

A cirkadián óra és a metabolizmus találkozási pontjai:

**A vizsцерális zsírszövet szerepének vizsgálata az
immunrendszer működésének szabályozásában**

Rektori pályamunka



Koós Bence

Semmelweis Egyetem
Általános Orvostudományi Kar, VI. évfolyam

Témavezetők: Dr. Ella Krisztina, egyetemi adjunktus, SE Élettani Intézet
Südy Ágnes Réka, PhD hallgató, SE Élettani Intézet

Semmelweis Egyetem
Élettani Intézet
2021

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
I. Irodalmi áttekintés	7
1. A cirkadián ritmus	7
2. A cirkadián ritmus immunológiai vonatkozásai	11
3. A metabolikus ritmus	15
4. A metabolikus ritmus és az immunrendszer kapcsolata	17
II. Célkitűzések	22
III. Módszerek	24
1. Kísérleti állatok és etetési protokoll	24
2. Mintavétel és RNS izolálás	24
3. Komplementer DNS szintézis és valós idejű PCR	25
4. A CXCL12 koncentráció meghatározása a csontvelőben és a szérumban	26
5. Lép tömegének meghatározása	27
6. Statisztikai elemzés	27
IV. Eredmények	28
1. Az időzített etetés hatása a testtömegre és a táplálékfelvételre	28
2. A TRF hatása a vizcserális zsírszövet működésére és a lép tömegére	29

a, A táplálkozás időzítése átállítja a zsírszövet molekuláris óráját és erősíti a metabolikus ritmust	29
b, A táplálkozás időzítése csökkenti a vizcerális zsírszövet lokális gyulladásos markereinek kifejeződését	32
c, A lép tömege csökken TRF hatására.....	34
3. A táplálkozási ritmus átállítja a csontvelői órát, de nem módosítja a szövet gyulladásos állapotát	35
4. A TRF nem módosítja a CXCL12 kifejeződését a csontvelőben	38
V. Megbeszélés.....	39
VI. Következtetések.....	45
VII. Összefoglaló	46
VIII. Summary	48
IX. Irodalomjegyzék	50
X. Köszönetnyilvánítás.....	58

Rövidítések jegyzéke

ABC – ATP-binding cassette

ACTH – Adrenocorticotropic hormone

AL – Ad libitum

AMPK - AMP-activated protein kinase

ANOVA – Analysis of variance

BMAL1 - Brain and muscle arnt-like protein-1

CCG - clock controlled gene (óra által kontrollált gén)

CCL - C-C motif chemokine ligand

CD – Cluster of differentiation

CD62L = L-Selectin

cDNS – komplementer DNS

CLOCK - Circadian locomotor output cycles kaput

CRY - CRYPTOCHROM

CXCL - C-X-C motif chemokine ligand

CXCR - C-X-C motif chemokine receptor

DNáz – dezoxi-ribonukleáz

DNS - Dezoxi-ribonukleinsav

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

G-CSF – Granulocyte – Colony stimulating factor

gDNS – genomiális DNS

GLUT – Glucose transporter

HBSS – Hanks' Balanced Salt Solution

HFD – High-fat diet

HSC – Hematopoietic stem cell

ICAM - Intercellular adhesion molecule

IL – Interleukin

LEPR – Leptin receptor

LPS – Lipopolysaccharide

LXR – Liver-X receptor

MCP – Monocyte Chemoattractant Protein-1

mRNS – messenger RNS

mTOR – Mammalian target of rapamycin

NAD - Nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADPH - Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NF- κ B - Nuclear factor –kappaB

NK – Natural killer cells

NLRP3 – Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing protein 3

PER - PERIOD

PRR - Pattern recognition receptor

REVERB - Nuclear receptor subfamily 1 group D member 1 (NR1D1)

RNS – ribonukleinsav

ROR - Retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor

RORE - Retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor responsive element

RPLP0 – Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0

RT-PCR – Reverse transcription polymerase chain reaction

SCN – Suprachiasmatic nucleus

SGLT - Sodium-glucose transporter

SIRT1 - Sirtuin 1

TEE – Total energy expenditure

TLR – Toll-like receptor

TNF – Tumor necrosis factor

TRF – Time restricted feeding

VCAM - Vascular cell adhesion molecule

ZT – Zeitgeber time

PBS - Phosphate-buffered saline

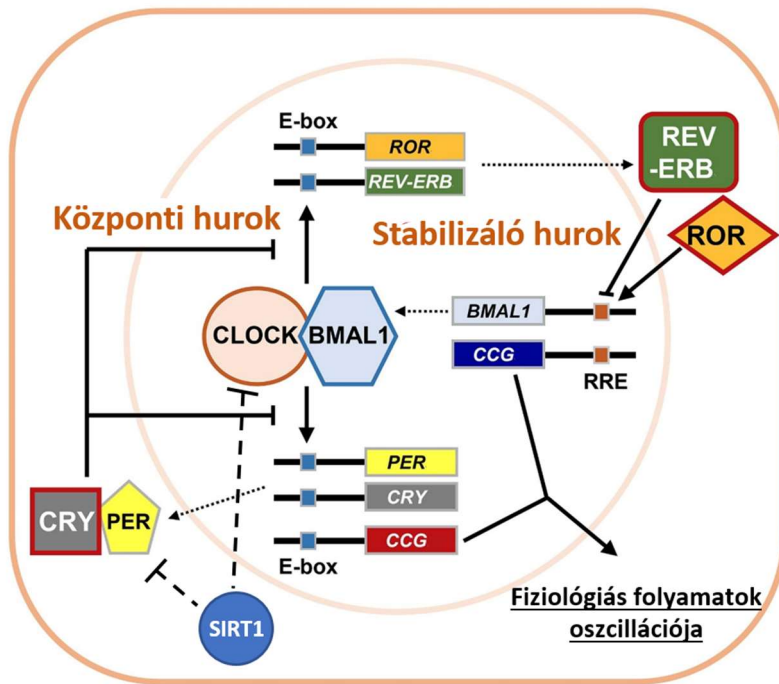
I. Irodalmi áttekintés

1. A cirkadián ritmus

A cirkadián óraműködés egy adaptációs mechanizmus, mely lehetővé teszi, hogy az élőlények alkalmazkodjanak a környezet naponta bekövetkező ritmikus változásaihoz. Mivel a mechanizmus előre felkészíti a szervezetet a környezet napszaki változásaira, így az élettani folyamatok optimalizálásában kulcsszerepet játszik. A cirkadián ritmus evolúciós jelentőségét támasztja alá, hogy működését nem csak az állatokban¹, de a növényekben², a gombákban és a prokarióta életformákban is kimutatták.³ Emellett figyelemre méltó az a friss, páviánokon végzett kutatás, melynek eredményei szerint a genom fehérjekódoló génjeinek 80%-a cirkadián expressziót követ legalább egy szövettípusban.⁴ Ezek alapján nem meglepő, hogy számos élettani paraméter mutat napi oszcillációt, melyek közül a legrégebben ismertek a testhőmérséklet változása, illetve a hormonok (kortizol, ACTH, növekedési hormon, melatonin) és a fehérvérsejtszám napi ingadozása.⁵

Az óraműködést egy endogén, molekuláris ritmusgenerátor hozza létre, melynek működése egy több komponensből álló transzkripciós-transzlációs visszacsatolási hurkon alapul (1. ábra). Az oszcillátor működési alapjainak leírásáért Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash és Michael W. Young 2017-ben elnyerték a fiziológiai és orvostudományi Nobel-díjat. Az emlős szervezetben működő órafehérjék közül a központi szerepet a CLOCK és BMAL1 transzkripciós faktorok töltik be, melyek a sejtmagban heterodimert képezve facilitálják egyes óragének, mint például a *Per*, a *Cry*, a *Ror*, és a *Reverb* expresszióját promoterük E-box régiójához kötődve. A szintetizálódó mRNS-ekről transzlációval keletkező PERIOD (PER) és CRYPTOCHROME (CRY) fehérjék a sejtmagba transzlokálódnak, heterodimert képeznek és gátolják a CLOCK-BMAL1 fehérjekomplex aktivitását, ezáltal pedig saját transzkripciójukat is megszüntetik. A PER és CRY fehérjék folyamatosan érnek, majd lebomlanak, így a CLOCK-BMAL1 komplex felszabadul a gátlás alól és egy újabb ciklus indulhat. A CLOCK-BMAL1 így kialakuló oszcilláló aktivitása körülbelül 24 órás periódushosszal jellemezhető. Ezt a transzkripciós-transzlációs hurkot további szabályozó körök is stabilizálják. A CLOCK-BMAL1 komplex hatására expresszálandó REVERB gátló, a

ROR pedig aktiváló hatást fejt ki a *Bmal1* promoterének RORE (RRE) régiójához kötődve.¹ A transzkripció-transzlációs körben résztvevő fehérjék stabilitását - és ezáltal a ritmusos működésüket - poszttranszlációs módosítások is befolyásolják. Ilyenek például a foszforiláció, az acetiláció és az ubikvitináció. Ezen módosításokat olyan enzimek végzik, melyek aktivitására metabolikus, inflammatorikus és egyéb szignálok is hatást gyakorolnak.⁶ Az egyik ilyen enzim a SIRT1, melynek működése NAD⁺ függő, így érzékeny a metabolikus változásokra. A fehérje képes deacetilálni a PER2 fehérjét, ezáltal elősegíti a fehérje degradációját. Emellett kötődik a CLOCK-BMAL1 komplexhez, ezáltal befolyásolja a központi oszcillátor működését. SIRT1 hiányában a PER2 koncentráció konstitutívan magas a sejtmagban, ami erősíti a negatív visszacsatolást, ez pedig gátolja többek között a *Per1*, *Per2*, *Cry1*, és *Ror-γ* transzkripcióját.⁷ Az órafehérjék, azon felül, hogy visszacsatolási körökön keresztül szabályozzák egymás működését, további gének expresszióját is befolyásolják. Ezek az úgynevezett óra által kontrollált gének, vagyis *cgc*-k (clock controlled genes), melyek ritmusos kifejeződése a fiziológias folyamatok oszcillációját eredményezi.



1.ábra

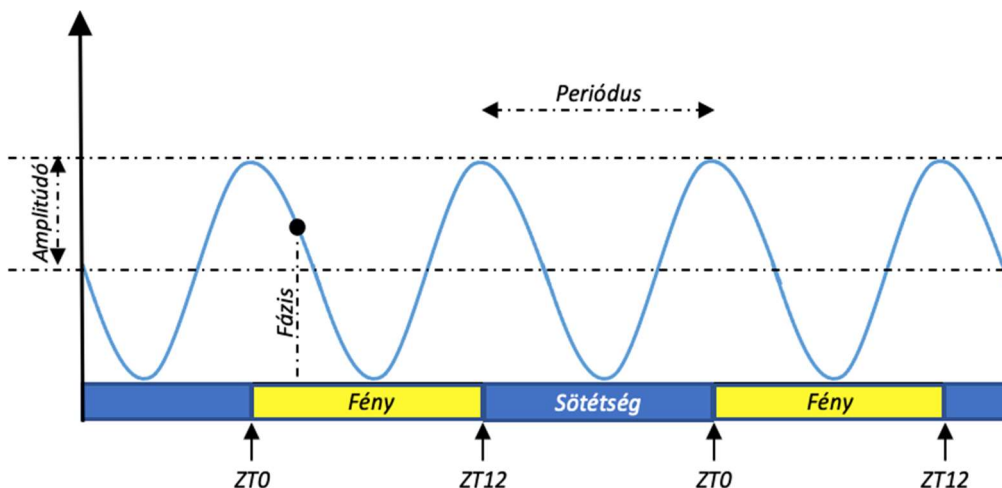
A molekuláris oszcillátor működésének összefoglaló ábrája

A CLOCK-BMAL1 komplex és az expresszáldó PER és CRY alakítja ki a központi szabályozó kört, amit az átíró ROR és REV-ERB stabilizálnak. Az óraműködést posztranszlációs hatásokkal a SIRT1 fehérje is befolyásolja. Az oszcillátor működése hozza létre az óra által kontrollált gének (*cgc*-k) ritmikus kifejeződését, ami pedig a fiziológias folyamatok napszaki ingadozását okozza. A részletesebb magyarázatot lásd a szövegben. (Cha et al., 2019 ábrája alapján)

Ahhoz, hogy egy ritmikus folyamatot cirkadiánnak nevezhessünk, a 24 órás periódushossz megléte mellett több feltételnek is teljesülnie kell. A cirkadián ritmus egyik speciális jellemzője, hogy állandó környezeti körülmények között - például állandó hőmérséklet vagy fényintenzitás mellett - is fennmarad. Ebben az esetben szabadon futó ritmusról beszélünk, melynek periódushossza kis mértékben eltérhet a környezet ritmusától, például az emberek esetében ez körülbelül 24,5 óra.⁸ Azonban az óraműködés képes reagálni a külvilág hatásaira, így nap mint nap szinkronizálódik a környezettel. A külső ingereket, melyek képesek az óraműködést befolyásolni, *Zeitgeber*-eknek (*Zeit geber* = időt adó németül) nevezzük. Az emlősök esetében a legfontosabb *Zeitgeber* a fény, azonban bizonyos szövetekben a táplálékfelvétel is szabályozza a ritmusgenerátort. A környezettel való szinkronizáció folyamatát *Entrainment*-nek nevezzük.⁹ A cirkadián ritmusokra a hőmérséklet kompenzáció is jellemző, mely azt jelenti, hogy ellentétben más biokémiai folyamatokkal, melyek

sebessége hőmérsékletfüggő, az oszcillátor működésének periódushossza széles hőmérsékleti tartományban változatlan marad.

A cirkadián ritmus legfontosabb paramétereit a 2. ábra mutatja be.



2.ábra

A cirkadián ritmus paramétereit

Egy adott paraméter maximuma és minimuma között mérhető különbség fele a ritmus amplitúdója. A fázis a ritmus perióduson belüli aktuális lefutása. A görbe két azonos és szomszédos pontja közötti időbeli távolság a periódus. A ZT0 (Zeitgeber time 0) a fény kezdetét jelöli, míg a többi érték (ZT12, ZT22) a fény megjelenése óta eltelt időt (óra) mutatja.

Az oszcillátor minden sejtmaggal rendelkező sejtben működik, azonban az emlősök órája hierarchikus felépítésű. A cirkadián ritmus irányítója a központi óra, melyet a hypothalamus nucleus suprachiasmaticus (SCN) neuronjai működtetnek. A retinában található speciális fotoszenzitív melanopszint tartalmazó ganglionsejtek a retinába érkező fény hatására efferens rostjaikkal átállítják az SCN-ben működő molekuláris órát.¹⁰ Az SCN magcsoportjai pedig idegi és hormonális szabályozás révén, például a kortizol, a melatonin és a vegetatív idegrendszer segítségével hangolják össze a szervezet többi sejtjének óráit, vagyis a perifériás órákat. Ezáltal a központi óra számos működést indirekt módon szabályoz, ilyenek például az alvás-ébrenléti ciklus¹¹, a DNS-hibajavítás¹², vagy az immunrendszer¹³ aktivitása és a metabolizmus.¹⁴

A cirkadián ritmus zavarának tekintjük azt az állapotot, amikor a környezet ritmusa és a belső óraműködés nincs összhangban, vagy ha a különböző szövetek oszcillátorai eltérő fázisban működnek, vagyis deszinkronizálódnak. Ritmuszavar létrejöhet endogén

és exogén okokból is. Míg a molekuláris oszcillátor komponenseinek mutációi következtében létrejövő endogén ritmuszavar nagyon ritkán fordul elő, az exogén okok rendkívül gyakoriak. Ide tartozik a váltott műszakban végzett munka, a hosszú, nyugatról keletre tartó repülőutak során fellépő *jetlag*, vagy a hétköznapi (társadalmi konvenciók által megszabott) és hétvégi (saját ritmus szerint preferált) alvásfázis eltérése miatt létrejövő szociális *jetlag*.¹⁵ A populáció igen jelentős hányada, több mint 70%-a, szenved exogén ritmuszavarban élete során legalább egyszer hosszabb vagy rövidebb ideig¹⁶, ez pedig számos betegség vagy pszichés zavar kialakulásának kockázatát növelheti. Munkatársaim kimutatták, hogy a nagyobb szociális *jetlag*-gel rendelkező egyetemisták tanulmányi teljesítménye jelentősen romlik abban az időszakban, amikor nem a saját ritmusuk szerinti az időbeosztásuk.¹⁷ Emellett bizonyították, hogy a szociális *jetlag*-gel rendelkezők alvás alatti szívfrekvencia variabilitása csökken a hétköznapi napokon, ez pedig rosszabb alvásminőséggel társul.¹⁸ A fenti okokból bekövetkező deszinkronizált óraműködés azonban fontos rizikófaktor a daganatos¹⁹, a kardiovaszkuláris²⁰, és a gyulladásos²¹ megbetegedések szempontjából is. Éppen ezért fontos az óraműködés pontos megismerése és olyan módszerek keresése, melyek elősegítik a belső óránk összehangolását a környezettel.

2. A cirkadián ritmus immunológiai vonatkozásai

Klinikai tapasztalatok azt mutatják, hogy nem csak a fiziológias működések mutatnak napi ritmicitást, hanem számos megbetegedés tüneti megjelenése is. Például az asthma bronchiale vagy a rheumatoid arthritis tünetei a kora hajnali órákban a legintenzívebbek, míg az akut myocardialis infarctus kialakulása a reggeli órákban a leggyakoribb.²²⁻²⁴ Ennek oka, hogy a különböző - a betegség lefolyását meghatározó - immunfunkciók is cirkadián kontroll alatt állnak. Ez nem meglepő, hiszen a cirkadián ritmus jelentős energiaspórolást tesz lehetővé a folyamatok időzítésén keresztül. Az immunrendszer működését is úgy optimalizálja, hogy a maximális hatékonyságot akkorra időzíti, amikor magas a kórokozónak való kitettség vagy a sérülések valószínűsége. Ma már ismert, hogy az adaptív immunválasz celluláris szereplőinek - a T_{Helper}17- és B-limfocitáknak – az érése és vándorlása is órafüggő.²⁵⁻²⁷ Továbbá ismert, hogy az órafehérjék közvetlenül és közvetetten is befolyásolják a mintázatfelismerő

receptorok (PRR), mint például a Toll-like receptor 9 (TLR9) expresszióját, illetve az NF- κ B transzkripciós faktor aktivitását és ezáltal számos pro-inflammatorikus citokin (pl. IL-6, TNF- α , CXCL1) szintjét is. Ez pedig hozzájárul a gyulladásos válasz időbeli ingadozásához.¹³ Ezt erősíti meg egy olyan tanulmány is, ahol a TLR4 receptor aktiválására lipopoliszacharidot (LPS) adtak az egereknek az aktív (éjszakai) vagy az inaktív (nappali) időszakukban. Az éjszakai fázis elején adott LPS nagyobb mértékű emelkedést váltott ki az IL-6, IL-12, CCL2, CCL5 and CXCL1 citokinek szérumszintjében, mint amikor nappal adták be az LPS-t az állatoknak. Makrofág specifikus Bmal1^{-/-} és Revb α ^{-/-} génhiányos egerek vizsgálatakor ez a különbség nem volt detektálható.²⁸ Az oszcillátor hiányában a gyulladásos folyamatok felerősödnek, így elmondható, hogy a cirkadián működés anti-inflammatorikus hatású.²⁹

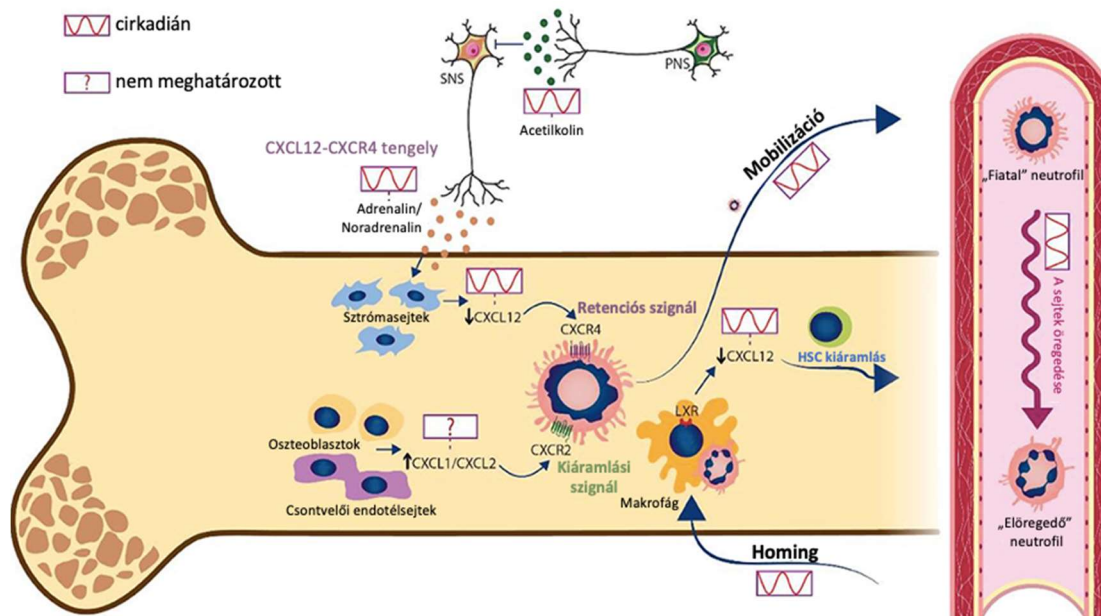
A leukociaszám napi oszcillációja is jól karakterizált a vérben.³⁰ A számbeli változás mellé pedig funkcionális ritmus is társul. Például *in vitro* kísérletek szerint ugyanazon vizsgálati alanyból különböző időpontban izolált neutrofil granulociták NADPH oxidáz aktivitásában, szuperoxid termelésében és fagocitotikus rátájában is napi ritmus tapasztalható.³¹

A perifériás vérben mérhető fehérvérsejtszám a klinikumban is rendszeresen vizsgált gyulladásos paraméternek tekinthető. Markáns ritmusát emberekben elsősorban a neutrofil granulocita populáció nagymértékű oszcillációja okozza. A leukocitaszám maximuma az inaktív fázisra, vagyis a diurnális fajokban az éjszakai, míg a nokturnális állatokban a nappali órákra tehető. A jelenség hátterében az áll, hogy az aktív fázisban, amikor a potenciális patogén expozíció, valamint a sérülések előfordulása nagyobb valószínűségű, az aktív, fiatal fehérvérsejtek a csontvelőből a vérbe, majd a szövetek közé áramlanak, hogy felkészülhessenek a kórokozók fogadására, ekkor csökken a vérben a sejtszám. Az inaktív fázisban pedig a szeneszcens immunsejtek a szövetek közül a perifériás vérbe kerülnek, ekkor nő a sejtszám, ez után a leukociták a csontvelőbe áramlanak vissza.³²

A leukocitaszám változását két fő szabályozó mechanizmus teszi lehetővé. Az egyik a csontvelői *homing* szabályozásán keresztül valósul meg, melynek központi szabályozó faktora a csontvelői sztrómasejtek által termelt CXCL12 kemokin, mely a leukociták a CXCR4 receptorának ligandja. Amennyiben szintje megnő, jelentős kemotaktikus

hatást fejt ki a receptort expresszáló leukocitákra, ezáltal indukálja a visszaáramlást csontvelőbe és gátolja az újonnan képződött sejtek perifériára áramlását. Mind a kemokin, mind a receptor expressziója napi ritmust mutat. Ennek egyik oka, hogy a csontvelői hemopoetikus őssejtekben és sztrómasejtekben is kifejezett a molekuláris óra működése. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy ha vad típusú egerek besugárzás után *Bmal1*^{-/-} génhányos csontvelői graftot kapnak, akkor a CXCL12 koncentráció és a leukocitaszám oszcillációja is megszűnik a vérben. Ehhez a szabályozáshoz a központi óra is hozzájárul a vegetatív idegrendszer által, ugyanis a csontvelőt szimpatikus rostok idegzik be, melyek β_3 -adrenoreceptorokon keresztül serkentik az immunsejtek és a hemopoetikus őssejtek (HSC) kiáramlását a velőállományból. A szimpatikus rostok, vagy az SCN roncsolása szintén megszünteti a fehérvérsejtszám ritmusát a vérben. A szimpatikus hatás más szövetekben is szabályozó szereppel bír, mégpedig az endotélsejtek adhéziós molekula expressziójának módosításán keresztül. Így hozzájárul az immunsejtek lokális toborzásához az aktív időszak idején. Az, hogy ugyanaz az adrenerg stimulus hogyan képes az egyes szövetekben különböző adhéziós molekula expressziós változásokat okozni, még jelenleg is intenzív kutatás tárgyát képezi.³³ A csontvelői szabályozás másik fontos eleme a rövid életű neutrofil granulociták „fiatal” és „előregedő” alpopulációinak ritmikus váltakozása. Egereken végzett kísérletek szerint az aktív fázis elején a csontvelőből a perifériára áramlanak a fiatal, alacsony CXCR4 és magas CD62L (L-selectin) expressziót mutató neutrofil sejtek, majd a szövetek közé kerülnek. Az inaktív fázis végén az előregedő - magas CXCR4 és alacsony CD62L expresszióval jellemezhető - granulociták a csontvelőbe vándorolnak vissza, ahol makrofágok bekebelezik és lebontják őket. Ennek hatására megváltozik a hemopoetikus *niche* és olyan – még nem teljesen ismert - szignalizáció jön létre, mely lokálisan gátolja a sztrómasejtek CXCL12 szintézisét, ezáltal lehetővé téve az újabb fiatal neutrofil granulociták kiáramlását a keringésbe.³⁴ Ebben a jelátvitelben a makrofágok LXR nukleáris receptor expressziójának növekedése is részt vesz. Az LXR receptor központi szerepet játszik a koleszterin és zsírsav lebontásában, működése során pedig indukálja különböző ABC (ATP-binding cassette) transzporterek expresszióját, többek között az ABCA1 kifejeződését is. Mivel a makrofágok intenzív fagocitózisa során megnő a bekebelezett granulociták plazmamembránjaiból felszabaduló zsírsav és

cholesterol szintje, a növekvő *Abca1* expresszió követése információt szolgáltat a sejtek fagocita aktivitásáról.³⁵ Minél nagyobb az aktivitás, annál jobban gátlódik a sztrómasejtek CXCL12 szintézise (3.ábra).

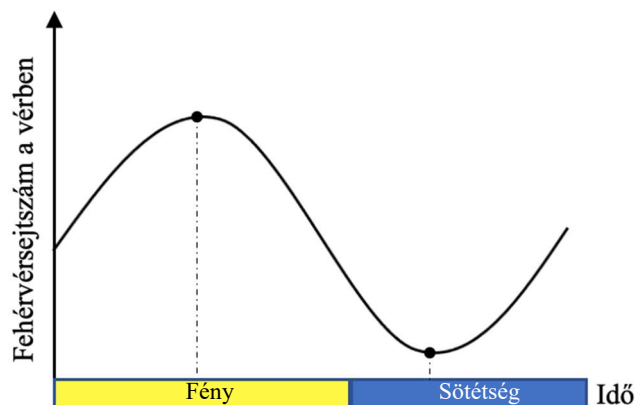


3.ábra

Összefoglaló ábra a csontvelői homing szabályozásának fő vonalairól

A HSC-k és a leukociták *homing*-ját és mobilizációját befolyásoló CXCL12 szintje nagymértékben függ a szimpatikus és paraszimpatikus idegrendszer sztrómasejtekre gyakorolt hatásától. Emellett egyes kemokinek (CXCL1/CXCL2) szintje függ az oszteoblasztok és a csontvelői endotélsejtek működésétől. Ezen mechanizmusok szabályozzák a fehérvérsejtek kiáramlását. A circadian óra reguláló szerepe a folyamat számos pontján igazolt. A csontvelői circadian szabályozás részletesebben a fenti bekezdésben kerül bemutatásra. (Aroca-Crevillén et al., 2020 ábrája alapján)

A leukocitaszám változás másik szabályozó mechanizmusa a fehérvérsejtek kiáramlása a vérből a szövetek közé. A leukociták adhéziós molekulái is circadian expressziót mutatnak. Például a neutrofil granulocitákon a CD11a, az ICAM-1 és az L-selectin kifejeződésének maximuma az aktív fázisra tehető. Ezzel összhangban az endotélsejtek integrinjei közül az ICAM-1 és a VCAM-1 is hasonló expressziós ritmust mutatnak az egyes szövetekben.³² Tehát összegezve mind a leukocita *homing*, mind a sejtek szövetek közé áramlása (*recruitment*) napi ritmust mutat, ez pedig egy nagy amplitúdójú sejtszám oszcillációt hoz létre a periférián. Kísérleteink szempontjából lényeges, hogy egerek esetén a maximális leukocitaszám ZT5-ben (a fényszakasz kezdetétől eltelt 5. óra) mérhető, míg a minimum a sötét (aktív) fázis elejére (ZT13) esik (4. ábra).



4.ábra

A leukocitaszám oszcillációja a perifériás vérben egérben

Egerekben a leukociták számának maximuma a nappali (inaktív) fázisban mérhető, míg a minimuma a sötét (aktív) fázis elejére esik.

3. A metabolikus ritmus

A metabolikus rendszer számos ponton kapcsolódik a cirkadián óra működésével, melynek az a következménye, hogy különböző metabolikus enzimek expressziója, az intermediér anyagcsere termékeinek szintje és az anyagcserét befolyásoló hormonok (pl. inzulin, glukagon, leptin, ghrelin) mennyisége is napi ritmicitást mutat, amit összességében metabolikus ritmusnak nevezünk. Az óraműködés lehetővé teszi, hogy az anabolikus és katabolikus folyamatok időben elkülönüljenek, valamint hogy a köztitermékek ne halmozódjanak fel szükségtelenül. Így például az enzimek is csak akkor szintetizálódnak, amikor szükség van a működésükre, így az élőlény energiafelhasználása jelentősen csökken.³⁶ A hormonális szinten megvalósuló szabályozás jó példái a hasnyálmirigy béta sejtjei, melyek melatonin receptort expresszálnak. Emberek esetén az esti órákban megnövekszik a tobozmirigy melatonin szekréciója, a keringéssel a hasnyálmirigy béta sejtjeihez jutó melatonin pedig a megfelelő receptorhoz kötődve gátló hatást fejt ki az inzulinelválasztásra.³⁷ Továbbá említést érdemel a molekuláris oszcillátor szabályozó hatása a szénhidrát-anyagcsere kulcs transzportereire (GLUT2, GLUT4), mely döntően befolyásolja a glükóz koncentrációját a vérben.³⁸ Egy patkányokon végzett kutatás szerint az enterocitákban

található Na⁺/Glükóz kotranszporter 1-es típusa (SGLT1) cirkadián oszcillációt mutat, így az állatok aktív fázisában - amikor a táplálkozás is esedékes - nagyobb a mennyisége a plazmamembránban.³⁹ Azonban a szénhidrát háztartáson kívül más anyagcsereutakat (pl. lipidek, fehérjék, intermediér metabolitok) is szabályoz a cirkadián óraműködés.³⁶

Robusztus ritmust mutatnak az autofágia folyamatában részt vevő fehérjék és maga az autofágia aktivitása is.⁴⁰ Az autofágia az éhezés hatására létrejövő sejtszintű önmérsztődés, melynek hatására degradálódnak a sejtorganellek és további citoplazmatikus komponensek, melyekből aminosavak és egyéb nutriensek szabadulnak fel, melyek biztosítják a megfelelő energiaellátottságot. Emellett a folyamat a károsodott organellek és a fehérjeaggregátumok eltávolításában is fontos szerepet játszik. Az autofágia nagymértékben függ az étkezési-éhezési periódusoktól, egerekben a délutáni órákban (inaktív fázis) zajlik a legintenzívebben, míg éjszaka az aktív fázisban lecsökken az aktivitása. A cirkadián szabályozását az bizonyítja, hogy *Bmal1*^{-/-} génhiányos egerekben elveszik az autofágia működtetésében részt vevő gének ritmikus expressziója. Az autofágia májspecifikus defektusának a lipid metabolizmus diszregulációja, valamint az inzulinrezisztencia kialakulása a következménye.⁴¹ Mivel az autofágia megfelelő működése csökkenti a daganatos és degeneratív betegségek kockázatát, ezért a megfelelően szinkronizált cirkadián ritmusának fenntartása kulcsfontosságú.

A metabolikus ritmus kialakításában a máj, a hasnyálmirigy, a gyomor-bél traktus, és a zsírszövet ritmikus működése is részt vesz. Ezen szervekben és szövetekben a perifériás órák számára a táplálékfelvétel a legerősebb szinkronizáló hatás. Ezt bizonyítja az a megfigyelés is, hogy az egerek nappali, vagyis inaktív fázisára korlátozódó táplálékfelvétel esetén a májban a BMAL1 és a CLOCK kifejeződésének ritmusa antifázisba kerül az SCN-ben mérhetőéhez képest.³⁸ Tekintve, hogy a táplálékfelvétel fontos *Zeitgeber* a perifériás óráknak, így az egészséges metabolikus ritmus fenntartásához az szükséges, hogy az étkezés időzítése az aktív fázisra korlátozódjon és így összhangban legyen a központi óra működésével. Amennyiben a táplálkozás az inaktív fázisra is átnyúlik és ritmicitása elveszik, vagy nincs összhangban a központi óra ritmusával, akkor létrejön a cirkadián ritmuszavar. Ez pedig az

anyagcsere folyamatok zavarához vezet, mely hosszútávon különböző metabolikus és gyulladásos betegségek kialakulását okozhatja.^{21,42} A táplálékfelvétel időzítésének fontosságát támasztja alá, hogy ha a kísérleti állatok táplálék hozzáférését az aktív időszakokra korlátozzuk, akkor a metabolikus ritmus kifejezettebbé válik, nagyobb amplitúdóval oszcillál, mely irodalmi adatok alapján számos előnnyel jár. Obezogén magas zsírtartalmú táppal etetett egerek esetében az aktív fázisra időzített etetés protektív tényezőnek bizonyult az elhízás szempontjából, összehasonlítva azokkal az állatokkal, akik korlátlanul hozzáfértek a táplálékukhoz. Emellett az időzítetten etetett egerek lipid profilja, glükóztoleranciája és inzulinszenzitivitása is kedvezőbb értékeket mutatott, annak ellenére, hogy a két kísérleti csoport kalória felvételében nem volt különbség. Génexpressziós vizsgálatok alapján pedig a *Cry* és a *Per* óragének, illetve a metabolizmus kulcs szignalizációs fehérjéi közül az AMPK és mTOR kifejeződésének amplitúdója is megnövekszik időzített etetés hatására.⁴³

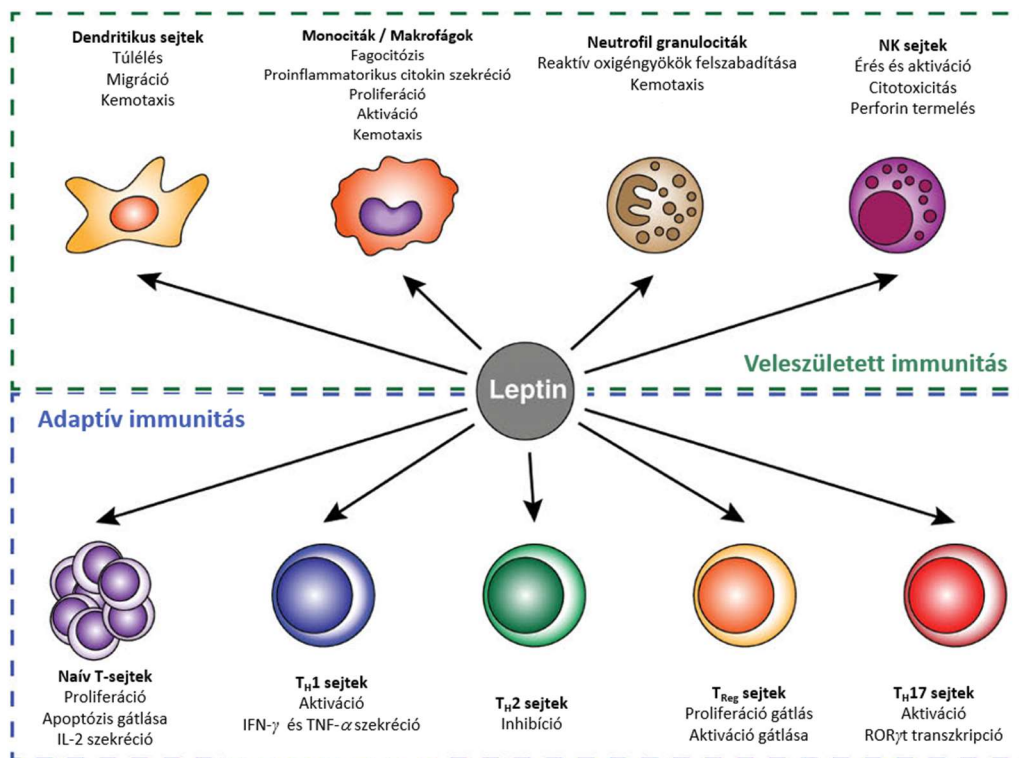
A jóléti társadalomra jellemző, hogy korlátlan az emberek hozzáférése az élelmiszerhez. Érdekes kérdés, hogy a 0-24 órás étkezési lehetőség hogyan befolyásolja az emberek táplálkozási ritmusát. Erre választ keresve egy kutatócsoport egy olyan mobil applikációs szoftvert fejlesztett ki, mely segítségével a vizsgálatban részt vevő önkéntesek adatokat küldhettek az étkezési szokásaikról. Az eredmények arra utalnak, hogy az emberek kalória bevitele egy megközelítőleg 15 órás időablakban történik, a táplálék nagyobb hányada pedig az esti órákban kerül elfogyasztásra. Ez a mintázat pedig nagyon hasonlít az *ad libitum* etetett egerek táplálékfogyasztási szokásaihoz. Azon vizsgálati alanyok, akik túlsúlyosak voltak és az applikáció segítségével 10-12 órára szűkítették a táplálkozási időablakukat, azok képesek voltak testsúlyukat redukálni.⁴⁴ Ezek a megfigyelések arra hívják fel a figyelmet, hogy a megfelelő táplálkozási ritmus kialakítása már önmagában is jótékonyan befolyásol számos folyamatot és hozzájárul a testtömeg normalizálásához.

4. A metabolikus ritmus és az immunrendszer kapcsolata

Számos klinikai és kísérletes megfigyelés támasztja alá, hogy a metabolikus szindróma és egyéb metabolikus zavarok gyulladásos állapotokkal társulnak. Például az elhízással kapcsolt metabolikus szindróma nagyon gyakran atheroszklerózishoz és korai

kardiovaszkuláris elhalálozáshoz vezet. Jellemző továbbá az inzulinrezisztencia, melyhez hiperinzulinémia, centrális elhízás, hipertónia, diszlipidémia és glükózintolerancia társulhat (Magyar Diabetes Társaság Metabolikus Munkacsoportja, 2002). Ebben az állapotban megemelkedik a gyulladásos citokinek (TNF- α , IL-1 β , IL-6) szintje, mely egy krónikus gyulladásos állapotot hoz létre.⁴⁵ Ehhez nagyban hozzájárul, hogy az adipociták is pro-inflammatorikus citokineket (IL-6, IL-8, MCP-1) választanak el, ha növekszik a térfogatuk⁴⁶, vagy ha növekszik az immunsejt infiltráció a zsírszövetbe.⁴⁷ A zsírszövetben található makrofágok fenotípusa is változik az elhízás hatására, mégpedig úgy, hogy a gyulladásos citokineket termelő, klasszikus úton aktivált (M1) makrofágok lesznek jelen nagyobb arányban a szövetben.⁴⁸

A zsírszövet által elválasztott adipokinek fontos kapcsolatot teremtenek a metabolizmus és az immunrendszer működése között. A leptinnek például fontos feladata a táplálékfelvétel és az anyagcsere szabályozása, azonban számos pleiotróp hatását is ismerik. Plazmakoncentrációjának csökkenése „éhezési” szignált közvetít és olyan neurohormonális és magatartásbeli változásokhoz vezet, mely az energiaraktárak megőrzését segíti elő. Ennek köszönhetően a csökkenő leptinkoncentráció a teljes energiafelhasználás (total energy expenditure = TEE) csökkenésével jár, mely biztosítja a vitális szervek (az agy, szív, máj) megfelelő energiaellátottságát.⁴⁹ A legújabb kutatási eredmények szerint a leptin a hemopoézis és az immunfunkciók szabályozásában is jelentős szerepet vállal. Receptora (LEPR) az I-es típusú citokin receptorok szupercsaládjába tartozik, mely számos az adaptív és a veleszületett immunitásban részt vevő sejten kifejeződik, mint például a monocitákon, a granulocitákon, a természetes ölősejteken (Natural Killer cells = NK cells), illetve a T_{Helper} 1 és 2 sejteken is. A leptin serkenti a monociták a fagocita funkcióját és pro-inflammatorikus citokin (TNF- α , IL-6, IL-12) szekrécióját. A granulociták a leptin receptor rövidebb formáját fejezik ki, melynek aktiválása növeli a CD11b integrin alegység expresszióját és túlélési szignált közvetít. A túlélési jelpálya a T-sejtekben is aktiválódik leptin hatására, emellett a sejtek érése és citokin szekréciója is módosul.⁵⁰ A leptin immunsejtekre gyakorolt hatásait az 5. ábra szemlélteti. Összességében elmondható, hogy a leptin pro-inflammatorikus hatásokkal rendelkezik és részt vesz a gyulladásos állapot kialakításában túlsúlyos és obese emberekben.⁵¹



5. ábra

Összefoglaló ábra a leptin immunsejtekre gyakorolt hatásairól.

A bővebb magyarázatot lásd a szövegben. (Lennart, Frank and Jan et al., 2014 ábrája alapján)

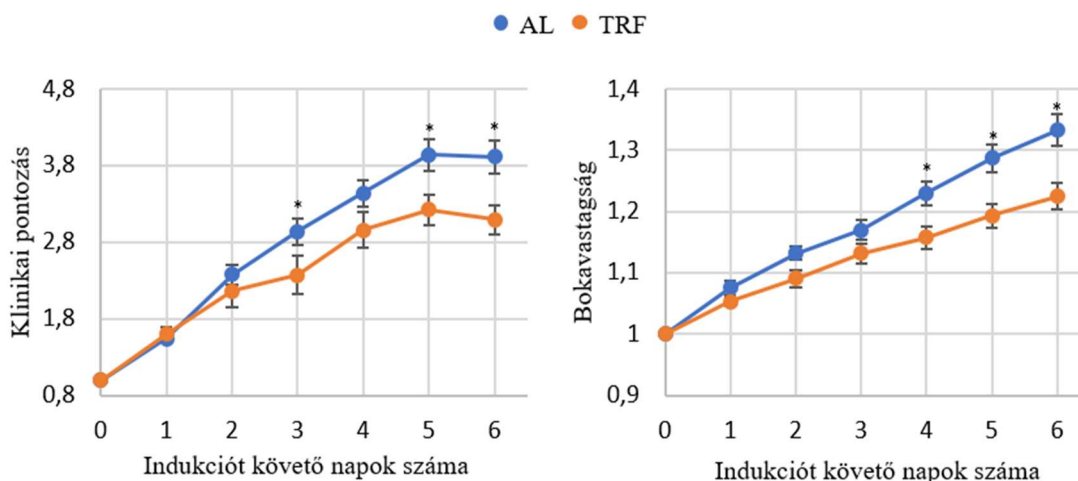
Vizsgálataink szempontjából lényeges kiemelni, hogy a csontvelői mezenchimális sztrómasejtek egy része is kifejez leptin receptorokat.⁵² Ezek a sejtek hatással lehetnek a metabolikus változásokra létrejövő fehérvérsejt vándorlás módosulásra a hemopoézis és a leukocita *homing* szabályozásán keresztül⁵³, így indirekt módon a leptin plazmakoncentrációjának változása hozzájárulhat a hemopoézis dinamikájának és a csontvelői környezet működésének szabályozásához.

Immunológiai hatásokat közvetít az adipociták által elválasztott adiposzin (komplement faktor D) hormon is, ami egy olyan szerin-proteáz, mely aktiválja a komplement rendszer alternatív útvonalát. Az adiposzin koncentrációja jelentősen emelkedik elhízott egyénekben, és humán tanulmányok leírták, hogy emelkedett szintje összefüggésbe hozható az inzulinrezisztencia, a hiperlipidémia és a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásával.⁵⁴

A szakirodalom alapján a legtöbb ismerettel arról rendelkezünk, hogy a cirkadián oszcillátor milyen hatást gyakorol az anyagcserére és az immunrendszerre. Azonban kevés az információnk a metabolikus ritmus és az immunrendszer ritmusa között

fennálló kapcsolatról. Fontos kérdés, hogy a metabolikus óraműködés megváltozása hogyan befolyásolja az immunológiai folyamatok ritmusát és az inflammatorikus állapotok lefolyását. Munkacsoportunk fókuszában a két rendszer ritmusának kölcsönhatása áll. Egereken végzett kísérleteink során azt vizsgáljuk, hogy az időzített etetés hatására módosult metabolikus ritmus hogyan befolyásolja az immunrendszer működését.

A jelen rektori pályázatban bemutatott kísérletek alapját két korábbi vizsgálatunk eredményei adták. Az első során az időzített etetés gyulladásra gyakorolt hatását vizsgáltuk K/BxN szérum transzfer arthritis modellen. A vizsgálat a humán rheumatoid arthritis akut fázisát modellezi.⁵⁵ Az ízületi gyulladás indukciójához transzgenikus egerek szérumát használtuk, mely glükóz-6-foszfát izomeráz elleni antitesteket tartalmaz. A szérumot vad típusú egerek peritoneumába oltottuk, a gyulladás lefolyását pedig két kísérleti csoportban követtük végig. Az egyik csoportnál időzített etetést alkalmaztunk, mely során az állatok csak az aktív fázisuk első 10 órájában jutottak táplálékhoz, ez az úgynevezett time-restricted feeding (TRF). A másik csoport bármikor - *ad libitum* (AL) – táplálkozhatott. A gyulladás mértékét klinikai pontozással és bokavastagság méréssel határoztuk meg. Az eredményeink azt mutatták, hogy a gyulladás mértéke a TRF csoportban szignifikánsan alacsonyabb mindkét mutató alapján, amiből arra következtethetünk, hogy az időzített táplálékelérés csökkenti a gyulladásos folyamatok intenzitását (6.ábra).



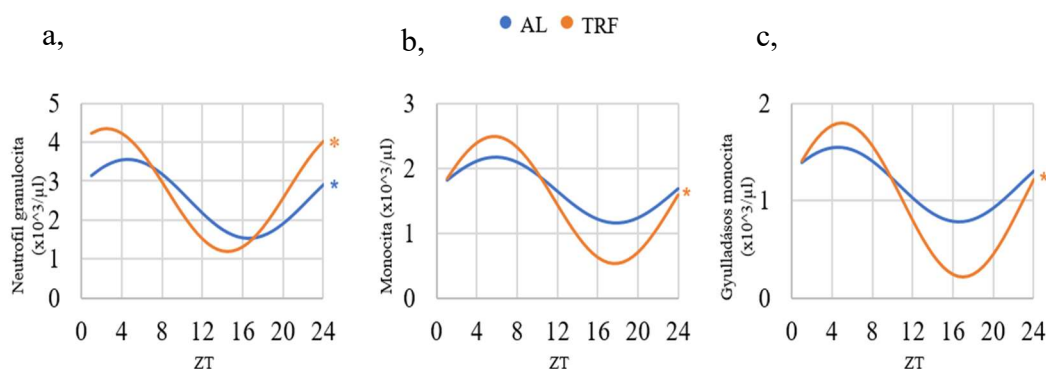
6. ábra

Az ízületi gyulladás követése rheumatoid arthritis egérmodellben

Az ízületek ödémájának kiterjedése és a duzzanat nagysága alapján megállapított klinikai pontszámok (bal oldali ábra) és a bokavastagság értéke (jobb oldali ábra). A feltüntetett eredmények az indukció napján mért értékekre normalizáltak. (átlag $\pm$ SEM, $n=25$ AL, $n=23$ TRF, ismétléses-ANOVA, * $p<0,05$)

A második kísérletünkben a fent részletezett arthritis modellben tapasztalt jelentős gyulladásbeli különbségek miatt tovább vizsgáltuk a táplálkozási ritmus hatásait az immunrendszer „*steady-state*” állapotára. Megfigyeléseink alapján az időzítetten etetett egerekben kifejezettebb a vérben a leukocitaszám napi oszcillációjának amplitúdója, mint azokban az állatokban, akik korlátlanul hozzáfértek a táplálékhoz. Az eltérés nem csak az abszolút sejtszám változásában detektálható, hanem a fehérvérsejt alpopulációk arányának módosulása is hozzájárul ehhez. Minden alpopuláció esetén erősödik a napi ritmus, azonban a neutrofil granulociták és a monociták, illetve a gyulladásos monociták ritmusának amplitúdója sokkal kifejezettebbé válik (7.ábra).

Feltételezéseink szerint ennek hátterében egyrészt a leukociták csontvelő eredetű szabályozása (*homing* és kiáramlás a csontvelőből) állhat. De az is elképzelhető, hogy a sejtek szövetek közé áramlása (*recruitment*) módosul az időzített etetés hatására.



7. ábra

A leukocitaszámok napi ingadozásának Cosinor analízisei

(a) neutrofil granulociták, (b) monociták, (c) gyulladásos monociták számának napi oszcillációja (n=3-9 AL, n=6-11 TRF, Cosinor analízis, *p<0,05)

II. Célkitűzések

Munkánk során azon faktorok megismerését tűztük ki célul, melyek közvetítő szerepet tölthetnek be a metabolikus ritmus, a fehérvérsejtek vándorlása és a gyulladásos folyamatok között. Ezért a rektori pályamunkám fókuszában a viszcerális zsírszövet, valamint a csontvelői szabályozás működésének vizsgálata áll. Kísérleteink eredményei rávilágíthatnak a zsírszövet szerepére az időzített etetés gyulladásra és a leukocita vándorlásra gyakorolt hatásában. Ez pedig közelebb vihet minket terápiás célpontok azonosításához, vagy kiegészítő terápiás lehetőségek (pl. időben korlátozott táplálékfelvétel) tervezéséhez.

Kísérleteink során a következő kérdések megválaszolása volt a célunk:

1. Milyen hatással van az időzített etetéssel kialakított táplálkozási ritmus a zsírszövet óraműködésére, inflammatorikus állapotára és leptin expressziójára?
2. Változik-e a szervezet szisztémás gyulladásos állapota időzített etetés hatására?
3. Milyen hatással van az időzített etetéssel kialakított táplálkozási ritmus a csontvelő óraműködésére és inflammatorikus állapotára?

4. Megváltozik-e az időzített etetés hatására a csontvelői CXCL12 szintézis?
Valamint hozzájárulhat-e a kemokin koncentrációjának megváltozása a leukocitaszám oszcillációjában tapasztalt amplitúdó növekedéséhez?

III. Módszerek

1. Kísérleti állatok és etetési protokoll

Kísérleteink során C56BL/6 egértörzs hím egyedein végeztük a vizsgálatainkat. Az állatokat konvencionális állatházban 12 óra fény/12 óra sötét ciklusban tartottuk. A fényszakasz kezdete a *Zeitgeber time* (ZT) 0, míg a sötét szakasz ZT12 időponttól indult. A kísérletek kezdete előtt az egerek korlátlanul (*ad libitum*) hozzáfértek a táplálékhoz. Az állatokat 60-80 napos korban két csoportra osztottuk a táplálékelérhetőség alapján: az egyik csoport továbbra is *ad libitum* jutott táplálékhoz (AL), míg a másik csoportnál időzített etetést alkalmaztunk (TRF). A TRF csoport számára a táplálékot csak az aktív fázisuk első 10 órájára tettük elérhetővé (ZT12-ZT22) FeedTime (TSE Systems) időzített etetőrendszer segítségével. A kísérleti állatok és az elfogyasztott táplálék tömegét hetente mértük. Annak érdekében, hogy megakadályozzuk az állatok koprofágiáját és a lehulló táp törmelékek elfogyasztását, az egereket taposórácson tartottuk. A megváltozott táplálékelérhetőséghez négy hétig szoktattuk az állatokat, majd ezt követően végezzük a kísérleteket.

Ahhoz, hogy a cirkadián ritmusra jellemző változásokat jól követhessük, az összes kísérletünket 4 órás felbontásban végeztük, így a 24 óra alatt 6 mérési időpont már jó indikátora a ritmikus folyamatok megváltozásának.

2. Mintavétel és RNS izolálás

Az állatokat az adott kísérleti időpontban cervicalis diszklokációval termináltuk, majd eltávolítottunk két-két femurt és tibiát a csontvelő vizsgálatához, valamint mintát vettünk a vizszerális zsírszövetből. A zsírszöveti mintát folyékony nitrogénben fagyasztottuk, mozsárban törve homogenizáltuk, majd 500 µl TriPure® Isolation Reagent-ben (Sigma) szuszpendáltuk fel. A csontokat az izolálás után HBSS pufferben tartottuk, majd 25 G méretű tű segítségével 4°C-os HBSS pufferrel átmostuk, az így készült sejtsuszpenziót pedig 70 µm-es szűrőn szűrtük át. Ez után a mintát 500 g-vel 5 percig centrifugáltuk. Ezután a vörösvértestek alacsonyabb ozmotikus rezisztenciáját kihasználva a sejtpelletet 30 másodpercig 0,2%-os NaCl oldatban szuszpendáltuk, ezzel

hemolizáltuk az eritrocitákat. Ezután az ozmotikus koncentrációt 1,6%-os NaCl oldattal normalizáltuk. Ezt követően ismét lecentrifugáltuk a sejteket, a pelletet pedig 500 µl TriPure® Isolation Reagent-ben vettük fel. A mintákat -80°C-on tároltuk. Az RNS izolálást mind a csontvelői, mind az zsírszöveti minták esetén 100 µl kloroform hozzáadásával folytattuk. A mintákat ezután vortexeltük, majd 10 percig szobahőmérsékleten 850 rpm rázattuk őket. Rázást követően centrifugáltuk őket (4°C, 15 perc 12000 g), majd a legfelül található vizes fázist elkülönítettük és azzal dolgoztunk tovább. 250 µl izopropanol hozzáadása után újra vortexeltük, rázattuk (10 perc, 850 rpm), majd centrifugáltuk (4°C, 10 perc 12000 g) a mintákat. A felülúszót leöntöttük, a pelletet pedig kétszer átmostuk 800 µl 70%-os etanollal. Ezután centrifugáltuk (4°C, 5 perc 8600 g) a mintákat, a pelletet pedig szárítottuk (50°C, 10 perc) és 30 µl RNáz mentes vízben szuszpendáltuk fel. Az RNS koncentrációt NanoDrop® fotométer segítségével határoztuk meg.

3. Komplementer DNS szintézis és valós idejű PCR

A cDNS-t mintánként 1µg RNS felhasználásával szintetizáltuk. Első lépésben az RNS mintákat DNázt (gDNA WipeOut – Quiagen) tartalmazó oldat hozzáadásával kezeltük, így eltávolítottuk a minták genomiális DNS-ét. Ezután komplementer DNS-t szintetizáltunk QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Quiagen) kit segítségével a gyártó utasításai szerint. A valós idejű PCR (Light Cycler® 480 system - Roche) során meghatároztuk a *per2*, *reverbα*, *cxcl12*, *tnfα*, *il1β*, *il18*, *nlrp3*, *leptin* és *adipszin* relatív génexpresszióját. Referenciaként az *rplp0* háztartási gént (riboszóma alegység) használtuk. Az alkalmazott primerek és TaqMan hidrolízis próbák szekvenciáit az 1. táblázat tartalmazza. A PCR reakció 55 ciklusának hőmérsékleti beállításai a következők: 95 °C 10 sec, 57 °C 30 sec, 72 °C 1 sec, melyeket egy egyszeri 10 perces inkubáció előzött meg 95 °C-on. Az eredmények értékelésekor a második derivált maximuma módszert alkalmaztuk, az értékelést pedig LightCycler® Relative Quantification (Roche) programban készítettük el.

1. táblázat

A vizsgált gének forward és reverse primereinek, illetve TaqMan próbáinak szekvenciái

gén		szekvencia
<i>rplp0</i>	forward	5'-CTCGCTTTCTGGAGGGTGTC-3'
	reverse	5'-AGTCTCCACAGACAATGCCA-3'
	próba	5'FAM-TGCCTCGGTGCCACACTCCA-TAMRA3'
<i>per2</i>	forward	5'-GCTTCCGCCCTGGAGTGT-3'
	reverse	5'-TCTCCTCCATGCACTCCTGAG-3'
	próba	5'FAM-CAGCGGCTTAGATTC-MGB3'
<i>reverbα</i>	forward	5'-GACCTTTCTCAGCACGACC-3'
	reverse	5'-CATCACTGTCTGGTCCTTCAC-3'
	próba	5'FAM-CAAAGCGCACCATCAGCACCTC-TAMRA3'
<i>cxcl12</i>	forward	5'-CGCTCTGCATCAGTGACG-3'
	reverse	5'-TGAAGGGCACAGTTTGGAG -3'
	próba	5'FAM-CTTGACGTTGGCTCTGGCGATGT-TAMRA3'
<i>tnfα</i>	forward	5'-CCCTCCAGAAAAGACACCATG-3'
	reverse	5'-GCCACAAGCAGGAATGAGAAG -3'
	próba	5'FAM-CACAGAAAGCATGATCCGCGACG-TAMRA3'
<i>il1β</i>	forward	5'-TCCTGTGTAATGAAAGACGGC-3'
	reverse	5'-ACTCCACTTTGCTCTTGACTTC-3'
	próba	5'FAM-TTGGGTATTGCTTGGGATCCACACTC-TAMRA3'
<i>il18</i>	forward	5'-GCCTCAAACCTTCCAAATCAC-3'
	reverse	5'-GTTGTCTGATTCCAGGTCTCC-3'
	próba	5'FAM-TGCCATGTCAGAAGACTCTTGCGT-TAMRA3'
<i>nlrp3</i>	forward	5'-ATGGGTTTGCTGGGATATCTC-3'
	reverse	5'-GCGTTCCTGTCCTTGATAGAG-3'
	próba	5'FAM-AGAACCTGCTTCTCACATGTCGTCTG-TAMRA3'
<i>leptin</i>	forward	5'-AGCCTCACTCTACTCCACAG-3'
	reverse	5'-CCTCTACATGATTCTTGGGAGC-3'
	próba	5'FAM-TCAGCATTCAAGGGCTAACATCCAACT-TAMRA3'
<i>adipszin</i>	forward	5'-CCTGAACCCTACAAGCGATG-3'
	reverse	5'-CAACGAGGCATTCTGGGATAG-3'
	próba	5'FAM-CCGGGTGAGGCACTACACTCTG-TAMRA3'

4. A CXCL12 koncentráció meghatározása a csontvelőben és a szérumban

Az egerekből eltávolított csontok közül az egyik femurt 1 ml PBS-sel mostuk át. A mintát centrifugáltuk (4°C, 3 perc, 2300 g), majd a felülúszót -80°C-on tároltuk, hogy a továbbiakban meghatározzuk a CXCL12 koncentrációját a csontvelői extracelluláris folyadékban.

A szérumvizsgálathoz izoflurán narkózisban a retro-orbitális vénás plexusból üvegkapilláris segítségével 1 ml vért nyertünk a kísérleti állatokból. Az éjszakai időpontokban a vérvételeket (ZT12-ZT24) monokróm vörös fény mellett végeztük, hogy ne zavarjuk meg az egerek környezetében a fény-sötétség ciklust és ezáltal az állatok cirkadián ritmusát. A vérmintákat 1 órán keresztül inkubáltuk

szobahőmérsékleten, majd 4°C-on 1500 g, 10 perc centrifugálást követően szeparáltuk a szérumot, melyeket -80 °C-on tároltunk az ELISA vizsgálatokhoz.

A CXCL12 koncentráció meghatározásához szendvics ELISA módszert (R&D Systems) alkalmaztunk. A csontvelő esetében a mérési eredményeket a felülúszó teljes fehérjekoncentrációjára normalizáltuk, melyet DC Protein Assay (Bio-Rad) kit segítségével határoztunk meg.

5. Lép tömegének meghatározása

Az állatokat az adott kísérleti időpontban termináltuk, majd eltávolítottuk a lépét és analitikai mérleg segítségével meghatároztuk a szerv tömegét.

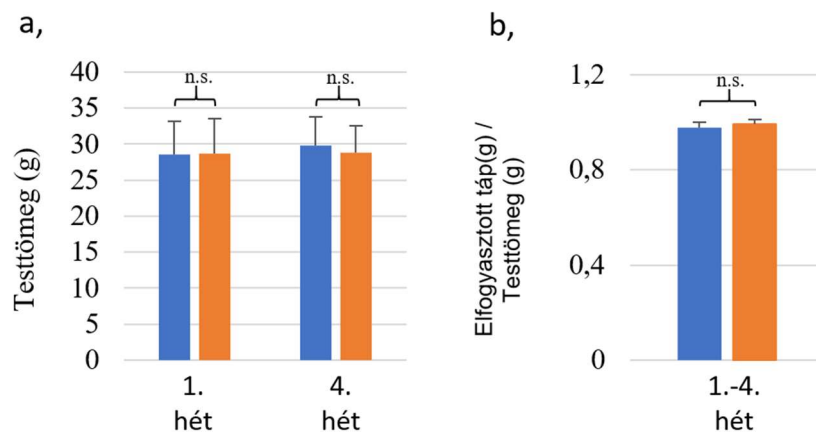
6. Statisztikai elemzés

Az eredmények statisztikai értékelését Statistica szoftverrel végeztük (version 13.5 – StatSoft). A TRF és AL csoportok testtömegének és az elfogyasztott táplálék mennyiségének összehasonlítására kétmintás t-próbát alkalmaztunk. A relatív génexpressziók, léptömeg, illetve a CXCL12 koncentrációja esetében nem csak a vizsgálati csoport, de az adott mintavételi időpont hatását is vizsgáltuk. Ezért a csoportok közötti különbséget kétfaktoros ANOVA segítségével vizsgáltuk. A cirkadián ritmussal rendelkező fiziológias paraméterek napszaki váltakozásai szinuszoid görbét írnak le, így az általunk mért mutatók oszcillációját Cosinor analízis segítségével vizsgáltuk. A Cosinor analízist kivitelezéséhez a Matlab R2021a (MathWorks) programot használtuk. A $p < 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

IV. Eredmények

1. Az időzített etetés hatása a testtömegre és a táplálékfelvételre

A célkitűzésben szereplő vizsgálataink megkezdése előtt először ellenőriznünk kellett, hogy a táplálék hozzáférhetőség korlátozása nem jár-e kalóriamegvonással, ugyanis a kalóriarestrikció egészségre gyakorolt pozitív hatásait, valamint szerepét a gyulladásos folyamatok mérséklésében már számos irodalmi adat alátámasztja.⁵⁶ Ezért a négy hét során hetente megmértük az egerek testtömegét és az elfogyasztott táplálék mennyiségét. Az első, illetve negyedik héten mért testtömegek átlagában nem volt szignifikáns különbség a TRF és az AL csoportok között (8/a ábra). A hetente elfogyasztott táp mennyiségét az egerek testtömegére vonatkoztattuk, melyben szintén nem találtunk különbséget a csoportok között (8/b ábra). Az időzített táplálékelérés nem változtatta meg a kísérleti állatok kalóriafelvételét, tehát a kísérleteinkben tapasztalt hatásokért nem a kalóriarestrikció felelős.



8. ábra

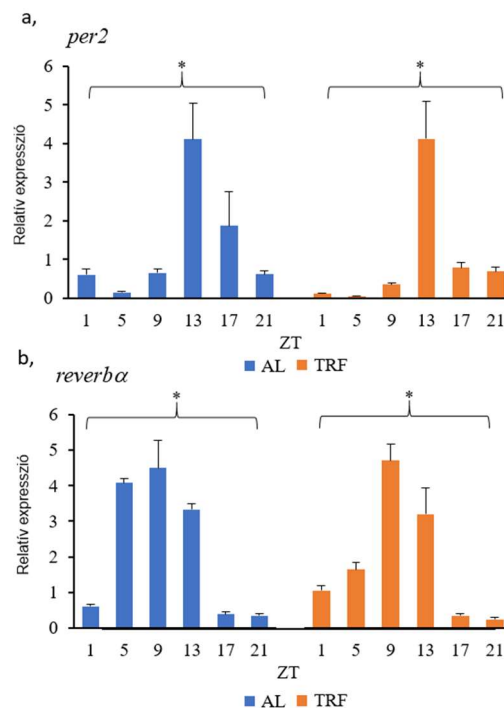
A kísérleti állatok testtömegének és a felvett táplálék mennyiségének alakulása

(a) Az egerek testtömege a kísérletek 1. és 4. hetében. (b) A hetente elfogyasztott táplálék testtömegre vonatkoztatott értéke a kísérletek 1. és 4. hetében. (átlag $\pm$ SD, $n=75$ AL, $n=82$ TRF, kétmintás t-próba, n.s. = nem szignifikáns, $p>0,05$) ZT=Zeitgeber time

2. A TRF hatása a vizszerális zsírszövet működésére és a lép tömegére

a, A táplálkozás időzítése átállítja a zsírszövet molekuláris óráját és erősíti a metabolikus ritmust

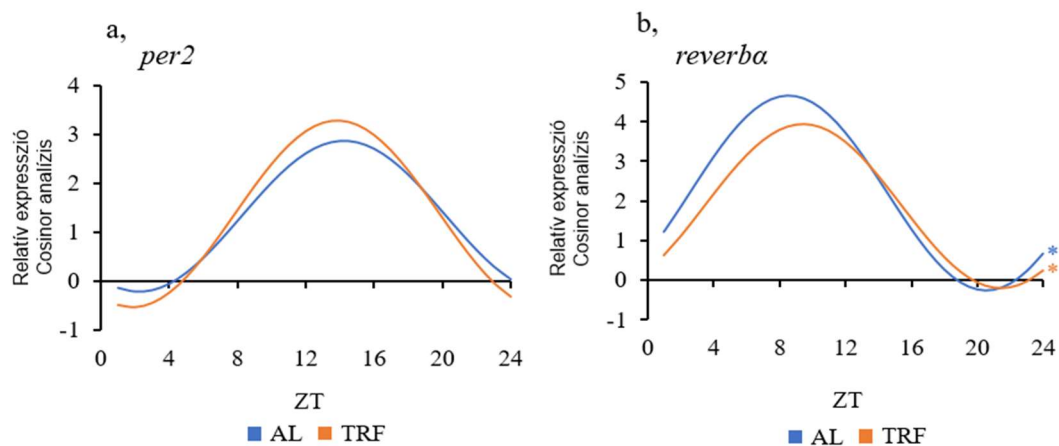
Irodalmi adatok alapján az időzített etetés hatására a perifériás órák átállíthatnak a különböző szervekben.⁴³ Annak vizsgálatára, hogy a metabolikus szabályozásban kulcsszerepet játszó vizszerális zsírszövetben is módosul-e az óraműködés TRF hatására, meghatároztuk az adipocitákban a molekuláris oszcillátor komponenseinek - *per2* és *reverbα* – relatív expresszióját. Az eredményeink azt mutatják, hogy a *per2* mRNS mennyisége nagyobb amplitúdóval oszcillál a TRF csoportban (9/a és 10/a ábrák), amellet, hogy a *reverbα* kifejeződése körülbelül 1 óras fáziskésést szenved (9/b és 10/b ábrák). Ez összességében arra utal, hogy az etetés időzítése átállítja a zsírszövet molekuláris óráját.



9. ábra

A TRF hatása az órakomponensek génexpressziójára a vizszerális zsírszövetben

A *per2* (a) és a *reverbα* (b) relatív génexpressziói a vizszerális zsírszövetben. (átlag ± SEM, n=3-9 AL, n=6-11 TRF, egyfaktoros ANOVA, szignifikáns idő hatás, * p<0,05) ZT=Zeitgeber time



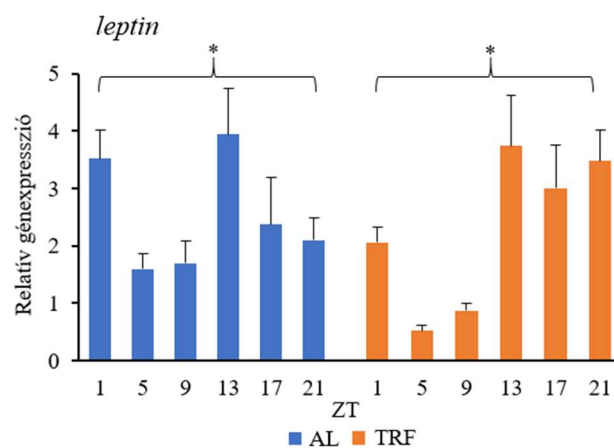
10.ábra

Az óragének expressziójának Cosinor analízise a vizszerális zsírszövetben

A *per2* (a) és a *reverba* (b) relatív génexpressziós profijára illesztett cosinus görbék. (n=3-9 AL, n=6-11 TRF, Cosinor analízis, * szignifikáns cosinus görbe illeszkedés $p < 0,05$) ZT=Zeitgeber time

Emellett a leptin gén kifejeződését is mértük, hogy felmérjük a táplálkozási ritmus hatását az adipociták endokrin funkciójára és a metabolikus ritmusra. A leptin génexpressziója – mely ismertén óra által kontrollált - AL etetett egerekben bár időfüggő (11. ábra), nem mutat cirkadián oszcillációt (12. ábra), míg a TRF csoportban az időfüggés mellett (11. ábra) a cosinor analízis is szignifikáns napszaki ingadozást mutat (12. ábra). Az átlagos *leptin* kifejeződés pedig csökkent az időzített etetés hatására.

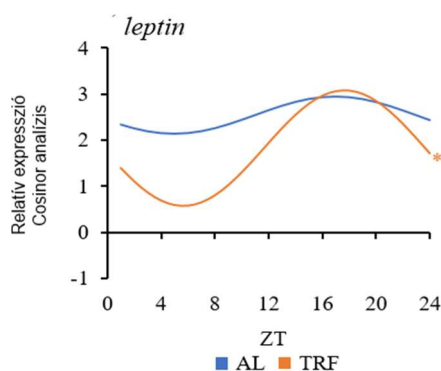
Eredményeink arra utalnak, hogy a molekuláris oszcillátor átállításán keresztül egy kifejezettebb metabolikus ritmus jön létre a TRF etetett állatcsoport vizszerális zsírszövetében.



11. ábra

A TRF hatása az leptin génexpressziójára a vizcerális zsírszövetben

A *leptin* génexpressziója a vizcerális zsírszövetben. (átlag $\pm$ SEM, n=3-9 AL, n=6-11 TRF, egyfaktoros ANOVA, szignifikáns idő hatás, * $p < 0,05$) ZT=Zeitgeber time



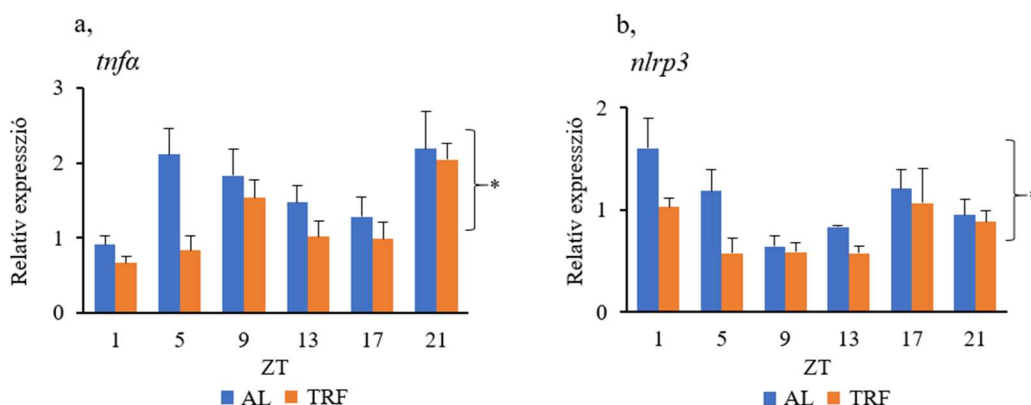
12. ábra

A leptin expressziójának Cosinor analízise a vizcerális zsírszövetben

A *leptin* relatív génexpressziós profiljára illesztett cosinus görbék. (n=3-9 AL, n=6-11 TRF, Cosinor analízis, * szignifikáns cosinus görbe illeszkedés $p < 0,05$) ZT=Zeitgeber time

b, A táplálkozás időzítése csökkenti a vizcerális zsírszövet lokális gyulladásos markereinek kifejeződését

A korábbi kísérleteink alapján a TRF etetett egerekben alacsonyabb a gyulladás mértéke rheumatoid arthritis modellben az AL csoporthoz képest. Ennek egyik oka lehet, hogy már az arthritis indukciója előtt is aktiváltabb állapotban volt az immunrendszer és ez vezetett a súlyosabb tünetekhez az AL csoportban. A zsírszövet kapcsolatot teremt a metabolizmus és az immunrendszer között és gyulladásos mediátor termelése nagyban hozzájárul a szervezet szisztémás inflammatorikus állapotához. Ezért „steady-state” állapotban végzett kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a zsírszövetben hogyan változnak a lokális inflammatorikus paraméterek. Vizsgáltuk a *tnfa* és az *nlrp3* (13. ábra) relatív kifejeződését. A zsírszövetben nagy számban jelenlévő makrofágok szintetizálják az NLRP3 fehérjét, mely a metabolikus változásokra különösen érzékeny inflammaszoma komponens. Aktivációja pro-inflammatorikus citokinek felszabadulását okozza, mint például az IL1 β és IL18, emellett piroptózist indukál, mely egy gyulladásos stimulusra bekövetkező programozott sejthalál.⁵⁷ Eredményeink szerint mind a *tnfa*, mind az *nlrp3* kifejeződés csökken TRF hatására (13. ábra).

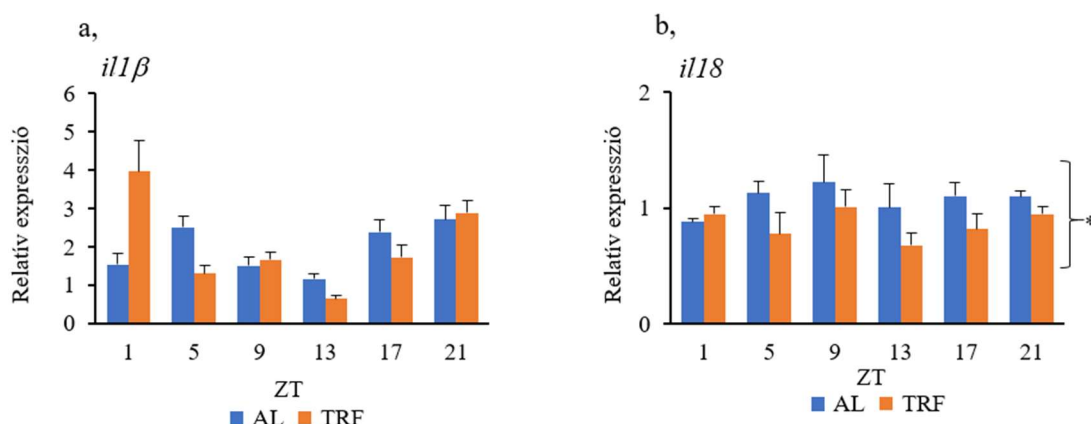


13. ábra

A TRF hatása gyulladásos mediátorok génexpressziójára a vizcerális zsírszövetben

A *tnfa* (a) és az *nlrp3* (b) relatív génexpressziói a vizcerális zsírszövetben (átlag $\pm$ SEM, n=3-9 AL, n=6-11 TRF, kétfaktoros ANOVA, szignifikáns csoport hatás, * p<0,05) ZT=Zeitgeber time

Ezért megvizsgáltuk a zsírszövet *il1 β* és *il18* expresszióját is, az *il18* kifejeződése szintén alacsonyabbnak bizonyult a TRF csoportban (14/b ábra).

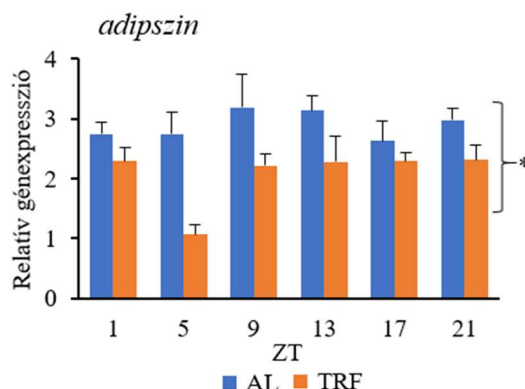


14. ábra

A TRF hatása az NLRP3 mediált interleukinek génexpressziójára a viscerális zsírszövetben

Az *il1 β* (a) és *il18* (b) relatív génexpressziói a viscerális zsírszövetben (átlag $\pm$ SEM, n=3-9 AL, n=6-11 TRF, kétfaktoros ANOVA, csoport hatás, * p<0,05) ZT=Zeitgeber time

Mivel a *leptin* és a gyulladásos markerek expressziójában is különbséget láttunk a csoportok között, ezért a vizsgálatainkat az *adipszin* génexpressziójának mérésével egészítettük ki, ugyanis az adipszin a komplement kaszkád aktivációján keresztül fontos kapcsolatot jelenthet a zsírszövet működése és a gyulladásos folyamatok között. Eredményeink szerint az *adipszin* génexpressziója átlagosan alacsonyabbnak bizonyult minden vizsgálati időpontban a TRF csoportban (15. ábra).



15. ábra

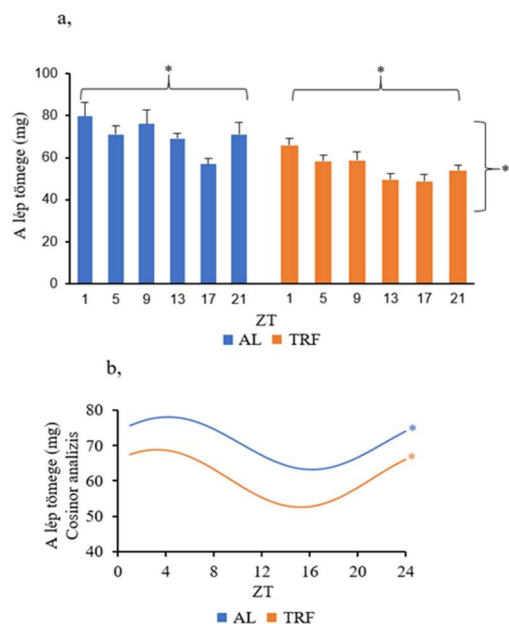
Az *adipszin* génexpressziója a viscerális zsírszövetben

Az *adipszin* relatív génexpressziója alacsonyabb minden időpontban TRF csoportban. (átlag $\pm$ SEM, n=3-9 AL, n=6-11 TRF, kétfaktoros ANOVA szignifikáns csoport hatás, * p<0,05) ZT=Zeitgeber time

Eredményeink bizonyítják, hogy a TRF csökkenti a zsírszövet gyulladásos mediátor termelését. Ez pedig felveti a lehetőségét, hogy a szisztémás inflammatorikus állapot is alacsonyabb szintű az AL csoporthoz képest.

c, A lép tömege csökken TRF hatására

A szervezet gyulladásos állapotának vizsgálatára irodalmi adatok alapján a lép tömegének mérése megbízható módszer. Már az alacsony szintű szisztémás gyulladás is lép megnagyobbodással párosul.^{58,59} A fent részletezett eredményekkel egybevágóan a TRF csoportban átlagosan alacsonyabb az állatok lépének tömege, ami arra utal, hogy az alapszintű gyulladás mértéke is kisebb ezekben az állatokban (16/a ábra). Emellett a cosinor analízis szerint az időzítetten etetett egerekben kifejezettebb a léptömeg változásának napi ritmusa (16/b ábra).



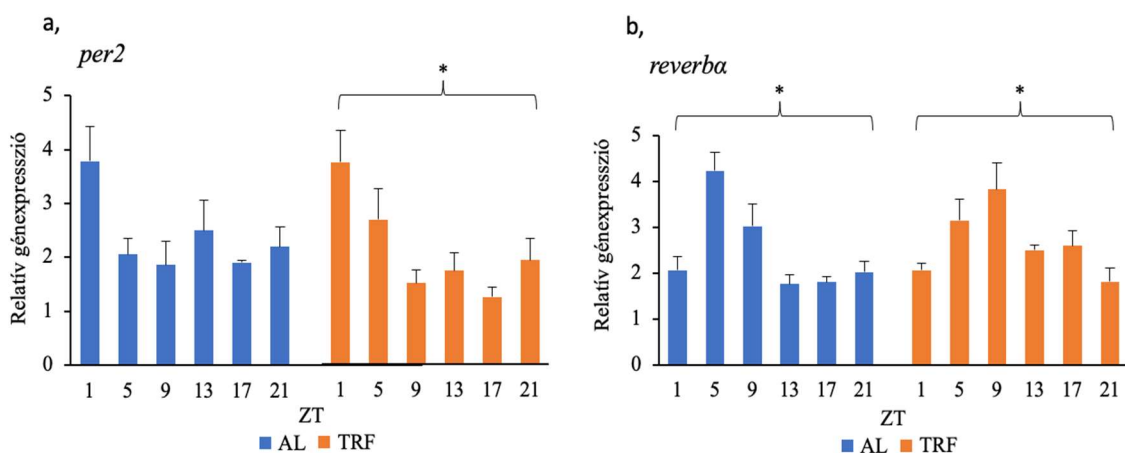
16. ábra

A lép tömegének vizsgálata

(a) A léptömegek napi ingadozása. (b) A léptömeg napi ingadozására illesztett cosinus görbék. (átlag $\pm$ SEM, n=3-11 AL, n=4-13 TRF, kétfaktoros ANOVA, szignifikáns idő hatás, * $p < 0,05$, szignifikáns csoport hatás ** $p < 0,05$, Cosinor analízis, * $p < 0,05$) ZT=Zeitgeber time

3. A táplálkozási ritmus átállítja a csontvelői órát, de nem módosítja a szövetgyulladásos állapotát

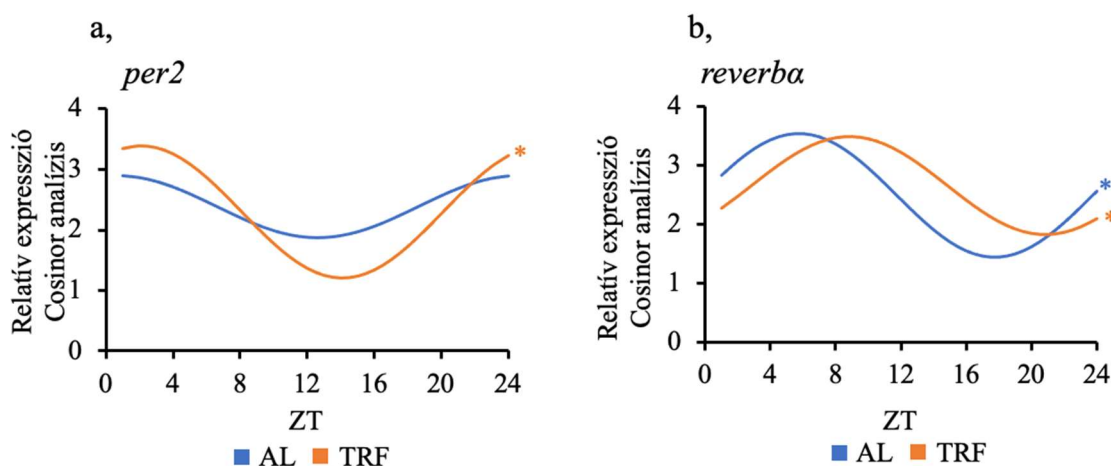
Korábbi kísérleteink alátámasztják, hogy a leukocitaszám ritmusának amplitúdója megnövekszik TRF hatásra, ezzel párhuzamosan pedig a fehérvérsejt alpopulációk is átrendeződnek. Ennek egyik magyarázata lehet, hogy megváltozik a csontvelő ritmusos működése, mely a kiáramlás és *homing* dinamikáját is módosíthatja. Így ennek vizsgálatára további génexpressziós méréseket végeztünk csontvelői mintákon. Vizsgáltuk az oszcillátor működését az órakomponensek - *per2* és *reverbα* - kifejeződésének mérésével (17. ábra). A *per2* esetén kifejezettebbé vált az oszcilláció amplitúdója (17/a és 18/a ábrák), a *reverbα* expressziójának fázisa pedig körülbelül 3 órával eltolódott az időzítetten etetett csoportban (17/b és 18/b ábrák). Eredményeink arra utalnak, hogy a vizszerális zsírszövethez hasonlóan a csontvelőben működő molekuláris oszcillátor is átállítódik TRF hatására.



17. ábra

A TRF hatása az órakomponensek génexpressziójára a csontvelőben

A *per2* (a) és a *reverbα* (b) relatív génexpressziói a csontvelőben. (átlag $\pm$ SEM, n=3-8 AL, n=6-9 TRF, egyfaktoros ANOVA, idő hatás, * p<0,05) ZT=Zeitgeber time

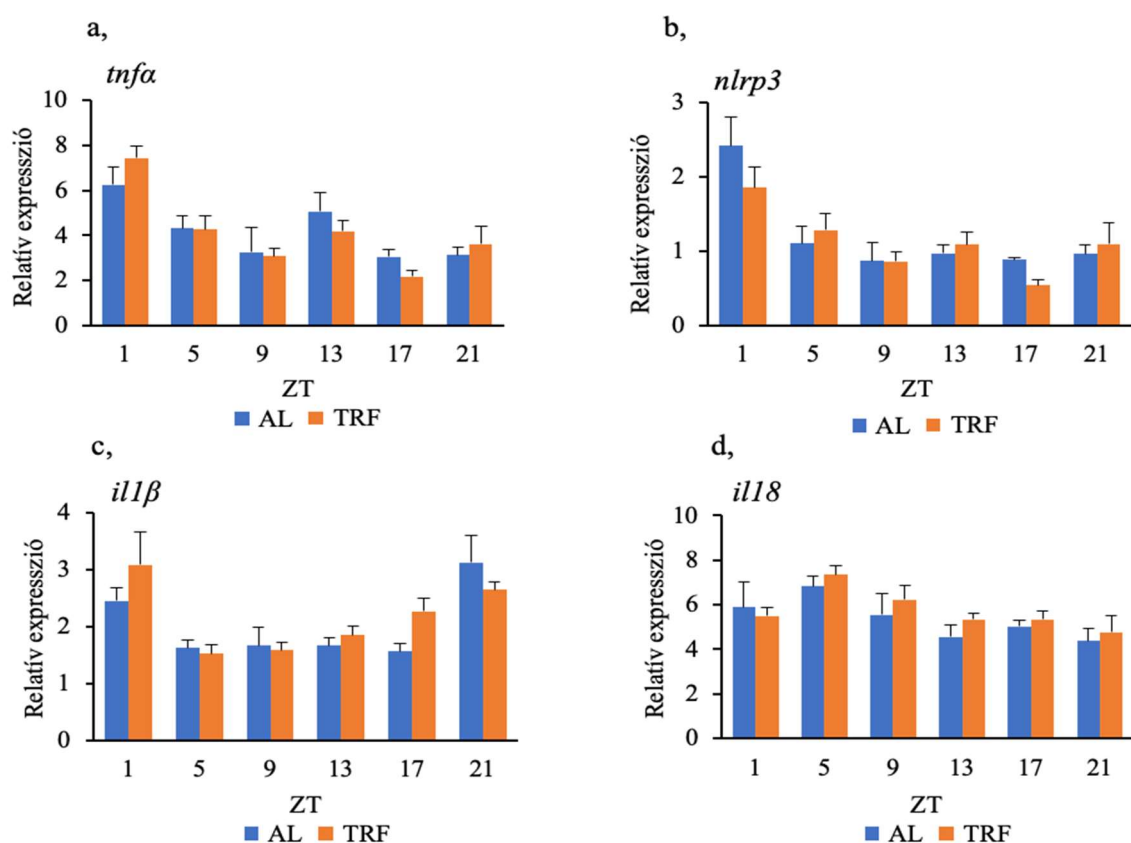


18. ábra

Az óragének expressziójának Cosinor analízise a csontvelőben

A *per2* (a) és a *reverba* (b) relatív génexpressziós profiljára illesztett cosinus görbék (n=3-8 AL, n=6-9 TRF, Cosinor analízis * p<0,05) ZT=Zeitgeber time

Ezután megvizsgáltuk, hogy az óraműködés megváltozása hozzájárul-e a gyulladásos mutatók kifejeződésének módosulásához. A gyulladásos állapot fokozódása ugyanis hozzájárulhat a mielopoézis serkentéséhez, ami magyarázhatná a korábbi kísérleteink során tapasztalt populációs átrendeződést, azaz a neutrofil granulocita és a monocita sejtek ritmusának erősödését a periférián. Vizsgáltuk a *tnfα*, az *nlrp3*, az *il1β* és az *il18* kifejeződését. Azonban - ellentétben a vizszerális zsírszövettel - a proinflammatorikus citokinek kifejeződése a csontvelőben nem mutatott szignifikáns különbséget a TRF és AL csoport között (19. ábra).



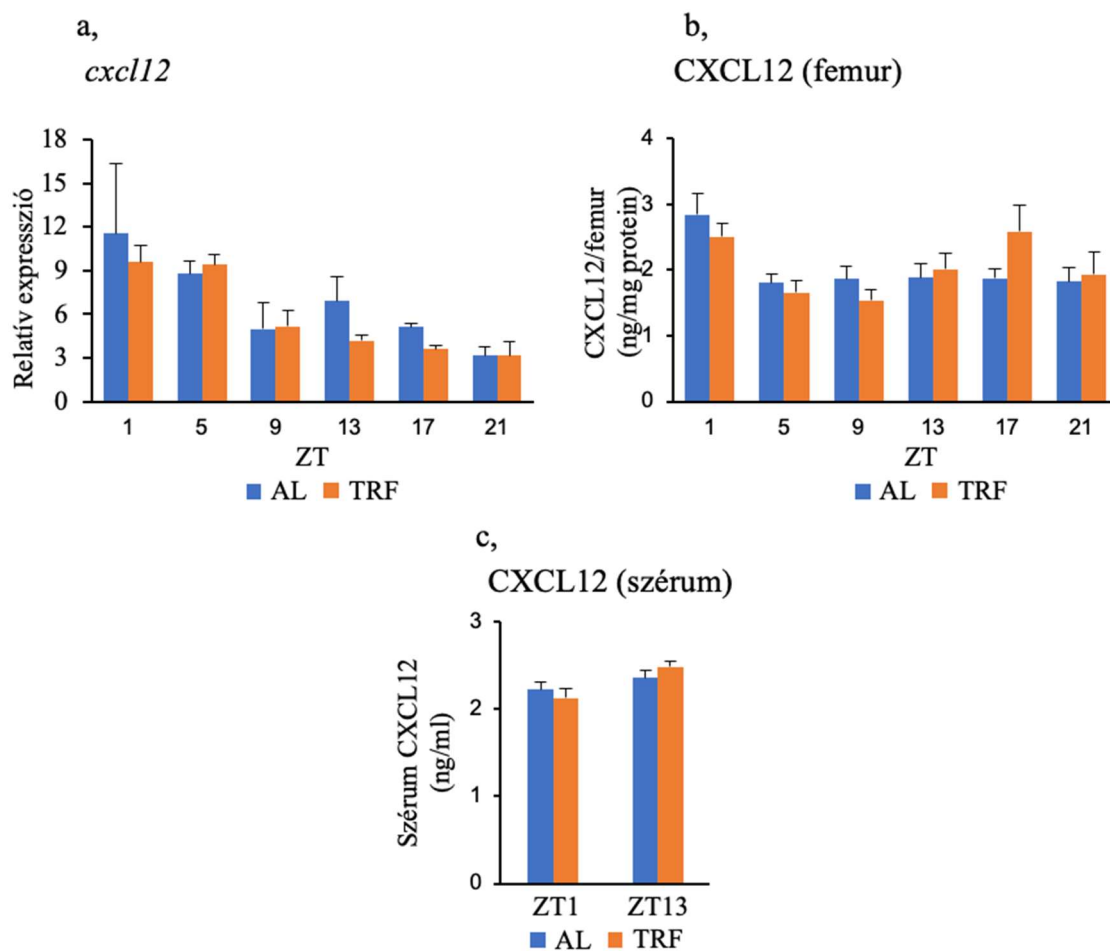
19. ábra

A TRF hatása gyulladásos mediátorok génexpressziójára a csontvelőben

A *tnfa* (a), az *nlrp3* (b), az *il1β* (c) és az *il18* (d) relatív génexpressziói a csontvelőben. (átlag ± SEM, n=3-8 AL, n=6-9 TRF, egyfaktoros ANOVA, idő hatás, * p<0,05) ZT=Zeitgeber time

4. A TRF nem módosítja a CXCL12 kifejeződését a csontvelőben

Tekintve, hogy a CXCL12 kemokin az egyik központi szabályozója a leukociták csontvelői ki- és beáramlásának, így kifejeződését mind mRNS, mind fehérjeszinten vizsgáltuk. A csontvelői extracelluláris folyadékból 6 időpontban, míg a szérumból ZT1 és ZT13 időpontokban határoztuk meg a fehérjekoncentrációkat. Meglepő módon, eredményeink azt mutatják, hogy sem mRNS-, sem fehérjeszinten nincs szignifikáns különbség a két csoport között (20. ábra). Így a periférián tapasztalt sejtszám- és sejtösszetétel módosulásoknak nem a megváltozott CXCL12 kifejeződés az oka.



20. ábra

A CXCL12 kifejeződésének napszaki ingadozása

(a) A *cxcl12* relatív génexpressziója a csontvelőben. (b) A CXCL12 koncentrációja a csontvelői extracelluláris folyadékban. (c) A CXCL12 koncentrációja a szérumban. (átlag $\pm$ SEM, mRNS: n=3-8 AL, n=6-9 TRF, kétfaktoros ANOVA, Femur koncentráció: n=5-10 AL, n=7-11 TRF, kétfaktoros ANOVA, Szérum koncentráció: n=4-8 AL, n=3-11 TRF, kétmintás t-próba, $p > 0,05$) ZT=Zeitgeber time

V. Megbeszélés

A cirkadián ritmus számos élettani működést szabályoz. Ennek megfelelően a ritmus zavara számos betegség kialakulásának lehet rizikófaktor, ilyenek például a metabolikus zavarok és a gyulladásos betegségek is. A társadalmi elvárások, a modern életstílus és a rendszertelen táplálkozás gyakran vezetnek cirkadián ritmuszavarhoz. A váltott műszakban végzett munka vagy a munkanapi és hétfégi alvásfázis különbségek miatt kialakuló szociális *jetlag* a leggyakoribb exogén okai a cirkadián ritmus működési problémáinak. A populáció 70%-a szenved valamilyen cirkadián ritmuszavarban életének rövidebb vagy hosszabb szakaszában. Ezért az immunrendszer cirkadián szabályozottságának vizsgálata kiemelten fontos. Kísérleteink célja az volt, hogy a rendszertelen (*ad libitum*) táplálkozás miatt kialakult metabolikus ritmuszavar és az időzített etetés segítségével normalizált metabolikus ritmus immunrendszerre gyakorolt hatásait összehasonlítsuk.

Kérdésünk volt, hogy mi lehet az oka a korábbi kísérleteink során tapasztalt mérsékeltebb ízületi gyulladásnak a TRF csoportban. Eredményeink arra utalnak, hogy az elhízás és a metabolikus szindróma esetén tapasztalt emelkedett citokin szintek hasonlóan jelen vannak akkor is, ha az állatok korlátlanul hozzáférnek a táplálékhoz és a nap folyamán egy széles időablakban veszik magukhoz a napi táplálékmennyiséget. Mivel a bevitt kalóriamennyiség és a testtömeg nem különbözött az AL és TRF csoportok között, így a változásokért a táplálkozási ritmus- és az ennek következményeként átállt metabolikus ritmus különbözősége felelős. A vizcerális adipocitákban a pro-inflammatorikus citokinek génexpressziója szignifikánsan alacsonyabb a TRF csoportban. A lokális mutatókhoz hasonlóan a léptömeg, mint szisztémás immun- és gyulladásos paraméter is átlagosan alacsonyabbnak bizonyult a TRF etetett állatokban az AL csoporthoz képest, emellett a ritmusa is kifejezettebb. Az eredményeink felhívják a figyelmet a metabolikus ritmus jelentőségére a metabolikus zavarokhoz társuló gyulladásos állapotokban. Mivel például a metabolikus szindróma esetén a pro-inflammatorikus citokinek emelkedett szintje magasabb kockázatot jelent az atheroszklerózis, a diabétesz és a hipertónia szempontjából, így felmerül a lehetőség,

hogyan az étkezés megfelelő időzítése kiegészítő elemként szerepelhet a gyógyszeres és kalóriacsökkentő terápia mellett.

Az időzített táplálkozás kifejezettebb ritmust hozott létre a vizcerális zsírszövet leptin expressziójában is, a génkifejeződés maximuma pedig az állatok aktív fázisára tehető, ami táplálékfelvétel idejével azonos. A leptin pro-inflammatorikus hatásaival hozzájárulhat, hogy az immunsejtek aktiváltsága az aktív fázisban érje el a maximumát, amikor a patogének megjelenése is valószínűbb. Ennek megfelelően a hormon kifejeződése a nappali szakaszban csökken, vagyis az állatok inaktív fázisában alacsonyabb a TRF etetett állatok esetében. Ezzel ellentétben AL csoportban a leptin szintje nem mutat robusztus ritmusos változást, hanem egy állandó, magasabb szintre áll be expressziója. Ez felveti a lehetőségét, hogy a nappali szakaszban a magasabb leptin szint fokozottabb immunsejt aktivitást tart fenn, ami összhangban lehet a korábbi arthritis modell kísérleteinkben tapasztalt fokozottabb gyulladással *ad libitum* etetett egerekben. A leptin számos *in vitro* vizsgálat során aktiváló hatásának bizonyult az leukocitáknál, azonban szerepe a rheumatoid arthritis patomechanizmusában jelenleg még nem teljesen tisztázott. Azonban irodalmi adatok szerint megemelkedett mennyisége összefüggésbe hozható az ízületi károsodás alakulásával.⁶⁰ A génexpresszióanalízis tapasztalt megfigyeléseinket későbbi kísérleteinkben a leptin fehérjekoncentráció meghatározásával is szeretnénk megerősíteni.

Megfigyelésünk, miszerint az az adiposzin (komplement faktor D) szintje átlagosan alacsonyabbnak bizonyult TRF etetett állatokban minden időpontban, szintén alátámasztja a metabolikus ritmus szerepét az immunrendszer szabályozásában. Az irodalmi adatok arra utalnak, hogy az adiposzin jelenléte nélkülözhetetlen az ízületi gyulladás létrejöttében. Az adiposzin modulálja a gyulladásos modellben fő effektor funkciót ellátó neutrofil granulociták válaszreakcióját, és hozzájárul a sejtek ízületi infiltrációjához és a fokozottabb szöveti károsodásához.⁶¹ Így az AL csoportban fokozottabb ízületi gyulladásához hozzájárulhat az adiposzin megnövekedett szintje is.

A korábbi projektünk során az arthritis akut fázisát modelleztük a K/BxN szérum-transzfer arthritis segítségével, de a későbbiekben vizsgálni szeretnénk a TRF hatását a krónikus ízületi gyulladás lefolyására is.⁶² Emellett terveink között szerepel, hogy hosszabb időtartamú TRF hatását is vizsgáljuk. Reményeink szerint ezek a kísérleteink

hozzájárulnak ahhoz, hogy pontosabb képet kapjunk az időzített táplálékfelvétel hosszabb távú anti-inflammatorikus hatásairól.

Az adipokinek és a gyulladásos mediátorok esetében detektált változások oka nagy valószínűséggel a zsírszövet perifériás órájának módosult működése lehet. A TRF etetés mind a zsírszövetben, mind a csontvelői sejtekben átállította az óraműködést, amit az órakomponensek kifejeződésének ellenőrzése bizonyított. Eredményeink azt mutatják, hogy a *per2* ritmusának amplitúdója kifejezettebb, míg a *reverb α* fázisa eltolódik az időzített etetés hatására mindkét szövettípusban. Ennek háttérében olyan mechanizmusokat feltételezünk, melyek során a molekuláris óra komponenseinek poszttranszlációs módosításai érvényesülnek. Érintett lehet a szervezet jelátviteli rendszerében központi szerepet játszó mTOR kináz és a szignáltranszdukciós útvonala (mTORC1), ami megfelelő energiaellátottság (táplálkozás) esetén számos fehérjét foszforilál. Képes indirekt módon modulálni PER2 fehérjét⁶³, ami a visszacsatolási hurkon keresztül befolyásolja a molekuláris oszcillátor központi fehérjeit (CLOCK-BMAL1 komplex). Éhezésben az AMPK útvonal aktivációja jellemző, mely a CRY fehérje foszforilációjával és következményes degradációjával megszünteti a CRY represszív hatást a CLOCK-BMAL1 komplexre, ezáltal több órakomponens kifejeződése serkentődhet, ilyen például a REVERB α is.⁶⁴ Az is elképzelhető, hogy az óragének expressziójának változása önmagában hatást gyakorol a hemopoézisre a sejtciklus befolyásolásán keresztül.⁶⁵ Azonban ezek tisztázása a mi kísérleti rendszerünkben még további vizsgálatokat igényel.

Érdekes és meglepő eredményünk, hogy a *per2* csontvelői expressziójának fázisa mind a két csoportban ellentétes (antifázisban működő) oszcillációt mutat az irodalomban leírt többi szövetben mérhetőhöz képest. Irodalmi adatok alapján a perifériás szövetekben (pl. máj, vese, vékonybél) a ZT12-ZT16 közötti intervallumra tehető a *per2* expressziójának maximuma.⁶⁶ Ennek megfelelően az adipocitákban általunk mért maximum ZT13-ra esik. Azonban a csontvelői *per2* kifejeződés ZT1-ben éri el a maximumát, vagyis abban az időpontban, amikor a többi szövetben a minimum mérhető. Ennek a megfigyelésnek a háttere egyelőre ismeretlen. Azonban számításba kell vennünk, hogy a csontvelői sejtek izolálásakor nem különítettük el a hemopoetikus ős- és progenitor sejteket a többi populációtól, vagyis expressziós vizsgálataink

kiterjednek valamennyi csontvelői sejttípusra (mieloid és limfoid vonal sejtei, adipociták). Például a mononukleáris immunsejtek óragénjeinek expressziója jelentős oszcillációt mutat a nap folyamán, de a neutrofil granulociták intrinsic óraműködése represszált.⁶⁷ De az is ismert, hogy az intenzíven osztódó sejtek óraműködése megváltozik. Ennek köszönhetően a valós idejű PCR vizsgálatok során egy „eredő” eredményt kaptunk az adott időpontban a csontvelőben jelenlévő sejtek óragén expressziójáról. Feltételezhetően ez lehet az egyik oka annak, hogy a *per2* amplitúdó növekedése és a *reverb*a fáziseltolódása nagyobb mértékű a csontvelőben, mint a vizcerális zsírszövetben. Az, hogy a csontvelői esetén ismertetett óraműködés változásokhoz mely sejtek járulnak hozzá, a későbbi kísérleteink során sejtszeparációs módszerekkel (FACS sorting) szeretnénk vizsgálni.

Korábbi vizsgálataink alapján az a kérdés is felmerült, hogy milyen folyamatok járulhatnak hozzá a perifériás leukocitaszámban tapasztalt növekedett oszcillációhoz a TRF csoportban. A kérdés megválaszolására az egyik legjelentősebb vizsgálatunk a CXCL12 változásának mérése volt, hiszen ez az egyik fő szabályozó faktor, melyet a cirkadián óra regulál és amely nagymértékben meghatározza a csontvelőből a perifériára áramló (illetve visszaáramló) leukociták számát a nap folyamán. Mivel a csontvelői hemopoetikus *niche*-ben fellelhetők leptin receptor pozitív sztrómasejtek, a vizcerális zsírszövetben pedig jelentős különbségeket tapasztaltunk a leptin expressziójában, így feltételeztük, hogy ez hatást gyakorolhat a CXCL12 felszabadulására is. Ez pedig hozzájárulhat a leukocitaszám oszcilláció különbségéhez TRF és AL csoport között. Azonban a génexpresszió és a fehérjekoncentrációk mérési eredményei alapján a CXCL12 termelődésére nincs jelentős hatása az időzített etetésnek, így a leukocita vándorlás módosulásához más mechanizmusra van szükség. A csontvelői eredetű szabályozás másik formája lehet a granulopoézis intenzitásának módosulása is. A granulopoézist többek között a megnövekedett lokális gyulladásos mediátor szintézis is növeli, azonban kísérleteink alapján a csontvelőben nem változik az inflammatorikus mediátorok szintje az etetéstől függően. Azonban a granulopoézis szabályozása megvalósulhat a bél mikrobiom módosulásán keresztül, ami mind összetételében, mind pedig mennyiségében cirkadián ritmust mutat.⁶⁸ Irodalmi adatok alapján a táplálék összetétele mellett az időzített táplálkozás is növeli a bélflóra

diverzitását.⁶⁹ A bélnyálkahártya lamina propriájában található T_{Helper}17 sejtek száma is napi ingadozást mutat és IL-17 termelésük a mikrobiom összetételétől is függ.⁷⁰ A keletkező IL-17 közvetlenül stimulálja a G-CSF termelődését, ami fokozza a csontvelői mieloid prekurzorok differenciálódását a granulocita és makrofág sejtvonalak irányába, tehát fokozza a granulopoézist.⁷¹ Jelenlegi kísérleteink során ezért a Peyer-plakkokban és a bél epithéliumban található immunsejtek óraműködését, *il17* expresszióját, valamint a mikrobiom összetételének változását vizsgáljuk.

A leukocitaszám oszcilláció másik fő szabályozója az aktív fehérvérsejtek szövetek közé vándorlása. Laborunk ezen folyamat szabályozó szerepét is vizsgálta, az ezzel kapcsolatos eredményeink Kisiczki Ármin rektori pályamunkájában kerülnek bemutatásra. Vizsgálataink során elkülöníthetőek a tüdőszövetben a marginált leukociták, illetve az intersticiális fehérvérsejtek. Eredményeink szerint a TRF hatással van a leukociták marginációs képességére, melynek a csökkent marginációs neutrofil granulocita- és szöveti makrofág populáció a következménye. A migrációs képesség változását alátámasztja, hogy a TRF etetett csoportban csökken a neutrofil granulociták és monociták adhézíós molekula- és kemokin receptor (CD62L, CD29, CXCR2, CXCR4, CD49d) expressziója. Ezen méréseink szintén alátámasztják a TRF anti-inflammatorikus hatását. Azonban annak vizsgálata, hogy pontosan mi okozhatja a leukocita sejtek funkcionális változását, még jelenleg is zajlik.

A TRF hatásait magas zsírtartalmú táppal etetett álatokon is vizsgáljuk. Az úgynevezett High-Fat Diet (HFD) a kísérleti állatok jelentős metabolikus zavarát okozza. A zsírszövet megnövekedett térfogata miatt krónikusan magas leptin koncentráció a leptin-receptorok deszenzitizációjával jár.⁷² Azonban leírták, hogy ha HFD *ad libitum* etetés következtében elhízott és diabéteszes egereket TRF táplálásra állítanak, akkor visszafordítható az állapotuk.⁷³ Javul az állatok glükóztoleranciája, lipid panele, csökken a testsúlyuk és javul a testösszetételük is. Az időzített etetés protektív tényező az obezitás kialakulásában a magas zsírtartalmú diéta esetén is, annak ellenére, hogy a bevitt kalória ugyanannyi, mint az *ad libitum* csoportban. Mivel HFD esetén a TRF szembetűnőbb változásokat okoz a metabolikus mutatókban, így a gyulladásra és leukocitavándorlásra is kifejezettebb hatást gyakorolhat, mely segítheti a szabályozó faktorok azonosítását.

Reményeink szerint a bemutatott, és a jelenleg is zajló kísérleteink eredményei rávilágítanak arra, hogy a szabályos cirkadián ritmus fenntartása mellett a táplálékfelvétel megfelelő időzítése legalább annyira fontos, mint a táplálék minősége. A TRF csökkenti a gyulladás mértékét és a pro-inflammatorikus citokinek szintjét, így megfelelő kiegészítése lehet a gyógyszeres terápiának a különböző gyulladásos és autoimmun megbetegedések esetén. Például a rheumatoid arthritis kezelése során a progresszió lassítására az immunszuppresszáns hatóanyagok mellett biológiai terápiát is alkalmaznak. Ennek részét képezik az anti-citokin gyógyszerek, mint a TNF- α (etanercept, infliximab) és az IL-6 inhibitorok (tocilizumab), melyek jelentős mellékhatásokat okozhatnak. Ilyen mellékhatások például az infekciók a szívelégtelenség és a malignus transzformációk.⁷⁴ Ha TRF hatásra ezen citokinek szintje akár kis mértékben is csökkenthető, akkor kisebb dózisban adhatók a gyógyszerek, csökkentve a mellékhatások megjelenésének kockázatát. Az időzített táplálkozással a cirkadián ritmus amplitúdója is növelhető, így stabilabb oszcillációt mutatnak a gyulladásos molekulák is, amivel pontosabban időzíthetjük a terápiás beavatkozást, ez pedig növelheti a kronoterápia hatékonyságát.⁷⁵ Nem utolsó sorban, az ízületi gyulladásos modellünkben tapasztalt TRF etetéssel elért gyulladáscsökkentés arra utal, hogy a betegség tünetei is enyhíthetők egy megfelelő táplálkozási ritmussal. Külön kiemелendő, hogy az általunk bemutatott TRF protokoll egy kiegyensúlyozott, hosszú távon fenntartható táplálkozási ritmust modellez, mely a gyulladásos folyamatok mérséklésén keresztül fontos prevenciós eszköz lehet.

VI. Következtetések

1. Eredményeink szerint az időzített etetés átállítja a vizszerális zsírszövet és a csontvelő óraműködését.
2. Az időzített etetés erősíti a leptin expresszió napi ritmusát, míg az átlagos expresszióját csökkenti. Emellett az adipszin kifejeződését minden vizsgált időpontban csökkenti az AL etetéshez képest.
3. A TRF hatására csökken a gyulladásos mediátorok kifejeződése a vizszerális zsírszövetben, mely mérsékelheti a szövet gyulladásos állapotát.
4. A lép tömegének csökkenése arra utal, hogy a szisztémás gyulladásos állapot is mérsékeltebb a TRF csoportban.
5. Eredményeink alapján elmondható, hogy a leukocitaszám ritmusának amplitúdó növekedését nem a csontvelői eredetű CXCL12 mediált szabályozás megváltozása okozza.

VII. Összefoglaló

Bevezetés: A cirkadián óraműködés egy adaptációs mechanizmus, mely lehetővé teszi, hogy az élőlények alkalmazkodjanak a környezet ritmikus változásához. Az óra szabályozó ingerei közül a fény a legfontosabb, de a táplálkozás időzítése is jelentős ritmusmoduláló hatást fejt ki a perifériás órákra. Az óraműködés következtében számos fiziológias működés ritmikus, többek között az immunrendszer működése és a metabolikus funkciók is. Vizsgálataink középpontjában a két említett rendszer kölcsönhatásai állnak, hiszen számos kísérletes és klinikai tapasztalat támasztja alá, hogy a metabolizmus zavara negatív hatást gyakorol az immunrendszerre és a gyulladásra. Azonban arról nincs információnk, hogy a metabolikus ritmus hogyan módosítja az immunrendszer oszcilláló működését.

Célkitűzés: Korábbi kísérleteink alapján a táplálékfelvétel időzítése csökkenti a gyulladás mértékét autoimmun ízületi gyulladásos egérmodellen, illetve növeli a leukocitaszám ritmusának amplitúdóját a vérben. Ennek fényében, jelenlegi vizsgálatainkkal arra kerestük a választ, hogy az időzített etetés és az így felerősített metabolikus ritmus hogyan befolyásolja a leukociták vándorlását „*steady-state*” állapotban.

Módszerek: A egyik vizsgálati csoportban az állatok a nap folyamán korlátlanul - *ad libitum* – hozzáfértek a táplálékhoz, míg a másik csoport csak az aktív fázis első tíz órájában táplálkozhatott (*time-restricted feeding=TRF*). Az AL etetés a metabolikus ritmus ellaposodását idézi elő, a TRF viszont erősíti azt. A megváltozott táplálék elérhetőséghez négy hétig szoktattuk az állatokat. Vizsgáltuk a vizsцерális zsírszövetben a gyulladásos mutatók (*tnf α* , *il1 β* , *il18*, *nlrp3*), a *leptin* és az *adipszin*, illetve a *per2* és a *reverb α* óragének napi relatív génexpresszióját. Emellett mértük a léptömeget, mint szisztémás inflammatorikus mutatót. A csontvelőben szintén meghatároztuk a gyulladásos markerek és az óragének relatív génexpresszióját és meghatároztuk a csontvelői *homing* központi szabályozójának (CXCL12) a kifejeződését.

Eredmények: TRF hatására módosult a *per2* ritmusának amplitúdója és a *reverb α* ritmusának fázisa a vizsцерális zsírszövetben és a csontvelőben is. A zsírszövetben a vizsgált gyulladásos mutatók relatív génexpressziója átlagosan alacsonyabb a TRF

csoportban, míg a csontvelőben nem detektálható különbség a csoportok között. A TRF csoportban kisebb lép tömeg mérhető. A CXCL12 koncentrációja azonban sem mRNS, sem fehérjeszinten nem mutat különbséget a két csoport között.

Következtetés: Eredményeink arra utalnak, hogy az időzített etetés átállítja a vizcerális zsírszövet és a csontvelő óraműködését. Vizsgálataink alapján a TRF csoportban detektált kifejezettebb leukocitaszám oszcilláció hátterében nem a csontvelői eredetű CXCL12 mediált szabályozás áll. Azonban a TRF etetett állatokban a gyulladásos mediátorok, valamint a leptin és az adiposzin szintje is csökken a zsírszövetben, mely hozzájárulhat a gyulladásos állapotok tüneteinek és a leukociták aktiváltságának csökkentéséhez. Ezt támasztja alá a TRF csoportban detektált léptömeg csökkenés is, mely szisztémás anti-inflammatorikus hatást jelez.

VIII. Summary

Introduction: Circadian rhythm is a crucial factor of adaptation by which organisms adjust their physiological processes to the daily environmental changes. The most important synchronizer stimuli is light, but timing of food intake influence the peripheral clockwork as well. The circadian clock has impact on many physiological processes such as metabolism and immun functions. Although numerous epidemiological and experimental data support the tight interaction of metabolism with both the immune functions and the circadian clock, it is still poorly understood how metabolic rhythms driven by rhythmic feeding affect the immune system.

Aims: Our previous investigations showed that timing of food intake reduces inflammation in a mouse model of rheumatoid arthritis, and increases the amplitude of the oscillation of the peripheral leukocyte counts. To investigate the underlying mechanism, our next experiments focused on the effect of time restricted feeding on inflammatory processes and leukocyte trafficking under steady-state conditions.

Methods: Two feeding groups were created: *time restricted feeding* (TRF), where food intake was limited to the first 10 hours of the active phase of mice, and *ad libitum* (AL), where food was available during the whole day. After four weeks of conditioning, gene expression of proinflammatory markers (*tnf α* , *il1 β* , *il18*, *nlrp3*) and adipokines (*leptin*, *adipsine*) were determined in visceral adipose tissue. To investigate the molecular clock of the tissue, expression of clock genes (*per2* és *reverb α*) were measured as well. Spleen weight - an indicator of systemic inflammation – was also determined. Gene expression of proinflammatory cytokines and clock genes in the bone marrow was measured as well. To investigate leukocyte homing and rhythmic bone marrow activity, changes in the concentration of the CXCL12 chemokine were determined in both the mRNA and the protein levels.

Results: TRF increased the amplitude of *per2* expression, whereas *reverb α* oscillation was phase shifted in visceral adipose tissue and bone marrow. In the adipose tissue, the relative gene expression of the inflammatory markers was lower in the TRF group, whereas no difference could be detected in the bone marrow. The spleen weight

was reduced in the TRF group. However, the concentration of CXCL12 does not show any difference between the two groups.

Conclusion: Our results suggest that time restricted feeding entrains the molecular clock of visceral adipose tissue and bone marrow. Our findings suggest that the prominent amplitude increase of leukocyte counts detected in the TRF group is not related to the bone marrow-derived CXCL12. However, reduced levels of inflammatory mediators may contribute to the decrease of inflammatory processes and impairs leukocyte activation in the TRF group.

IX. Irodalomjegyzék

1. Ko, C. H. & Takahashi, J. S. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics* **15**, 271–277 (2006).
2. Gardner, M. J., Hubbard, K. E., Hotta, C. T., Dodd, A. N. & Webb, A. A. R. How plants tell the time. *Biochemical Journal* **397**, 15–24 (2006).
3. Johnson, C. H., Golden, S. S., Ishiura, M. & Kondo, T. Circadian clocks in prokaryotes. *Molecular Microbiology* **21**, 5–11 (1996).
4. Mure, L. S. *et al.* Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. *Science* **359**, 1–16 (2018).
5. Czeisler, C. A. & Klerman, E. B. Circadian and sleep-dependent regulation of hormone release in humans. *Recent progress in hormone research* **54**, 92–97 (1999).
6. Gallego, M. & Virshup, D. M. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 139–148 (2007).
7. Asher, G. *et al.* SIRT1 Regulates Circadian Clock Gene Expression through PER2 Deacetylation. *Cell* **134**, 317–328 (2008).
8. Czeisler, C. A. *et al.* Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker. *Science* **284**, 2177–2181 (1999).
9. Heyde, I. & Oster, H. Differentiating external zeitgeber impact on peripheral circadian clock resetting. *Scientific Reports* **9**, 20114 (2019).
10. Berson, D. M., Dunn, F. A. & Takao, M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* **295**, 1070–1073 (2002).

11. Waterhouse, J., Fukuda, Y. & Morita, T. Daily rhythms of the sleep-wake cycle. *Journal of Physiological Anthropology* **31**, 1–14 (2012).
12. Plikus, M. V. *et al.* Local circadian clock gates cell cycle progression of transient amplifying cells during regenerative hair cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, (2013).
13. Scheiermann, C., Kunisaki, Y. & Frenette, P. S. Circadian control of the immune system. *Nature Reviews Immunology* **13**, 190–198 (2013).
14. Bass, J. & Takahashi, J. S. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science (New York, N.Y.)* **330**, 1349–1354 (2010).
15. Wittmann, M., Dinich, J., Merrow, M. & Roenneberg, T. Social jetlag: Misalignment of biological and social time. *Chronobiology International* **23**, 497–509 (2006).
16. Potter, G. D. M. *et al.* Circadian Rhythm and Sleep Disruption: Causes, Metabolic Consequences, and Countermeasures. *Endocrine reviews* **37**, 584–608 (2016).
17. Haraszti, R. Á., Ella, K., Gyöngyösi, N., Roenneberg, T. & Káldi, K. Social jetlag negatively correlates with academic performance in undergraduates. *Chronobiology international* **31**, 603–612 (2014).
18. Sűdy, Á. R., Ella, K., Bódizs, R. & Káldi, K. Association of Social Jetlag With Sleep Quality and Autonomic Cardiac Control During Sleep in Young Healthy Men. *Frontiers in Neuroscience* **13**, (2019).
19. Shafi, A. A. & Knudsen, K. E. Cancer and the circadian clock. *Cancer Research* **79**, 3806–3814 (2019).

20. Chellappa, S. L., Vujovic, N., Williams, J. S. & Scheer, F. A. J. L. Impact of Circadian Disruption on Cardiovascular Function and Disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **30**, 767–779 (2019).
21. Castanon-Cervantes, O. *et al.* Dysregulation of Inflammatory Responses by Chronic Circadian Disruption. *The Journal of Immunology* **185**, 5796–5805 (2010).
22. Martin, R. J. Nocturnal asthma: Circadian rhythms and therapeutic interventions. *American Review of Respiratory Disease* **147**, 525–528 (1993).
23. Cutolo, M. Circadian rhythms and rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* **86**, 327–333 (2019).
24. Muller, J. E. *et al.* Circadian variation in the frequency of onset of acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine* **313**, 1315–1322 (1985).
25. Druzd, D. *et al.* Lymphocyte Circadian Clocks Control Lymph Node Trafficking and Adaptive Immune Responses. *Immunity* **46**, 120–132 (2017).
26. Sun, Y. *et al.* MOP3, a component of the molecular clock, regulates the development of B cells. *Immunology* **119**, 451–460 (2006).
27. Yu, X. *et al.* TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock. *Science* **342**, 727–730 (2013).
28. Gibbs, J. E. *et al.* The nuclear receptor REV-ERB α mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 582 LP – 587 (2012).
29. Curtis, A. M., Bellet, M. M., Sassone-Corsi, P. & O'Neill, L. A. J. Circadian Clock Proteins and Immunity. *Immunity* **40**, 178–186 (2014).

30. Born, J., Lange, T., Hansen, K., Mölle, M. & Fehm, H. L. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **158**, 4454–4464 (1997).
31. Ella, K., Csépanyi-Kömi, R. & Káldi, K. Circadian regulation of human peripheral neutrophils. *Brain, Behavior, and Immunity* **57**, 209–221 (2016).
32. Pick, R., He, W., Chen, C. S. & Scheiermann, C. Time-of-Day-Dependent Trafficking and Function of Leukocyte Subsets. *Trends in Immunology* **40**, 524–537 (2019).
33. Scheiermann, C. *et al.* Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity* **37**, 290–301 (2012).
34. Casanova-Acebes, M. *et al.* XRhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* **153**, 1025 (2013).
35. Costet, P., Luo, Y., Wang, N. & Tall, A. R. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *The Journal of biological chemistry* **275**, 28240–28245 (2000).
36. Panda, S. Circadian physiology of metabolism. *Science* **354**, 1008–1015 (2016).
37. Peschke, E., Bähr, I. & Mühlbauer, E. Melatonin and pancreatic islets: Interrelationships between melatonin, insulin and glucagon. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 6981–7015 (2013).
38. Reinke, H. & Asher, G. Crosstalk between metabolism and circadian clocks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **20**, 227–241 (2019).
39. Rhoads, D. B., Rosenbaum, D. H., Unsal, H., Isselbacher, K. J. & Levitsky, L. L. Circadian periodicity of intestinal Na⁺/glucose cotransporter 1 mRNA levels is transcriptionally regulated. *The Journal of biological chemistry* **273**, 9510–9516 (1998).

40. Ma, D., Panda, S. & Lin, J. D. Temporal orchestration of circadian autophagy rhythm by C/EBP β . *The EMBO journal* **30**, 4642–4651 (2011).
41. Yang, L., Li, P., Fu, S., Calay, E. S. & Hotamisligil, G. S. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell metabolism* **11**, 467–478 (2010).
42. Maury, E., Hong, H. K. & Bass, J. Circadian disruption in the pathogenesis of metabolic syndrome. *Diabetes and Metabolism* **40**, 338–346 (2014).
43. Hatori, M. *et al.* Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metabolism* **15**, 848–860 (2012).
44. Gill, S. & Panda, S. A Smartphone App Reveals Erratic Diurnal Eating Patterns in Humans that Can Be Modulated for Health Benefits. *Cell Metabolism* **22**, 789–798 (2015).
45. Pickup, J. C., Mattock, M. B., Chusney, G. D. & Burt, D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* **40**, 1286–1292 (1997).
46. Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C. & Hauner, H. Relationship between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **92**, 1023–1033 (2007).
47. Daryabor, G., Kabelitz, D. & Kalantar, K. An update on immune dysregulation in obesity-related insulin resistance. *Scandinavian Journal of Immunology* **89**, 1–16 (2019).
48. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation* **117**, 175–184 (2007).

49. Ahlma, R. S. *et al.* Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* vol. 382 250–252 (1996).
50. Pérez-Pérez, A. *et al.* Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **35**, 71–84 (2017).
51. Lord, G. M. Leptin as a proinflammatory cytokine. *Contributions to Nephrology* **151**, 151–164 (2006).
52. Zhou, B. O., Yue, R., Murphy, M. M., Peyer, J. G. & Morrison, S. J. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell* **15**, 154–168 (2014).
53. Frodermann, V. *et al.* Exercise reduces inflammatory cell production and cardiovascular inflammation via instruction of hematopoietic progenitor cells. *Nature Medicine* **25**, 1761–1771 (2019).
54. Ruiz-Ojeda, F. J., Olza, J., Gil, Á. & Aguilera, C. M. Chapter 1 - Oxidative Stress and Inflammation in Obesity and Metabolic Syndrome. in (eds. del Moral, A. M. & Aguilera García, C. M. B. T.-O.) 1–15 (Academic Press, 2018). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812504-5.00001-5>.
55. Christensen, A. D., Haase, C., Cook, A. D. & Hamilton, J. A. K/BxN serum-transfer arthritis as a model for human inflammatory arthritis. *Frontiers in Immunology* **7**, (2016).
56. Mattison, J. A. *et al.* Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* **489**, 318–321 (2012).
57. Meyers, A. K. & Zhu, X. The NLRP3 Inflammasome: Metabolic Regulation and Contribution to Inflammaging. *Cells* **9**, (2020).
58. Bronte, V. & Pittet, M. J. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity* **39**, 806–818 (2013).

59. Buchan, L. *et al.* High-fat, high-sugar diet induces splenomegaly that is ameliorated with exercise and genistein treatment. *BMC research notes* **11**, 752 (2018).
60. Tian, G., Liang, J. N., Wang, Z. Y. & Zhou, D. Emerging role of leptin in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Immunology* **177**, 557–570 (2014).
61. Li, Y. *et al.* Fat-Produced Adipsin Regulates Inflammatory Arthritis. *Cell Reports* **27**, 2809–2816.e3 (2019).
62. Brand, D. D., Latham, K. A. & Rosloniec, E. F. Collagen-induced arthritis. *Nature Protocols* **2**, 1269–1275 (2007).
63. Giebultowicz, J. & Kapahi, P. Circadian clocks and metabolism: The nutrient-sensing akt and tor pathways make the link. *Current Biology* **20**, R608–R609 (2010).
64. Lamia, K. A. *et al.* AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science* **326**, 437–440 (2009).
65. Farshadi, E., van der Horst, G. T. J. & Chaves, I. Molecular Links between the Circadian Clock and the Cell Cycle. *Journal of Molecular Biology* **432**, 3515–3524 (2020).
66. Destici, E. *et al.* Altered phase-relationship between peripheral oscillators and environmental time in Cry1 or Cry2 deficient mouse models for early and late chronotypes. *PLoS ONE* **8**, (2013).
67. Ella, K., Mócsai, A. & Káldi, K. Circadian regulation of neutrophils: Control by a cell-autonomous clock or systemic factors? *European Journal of Clinical Investigation* **48**, 1–9 (2018).

68. Voigt, R. M., Forsyth, C. B., Green, S. J., Engen, P. A. & Keshavarzian, A. Circadian Rhythm and the Gut Microbiome. *International review of neurobiology* **131**, 193–205 (2016).
69. Zeb, F. *et al.* Effect of time-restricted feeding on metabolic risk and circadian rhythm associated with gut microbiome in healthy males. *The British journal of nutrition* **123**, 1216–1226 (2020).
70. Pandiyan, P. *et al.* Microbiome Dependent Regulation of Tregs and Th17 Cells in Mucosa. *Frontiers in Immunology* **10**, 426 (2019).
71. Stark, M. A. *et al.* Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* **22**, 285–294 (2005).
72. Lin, S., Thomas, T. C., Storlien, L. H. & Huang, X. F. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57B1/6J mice. *International Journal of Obesity* **24**, 639–646 (2000).
73. Chaix, A., Zarrinpar, A., Miu, P. & Panda, S. Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. *Cell Metabolism* **20**, 991–1005 (2014).
74. Singh, J. A. *et al.* 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* **68**, 1–26 (2016).
75. Cutolo, M. Chronobiology and the treatment of rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology* **24**, (2012).

X. Köszönetnyilvánítás

Szeretném ezúton hálámat kifejezni témavezetőimnek, Dr. Ella Krisztinának és Sűdy Ágnes Rékának, akik lehetővé tették, hogy ezt a fantasztikus négy évet a laborban és közösségében tölthettem. Segítségükkel nem csak ez a pályamunka születhetett meg, de számos kísérletben részt vehettem és izgalmas módszereket tanulhattam meg és végezhettem egyedül. A szakmai támogatáson kívül hozzájárultak, hogy rengeteg jó élménnyel és baráttal gazdagodjak az egyetemi éveim során. A jó élményekhez és szakmai fejlődésemhez a labor többi tagja is hozzájárult, személy szerint Dr. Búr Zsófia, Kisiczki Ármin, Sárkány Orsolya, Lumniczky Zalán, Dr. Káldi Krisztina, Szőke Anita és Nagy Rita, amit ezúton is köszönök nekik. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm élettársamnak és családjának, testvéremnek és édesapámnak a rengeteg támogatást.