

Az anyai cirkadián ritmus szerepe a magzati fejlődés során

Ph.D. Tézisfüzet
Dr. Krisztina Mészáros

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola, Semmelweis Egyetem
Program: Krónikus betegségek gyermekkori prevenciója



Témavezető: Prof. Dr. Szabó Attila J., Ph.D., D.Sc.

I. Számú Gyermekgyógyászati Klinika, Semmelweis Egyetem,
Budapest.

Külső Konzulens: Prof. Dr. Schaefer Franz

Gyermek- és Ifjúsági Centrum, Ruprecht Karl Egyetem, Heidelberg,
Németország

Budapest, 2017

1. BEVEZETÉS

Ismert, hogy számos fiziológiai folyamat a belső napi ritmust generáló cirkadián óra által időzített, emlősökben ilyen például az alvás-ébrenléti ciklus, egyes hormonok ritmikus elválasztása, vagy a veseműködés napszakos változása. Napjainkra világossá vált, hogy a napi ritmus generálásáért és fenntartásáért sejt szinten az óragének (e.g. *Clock*, *Bmal1*, *Per1/2*, *Cry1/2* és *Rev-erba*) transzkripciós-transzlációs visszacsatolós hurokkal történő, önfenntartó szabályozása a felelős. A sejt szintű molekuláris órák közötti szinkronizáció mind központi, mind pedig perifériás szinten szorosán szabályozott. A központi, ún. cirkadián pacemaker, mely önálló 24 órás endogén aktivitással rendelkezik, a hypothalamus suprachiasmaticus magjában (SCN) található. Az SCN funkciója tekintetében a fő szinkronizáló, mely a Föld forgásából adódó ritmikus környezeti változások (i.e. Zeitgeber stimulus), pl. fényingerek hatására szinkronizálódni képes a külső környezethez. Ezt követően komplex idegi és hormonális (e.g. időzített glükokortikoid és a melatonin szekréció) úton, valamint a magatartás (e.g. alvás-ébrenlét) szabályozása révén összehangolja a perifériás órákat a környezeti ritmusokkal.

Az utóbbi években egyre intenzívebben vizsgált a cirkadián óra működése pl. a méhen belüli fejlődés során, illetve a magzatot ért anyai stimulusok (e.g. alvás-ébrenléti ciklusa, táplálkozási-, aktivitási magatartása) szinkronizációs hatása.

Ezzel párhuzamosan, egyre több meggyőző bizonyíték gyűlik össze arra nézve, hogy a cirkadián óra deszinkronizációját felnőttekben súlyos kórképek (e.g. anyagcsere- és cardiovascularis, tumoros betegségek) kialakulásához vezethet. Mindezek mellett ismert, hogy a méhen belüli fejlődés során a nem megfelelő környezeti viszonyok kedvezőtlenül befolyásolják az organogenezist, így úgymond programozhatják egyes krónikus betegségek későbbi kialakulását.

Mindezeket figyelembe véve felmerül, hogy a cirkadián ritmus zavara, a várandós anya megváltozott táplálkozási és alvási mintázatával, befolyásolhatja a cirkadián óra szerveződését az utódokban, amely potenciálisan hosszan tartó hatásokkal bírhat.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy van-e akut és/vagy hosszan tartó hatása az anyai cirkadián óra deszinkonizációjának a vese perifériás cirkadián órájának szerveződésére és működésére az utódokban.

A következő kérdéseket kívántuk megválaszolni:

- Befolyásolja-e a vemhes állatok cirkadián ritmusának zavara az utód patkányok renális cirkadián óra komponenseinek működését közvetlenül a prenatális időszak alatt és/vagy a későbbi élet során?
- Hatással van-e a vemhes állatok cirkadián ritmusának zavara az utódok intrauterin növekedésére és a vese fejlődésére?
- Van-e hosszú távú hatása a vese funkciójára vagy a vérnyomás szabályozására az utódokban az intrauterin fejlődés alatt bekövetkezett anyai cirkadián ritmus diszregulációjának?

3. MÓDSZEREK

Kísérleti protokoll

Kérdéseink megválaszolására anyaállatokat (n = 240) a vemhesség második napjától a vemhesség végéig (2-20. embrionális nap, E2-E20) véletlenszerűen vetettük alá 5 különböző megvilágítási ciklusnak:

1. normál 12 h fény- 12 h sötétség fotoperiódus (**LD**),
2. folyamatos megvilágítás, 50- 200 lx/ ketrec (**LL**)
3. állandó sötétség (**DD**)
4. ultradián fotoperiódus: 6 h fény- 6 h sötétség (**6:6-LD**)
5. rövid fény (3h) - hosszú sötét (21h) periódus (**3:21-LD**)

Táplálékot ad libitum biztosítottunk, kivéve egy alcsoportot a normál megvilágítás alatt (**LD**), ahol a táplálékot az aktív (sötét) fázis során megvontuk az anyaállatoktól (**FR-LD**), ezzel kényszerítve a táplálékfelvétel napi, normál ritmusának megváltoztatását.

A kísérleteket a helyi állatvédelmi törvényeknek megfelelően, a hatályos laboratóriumi irányelveknek megfelelően végeztük (Regierungspräsidium Karlsruhe, 35-9185.81/G-29/11).

Kísérletsorozatunkat 3 fázisra osztottuk. Az **1. kísérlet** során az anyai cirkadián ritmusokat vizsgáltuk a különböző prenatalis megvilágítás alatt, illetve ezek direkt hatását a főtuszok renális cirkadián óra komponenseinek szerveződésére közvetlenül a születést megelőzően (20. embrionális napon, **E20**). Emellett dokumentáltuk az anyaállatok és az utódok súlyát, valamint a placenták méretét.

A **2. kísérlet** keretében 3 csoportban (**LD, LL és DD**) leírtuk az óragének napi expressziós mintázatának fejlődését (1, 4 és 12 hetes korban, **1W, 4W, 12W**), valamint vizsgáltuk a vesére ható potenciális Zeitgeber stimulusokat.

Majd a **3. kísérletben** célunk volt a prenatalis, anyai cirkadián diszreguláció hosszú távú hatásainak feltárása (34 hetes korban, **34 W**), az utódok vesefunkcióját, a vérnyomás szabályozását és a metabolikus státuszát vizsgálva.

Ezen túlmenően, célul tűztük ki, hogy vizsgáljuk a cirkadián óragének génexpressziós mintázatának nemek közti különbségeit különböző korú (1W és 12W) utódok veséiben.

Mintavétel

Az anyaállatokat (n = 6-10/csoport) utódaikkal a 20. embrionális napon, valamint az utódokat az 1., 4. és a 12. héten (n = 84/csoport, 42 hím mindegyik életkornak megfelelően) minden vizsgált prenatális megvilágítási csoportból (**LD, LL, DD, 6:6-LD** és **3:21-LD**; FR-LD csoportból csak E20) általános anesztéziában 1 nap leforgása (ZT2-24, ZT0 = 06:00 h) alatt 4 óránként 0,9% NaCl oldattal perfundáltuk. Ezt követően eltávolítottuk a veséket, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, további felhasználásig - 80 °C-on tartottuk.

Teljes RNS izoláció és kvantitatív rt-PCR technika

A teljes RNS kivonását homogenizált vese szövetből (10–50 mg) a RNeasy Mini Isolation Kit segítségével (Cat.No.74106, Qiagen, Hilden, Germany) végeztük. A minták koncentrációját és tisztaságát spektrofotometriás módszerrel mértük. A reverz-transzkripciót 1 µg teljes RNS-t felhasználva GeneAmp RNA-PCR Kit-tel végeztük. Az előállított cDNS-t specifikus primerek segítségével amplifikáltuk. A *Clock*, *Bmal1*, *Per1/2*, *Cry1/2* és *Rev-erba*, illetve az *α ENaC*, *Sgk11*, *ENH3*, *AVPR2* gének relatív

expresszióját StepOnePlus Real-Time PCR System használatával mértük SYBR Green-nel jelölt szekvenspecifikus próbákkal. A mennyiségi meghatározást standard görbe alapján végeztük, belső referenciaként a 18S rRNS mennyiségét vettük figyelembe. A primereket a Primer Express Software v2.0.-t használva terveztük a specificitásukat a BLAST adatbázisban (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ellenőriztük.

A vesefunkció mérése

Az anyaállatokat az 1., 2. és 3. gesztációs héten (**1.GW**, **2.GW** és **3.GW**) **LD**, **LL** és **DD** csoportokban és 34 hetes utódokat (**34W**) minden egyes csoportban 24 órára metabolikus ketrecekbe helyeztük és 4 órás frakcionált, illetve 24 órás vizeletmintákat gyűjtöttünk (n = 8-12/ 4h, n = 8-12/ 24h minden vizsgált csoportban). A renális elektrolitok (i.e. nátrium, kálium, foszfát, kalcium) napi exkrécióját, valamint az albuminúriát és a glukózúriát standard laboratóriumi körülmények között határoztuk meg. Ezen felül ELISA technikát alkalmazva mértük a renális melatonin-Sulfát (6-SMT), valamint az aldosteron exkréció napi ritmusát az **LD**, **LL** és **DD** csoportokban.

A viselkedés/ lokomotoros aktivitás mérése

Az anyaállatokat normál megvilágítás alatt (**LD**) egy hetes utódaikkal (**1W**), valamint az utódokat 4 (**4W**) és 12 hetes (**12W**) korban videokamerás rendszerrel figyeltük meg. A video elemzése során kiértékeljük az állatok táplálkozással, vízfogyasztással, aktív mozgással, valamint az anyák utódaik táplálásával eltöltött idő órákra lebontott százalékos arányát.

A vérnyomás monitorozása telemetriás módszerrel

Az anyaállatokba az **LD** (n = 4), **LL** (n = 4), **DD** (n = 6) és **3:21-LD** (n = 7) csoportokban, valamint minden vizsgált csoportban a 34 hetes (34 ± 2 hét) nőstény utódokba **LD** (n = 9), **LL** (n = 11), **DD** (n = 8), **6:6-LD** (n = 5), **3:21-LD** (n = 7) és **FR-LD** (n = 6) telemetriás szenzorokat implantáltunk. A rádió-adó egységeket (model PA-C40; Data Science Internationa) a hasi aortába ültettük be izoflurán (1-3%) anesztézia és kontrolált testhőmérséklet alatt ($37 \pm 0,5$ °C). A rádió-vevő készüléket a ketrecek (Typ IV) alá helyeztük. 7-14 nap regenerációs időszak elteltével mértük a vérnyomást, szívfrekvenciát, valamint a lokomotoros aktivitást. A szisztolés vérnyomásértékeket 10

perces átlagok alapján számoltuk 3 egymást követő nap kapott 24 órás mérést követően.

Echokardiográfia

A szívultrahangos vizsgálatok izoflurán anesztéziában (1-3%) történtek a 34 hetes állatoknál a következő csoportokban: **LD**, **LL**, **6:6-LD**, **3:21-LD** és **FR-LD** (n = 6-10 /csoport). Paraszternális rövid tengelyi M-mód képből a papilláris izmok magasságában mértük a bal kamra vég diasztolés (EED) és vég szisztolés átmérőjét (ESD). A fenti adatokból kiszámoltuk a frakcionális rövidülést [(EDD-ESD)/EDD] x100].

Statisztikai analízis

Az adatokat átlagérték \pm SD (standard szórás), illetve átlag \pm SEM (átlag szórás) értéként adtuk meg. A statisztikai elemzéseket SigmaPlot (version 11.0) programmal végeztük. Szignifikánsnak a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

A cirkadián ritmusok vizsgálatát cosinor analízissel R (version 3.0.3) programmal végeztük (a cosinor funkciót Charles W. Berry

szerint). A cirkadián ritmus elemzésénél a sinusoid görbéket akrofázisukkal, azaz az illesztett görbe maximum-értékének helyével, φ (hh:mm) és a kétszeres amplitúdójukkal $2A$ (%) jellemeztük.

4. LEGFONTOSABB EREDMÉNYEINK

1. Kísérlet

Elsőként írtuk le a renális cirkadián óra komponenseinek (Clock [2A = 22 (%), ϕ = 16:32 (ZT), p = 0,008], Per2 [2A = 36 (%), ϕ = 15:05 (ZT), p = 0,014] and Rev-erba [2A = 78 (%), ϕ = 15:54 (ZT), p = 0,014]) napszaki oszcillációját in vivo már születés előtti patkány főtuszokban. Az irodalmi adatokat figyelembe véve, ezen óragének expressziójának oszcillációja in vivo hamarabb volt detektálható vesében (E20), mint más perifériás szövetekben. Mivel az SCN komplex neuronális kapcsolatai patkányban a születéskor még nem véglegesek, így az szinkronizáló funkcióját sem tudja ellátni, ezért azt feltételezzük, hogy az általunk megfigyelt ritmusok tükrözik a vese sejteinek belső, autonóm oszcillációját.

Továbbá dokumentáltuk a főtusz renális óragénjeinek, illetve az óragének által kontrolált renális gének napi expressziós mintázatának sokrétű változásait a prenatálisan módosított fényviszonyok (**LL**, **DD**, **6:6-LD**, **3:21-LD**) vagy az időben korlátozott anyai táplálékfelvétel (**FR-LD**) hatására. Ezen a

ponton azonban nehéz értelmezni a megfigyelt génexpressziós változások tényleges élettani relevanciáját.

Ellentétben a korábbi állatkísérletekkel, amelyekben például a főtuszok intrauterin retardációja volt megfigyelhető a megzavart fotoperiódus hatására, mi nem találtunk szignifikáns különbséget a magzat (E20) és a placenta súlyát vizsgálva az egyes csoportok között.

2. Kísérlet

Munkánk alátámasztja azon korábbi kutatások eredményeit, melyek bizonyítékokkal szolgálnak arra vonatkozóan, hogy az óragének expressziós mintázata a vesében összefügg a táplálék felvétel napi ritmusával. Leírtuk, hogy a postnatális időszakban (1W, 4W, 12W) az intrarenális óragének génexpressziójának napi mintázata fejlődésen megy keresztül, mely során egyes gének fáziseltolódásait látszólag a tápanyagfelvétel folyamatainak időzítése vezérli. Ezen összefüggés tüzetesebb vizsgálatára az anyák táplálási ritmusát átrendeztük a szülést követő első 7 napon, az anyák napi 4 órás megvonásával azon időszak alatt, amikor normál esetben a legtöbb idejüket az utódok táplálásával

töltötték (ZT 3-7). Ennek hatására a *Clock* és a *Bmal1* gén expressziójának fázisa jelentősen eltolódott (akrofázisok: *Clock* φ : 05:12 vs. 19:07, *Bmal1* φ 06:12 vs. 19:34), míg a többi vizsgált gén nem mutatott napi ritmicitást. A CLOCK és BMAL1 fehérjékből álló komplex transzkripciós faktorként serkenti más óragének, i.e. *Per1/2*, *Cry1/2* és *Rev-erba* génjeinek átíródását. Ezért azt feltételeztük, hogy a táplálási rezsim megváltozásának hatására bekövetkezett *Clock* és *Bmal1* expressziós mintázatának viszonylag gyors reszinkronizációja átmenetileg megzavarta az ezen komponensek által kontrolált más óragének expresszióját.

Bár a táplálékfelvétellel járó folyamatok számos perifériás szövet számára szinkronizációs hatásként (Zeitgeber stimulusként) szolgálnak, figyelembe kell vennünk, más (felnőtt állatokban az SCN által vezérelt) napi ritmusokat, pl. az alvási mintázat vagy a testhőmérséklet, melyek szintén hozzájárulhatnak a perifériás órák szabályozáshoz.

3. Kísérlet

Hosszú távú megfigyeléseink során, a kor előrehaladtával (**34W**) fokozott elhízásra való hajlam volt megfigyelhető főleg a nőstény

utódokban. A vizsgált csoportokban, az **LL** csoportot kivéve (így a **DD**, **6: 6-LD**, **3: 21-LD** és **FR-LD** csoportban) a nőtény állatok testsúlya szignifikánsan magasabb volt a kontrollcsoporthoz (**LD**) képest (DD vs. LD $p < 0,05$, 6:6-LD vs. LD $p < 0,05$, 3:21-LD vs. LD $p < 0,05$, FR-LD vs. LD $p < 0,05$).). Ez a tendencia hímeknél csak a **6:6-LD** csoportban volt szignifikáns (6:6-LD vs. LD $p < 0,001$).

Továbbá a **6:6-LD** és **FR-LD** csoport nőtény utódaiban csökkent vizelet nátriumszekréció (6:6-LD vs. LD $p < 0,001$, FR-LD vs. LD $p < 0,001$) és magasabb szisztolés vérnyomás volt megfigyelhető (6:6-LD vs. LD $p < 0,001$, FR-LD vs. LD $p < 0,001$). Az FR-LD csoportban a fiziológiás vérnyomáscsökkenés nem a passzív napszakban volt megfigyelhető, épp ellenkezőleg (napközben: $140,84 \pm 4,40$ Hgmm vs. éjjel: $133,20 \pm 8,84$ Hgmm)

Emellett az **LL** csoport egyes nőtényeinél magas fokú albuminúriát ($25,42 \pm 35,87$ mg/l vs. LD: $3,66 \pm 1,46$ mg/l, $p = 0,03$), calciúriát ($0,78 \pm 0,13$ mg/mg vs. LD: $0,45 \pm 0,25$ mg/mg, $p < 0,001$) és emelkedett renális foszfát vesztést ($1,77 \pm 0,98$ mg/mg vs. LD: $0,83 \pm 0,55$ mg/mg, $p = 0,023$) dokumentáltunk.

Összefoglalva, megállapításaink alátámasztják azon hipotézisünket, miszerint az anyai cirkadián ritmus diszregulációja hatással van a veseműködésre, így a vérnyomás szabályozására a felnőtt utódokban. A megfigyelt patológiás elváltozások molekuláris háttere azonban még feltárásra vár.

Nemi különbségek

Az óragének napi expressziós mintázatát vizsgálva (*Clock*, *Bmal1*, *Per1/2*, *Cry1/2* és *Rev-erba*, illetve az *α ENaC*, *Sgk11*, *ENH3*, *AVPR2*) egy hetes korban (**1W**) a kontrollcsoportban (**LD**) a ritmusok akrofázisai jelentős különbséget mutattak a nőstény és hím utódok között. Ez arra engedett következtetni, hogy korai posztnatális periódusban a szinkronizációs hatásokra adott válasz nemek között eltérő.

Nem találtunk azonban különbséget a *Bmal1* és a *Rev-erba* expressziós mintázatában a felnőttkorban (**12W**). Kivétel volt a *Clock* gén cirkadián oszcillációja, amely megfigyelhető volt nőstényekben ($p = 0,02$, $2A = 58\%$, $\phi = 06:20h$), ellentétben a hímekkel (*NS*).

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Ez a tanulmány mutatta be először, hogy a vesében lévő óragének már a késői gesztációs időszakban (**E20**) cirkadián oszcillációt mutatnak, mely tükrözi a főtális vese sejtjeinek belső, autonóm oszcillációját. Ezentúl leírtuk a renális óragének napi expressziós mintázatának fejlődését (1, 4 és 12 hetes korban, **1W, 4W, 12W**) az életkorral változó Zeitgeber stimulusok hatására. Eredményeink bizonyítják a vese molekuláris óraszerkezetét, melynek működése révén az intrarenális génaktivitás képes alkalmazkodni a változó környezeti feltételekhez. Az irodalmi adatok alapján a tubuláris funkciók a cirkadián homeosztatisz szabályozás végpontjai, az azonban, hogy az elektrolit és a vízhomeosztázis változásai visszahatnak-e a molekuláris cirkadián óra komponenseire, még tisztázásra szorul.

Ezenkívül kísérleteink eredményei felhívják a figyelmet a prenatális anyai cirkadián ritmus zavarának hosszútávú hatásaira. Bár a patomechanizmus nem tisztázott, az anyai cirkadián óra zavara az intrauterin fejlődés során a vizsgált felnőtt utódokban elhízásra való hajlammal, magasvérnyomással és megváltozott vesefunkcióval járt.

Modern társadalmunk problémája a szív- és érrendszeri megbetegedések és metabolikus diszfunkció egyre magasabb incidenciája, ami még inkább ezen betegségek megelőzésének fontosságára hívja fel a figyelmet. A molekuláris cirkadián óra működésének, illetve diszfunkciójának lehetséges hatásainak megértésével, különösen a fejlődő magzatban, egy lépéssel közelebb kerülhetünk a krónikus betegségek megelőzéséhez és terápiájához.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK

A disszertációhoz kapcsolódó közlemény:

Mészáros K, Pruess L, Szabó AJ, Gondan M, Ritz E, Schaefer F. Development of the circadian clockwork in the kidney. *Kidney Int.* 2014 Nov; 86:915-22.

Egyéb publikációk:

Pásti K, Szabo AJ, Prokai A, **Meszáros K**, Peko N, Solyom R, Sallay P, Reusz G, Rusai K. Continuous glucose monitoring system (CGMS) in kidney-transplanted children. *Pediatr Transplant.* 2013 Aug; 17:454-60.

Rusai K, Prokai A, Juanxing C, **Meszáros K**, Szalay B, Pásti K, Müller V, Heemann U, Lutz J, Tulassay T, Szabo AJ. Dexamethasone protects from renal ischemia/reperfusion injury: a possible association with SGK-1. *Acta Physiol Hung.* 2013 Jun; 100:173-85.

Rusai K, Prókai A, Szebeni B, **Mészáros K**, Fekete A, Szalay B, Vannay Á, Degrell P, Müller V, Tulassay T, Szabó AJ. Gender differences in serum and glucocorticoid regulated kinase-1 (SGK-1) expression during renal ischemia/reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem.* 2011; 27:727-38.