se světlem od 7:00 do 19:00. Od E14 došlo k posunutí světelného režimu o 6 hodin ve směru fázového předběhnutí, světlo tedy bylo ve zvěřinci vypnuté od 13:00 (CT6) do 1:00 (CT18). Embrya byla odebírána během 24 h v E19. Porovnáním s kontrolní skupinou byl pomocí stanovení relativní exprese genu *c-fos* byl sledován vliv vystavení březích samic světelnému posunu na denní profil neuronální aktivity v SCN 19ti denních fétů.

Jednoduchá analýza variance v případě skupiny vystavené 6-h předběhnutí ($F = 3,156$; $P = 0,0528$) prokázala signifikantní rozdíly v expresi genu *c-fos* pouze mezi CT 9 a CT 24. Kosinorová analýza však u této skupiny zamítla přítomnost rytmu ($P = 0,0528$, $R^2 = 0,1307$).

Vzájemné porovnání profilů kontrolní skupiny a skupiny vystavené 6 h posunu světelného režimu pomocí dvojnásobné analýzy variance prokázalo statisticky významný vliv času ($P < 0,0001$) a interakce ($P < 0,0001$), ne však skupiny ($P = 0,1655$). Signifikantní rozdíl mezi oběma profily byl prokázán pomocí Holm-Šídákova testu v CT18 ($P = 0,0021$) (viz obr. 15).

Výsledky ukázaly, že vlivem fázového předběhnutí světelného režimu březím samicím došlo k ovlivnění denního profilu v expresi *c-fos* v SCN 19 denních embryí tak, že cirkadiánní rytmus v expresi tohoto genu byl důsledkem posunu světelného režimu narušen.



Obr. 15: Denní profil relativní exprese genu *c-fos* v SCN 19ti denních potkaních embryí. Černá barva znázorňuje relativní expresi genu *c-fos* v SCN embryí, jejichž mateky patří do kontrolní skupiny. Červená barva představuje relativní expresi genu *c-fos* v SCN embryí, jejichž matky byly podrobené od E14 6h fázovému předběhnutí.

4.3. Vliv příjmu potravy na expresi genu *c-fos* v SCN 19-denních embryí

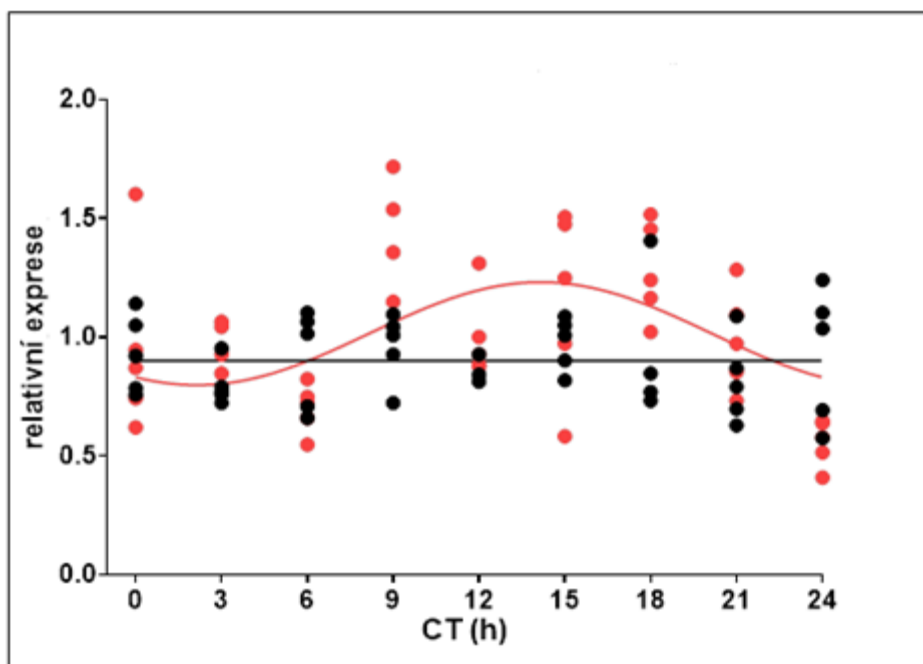
V tomto experimentu byly samice od dne E0 přemístěny na LL režim, na kterém byly chovány po celou dobu experimentu. V E0 byly březí samice rozděleny do dvou skupin. Jedna skupina měla po celou dobu experimentu přístup k potravě *ad libitum*. Druhá skupina byla podrobená RF režimu, což znamená, že měla přístup k potravě pouze od 10:00 do 16:00. V E19 byly březí samice obou skupin usmrcovány v 3 h intervalu během 24 h a byly jim odebrány fěty pro stanovení relativní exprese genu *c-fos* v SCN.

U skupiny vystavené RF prokázala jednoduchá analýza variance mezi jednotlivými časovými body signifikantní rozdíly v relativní expresi genu *c-fos* ($F = 6,133$; $P = 0,0047$), zatímco u skupiny krmené *ad libitum* nebyly rozdíly mezi jednotlivými časovými body statisticky významné ($F = 0,3699$; $P = 0,6931$).

Kosinorová analýza prokázala u skupiny s RF přítomnost cirkadiálního rytmu v expresi genu *c-fos* ($P = 0,0047$; $R^2 = 0,2303$), jehož amplituda byla $0,2166 \pm 0,0620$, akrofáze tohoto rytmu byla určena v $CT14,1 \pm 1,2$ a hodnota mesoru byla $1,014 \pm 0,0455$. U skupiny krmené *ad libitum* byla kosinorovou metodou potvrzena absence cirkadiálního rytmu ($P = 0,6931$; $R^2 = 0,0182$) a hodnota mesoru byla $0,9063 \pm 0,0285$.

Porovnáním profilů obou skupin pomocí dvojnásobné analýzy variance byl prokázán statisticky významný vliv času ($P = 0,0002$), signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami ($P = 0,0293$) a významná interakce ($P = 0,0014$). Následná post hoc analýza pomocí Holm-Šídákova testu prokázala signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami v CT9 ($P = 0,0108$) (viz obr.16).

Výsledky prokázaly, že vystavení březích samic LL od počátku jejich březosti vyrušilo cirkadiální rytmus v expresi *c-fos* v SCN 19ti denních embryí a expozice březích samic RF režimu tento rytmus obnovila.



Obr.16: Denní profil relativní exprese genu *c-fos* v SCN 19ti denních potkaních embryí. Černá barva představuje relativní expresi genu *c-fos* v SCN embryí, jejichž matky byly od E0 umístěny na stálé světlo a potravu měly k dispozici *ad libitum* po celou dobu experimentu. Červenou barvou je vyobrazena relativní exprese genu *c-fos* v SCN embryí, jejichž matky byly od E0 také chovány na stálém světle, potravu však měly po celou dobu experimentu k dispozici pouze mezi CT3-CT9.

5. Diskuze

Přítomnost synchronizace mezi matkou a mládětem je známa již poměrně dlouho a je nezbytná pro správné nastavení rytmů v těle mláděte, které je tak připravováno na cyklické změny v okolním prostředí. Mechanismus signalizace matky k mláděti ať před narozením, nebo po něm, však není do této doby detailně objasněn, zejména s ohledem na dobu, kdy k této synchronizaci dochází. V E19 je neurogeneze SCN embrya ukončena a vznikají první synaptické spoje mezi neurony (Altman and Bayer, 1986; Moore and Bernstein, 1989). Vlastní cirkadiánní hodiny fétu nejsou v tomto stádiu funkční, protože na úrovni celého SCN hodinové geny dosud nevykazují rytmicitu (Houdek and Sumova, 2014; Sladek et al., 2004). Cílem této práce proto bylo zjistit, zda mateřská signalizace v tomto vývojovém období ovlivňuje hodiny fétů.

Mnoho prací nabízí hypotézy o přítomnosti synchronizačních signálů na prenatální i postnatální úrovni. Výsledky této diplomové práce podporují hypotézu o synchronizaci cirkadiánních hodin v SCN mateřskými signály již před narozením. Zjistili jsme, že posun cirkadiánních hodin březí samice, vyvolaný posunem světelného režimu, ovlivní fázi cirkadiánních hodin v SCN jejich fétů. Dále jsme zjistili, že fetální SCN hodiny jsou seřizovány také signály souvisejícími s rytmickou aktivitou a příjmem potravy březí samice. Lze tedy shrnout, že naše výsledky prokázaly schopnost mateřských signálů, ovlivněných manipulací s potravním a světelným režimem matky, seřizovat chod cirkadiánních hodin v SCN 19ti denních embryí.

Pro prokázání synchronizačního vlivu mateřských signálů na fetální hodiny v SCN jsme zvolili strategii, při které jsme záměrně ovlivnili mateřské hodiny v SCN (posuny ve světelném režimu) a rytmy v chování a příjmu potravy a sledovali dopad těchto manipulací na hodiny v SCN fétů. Naším cílem bylo zjistit, zda má manipulace se světelným a potravním režimem vliv na rytmy v SCN 19ti denních embryí. Jestliže se ovlivněním přirozených matčiných rytmů pomocí manipulace se světlem ovlivní i embryonální hodiny v SCN, dokazuje to přítomnost synchronizačních signálů mezi matkou a mládětem. Jako ukazatel cirkadiánních hodin ve fetálním SCN byl v tomto případě použit gen *c-fos*, který není přímo součástí molekulární smyčky zodpovědné za chod cirkadiánních hodin, ale jeho exprese je odrazem spontánní neuronální aktivity v SCN jak u dospělých zvířat (Sumova et al., 1998) tak

i fétů (Houdek and Sumova, 2014). Cirkadiánní rytmus v expresi tohoto genu v SCN 19ti denních embryí byl již dříve úspěšně detekován stejnými metodami, které byly použité i v této diplomové práci (Houdek and Sumova, 2014).

5.1. Vliv posunutí světelného režimu na expresi genu *c-fos* u 19ti denních potkaních embryí

Bylo už dříve prokázáno, že posuny světelného režimu ovlivňují rytmy hodinových genů v SCN potkanů (Nagano et al., 2003) i myši (Reddy et al., 2002). Zároveň existuje i mnoho studií, které se zabývají dopadem posunu světelného režimu na zdraví dospělců (Herrero et al., 2015; Cho, 2001; Schernhammer et al., 2001). Vlivu těchto posunů na vyvíjející se plod a jeho dosud nezralé cirkadiánní rytmy se však věnuje jen málo pozornosti a v porovnání s dospělci bylo publikováno jen malé množství studií, které se této problematice věnují.

Výsledky této práce prokázaly, že posunutí světelného režimu březím samicím o 6h ve směru fázového zpoždění ovlivnilo profil denní exprese genu *c-fos* v SCN fétů. Ten si u experimentální skupiny zachoval rytmický charakter, vlivem světelné manipulace ale došlo k jeho fázovému opoždění oproti kontrolní skupině zhruba o 5 hodin. Současně s tím došlo k ovlivnění amplitudy, která byla u experimentální skupiny nižší.

Posunutí světelného režimu opačným směrem, tedy 6h předběhnutí, mělo též vliv na denní profil v expresi *c-fos*. V tomto případě byl rytmus v expresi tohoto genu vyrušen, což naznačuje desynchronizaci mezi jednotlivými březími matkami a jednotlivými féty. Vzhledem k tomu, že endogenní perioda cirkadiánních hodin potkana je delší než 24 hodin, je u těchto zvířat k úplné adaptaci na posunutí světelného režimu ve směru fázového předběhnutí zřejmě zapotřebí delší období než jen 5 dní fetálního vývoje. Tuto domnětku podporuje i zaznamenaná behaviorální aktivita březích samic, jejíž vyhodnocení není součástí této práce. Zatímco jednotlivé matky na posun ve smyslu zpoždění reagovaly shodně a jejich pohybová aktivita byla u všech fázově opožděná, matky které byly vystaveny fázovému předběhnutí, reagovaly na tuto manipulaci odlišně. U některých byla aktivita asynchronní a pouze u některých z nich byla fázově posunuta. Fakt, že se k fázovému předběhnutí světelného režimu cirkadiánní systém hůře adaptuje, podporuje i studie, která se zabývala úmrtností při akutním

fázovém předběhnutí, nebo zpoždění (Davidson et al., 2006). Tato práce dokládá zvýšenou mortalitu u myši, starých 27-30 měsíců, které byly vystaveny fázovému předběhnutí.

Experimenty v této části diplomové práce navazují na předchozí výsledky z laboratoře Neurohumorální regulace AV ČR, kde bylo dříve zjištěno, že posunutí světelného režimu u březí samice vyvolá fázový posun hodin jejich novorozených mláďat. Pokud byl světelný režim březím samicím posunut v E18 o 6 hodin ve směru fázového zpoždění, profil denní exprese genu *c-fos* u novorozených potkanů byl též fázově opožděn (El-Hennamy et al., 2008). Interval mezi posunem světelného režimu březí samici a sledováním fáze hodin u mláďat byl 5 dní, zahrnující 4 dny před narozením a 1 postnatální den. I v tomto případě si profil denní exprese genu *c-fos* zachoval rytmický charakter, a oproti kontrole byl posunutý zhruba o 2 hodiny. V naší současné studii jsme ukázali, že vystavení posunu světelného režimu po dobu 5 dní během fetálního vývoje je dostačující k posunu SCN hodin fetů. Při porovnání výsledků z předkládané diplomové práce a dříve publikované práce (El-Hennamy et al., 2008) je zřejmé, že velikost posunu rytmického profilu genu *c-fos* je závislá na době a stupni vývoje, ve kterém byl posun světelného režimu realizován. Hlavním přínosem našich současných výsledků je předložení důkazu, že SCN jsou přímo ovlivňovány mateřskými signály během embryonálního vývoje, které souvisí s nastavením mateřských cirkadiánních hodin v SCN. Zjistili jsme, že tyto signály mají přímý dopad na rytmus v neuronální aktivitě fetálních SCN.

5.2. Vliv manipulace s příjmem potravy na expresi genu *c-fos* u 19ti denních potkaních embryí

Jak již bylo zmíněno v teoretickém úvodu, nejen světlo, ale i doba příjmu potravy je neméně důležitým synchronizačním signálem, který se uplatňuje především při synchronizaci periferních hodin v těle. Za normálních podmínek je příjem potravy regulován cirkadiánními hodinami v SCN. Pokud však dojde k omezení příjmu potravy na dobu, kdy ji organismus přirozeně není zvyklý konzumovat (tj. na světlou část dne, pro noční živočichy jako např. potkany a myši), dojde k seřízení periferních hodin, přičemž centrální hodiny v SCN na tuto situaci nereagují (Stokkan et al., 2001), a výsledkem je desynchronizace mezi hodinami v periférii a v SCN (Damiola et al., 2000).

Pro zjištění vlivu režimu v příjmu potravy a s tím spojené pohybové aktivity březí samice na fetální hodiny v SCN jsme vystavením LL rytmickou signalizaci z centrálních hodin v SCN matky k fétům vyrušili. Za předpokladu, že jsou pokusná zvířata krmena *ad libitum*, vystavení režimu LL vede k potlačení rytmů v příjmu potravy a v pohybové aktivitě (Depresbrummer et al., 1995; Polidarova et al., 2011). Je to způsobeno tím, že vlivem LL dochází v centrálních hodinách v SCN k desynchronizaci jednotlivých oscilátorů (Ohta et al., 2005), což způsobí ztrátu rytmicity některých hodinových genů (Novakova et al., 2011) a SCN pak ztrácí schopnost vysílat koherentní rytmický signál a řídit cirkadiánní rytmy. U březí samice tak nemohou synchronizovat hodiny jejich fétů a mláďata ve vrhu se rodí se vzájemně desynchronizovanými hodinami.

Ztráty rytmicity mezi vrhy může být docíleno i lézemi SCN u březích samic (Weaver and Reppert, 1989). V případě této práce byla u samic provedena na počátku březosti léze SCN, což vede k narušení rytmicity u matky a ztrátě informovanosti embryí o střídání dne a noci. Tato mláďata byla po narození chována na stálé tmě, aby bylo zabráněno světelné synchronizaci a po odstavu byl u nich zaznamenáván rytmus v příjmu tekutin.

Zatímco léze a potrava *ad libitum* vedla k arytmicitě, mláďata matek, vystavených RF režimu, vykazovala určitý rytmus v příjmu tekutin (Weaver and Reppert, 1989). Toto pozorování naznačuje schopnost RF režimu synchronizovat březí matky a proto i mláďata ve vrhu mezi sebou.

Vliv RF na vyvíjející se SCN za stálého světla byl již dříve zkoumán pomocí metody *in situ* hybridizace, kdy bylo prokázáno vymizení rytmů v SCN novorozených mláďat, jejichž matky byly krmeny *ad libitum*, zatímco v případě SCN novorozených mláďat, jejichž matky byly krmeny pouze 6 hodin během dne, byly rytmy přítomné (Novakova et al., 2010). V tomto případě byl sledován rytmus v expresi genů *c-fos* a *Avp* v SCN mláďat matek, krmených *ad libitum* nebo pouze 6 hodin denně. Stejně jako v případě této diplomové práce výsledky těchto experimentů prokázaly ztrátu rytmicity u mláďat, jejichž matky měly neustálý přístup k potravě. U mláďat matek, které byly krmeny pouze 6 hodin denně byl však rytmus v SCN obnoven (Novakova et al., 2010).

Výsledky této práce potvrdily, že vystavení režimu LL při dostupnosti potravy *ad libitum* způsobilo vymizení denního rytmu v expresi genu *c-fos* v SCN 19ti denních embryí. Režim RF byl však schopen rytmus v expresi tohoto genu obnovit a jeho nastavení

odpovídalo době, po kterou měla zvířata přístup k potravě. Vzhledem k tomu, že byla u dospělců prokázána stejná schopnost obnovy rytmicity v hodinových genech pomocí RF režimu (Novakova et al., 2011), jsou zřejmě embryonální SCN k těmto signálům rovněž citlivé.

6. Závěr

Tato diplomová práce prokázala, že jak manipulace se světelnými podmínkami, tak s příjmem potravy u březích samic vede ke změnám v denní expresi genu *c-fos* v SCN 19ti denních embryí. Vzhledem k tomu, že rytmy v SCN takto starých embryí dosud nejdou zcela vyvinuté, rytmus v expresi tohoto genu je pravděpodobně řízen mateřskými signály, kterými matka celý vrh synchronizuje s okolními podmínkami. Výsledky této diplomové práce prokazují vliv těchto signálů na SCN vyvíjejícího se embrya.

Tato diplomová práce doplňuje aktuální poznatky o synchronizaci cirkadiálních hodin mezi matkou a mládětem a může tak přispět k pochopení této problematiky.

Citace

- Abe, H., and B. Rusak, 1992, STIMULATION OF THE HAMSTER VENTRAL LATERAL GENICULATE-NUCLEUS INDUCES FOS-LIKE IMMUNOREACTIVITY IN SUPRACHIASMATIC NUCLEUS CELLS: *Neuroscience Letters*, v. 148, p. 185-189.
- Akashi, M., Y. Tsuchiya, T. Yoshino, and E. Nishida, 2002, Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKI epsilon) and CKI delta in cultured cells: *Molecular and Cellular Biology*, v. 22, p. 1693-1703.
- Akiyama, M., Y. Kouzu, S. Takahashi, H. Wakamatsu, T. Moriya, M. Maetani, S. Watanabe, H. Tei, Y. Sakaki, and S. Shibata, 1999, Inhibition of light- or glutamate-induced mPer1 expression represses the phase shifts into the mouse circadian locomotor and suprachiasmatic firing rhythms: *Journal of Neuroscience*, v. 19, p. 1115-1121.
- Albus, H., M. J. Vansteensel, S. Michel, G. D. Block, and J. H. Meijer, 2005, A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock: *Current Biology*, v. 15, p. 886-893.
- Altman, J., and S. A. Bayer, 1986, THE DEVELOPMENT OF THE RAT HYPOTHALAMUS: *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology*, v. 100, p. 1-173.
- Ando, H., H. Yanagihara, Y. Hayashi, Y. Obi, S. Tsuruoka, T. Takamura, S. Kaneko, and A. Fujimura, 2005, Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue: *Endocrinology*, v. 146, p. 5631-5636.
- Ansari, N., M. Agathagelidis, C. Lee, H. W. Korf, and C. von Gall, 2009, Differential maturation of circadian rhythms in clock gene proteins in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis during mouse ontogeny: *European Journal of Neuroscience*, v. 29, p. 477-489.
- Aton, S. J., C. S. Colwell, A. J. Harmar, J. Waschek, and E. D. Herzog, 2005, Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons: *Nature Neuroscience*, v. 8, p. 476-483.
- Baler, R., S. Covington, and D. C. Klein, 1997, The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter - cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex: *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 6979-6985.
- Balsalobre, A., 2002, Clock genes in mammalian peripheral tissues: *Cell and Tissue Research*, v. 309, p. 193-199.
- Balsalobre, A., F. Damiola, and U. Schibler, 1998, A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells: *Cell*, v. 93, p. 929-937.
- Ban, Y., Y. Shigeyoshi, and H. Okamura, 1997, Development of vasoactive intestinal peptide mRNA rhythm in the rat suprachiasmatic nucleus: *Journal of Neuroscience*, v. 17, p. 3920-3931.
- Bellavia, S. L., A. R. Carpentieri, A. M. Vaque, A. F. Macchione, and N. T. Vermouth, 2006, Pup circadian rhythm entrainment - effect of maternal ganglionectomy or pinealectomy: *Physiology & Behavior*, v. 89, p. 342-349.
- Bender, M., J. Drago, and S. A. Rivkees, 1997, D1 receptors mediate dopamine action in the fetal suprachiasmatic nuclei: studies of mice with targeted deletion of the D1 dopamine receptor gene: *Molecular Brain Research*, v. 49, p. 271-277.
- Botchkina, G. I., and L. P. Morin, 1995, ONTOGENY OF RADIAL GLIA, ASTROCYTES AND VASOACTIVE-INTESTINAL-PEPTIDE IMMUNOREACTIVE NEURONS IN HAMSTER SUPRACHIASMATIC NUCLEUS: *Developmental Brain Research*, v. 86, p. 48-56.
- Brown, S. A., G. Zimbrunn, F. Fleury-Olela, N. Preitner, and U. Schibler, 2002, Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks: *Current Biology*, v. 12, p. 1574-1583.
- Buijs, R. M., C. G. van Eden, V. D. Goncharuk, and A. Kalsbeek, 2003, The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system: *Journal of Endocrinology*, v. 177, p. 17-26.

- Buxton, O. M., C. W. Lee, M. L'Hermite-Baleriaux, F. W. Turek, and E. Van Cauter, 2003, Exercise elicits phase shifts and acute alterations of melatonin that vary with circadian phase: *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 284, p. R714-R724.
- Cagampang, F. R. A., J. Yang, Y. Nakayama, C. Fukuhara, and S. I. T. Inouye, 1994, CIRCADIAN VARIATION OF ARGININE-VASOPRESSIN MESSENGER-RNA IN THE RAT SUPRACHIASMATIC NUCLEUS: *Molecular Brain Research*, v. 24, p. 179-184.
- Camacho, F., M. Cilio, Y. Guo, D. M. Virshup, K. Patel, O. Khorkova, S. Styren, B. Morse, Z. Yao, and G. A. Keesler, 2001, Human casein kinase I delta phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2: *Febs Letters*, v. 489, p. 159-165.
- Carter, D. S., and B. D. Goldman, 1983, ANTIGONADAL EFFECTS OF TIMED MELATONIN INFUSION IN PINEALECTOMIZED MALE DJUNGARIAN HAMSTERS (PHODOPUS-SUNGORUS-SUNGORUS) - DURATION IS THE CRITICAL PARAMETER: *Endocrinology*, v. 113, p. 1261-1267.
- Claustrat, B., G. Chazot, J. Brun, D. Jordan, and G. Sassolas, 1984, A CHRONOBIOLOGICAL STUDY OF MELATONIN AND CORTISOL SECRETION IN DEPRESSED SUBJECTS - PLASMA MELATONIN, A BIOCHEMICAL MARKER IN MAJOR DEPRESSION: *Biological Psychiatry*, v. 19, p. 1215-1228.
- Cos, S., M. D. Mediavilla, R. Fernandez, D. Gonzalez-Lamuno, and E. J. Sanchez-Barcelo, 2002, Does melatonin induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells in vitro?: *Journal of Pineal Research*, v. 32, p. 90-96.
- Damiola, F., N. Le Minh, N. Preitner, B. Kornmann, F. Fleury-Olela, and U. Schibler, 2000, Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus: *Genes & Development*, v. 14, p. 2950-2961.
- Davidson, A. J., M. T. Sellix, J. Daniel, S. Yamazaki, M. Menaker, and G. D. Block, 2006, Chronic jet-lag increases mortality in aged mice: *Current Biology*, v. 16, p. R914-R916.
- Davis, F. C., R. Boada, and J. Ledeaux, 1990, NEUROGENESIS OF THE HAMSTER SUPRACHIASMATIC NUCLEUS: *Brain Research*, v. 519, p. 192-199.
- Davis, F. C., and R. A. Gorski, 1985, DEVELOPMENT OF HAMSTER CIRCADIAN-RHYTHMS .1. WITHIN-LITTER SYNCHRONY OF MOTHER AND PUP ACTIVITY RHYTHMS AT WEANING: *Biology of Reproduction*, v. 33, p. 353-362.
- Davis, F. C., and R. A. Gorski, 1988, DEVELOPMENT OF HAMSTER CIRCADIAN-RHYTHMS - ROLE OF THE MATERNAL SUPRACHIASMATIC NUCLEUS: *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology*, v. 162, p. 601-610.
- Davis, F. C., and J. Mannion, 1988, ENTRAINMENT OF HAMSTER PUP CIRCADIAN-RHYTHMS BY PRENATAL MELATONIN INJECTIONS TO THE MOTHER: *American Journal of Physiology*, v. 255, p. R439-R448.
- Deguchi, T., 1975, ONTOGENESIS OF A BIOLOGICAL CLOCK FOR SEROTONIN-ACETYL COENZYME-A N-ACETYLTRANSFERASE IN PINEAL-GLAND OF RAT: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 72, p. 2814-2818.
- Depresbrummer, P., F. Levi, G. Metzger, and Y. Touitou, 1995, LIGHT-INDUCED SUPPRESSION OF THE RAT CIRCADIAN SYSTEM: *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 268, p. R1111-R1116.
- Devries, J. I. P., G. H. A. Visser, E. J. H. Mulder, and H. F. R. Prechtel, 1987, DIURNAL AND OTHER VARIATIONS IN FETAL MOVEMENT AND HEART-RATE PATTERNS AT 20-22 WEEKS: *Early Human Development*, v. 15, p. 333-348.
- Ding, J. M., L. E. Faiman, W. J. Hurst, L. R. Kuriashkina, and M. U. Gillette, 1997, Resetting the biological clock: Mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide: *Journal of Neuroscience*, v. 17, p. 667-675.
- Duez, H., and B. Staels, 2009, Rev-erb-alpha: an integrator of circadian rhythms and metabolism: *Journal of Applied Physiology*, v. 107, p. 1972-1980.
- Eide, E. J., E. L. Vielhaber, W. A. Hinz, and D. M. Virshup, 2002, The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase I epsilon: *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 17248-17254.

- El-Hennamy, R., K. Mateju, Z. Bendova, S. Sosniyenko, and A. Sumova, 2008, Maternal control of the fetal and neonatal rat suprachiasmatic nucleus: *Journal of Biological Rhythms*, v. 23, p. 435-444.
- Fonjallaz, P., V. Ossipow, G. Wanner, and U. Schibler, 1996, The two PAR leucine zipper proteins, TEF and DBP, display similar circadian and tissue-specific expression, but have different target promoter preferences: *Embo Journal*, v. 15, p. 351-362.
- Gekakis, N., D. Staknis, H. B. Nguyen, F. C. Davis, L. D. Wilsbacher, D. P. King, J. S. Takahashi, and C. J. Weitz, 1998, Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism: *Science*, v. 280, p. 1564-1569.
- Golombek, D. A., and R. E. Rosenstein, 2010, Physiology of Circadian Entrainment: *Physiological Reviews*, v. 90, p. 1063-1102.
- Gooley, J. J., J. Lu, T. C. Chou, T. E. Scammell, and C. B. Saper, 2001, Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract: *Nature Neuroscience*, v. 4, p. 1165-1165.
- Gravotta, L., A. M. Gavrilă, S. Hood, and S. Amir, 2011, Global Depletion of Dopamine Using Intracerebroventricular 6-Hydroxydopamine Injection Disrupts Normal Circadian Wheel-Running Patterns and PERIOD2 Expression in the Rat Forebrain: *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 45, p. 162-171.
- Guillaumond, F., H. Dardente, V. Giguere, and N. Cermakian, 2005, Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors: *Journal of Biological Rhythms*, v. 20, p. 391-403.
- Hafner, M., H. Koepl, and D. Gonze, 2012, Effect of Network Architecture on Synchronization and Entrainment Properties of the Circadian Oscillations in the Suprachiasmatic Nucleus: *Plos Computational Biology*, v. 8, p. 16.
- Herrero, L., L. Valcarcel, C. A. da Silva, N. Albert, A. Diez-Noguera, T. Cambras, and D. Serra, 2015, Altered Circadian Rhythm and Metabolic Gene Profile in Rats Subjected to Advanced Light Phase Shifts: *Plos One*, v. 10.
- Hiroshige, T., K. I. Honma, and K. Watanabe, 1982, POSSIBLE ZEITGEBERS FOR EXTERNAL ENTRAINMENT OF THE CIRCADIAN-RHYTHM OF PLASMA-CORTICOSTERONE IN BLIND INFANTILE RATS: *Journal of Physiology-London*, v. 325, p. 507-519.
- Houdek, P., L. Polidarova, M. Novakova, K. Mateju, S. Kubik, and A. Sumova, 2015, Melatonin Administered During the Fetal Stage Affects Circadian Clock in the Suprachiasmatic Nucleus but Not in the Liver: *Developmental Neurobiology*, v. 75, p. 131-144.
- Houdek, P., and A. Sumova, 2014, In Vivo Initiation of Clock Gene Expression Rhythmicity in Fetal Rat Suprachiasmatic Nuclei: *Plos One*, v. 9.
- Cho, K. W., 2001, Chronic 'jet lag' produces temporal lobe atrophy and spatial cognitive deficits: *Nature Neuroscience*, v. 4, p. 567-568.
- Illnerova, H., and J. Vanecek, 1988, ENTRAINMENT OF THE RAT PINEAL RHYTHM IN MELATONIN PRODUCTION BY LIGHT: *Reproduction Nutrition Development*, v. 28, p. 515-526.
- Ingram, C. D., R. Ciobanu, I. L. Coculescu, R. Tanasescu, M. Coculescu, and R. Mihai, 1998, Vasopressin neurotransmission and the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus: *Advances in Brain Vasopressin*, v. 119, p. 351-364.
- Inouye, S. T., and H. Kawamura, 1979, PERSISTENCE OF CIRCADIAN RHYTHMICITY IN A MAMMALIAN HYPOTHALAMIC ISLAND CONTAINING THE SUPRACHIASMATIC NUCLEUS: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 76, p. 5962-5966.
- Jean-Louis, G., N. J. Williams, D. Sarpong, A. Pandey, S. Youngstedt, F. Zizi, and G. Ogedegbe, 2014, Associations between inadequate sleep and obesity in the US adult population: analysis of the national health interview survey (1977-2009): *Bmc Public Health*, v. 14, p. 10.
- Jiao, Y. Y., and B. Rusak, 2003, Electrophysiology of optic nerve input to suprachiasmatic nucleus neurons in rats and degus: *Brain Research*, v. 960, p. 142-151.
- Jilg, A., J. Moek, D. R. Weaver, H. W. Korf, J. H. Stehle, and C. von Gall, 2005, Rhythms in clock proteins in the mouse pars tuberalis depend on MT1 melatonin receptor signalling: *European Journal of Neuroscience*, v. 22, p. 2845-2854.

- Jin, X. W., L. P. Shearman, D. R. Weaver, M. J. Zylka, G. J. De Vries, and S. M. Reppert, 1999, A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock: *Cell*, v. 96, p. 57-68.
- Kabrita, C. S., and F. C. Davis, 2008, Development of the mouse suprachiasmatic nucleus: Determination of time of cell origin and spatial arrangements within the nucleus: *Brain Research*, v. 1195, p. 20-27.
- Kanishi, Y., Y. Kobayashi, S. Noda, B. Ishizuka, and K. Saito, 2000, Differential growth inhibitory effect of melatonin on two endometrial cancer cell lines: *Journal of Pineal Research*, v. 28, p. 227-233.
- Karlsson, B., A. Knutsson, and B. Lindahl, 2001, Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people: *Occupational and Environmental Medicine*, v. 58, p. 747-752.
- Klein, D. C., S. L. Coon, P. H. Roseboom, J. L. Weller, M. Bernard, J. A. Gastel, M. Zatz, P. M. Iuvone, I. R. Rodriguez, V. Begay, J. Falcon, G. M. Cahill, V. M. Cassone, and R. Baler, 1997, The melatonin rhythm-generating enzyme: Molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland: *Recent Progress in Hormone Research, Proceedings of the 1996 Conference*, Vol 52, v. 52, p. 307-358.
- Kovacikova, Z., M. Sladek, Z. Bendova, H. Illnerova, and A. Sumova, 2006, Expression of clock and clock-driven genes in the rat suprachiasmatic nucleus during late fetal and early postnatal development: *Journal of Biological Rhythms*, v. 21, p. 140-148.
- Kriegsfeld, L. J., and R. Silver, 2006, The regulation of neuroendocrine function: Timing is everything: *Hormones and Behavior*, v. 49, p. 557-574.
- Kubo, T., K. Ozasa, K. Mikami, K. Wakai, Y. Fujino, Y. Watanabe, T. Miki, M. Nakao, K. Hayashi, K. Suzuki, M. Mori, M. Washio, F. Sakauchi, Y. Ito, T. Yoshimura, and A. Tamakoshi, 2006, Prospective cohort study of the risk of prostate cancer among rotating-shift workers: Findings from the Japan Collaborative Cohort Study: *American Journal of Epidemiology*, v. 164, p. 549-555.
- Kume, K., M. J. Zylka, S. Sriram, L. P. Shearman, D. R. Weaver, X. W. Jin, E. S. Maywood, M. H. Hastings, and S. M. Reppert, 1999, mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop: *Cell*, v. 98, p. 193-205.
- Landgraf, D., C. E. Koch, and H. Oster, 2014, Embryonic development of circadian clocks in the mammalian suprachiasmatic nuclei: *Frontiers in Neuroanatomy*, v. 8, p. 7.
- Lavery, D. J., and U. Schibler, 1993, CIRCADIAN TRANSCRIPTION OF THE CHOLESTEROL 7-ALPHA HYDROXYLASE GENE MAY INVOLVE THE LIVER-ENRICHED BZIP PROTEIN DBP: *Genes & Development*, v. 7, p. 1871-1884.
- Leake, R. D., H. Stegner, M. G. Ross, M. G. Ervin, T. H. Oddie, and D. A. Fisher, 1986, DIURNAL-VARIATIONS IN PLASMA ARGININE VASOTOCIN (AVT) CONCENTRATIONS IN THE OVINE FETUS: *Life Sciences*, v. 38, p. 1485-1490.
- Lee, Y. H., J. A. Alberta, F. J. Gonzalez, and D. J. Waxman, 1994, MULTIPLE, FUNCTIONAL DBP SITES ON THE PROMOTER OF THE CHOLESTEROL 7-ALPHA-HYDROXYLASE P450 GENE, CYP7 - PROPOSED ROLE IN DIURNAL REGULATION OF LIVER GENE-EXPRESSION: *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 14681-14689.
- Lehman, M. N., R. Silver, W. R. Gladstone, R. M. Kahn, M. Gibson, and E. L. Bittman, 1987, CIRCADIAN RHYTHMICITY RESTORED BY NEURAL TRANSPLANT - IMMUNOCYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE GRAFT AND ITS INTEGRATION WITH THE HOST BRAIN: *Journal of Neuroscience*, v. 7, p. 1626-1638.
- Li, X. D., and F. C. Davis, 2005, Developmental expression of clock genes in the Syrian hamster: *Developmental Brain Research*, v. 158, p. 31-40.
- Marchant, E. G., and R. E. Mistlberger, 1997, Anticipation and entrainment to feeding time in intact and SCN-ablated C57BL/6j mice: *Brain Research*, v. 765, p. 273-282.
- Mateju, K., Z. Bendova, R. El-Hennamy, M. Sladek, S. Sosniyenko, and A. Sumova, 2009, Development of the light sensitivity of the clock genes *Period1* and *Period2*, and immediate-early gene *c-*

- fos within the rat suprachiasmatic nucleus: *European Journal of Neuroscience*, v. 29, p. 490-501.
- Maywood, E. S., A. B. Reddy, G. K. Y. Wong, J. S. O'Neill, J. A. O'Brien, D. G. McMahon, A. J. Harmar, H. Okamura, and M. H. Hastings, 2006, Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling: *Current Biology*, v. 16, p. 599-605.
- McArthur, A. J., M. U. Gillette, and R. A. Prosser, 1991, MELATONIN DIRECTLY RESETS THE RAT SUPRACHIASMATIC CIRCADIAN CLOCK INVITRO: *Brain Research*, v. 565, p. 158-161.
- McCarthy, J. J., J. L. Andrews, E. L. McDearmon, K. S. Campbell, B. K. Barber, B. H. Miller, J. R. Walker, J. B. Hogenesch, J. S. Takahashi, and K. A. Esser, 2007, Identification of the circadian transcriptome in adult mouse skeletal muscle: *Physiological Genomics*, v. 31, p. 86-95.
- Moga, M. M., and R. Y. Moore, 1997, Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat: *Journal of Comparative Neurology*, v. 389, p. 508-534.
- Monti, J. M., F. Alvarino, D. Cardinali, I. Savio, and A. Pintos, 1999, Polysomnographic study of the effect of melatonin on sleep in elderly patients with chronic primary insomnia: *Archives of Gerontology and Geriatrics*, v. 28, p. 85-98.
- Moore, R. Y., and M. E. Bernstein, 1989, SYNAPTOGENESIS IN THE RAT SUPRACHIASMATIC NUCLEUS DEMONSTRATED BY ELECTRON-MICROSCOPY AND SYNAPSIN-1 IMMUNOREACTIVITY: *Journal of Neuroscience*, v. 9, p. 2151-2162.
- Moore, R. Y., and J. P. Card, 1994, INTERGENICULATE LEAFLET - AN ANATOMICALLY AND FUNCTIONALLY DISTINCT SUBDIVISION OF THE LATERAL GENICULATE COMPLEX: *Journal of Comparative Neurology*, v. 344, p. 403-430.
- Moore, R. Y., and V. B. Eichler, 1972, LOSS OF A CIRCADIAN ADRENAL CORTICOSTERONE RHYTHM FOLLOWING SUPRACHIASMATIC LESIONS IN RAT: *Brain Research*, v. 42, p. 201-&.
- Moore, R. Y., J. C. Speh, and R. K. Leak, 2002, Suprachiasmatic nucleus organization: *Cell and Tissue Research*, v. 309, p. 89-98.
- Muhlbauer, E., S. Wolgast, U. Finckh, D. Peschke, and E. Peschke, 2004, Indication of circadian oscillations in the rat pancreas: *Febs Letters*, v. 564, p. 91-96.
- Munekawa, K., Y. Tamada, N. Iijima, S. Hayashi, A. Ishihara, K. Inoue, M. Tanaka, and Y. Ibata, 2000, Development of astroglial elements in the suprachiasmatic nucleus of the rat: With special reference to the involvement of the optic nerve: *Experimental Neurology*, v. 166, p. 44-51.
- Nagano, M., A. Adachi, K. Nakahama, T. Nakamura, M. Tamada, E. Meyer-Bernstein, A. Sehgal, and Y. Shigeyoshi, 2003, An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center: *Journal of Neuroscience*, v. 23, p. 6141-6151.
- Novakova, M., L. Polidarova, M. Sladek, and A. Sumova, 2011, RESTRICTED FEEDING REGIME AFFECTS CLOCK GENE EXPRESSION PROFILES IN THE SUPRACHIASMATIC NUCLEUS OF RATS EXPOSED TO CONSTANT LIGHT: *Neuroscience*, v. 197, p. 65-71.
- Novakova, M., M. Sladek, and A. Sumova, 2010, Exposure of Pregnant Rats to Restricted Feeding Schedule Synchronizes the SCN Clocks of Their Fetuses under Constant Light but Not under a Light-Dark Regime: *Journal of Biological Rhythms*, v. 25, p. 350-360.
- Ohta, H., S. Yamazaki, and D. G. McMahon, 2005, Constant light desynchronizes mammalian clock neurons: *Nature Neuroscience*, v. 8, p. 267-269.
- Oishi, K., K. Sakamoto, T. Okada, T. Nagase, and N. Ishida, 1998a, Antiphase circadian expression between BMAL1 and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues of rats: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 253, p. 199-203.
- Oishi, K., K. Sakamoto, T. Okada, T. Nagase, and N. Ishida, 1998b, Humoral signals mediate the circadian expression of rat period homologue (rPer2) mRNA in peripheral tissues: *Neuroscience Letters*, v. 256, p. 117-119.
- Perreau-Lenz, S., A. Kalsbeek, J. Van der Vliet, P. Pevet, and R. M. Buijs, 2005, In vivo evidence for a controlled offset of melatonin synthesis at dawn by the suprachiasmatic nucleus in the rat: *Neuroscience*, v. 130, p. 797-803.

- Polidarova, L., M. Sladek, M. Sotak, J. Pacha, and A. Sumova, 2011, Hepatic, Duodenal, and Colonic Circadian Clocks Differ in their Persistence under Conditions of Constant Light and in their Entrainment by Restricted Feeding: *Chronobiology International*, v. 28, p. 204-215.
- Ralph, M. R., R. G. Foster, F. C. Davis, and M. Menaker, 1990, TRANSPLANTED SUPRACHIASMATIC NUCLEUS DETERMINES CIRCADIAN PERIOD: *Science*, v. 247, p. 975-978.
- Reddy, A. B., M. D. Field, E. S. Maywood, and M. H. Hastings, 2002, Differential resynchronisation of circadian clock gene expression within the suprachiasmatic nuclei of mice subjected to experimental jet lag: *Journal of Neuroscience*, v. 22, p. 7326-7330.
- Reppert, S. M., and W. J. Schwartz, 1986, MATERNAL SUPRACHIASMATIC NUCLEI ARE NECESSARY FOR MATERNAL COORDINATION OF THE DEVELOPING CIRCADIAN SYSTEM: *Journal of Neuroscience*, v. 6, p. 2724-2729.
- Ripperger, J. A., L. P. Shearman, S. M. Reppert, and U. Schibler, 2000, CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP: *Genes & Development*, v. 14, p. 679-689.
- Sagar, S. M., F. R. Sharp, and T. Curran, 1988, EXPRESSION OF C-FOS PROTEIN IN BRAIN - METABOLIC MAPPING AT THE CELLULAR-LEVEL: *Science*, v. 240, p. 1328-1331.
- Shearman, L. P., M. J. Zylka, D. R. Weaver, L. F. Kolakowski, and S. M. Reppert, 1997, Two period homologs: Circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei: *Neuron*, v. 19, p. 1261-1269.
- Shibata, S., and R. Y. Moore, 1987, DEVELOPMENT OF NEURONAL-ACTIVITY IN THE RAT SUPRACHIASMATIC NUCLEUS: *Developmental Brain Research*, v. 34, p. 311-315.
- Shibata, S., Y. Oomura, K. Hattori, and H. Kita, 1984, RESPONSES OF SUPRACHIASMATIC NUCLEUS NEURONS TO OPTIC-NERVE STIMULATION IN RAT HYPOTHALAMIC SLICE PREPARATION: *Brain Research*, v. 302, p. 83-89.
- Shimomura, H., T. Moriya, M. Sudo, H. Wakamatsu, M. Akiyama, Y. Miyake, and S. Shibata, 2001, Differential daily expression of Per1 and Per2 mRNA in the suprachiasmatic nucleus of fetal and early postnatal mice: *European Journal of Neuroscience*, v. 13, p. 687-693.
- Shinohara, K., S. Honma, Y. Katsuno, H. Abe, and K. Honma, 1995, 2 DISTINCT OSCILLATORS IN THE RAT SUPRACHIASMATIC NUCLEUS IN-VITRO: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 92, p. 7396-7400.
- Scheer, F., G. A. Van Montfrans, E. J. W. van Someren, G. Mairuhu, and R. M. Buijs, 2004, Daily nighttime melatonin reduces blood pressure in male patients with essential hypertension: *Hypertension*, v. 43, p. 192-197.
- Schernhammer, E. S., F. Laden, F. E. Speizer, W. C. Willett, D. J. Hunter, I. Kawachi, and G. A. Colditz, 2001, Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study: *Journal of the National Cancer Institute*, v. 93, p. 1563-1568.
- Schernhammer, E. S., F. Laden, F. E. Speizer, W. C. Willett, D. J. Hunter, I. Kawachi, C. S. Fuchs, and G. A. Colditz, 2003, Night-shift work and risk of colorectal cancer in the Nurses' Health Study: *Journal of the National Cancer Institute*, v. 95, p. 825-828.
- Schernhammer, E. S., B. Rosner, W. C. Willett, F. Laden, G. A. Colditz, and S. E. Hankinson, 2004, Epidemiology of urinary melatonin in women and its relation to other hormones and night work: *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 13, p. 936-943.
- Schwartz, W. J., N. Aronin, J. Takeuchi, M. R. Bennett, and R. V. Peters, 1995, TOWARDS A MOLECULAR-BIOLOGY OF THE SUPRACHIASMATIC NUCLEUS - PHOTIC AND TEMPORAL REGULATION OF C-FOS GENE-EXPRESSION: *Seminars in the Neurosciences*, v. 7, p. 53-60.
- Sladek, M., M. Rybova, Z. Jindrakova, Z. Zemanova, L. Polidarova, L. Mrnka, J. O'Neill, J. Pacha, and A. Sumova, 2007, Insight into the circadian clock within rat colonic epithelial cells: *Gastroenterology*, v. 133, p. 1240-1249.
- Sladek, M., A. Sumova, Z. Kovacikova, Z. Bendova, K. Laurinova, and H. Illnerova, 2004, Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 6231-6236.

- Speh, J. C., and R. Y. Moore, 1993, RETINOHYPOTHALAMIC TRACT DEVELOPMENT IN THE HAMSTER AND RAT: *Developmental Brain Research*, v. 76, p. 171-181.
- Stephan, F. K., and I. Zucker, 1972, CIRCADIAN-RHYTHMS IN DRINKING BEHAVIOR AND LOCOMOTOR ACTIVITY OF RATS ARE ELIMINATED BY HYPOTHALAMIC-LESIONS: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 69, p. 1583-&.
- Stokkan, K. A., S. Yamazaki, H. Tei, Y. Sakaki, and M. Menaker, 2001, Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding: *Science*, v. 291, p. 490-493.
- Sumova, A., M. Sladek, L. Polidarova, M. Novakova, and P. Houdek, 2012, Circadian system from conception till adulthood: *Neurobiology of Circadian Timing*, v. 199, p. 83-103.
- Sumova, A., Z. Travnickova, J. D. Mikkelsen, and H. Illnerova, 1998, Spontaneous rhythm in c-Fos immunoreactivity in the dorsomedial part of the rat suprachiasmatic nucleus: *Brain Research*, v. 801, p. 254-258.
- Tahara, Y., H. Kuroda, K. Saito, Y. Nakajima, Y. Kubo, N. Ohnishi, Y. Seo, M. Otsuka, Y. Fuse, Y. Ohura, T. Komatsu, Y. Moriya, S. Okada, N. Furutani, A. Hirao, K. Horikawa, T. Kudo, and S. Shibata, 2012, In Vivo Monitoring of Peripheral Circadian Clocks in the Mouse: *Current Biology*, v. 22, p. 1029-1034.
- Torres-Farfan, C., N. Mendez, L. Abarzua-Catalan, N. Vilches, G. J. Valenzuela, and M. Seron-Ferre, 2011, A Circadian Clock Entrained by Melatonin Is Ticking in the Rat Fetal Adrenal: *Endocrinology*, v. 152, p. 1891-1900.
- Tuunainen, A., D. F. Kripke, J. A. Elliott, J. D. Assmus, K. M. Rex, M. R. Klauber, and R. D. Langer, 2002, Depression and endogenous melatonin in postmenopausal women: *Journal of Affective Disorders*, v. 69, p. 149-158.
- Viswanathan, N., D. R. Weaver, S. M. Reppert, and F. C. Davis, 1994, ENTRAINMENT OF THE FETAL HAMSTER CIRCADIAN PACEMAKER BY PRENATAL INJECTIONS OF THE DOPAMINE AGONIST SKF-38393: *Journal of Neuroscience*, v. 14, p. 5393-5398.
- Weaver, D. R., and S. M. Reppert, 1986, MATERNAL MELATONIN COMMUNICATES DAYLENGTH TO THE FETUS IN DJUNGARIAN HAMSTERS: *Endocrinology*, v. 119, p. 2861-2863.
- Weaver, D. R., and S. M. Reppert, 1989, PERIODIC FEEDING OF SCN-LESIONED PREGNANT RATS ENTRAINS THE FETAL BIOLOGICAL CLOCK: *Developmental Brain Research*, v. 46, p. 291-296.
- Weaver, D. R., S. A. Rivkees, and S. M. Reppert, 1992, D1-DOPAMINE RECEPTORS ACTIVATE C-FOS EXPRESSION IN THE FETAL SUPRACHIASMATIC NUCLEI: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 89, p. 9201-9204.
- Williams, L. M., M. G. Martinoli, L. T. Titchener, and G. Pelletier, 1991, THE ONTOGENY OF CENTRAL MELATONIN BINDING-SITES IN THE RAT: *Endocrinology*, v. 128, p. 2083-2090.
- Yamaguchi, S., H. Isejima, T. Matsuo, R. Okura, K. Yagita, M. Kobayashi, and H. Okamura, 2003, Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus: *Science*, v. 302, p. 1408-1412.
- Yamazaki, S., R. Numano, M. Abe, A. Hida, R. Takahashi, M. Ueda, G. D. Block, Y. Sakaki, M. Menaker, and H. Tei, 2000, Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats: *Science*, v. 288, p. 682-685.
- Yellon, S. M., and L. D. Longo, 1988, EFFECT OF MATERNAL PINEALECTOMY AND REVERSE PHOTOPERIOD ON THE CIRCADIAN MELATONIN RHYTHM IN THE SHEEP AND FETUS DURING THE LAST TRIMESTER OF PREGNANCY: *Biology of Reproduction*, v. 39, p. 1093-1099.
- Yoo, S. H., S. Yamazaki, P. L. Lowrey, K. Shimomura, C. H. Ko, E. D. Buhr, S. M. Siepk, H. K. Hong, W. J. Oh, O. J. Yoo, M. Menaker, and J. S. Takahashi, 2004, PERIOD2 :: LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 5339-5346.
- Zordan, M., R. Costa, G. Macino, C. Fukuhara, and G. Tosini, 2000, Circadian clocks: What makes them tick?: *Chronobiology International*, v. 17, p. 433-451.