

Transgeneračný vplyv maternálnej konzumácie stravy s obsahom Maillardových produktov na koncentrácie mimobunkovej DNA v cirkulácii u potomkov v modeli potkana

Mgr. Lucia Mihalovičová

(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Šarayová V.¹, Janko J.¹, Csongová M.¹, Štefíková K.²

Školiteľ: doc. MUDr. Katarína Šebeková, DrSc.

¹Ústav Molekulárnej Biomedicíny, Lekárska fakulta, Bratislava, Slovensko

²Lekárska fakulta Slovenskej zdravotníckej univerzity, Bratislava, Slovensko

Úvod

Koncové produkty pokročilej glykácie (advanced glycation end products - AGEs) sú heterogénnou skupinou zlúčenín tvorených Maillardovou reakciou - neenzymatickou glykáciou voľných aminoskupín proteínov, lipoproteínov a nukleových kyselín. Táto reakcia prebieha *in vivo* (endogénne) ale aj pri tepelnom spracovaní potravy nad 100°C (exogénne) (1). Endogénne AGEs sa akumulujú v organizme s pribúdajúcim vekom (2). V závislosti od ich chemickej štruktúry sa AGEs v strave hromadia v rôznej miere v rôznych orgánoch, vrátane mozgu, najviac v obličkách, ktoré sú hlavným orgánom vylučovania AGEs (3,4). Modifikácia AGEs *in vivo* mení štruktúru a tým aj funkciu proteínov. Proteíny modifikované AGEs sú ligandy, ktoré sa viažu s ich povrchovým bunkovým receptorom – RAGE a inicializujú procesy vedúce k tvorbe reaktívnych druhov kyslíka, zápalových cytokínov pri aterogénnych, zápalových alebo diabetogénnych odpovediach (5). Štúdie na zvieratách úspešne demonštrovali vzťahy medzi konzumáciou stravy bohatej na AGEs a mnohými zápalovými procesmi nízkeho stupňa, ktoré sú spojené s patogenézou a dlhodobými komplikáciami chronických ochorení (6). RAGE v solubilnej forme (sRAGE) viaže cirkulujúce ligandy a tým znižuje ich množstvo, ktoré môže reagovať s receptorom a teda má protektívny účinok (7). AGEs absorbované z potravy indukujú zmeny v orexigénnych a anorexigénnych hormónoch, v ich receptoroch v mozgu a aktivujú sa centrá, ktoré regulujú hlad a nasýtenosť (8). Transplacentárny prenos AGEs doteraz nebol zdokumentovaný, je však veľmi pravdepodobný, pretože koncentrácia AGE v sére matky pri pôrode priamo koreluje s AGEs v pupočníkovej krvi (9). V štúdiu Csongovej et al. (10) mali potomkovia matiek, ktoré konzumovali stravu bohatú na AGEs predispozíciu k obezite a inzulínovej rezistencii. Počas bunkovej smrti, či už apoptózy, nekrózy alebo NETózy, sa do cirkulácie uvoľňuje DNA (11). Táto mimobunková - extracelulárna DNA (ecDNA) je rozpoznávaná imunitným systémom a môže vyvolávať zápalovú odpoveď (12). Pri obezite sú zdrojom vysokých koncentrácií ecDNA adipocyty podliehajúce apoptóze (13).

Vychádzajúc z týchto faktov sme si položili otázku, či konzumácia stravy bohatej na AGEs od odstavu po laktáciu ovplyvní koncentráciu cirkulujúcej mimobunkovej DNA u dospelých potomkov, ktorí nekonzumovali tepelne modifikovanú stravu.

Materiál a metódy

Do pokusu sme zaradili 16 samcov a 16 samíc potkanov z kmeňa Wistar (Anlab, Praha, ČR). Experimentálne zvieratá sme chovali v štandardných laboratórnych podmienkach (teplota 22 ± 2 °C, vlhkosť 55 ± 10 %, 12 hodinový cyklus). Prístup k potrave a vode bol *ad libitum*. Samice sme rozdelili do kontrolnej a experimentálnej skupiny. V experimentálnej skupine sme potkany po odstavu (= puberta) krmili tepelne upravenou stravou a v kontrolnej skupine sme od toho istého veku krmili len štandardnou stravou Sniff R/M-H (ssniff Spezialdiäten, Soest, Nemecko). Tepelne upravenú stravu (TUS) sme pripravili pečením na 120°C po dobu 30 minút. Krátke tepelné spracovanie neovplyvňuje obsah makro- a mikronutrientov ale

zvyšuje množstvo AGEs. Takáto strava obsahuje o 50 % viac karboxymetyl-lyzínu a 2,5 krát viac karboxyetyl-lyzínu (chemicky definované AGEs stanovené validovanou metódou LC-MS/MS) ako štandardná strava. Po dosiahnutí veku dvoch mesiacov, tj. v dospelosti sme samice pářili so samcami, ktorí žrali len štandardnú stravu. Samice konzumovali danú stravu vzhľadom na skupinu až do ukončenia skončenia laktácie. Novonarodené mláďatá generácie F1 (n = 80) sme odstavili na 21. postnatálny deň a až do usmrtenia konzumovali len štandardnú stravu. Počas pokusu sme experimentálne zvieratá týždenne vážili. V spolupráci so Slovenskou zdravotníckou univerzitou sme denzitometricky (LUNAR Prodigy Advance device, GE Medical Systems, Madison, WI, USA) stanovili množstvo telesného tuku. Potkany z generácie F1 sme usmrtili vo veku jedného roka. Odobraté vzorky plazmy na biochemické a molekulárne analýzy sme uskladnili pri teplote -80 °C. Metódou ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) využitím komerčných ELISA kitov (Quantikine, R&D systems, USA) sme kvantifikovali koncentráciu zápalového markeru TNF- α (tumor necrosis factor- α ; tumornekrotizujúci faktor- α) a receptora pre AGE - RAGE v plazme podľa inštrukcií výrobcu. Extracelulárnu DNA sme izolovali komerčným kitom QIAGEN a koncentráciu sme stanovili fluorometricky. Parametre krvného obrazu sme stanovili hematologickým analyzátorom BC-VET. Funkciu obličiek sme vyjadrili glomerulárnou filtráciou (GFR) na základe stanovenia kreatinínu v plazme a v moči. Na štatistickú analýzu dát sme použili program GraphpadPrism 6.0. Dáta sme vyhodnotili použitím dvojfaktorovej ANOVA. Výsledky uvádzame ako priemer \pm SD. Za hladinu významnosti považujeme $\alpha < 0,05$.

Výsledky

V tabuľke 1 uvádzame priemerné telesné hmotnosti, percento tuku, počty erytrocytov a leukocytov, glomerulárnu filtráciu a koncentrácie receptora pre AGE - RAGE. Nezistili sme rozdiely v hmotnosti ani v percente tuku u potomkov matiek, ktoré konzumovali tepelne upravenú stravu. Rozdiely neboli ani v počte erytrocytov a leukocytov a obdobne ani v renálnej funkcii či koncentrácii sRAGE.

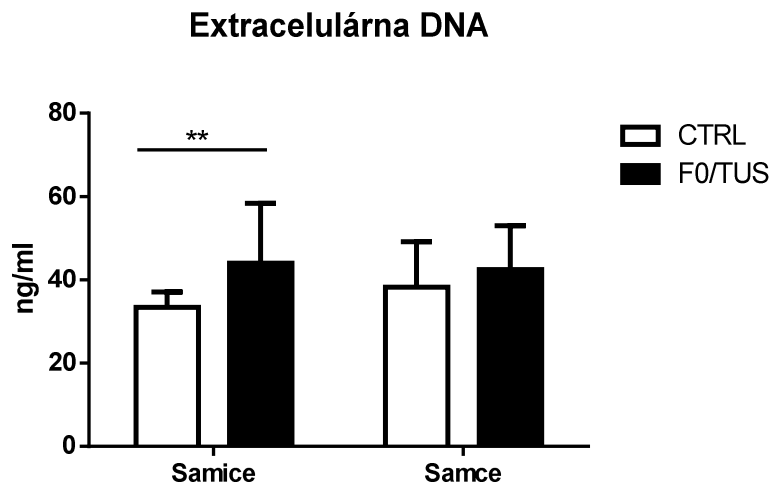
Tab. 1: Priemerné hodnoty telesnej hmotnosti, relatívneho percenta tuku, počtu erytrocytov a leukocytov, glomerulárnej filtrácie a koncentrácie sRAGE.

Parameter	Samice				p	Samci				p
	CTRL		F0/TUS			CTRL		F0/TUS		
	M	SD	M	SD		M	SD	M	SD	
	N = 21		N = 23			N = 16		N = 17		
Hmotnosť (g)	356	46	355	40	0,980	705	106	674	120	0,650
Tuk (%)	35	7	35	9	0,790	39	9	38	8	0,910
Erytrocyty (*10 ¹² /l)	7,91	1,15	7,89	1,54	0,998	7,90	2,32	9,36	1,16	0,021
Leukocyty (*10 ⁹ /l)	1,31	0,67	1,55	0,77	0,658	2,93	1,05	3,80	1,52	0,061
GFR (ml/min/100 g)	1,94	1,06	1,95	0,62	0,978	1,36	0,65	1,50	0,51	0,655
sRAGE (pg/ml)	321	99	313	107	0,950	364	88	309	67	0,251

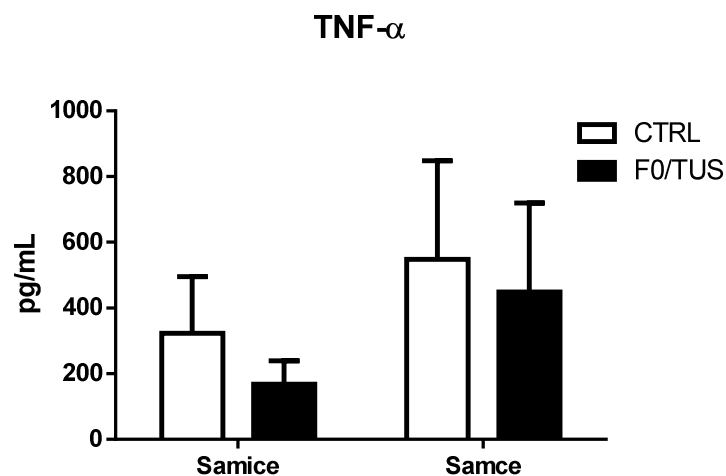
Vysvetlivky: N = počet; GFR – glomerulárna filtrácia; sRAGE – rozpustný receptor pre AGE; N = počet; M – priemer; SD – štandardná odchýlka; F0/TUS – tepelne upravená strava konzumovaná F0 generáciou; p = p-hodnota

Zistili sme medziskupinové rozdiely v koncentrácii ecDNA (P = 0,003; F = 9,196; obr. 1). Post hoc testy odhalili signifikantné rozdiely len u samíc, kde významne vyššie koncentrácie mali samice z experimentálnej skupiny (P = 0,004; t = 3,212). Pri prozápalovom cytokíne

TNF- α (obr. 2) sme zistili rozdiely ($P = 0,030$; $F = 4,969$), avšak post hoc testy medziskupinové rozdiely neodhalili.



Obr. 1 Koncentrácia extracelulárnej DNA v plazme u potkanov v F1 generácii. U samíc sú signifikantne vyššie koncentrácie v experimentálnej skupine (CTRL: $n = 21$, F0/TUS: $n = 23$), u samcov sme štatisticky významné rozdiely nezistili (CTRL: $n = 16$, F0/TUS: $n = 17$). CTRL – kontrola, F0/TUS = tepelne upravená strava konzumovaná F0 generáciou, ** - $p < 0,01$.



Obr. 2 Koncentrácia TNF- α v sére u potkanov v F1 generácii. Štatisticky významné rozdiely v koncentráciách sme nezistili u samíc (CTRL: $n = 21$, F0/TUS: $n = 23$) ani u samcov (CTRL: $n = 16$, F0/TUS: $n = 17$). CTRL – kontrola, F0/TUS = tepelne upravená strava konzumovaná F0 generáciou.

Diskusia

Hypotéza vývinového pôvodu zdravia a chorôb predpokladá, že vývinovou plasticitou môžu intrauterinné a skoré postnatálne stresory zvýšiť riziko rozvoja chronických ochorení v neskoršom veku. Výživa počas obdobia rastu a vývinu plodu výrazne ovplyvňuje dlhodobé zdravie jedinca (14). Údaje o negatívnych vplyvoch stravy západného typu, to znamená s vysokým obsahom tukov, soli a sacharidov sú známe (15). Táto strava obsahuje aj množstvo pokročilých koncových produktov glykácie – AGEs, ktorých nežiadúce zdravotné účinky pri prijímaní v dospelosti sú známe, nie je však jasný efekt prenatálnej expozície. Na rozdiel od predchádzajúceho pokusu na myšiach, kde konzumácia stravy bohatej na AGEs vo forme chlebových kôrok viedla k rozvoju obezity u mladých mužských potomkov (10), sme v tomto experimente tento efekt nezistili. Mohlo by to poukazovať na iný typ stravy, hoci obsah CML bol korešpondujúci alebo ide o efekt viazaný na druh, keďže v tomto experimente sme mali potkany z kmeňa Wistar na rozdiel od myši z kmeňa C57BL/6. Ďalším dôvodom by mohol byť fakt, že v tentokrát sme vyšetrovali zvieratá v dospelom veku na rozdiel od predchádzajúcich vyšetrení z obdobia puberty. V tomto experimente sme rozdiely v koncentrácii ecDNA zistili len u samičiek, avšak tieto výsledky pozorujeme bez zmeny hmotnosti alebo množstva tuku. Jedným zo zdrojov ecDNA je aj NETóza a teda sme predpokladali, že by mohla byť spojená so zmenou zápalového statusu u potomkov, avšak sme nezistili rozdiely v počte leukocytov ani granulocytov (dáta neuvedené). Tento fakt podporuje aj naše výsledky, že sme nenašli významné zmeny v koncentrácii TNF- α . Podľa našich výsledkov majú potomkovia experimentálnej skupiny práve trend k nižším koncentráciám prozápalového cytokínu TNF- α . Vychádzajúc z týchto výsledkov môžeme systémový zápal alebo mikrozápal vylúčiť. Zvýšená koncentrácia cirkulujúcej DNA by mohla súvisieť s aktivitou erythropoézy, kedy počas maturácie erytrocyty vylúčia svoje jadrá a organely (16). Tento mechanizmus ale nie je pravdepodobný, pretože sme nepozorovali zmeny v počte erytrocytov. Predpokladáme, že znížená renálna funkcia by mohla viesť k retencii fragmentov. Avšak sme rozdiely v glomerulárnej filtrácii nezistili, takže ani tento mechanizmus nie je nepravdepodobný. Keďže ecDNA je potenciálnym ligandom bunkového receptora RAGE, môžeme predpokladať, že dochádza k interakcii s sRAGE. Pri zvýšení koncentrácie ecDNA sme nepozorovali zmeny sRAGE a z našich výsledkov doteraz vyplýva, že zvýšené koncentrácie ecDNA nevedú k nadprodukcii sRAGE a nie je jasné, či hrá úlohu v jej odstraňovaní. EcDNA je degradovaná deoxyribonukleázami (DNáza). EcDNA, ktorá je chránená histónmi je rezistentná voči DNáze a teda aktivita DNázy nemusí vždy súvisieť s koncentráciou ecDNA. Nevieme presne určiť zdroj uvoľňovania ecDNA – môže byť bunkového pôvodu alebo odráža zvýšenú koncentráciu DNA dôsledkom NETózy. Jednou z možností ako by sme mohli určiť jej pôvod je zamerať sa na stanovenie tkanivových markerov a markerov NETózy.

Na záver môžeme skonštatovať, že sme zistili efekt maternálnej konzumácie tepelne modifikovanej stravy s obsahom AGEs špecificky u samičích potomkov. Známe príčiny spôsobujúce zvýšené koncentrácie mimobunkovej DNA sme vylúčili a patologické dopady z tejto predbežnej štúdie nevieme určiť.

Zoznam použitej literatúry

1. Nedić O, Rattan SIS: Molecular effects of advanced glycation end products on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology. *Free Radical Research* 2013; 47:sup1, 28-38.
2. Šebeková K, Brouder Šebeková K: Glycated proteins in nutrition: Friend or foe? *Experimental gerontology* 2019; 117:76-90.
3. Somoza V, Wenzel E, Weiss C a spol.: Dose-dependent utilisation of casein-linked lysinoalanine, N(epsilon)-fructoselysine and N(epsilon)-carboxymethyllysine in rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006; 50(9):833-841.
4. Tessier FJ, Niquet-Léridon C, Jacolot P a spol.: Quantitative assessment of organ distribution of dietary protein-bound ¹³C-labeled N^ε-carboxymethyllysine after a chronic oral exposure in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016; 60(11):2446-2456.
5. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M a spol.: Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products, *J. Mol. Med.* 2015; 83: 876-886.
6. Kellow NJ, Coughan MT: Effect of diet-derived advanced glycation end products on inflammation. *Nutr. rev.* 2015; 73(11):737-759.
7. Sirois CM, Tengchuan J, Miller AL a spol.: RAGE is a nucleic acid receptor that promotes inflammatory responses to DNA. *J. Exp. Med.* 2013; 210(11):2447-2463.
8. Šebeková K, Klenovics KS, Boor P a spol.: Behaviour and hormonal status in healthy rats on a diet rich in Maillard reaction products with or without solvent extractable aroma compounds. *Physiol. Behav.* 2012; 105(3):693-701.
9. Mericq V, Piccardio C, Weijing C a spol.: Maternally Transmitted and Food-Derived Glycotoxins. A factor preconditioning the young to diabetes? *Diabetes Care* 2010; 33:p 2232-2237.
10. Csongova M, Gurecka R, Koborova I a spol.: The effects of maternal advanced glycation end products-rich diet on somatic features, reflexes ontogeny and metabolic parameters of offspring mice. *Food Funct.* 2018; 9:3432-3446.
11. Revelo XS, Ghazarian M, Chng MH a spol.: Nucleic acid-targeting pathways promote inflammation in obesity-related insulin resistance. *Cell Rep.* 2016; 16(3):717-730.
12. Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T a spol.: Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biology and Therapy* 2019; 20(8):1057-1067.
13. Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y a spol.: Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Sci. Adv.* 2019; 2(3):e1501332.
14. Barker DJP: The developmental origins of adult disease. *Eur. J. Epidemiol.* 2003; 18:733-736.
15. Waterland R A, Jirtle J: Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* 2004; 20:63-68.
16. Morras M, Lefevre SD, Ostuni MA: From erythroblasts to mature red blood cells: Organelle clearance in Mammals. *Front. Physiol.* 2017; 8:1076.