THE EFFECT OF DISRUPTION OF CIRCADIAN RHYTHM ON VASCULAR FUNCTION IN LEAN (C57BL/6) AND OBESE, LEPTIN RESISTANT (*DB/DB*) MICE

NITIRUT NERNPERMPISOOTH

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2013

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

THE EFFECT OF DISRUPTION OF CIRCADIAN RHYTHM ON VASCULAR FUNCTION IN LEAN (C57BL/6) AND OBESE, LEPTIN RESISTANT (*DB/DB*) MICE

NITIRUT NERNPERMPISOOTH 5137404 PYBS / D

Ph.D. (BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: SUWAN THIRAWARAPAN, Ph.D., DAVID W. STEPP, Ph.D., WISUDA SUVITAYAVAT, Ph.D.

ABSTRACT

The environmental light cycle strongly influences human physiology and pathology. An artificial light or shift work at night might disturb a circadian gene oscillation and behavior, which has been known to associate with cardiovascular and metabolic risks. However, the mechanisms of circadian disruption on vascular function still remain unclear. The aim of this study is to determine whether disruption of the circadian rhythm impairs the vascular function in lean (C57/BL6) mice (LM) and enhances the vascular dysfunction in obese, leptin resistant (*db/db*) mice (Ob). Lean and obese male mice, age 10-11 weeks were subjected to normal 12:12 h light-dark cycle (LD) or constant darkness (DD) to disrupt the circadian rhythm for 4 weeks. The metabolic parameters, vasoreactivity of thoracic aorta and small mesenteric artery were evaluated. In addition, daily rhythmic expression of clock genes (*BMAL1, CLOCK, NPAS2, PER1, PER2, CRY1*)**,** clock output gene (*DBP*), vascular relaxation-related genes (*eNOS, GTP-CH1*), and superoxide-related genes (*NOXs, SODs*) were also investigated after 4 weeks of light regimens.

Circadian disruption had no effect on glucose metabolism in lean mice, while obese mice showed a marked increase in fasting serum glucose and HbA1C levels. Obese mice had stronger aortic vasoconstriction to 5-HT than lean mice. Circadian disruption enhanced the response to 5-HT only in lean mice. In small mesenteric artery, the vasoconstriction to PE was not altered by obesity or circadian disruption. While endothelium-dependent dilation to Ach was attenuated in obese mice (LM-LD 81.1± 6.0% vs. Ob-LD 52.0±3.4 vs.) and depressed in lean mice subjected to constant darkness (LM-LD 81.1±6.0 % vs. LM-DD 63.3±6.4). In the presence of L-NAME, the vasodilator responses were attenuated in both lean and obese groups. SNP-mediated relaxation was impaired in lean mice subjected to constant darkness (LM-LD 57.5±10.8% vs. LM-DD 32.5±3.9 %) but was not observed in obesity. In small mesenteric artery, the rhythmic expression of *PER1* and *DBP* was depressed in obesity. Circadian disruption altered the daily oscillation of *CLOCK, NPAS2*, and *PER1* in lean mice. The gene profile of *DBP* was also depressed in lean mice under constant darkness. The vascular profile of *eNOS* expression was depressed and *GTPCH1* lost rhythmic expression both in obesity and by constant darkness. The *SODs* expression was also depressed in obesity and in constant darkness, while the *NOXs* components were generally increased in obese subjected to constant darkness.

These results suggested that circadian disruption increased the vasoconstrictor property of macrovessel and impaired both endothelium-dependent and independent dilation of microvessel in lean mice without metabolic disturbances. However, circadian disruption exacerbates glycemic load but fails to enhance the vascular impairment in obese mice. The interruption of nitric oxide pathways reveals an underlying mechanism of vascular impairment by circadian disruption. Aberrant clock gene oscillation and vascular dysfunction might imply a parallel interconnection. Their regulation and relation between circadian clock and vascular disease are further needed to verify.

KEY WORDS: CIRCADIAN DISRUPTION / CLOCK GENES / OBESITY / VASCULAR FUNCTION / eNOS

141 pages

Copyright by Mahidol University

ผลของการรบกวนระบบรอบวันต่อการทำงานของหลอดเลือดในหนูเม้าส์ปกติ(C57BL/6) และหนูเม้าส์อ้วนจากภาวะดื้อต่อฮอร์โมนเลปติน (*DB/DB*)

THE EFFECT OF DISRUPTION OF CIRCADIAN RHYTHM ON VASCULAR FUNCTION IN LEAN (C57BL/6) AND OBESE, LEPTIN RESISTANT (*DB/DB*) MICE

นิธิรัตน์ เนินเพิ่มพิสุทธิ์ 5137404 PYBS/D

ปร.ด. (เภสัชศาสตร์ชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : สุวรรณ ธีระวรพันธ์, Ph.D., DAVID W. STEPP, Ph.D., วิสุดา สุวิทยาวัฒน์, Ph.D.

บทคัดย่อ

วงจรรอบวันของแสงในสิ่งแวดล้อมมีผลต่อการทำงานของร่างกายและพยาธิวิทยาในมนุษย์ แสงประดิษฐ์หรือการทำงานในเวลากลางคืนอาจรบกวนการแกว่งขึ้นลงของยีนที่ควบคุมรอบวัน (Circadian Gene) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปัจจัยเสี่ยงความผิดปกติของหัวใจและหลอดเลือดและแมแทบอลิซึม กลไกการรบกวนระบบรอบวันต่อการทำงานของหลอดเลือดยังไม่ชัดเจน วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อประเมินการรบกวนระบบรอบวันมีผลให้การทำงานของหลอดเลือดบกพร่องในหนูเม้าส์ปกติ (C57BL/6) และเพิ่มความผิดปกติการทำงานของหลอดเลือดในหนูเม้าส์อ้วนจากภาวะดื้อต่อฮอร์โมนเลปติน *(db/db) หรือ ไม่* หนูเม้าส์เพศผู้อายุ 10-11 สัปดาห์ถูกเลี้ยงในห้องที่วงจรรอบแสงสว่างสลับมืดอย่างละ 12 ชม (LD) หรือมีสภาวะมืดตลอด 24 ชม (DD) เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยประเมินค่าพารามิเตอร์ตัวแปรเมตาบอลิซึม ปฏิกิริยาตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารกระตุ้นทั้งในหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตา (Aorta) และในหลอดเลือดแดงมีเซนเทอริค (Mesenteric Artery) รวมทั้งจังหวะการแสดงออกของยีนนาฬิกาที่ควบคุมรอบวัน (*BMAL1, CLOCK, NPAS2, PER1, PER2, CRY1*) ยีนผลผลิตจากยีนนาฬิกาที่ควบคุมรอบวัน (*DBP*) ยีนที่เกี่ยวกับการคลายตัวของหลอดเลือด (*eNOS, GTP-CH1*) และยีนที่เกี่ยวกับการสร้างและขับยั้งมูลอิสระ (*NOXs, SODs*) เมื่อครบ 4 สัปดาห์

การรบกวนระบบรอบวันไม่มีผลต่อแมแทบอลิซึมของกลูโคสในหนูเม้าส์ปกติแต่ในหนูเม้าส์อ้วนมีการเพิ่มของระดับน้ำตาลในเลือดหลังงดอาหารและระดับ HbA1C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหนูเม้าส์อ้วนมีการหดตัวของหลอดเลือดเออร์ตาต่อ 5-HT ที่แรงกว่าหนูเม้าส์ปกติ การรบกวนระบบรอบวันพบการตอบสนองต่อ 5-HT เพิ่มขึ้นเฉพาะในหนูเม้าส์ปกติ ในหลอดเลือดแดงมีเซนเทอริคการหดตัวของหลอดเลือดต่อ PE ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งในภาวะอ้วนหรือการรบกวนระบบรอบวัน ในขณะที่การคลายตัวของหลอดเลือดต่อ Ach ซึ่งขึ้นอยู่กับเซลล์บุหลอดเลือดชนิดไนตริกออกไซด์ลดลงในหนูเม้าส์อ้วน (LM-LD 81.1± 6.0%) vs. Ob-LD 52.0±3.4) และถูกกดลงในหนูเม้าส์ปกติที่อยู่ในสภาวะมืดตลอด24 ชม (LM-LD 81.1±6.0 % vs. LM-DD 63.3±6.4). เมื่อมีสาร L-NAME การขยายตัวตอบสนองต่อ Ach ของหลอดเลือดลดลงทั้งในหนูเม้าส์ปกติและหนูเม้าส์อ้วนการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ SNP ลดลงในหนูเม้าส์ปกติที่อยู่ในสภาวะมืดตลอด 24 ชม (LM-LD 57.5±10.8% vs. LM-DD 32.5±3.9 %) แต่ไม่พบในภาวะอ้วน ในหลอดเลือดแดงมีเซนเทอริคจังหวะการแสดงออกของยีน *PER1* และ *DBP* ลดลงในหนูเม้าส์อ้วน การรบกวนระบบรอบวันมีผลเปลี่ยนแปลงการแกว่งขึ้นลงในรอบวันของยีน *CLOCK NPAS2* และ *PER1* ในหนูเม้าส์ปกติ โดยพบการแสดงออกของยีน *DBP* ถูกกดลงในหนูเม้าส์ปกติที่อยู่ในสภาวะมืดตลอด 24 ชม อีกด้วย การแสดงออกของยีน *eNOS* ในหลอดเลือดถูกกดลงและไม่พบการแกว่งขึ้นลงในรอบวันของยีน *GTP-CH1* ทั้งในภาวะอ้วนและโดยสภาวะมืดตลอด 24 ชม รวมทั้งพบการแสดงออกของยีน *SODs* ถูกกดลงในภาวะอ้วนและสภาวะมืดตลอด 24 ชั่วโมงแต่ในส่วนของ *NOXs* โดยทั่วไปพบการเพิ่มขึ้นในหนูเม้าส์อ้วนที่อยู่ในสภาวะมืดตลอด24 ชม

จากผลการทดลองแสดงว่าการรบกวนระบบรอบวันทำให้ลักษณะการหดตัวในหลอดเลือดขนาดใหญ่รุนแรงเพิ่มขึ้นและการคลายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กมีความบกพร่องทั้งที่พึ่งและไม่พึ่งเซลล์บุโดยไม่มีผลรบกวนเมตาบอลิซึม อย่างไรก็ตามภาวะรบกวนระบบรอบวันทำให้ภาวะระดับน้ำตาลสูงมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นแต่ไม่สามารถเพิ่มความบกพร่องของหลอดเลือดในหนูเม้าส์อ้วน การขัดขวางวิถีการออกฤทธิ์ของ NO แสดงให้เห็นถึงกลไกที่ก่อให้เกิดความบกพร่องของหลอดเลือดจากการรบกวนระบบรอบวัน การเปลี่ยนแปลงของการแกว่งขึ้นลงของยีนนาฬิกาที่ควบคุมรอบวันและความผิดปกติการทำงานของหลอดเลือดอาจแสดงนัยสอดคล้องกันในเชิงขนาน การควบคุมและความสัมพันธ์ระหว่างยีนนาฬิกาที่ควบคุมรอบวันกับโรคหลอดเลือดต้องมีการศึกษาเพิ่มต่อไป

Copyright by Mahidol University