

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2999.

SÚDY ÁGNES RÉKA

Celluláris és molekuláris élettan
című program

Programvezető: Dr. Hunyady László, egyetemi tanár
Témavezető: Dr. Káldi Krisztina, egyetemi tanár
Dr. Ella Krisztina, egyetemi adjunktus

A környezeti deszinkronizáció szerepe a szív működés és az immunválasz szabályozásában



Doktori értekezés

Südy Ágnes Réka

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Káldi Krisztina, DSc., egyetemi tanár
Konzulens: Dr. Ella Krisztina, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Zákány Róza, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Horváth Viktor, Ph.D., egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Mandl József, az MTA tagja, egyetemi tanár
Tagok: Dr. Nagy András Dávid, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Kardon Tamás, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2023

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	3
2. Bevezetés.....	11
2.1 A cirkadián ritmus jellemzői.....	11
2.2 Az emlős cirkadián óra molekuláris felépítése.....	13
2.3 A központi óra.....	17
2.4 A perifériás órák, az idegi és hormonális ritmusok.....	18
2.5 Az alvás-ébrenléti ritmus és a kronotípus.....	21
2.6 A cirkadián ritmuszavarok és egészségügyi jelentőségük.....	23
2.7 A cirkadián ritmus néhány kiemelt élettani vonatkozása.....	26
2.7.1 A kardiovaszkuláris rendszer cirkadián vonatkozásai és a szívfrekvencia variabilitás.....	26
2.7.2 Az anyagcsere cirkadián szabályozása.....	28
2.7.3 Az immunrendszer cirkadián szabályozása.....	31
2.8 Az immunrendszer és a metabolizmus összefüggései.....	36
3. Célkitűzés.....	37
4. Módszerek.....	39
4.1 Az alvásminőség vizsgálat protokollja és a résztvevők kiválasztása.....	39
4.2 Az alvási paraméterek meghatározása.....	39
4.3 Melatonin.....	41
4.4 HRV analízis.....	41
4.5 A szubjektív alvásminőség értékelése.....	45
4.6 Kísérleti állatok.....	46
4.7 Intraperitoneális glükóztolerancia teszt.....	47
4.8 Génexpresszió vizsgálata.....	47
4.9 K/BxN szérumsztransfer artritisz.....	48
4.10 A leukocita populációk, adhéziós molekulák és kemokin receptorok áramlási citometriás vizsgálata.....	49
4.11 Csontvelői és szérumsz CXCL12 szintek meghatározása.....	50
4.12 Marginált és szöveti leukociták meghatározása a tüdőben.....	50
4.13 Cosinor analízis.....	51
4.14 Statisztikai analízis.....	51

5. Eredmények	53
5.1 A szociális <i>jetlag</i> és az alvás alatti kardiovaszkuláris szabályozás, valamint az alvásminőség összefüggései	53
5.1.1 Az SJL alvásminőségre gyakorolt hatásának vizsgálatában résztvevők alapvető jellemzői, napi ritmusuk és alvási paramétereik.....	53
5.1.2 A HRV analízise az időtartományban.....	56
5.1.3 A HRV analízise a frekvenciatartományban.....	60
5.1.4 Az SJL és a szubjektív alvásminőség összefüggései	63
5.2 Az időzített etetés hatása az autoimmun artritisz lefolyására, valamint az immunrendszer válaszkészségére	65
5.2.1 A TRF alapvető metabolikus paraméterekre és a metabolikus ritmusra gyakorolt hatása.....	65
5.2.2 A TRF hatása az autoimmun K/BxN szérum transzfer artritisz tüneteire.....	69
5.2.3 A TRF hatása a lép tömegének és a fehérvérsejtek eloszlásának napi ingadozására	70
5.2.4 A TRF hatása a csontvelői óraműködésre és a CXCL12 ritmusára.....	76
5.2.5 A TRF hatása a vérben keringő neutrofil granulociták és monociták felszínén megjelenő adhéziós molekulák kifejeződésére	78
5.2.6 A TRF hatása a leukociták tüdőszöveti megoszlására	80
6. Megbeszélés	82
7. Következtetések.....	92
8. Összefoglalás	94
9. Summary.....	95
10. Irodalomjegyzék	96
11. Saját publikációk jegyzéke	124
12. Társszerzők közötti munkamegosztás	125
13. Köszönetnyilvánítás	126

1. Rövidítések jegyzéke

ACTH	adrenocorticotropic hormone (adrenokortikotrop hormon)
ADHD	attention deficit hyperactivity disorder (figyelemhiányos hiperaktivitás-zavar)
AL	ad libitum
AMP	adenosine monophosphate (adenozin-monofoszfát)
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMP aktivált protein kináz)
ANOVA	analysis of variance (varianciaanalízis)
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (aromás szénhidrogén receptor sejtmagi transzlokátor)
ATP	adenosine triphosphate (adenozin-trifoszfát)
AVP	arginine vasopressin (arginin-vazopresszin)
β -TrCP	beta-transducin repeats-containing protein (béta-transzducin ismétlődéseket tartalmazó fehérje)
BMAL1	brain and muscle ARNT-like protein-1 (agy és izom ARNT hasonló fehérje 1)
BMI	body mass index (testtömegindex)
BSA	bovine serum albumin (szarvasmarha szérumalbumin)
cAMP	cyclic adenosine monophosphate (ciklikus adenzin-monofoszfát)
CCG	clock controlled gene (óra kontrollált gén)

CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2 (kemokin (C-C motívum) ligand 2)
CCR2	CC motif chemokine receptor 2 (CC motívum kemokin receptor 2)
CD	cluster of differentiation (differenciálódási klaszter)
CD62L	L-selectin (L-szelektin)
CDK1	cyclin dependent kinase 1 (ciklin-dependens kináz 1)
cDNS	komplementer DNS (complementary deoxyribonucleic acid)
CIRP	cold-inducible RNA-binding protein (hideg által indukálható RNS-kötő fehérje)
CK	casein kinase (kazein kináz)
CLOCK	circadian locomotor output cycles kaput (cirkadián lokomotor kimeneti ciklus elromlik)
COPD	chronic obstructive pulmonary disease (krónikus obstruktív tüdőbetegség)
COVID-19	coronavirus disease 2019 (koronavírus megbetegedés 2019)
CREB	cAMP response element-binding protein (cAMP-reszponzív elem kötő fehérje)
CRY	cryptochrom (kriptokróm)
CT	circadian time (cirkadián idő)
CVD	cardiovascular disease (kardiovaszkuláris betegség)
CXCL	CXC motif chemokine ligand (CXC-motívum kemokin ligand)

CXCR	CXC motif chemokine receptor (CXC-motívum kemokin receptor)
DBP	D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein (albumin D-box kötő fehérje)
DIO	diet induced obesity (diéta indukált elhízás)
DNáz	dezoxiribonukleáz (deoxyribonuclease)
DNS	dezoxiribonukleinsav (deoxyribonucleic acid)
DSPD	delayed sleep phase disorder (késleltetett alvásfázis zavar)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat)
FASPS	familial advanced sleep phase syndrome (familiáris előretolt alvásfázis szindróma)
FFT	fast Fourier transformation (gyors Fourier transzformáció)
GR	glucocorticoid receptor (glükokortikoid receptor)
GSK3	glycogen synthase kinase-3 (glikogén szintáz kináz 3)
GSQS	Groningen sleep quality scale (Groningen alvásminőség skála)
HDL	high density lipoprotein (nagy sűrűségű lipoprotein)
HF	high frequency (0,15-0,4 Hz) (magas frekvenciasáv)
HR	heart rate (szívfrekvencia)
HRV	heart rate variability (szívfrekvencia variabilitás)

HSF1	heat shock factor 1 (hősokk faktor 1)
IBI	interbeat interval (ütések közötti intervallum)
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1 (intracelluláris adhéziós molekula 1)
I κ B	NF- κ B inhibitor
IL	interleukin
ipRGC	intrinsically photosensitive retinal ganglion cell (intrinzik fényérzékeny retinális ganglionsejt)
IRS	insulin receptor substrate (inzulin receptor szubsztrát)
K/BxN	KRN transgene on B6 background crossed with NOD (KRN transzgén B6 háttéren NOD-dal keresztezve)
LED	light-emitting diode (világító dióda)
LepR	leptin receptor
LF	low frequency (0,04-0,15 Hz) (alacsony frekvenciasáv)
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1 (limfocita funkció asszociált antigén 1)
LSD	least significant difference (legkisebb szignifikáns különbség)
Ly6G	lymphocyte antigen 6 family member G (limfocita antigén 6 családtag G)
Ly6C	lymphocyte antigen 6 family member C (limfocita antigén 6 családtag C)
Mac-1	macrophage-1 antigen (makrofág 1 antigén)
MAPK	mitogen-activated protein kinase (mitogén aktivált protein kináz)

MCTQ	munich chronotype questionnaire (müncheni kronotípus kérdőív)
MFI	mean fluorescence intensity (átlagos fluoreszcencia intenzitás)
MSF	mid-sleep on free days (szabadnapai alvási középítő)
MSFsc	sleep corrected MSF (magnövekedett alváshosszra korrigált MSF)
MSW	mid-sleep on workdays (munkanapi alvási középítő)
MT	melatonin receptor
mTOR	mammalian target of rapamycin (emlős rapamicin célpont)
N24SWD	non-24-hour sleep-wake disorder (nem 24 órás alvás-ébrenlét zavar)
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide (nikotinamid-adenin-dinukleotid)
NET	neutrophil extracellular traps (neutrofil extracelluláris csapda)
NFIL3	nuclear factor, interleukin 3 regulated (interleukin 3 szabályozott nukleáris faktor)
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (nukleáris faktor, az aktivált B sejtek kappa-könnyűlánc fokozója)
NK	natural killer (természetes ölósejt)
NLR	nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat (nukleotid-kötő domén, leucinban gazdag ismétlődés)
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3 (NLR család, pirin domént tartalmazó 3)
NN	normal to normal (normál (szinusz) ütéstől normál (szinusz) ütésig)

NOD	non-obese diabetic (nem elhízott diabéteszes)
NREM	non rapid eye movement (gyors szemmozgás nélküli)
nu	normalized unit (normalizált egység)
OPN4	melanopsin (melanopszin)
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (agyalapi mirigy adenilát cikláz aktiváló polipeptid)
PBS	phosphate buffered saline (foszfátpuffer)
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule (vérlemezke endotélsejt adhéziós molekula)
PER	period (periódus)
PI3K	phosphoinositide 3-kinase (foszfatidilinozitol 3 kináz)
pNN50	percentage of successive normal to normal intervals differing by more than 50 ms (azon egymást követő intervallumok aránya, amelyek között 50 ms-nál nagyobb a különbség)
PNS	parasympathetic nervous system (paraszimpatikus idegrendszer)
PP1	protein phosphatase 1 (protein foszfatáz 1)
PSD	power spectral density (spektrális teljesítménysűrűség)
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1 (P-szelektin glikoprotein ligand 1)
REM	rapid eye movement (gyors szemmozgás)

RHT	retinohypothalamic tract (retinohipotalamikus pálya)
RMSSD	root mean square of successive differences (az egymás utáni ütések közötti különbségek négyzetes középértéke)
RNS	ribonukleinsav (ribonucleic acid)
ROR	retinoic acid receptor-related orphan receptor (retinsav receptor rokon árva receptor)
RPLP0	ribosomal protein lateral stalk subunit P0 (riboszómális protein oldalsó szár P0 alegység)
RRE	REVERB/ROR response element (REVERB/ROR reszponzív elem)
SCN	suprachiasmatic nucleus (szuprakiazmatikus mag)
SD	standard deviation (szórás)
SDNN	standard deviation of the normal to normal intervals (az egymást követő szinusz ütések idejének (NN intervallumok) szórása)
SEM	standard error of the mean (standard hiba)
SIRT1	sirtuin 1
SJL	social jetlag (szociális jetlag)
SNS	sympathetic nervous system (szimpatikus idegrendszer)
SSC	side scatter (oldalra irányuló fényszórás)
TLR	toll-like receptor (<i>toll</i> -szerű receptor)
TNF α	tumor necrosis factor alpha (tumor nekrozis faktor alfa)

TRE	time-restricted eating (időben korlátozott étkezés)
TRF	time-restricted feeding (időben korlátozott etetés)
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1 (vaszkuláris sejtadhéziós molekula 1)
VE-cadherin	vascular endothelial cadherin (vaszkuláris endoteliális kadherin)
VIP	vasoactive intestinal peptide (vazoaktív intesztinális peptid)
VLA-4	very late antigen-4 (nagyon késői antigén 4)
VLF	very low frequency (0,0033-0,04 Hz) (nagyon alacsony frekvenciasáv)
WHO	World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)
ZT	Zeitgeber time (<i>Zeitgeber</i> idő)

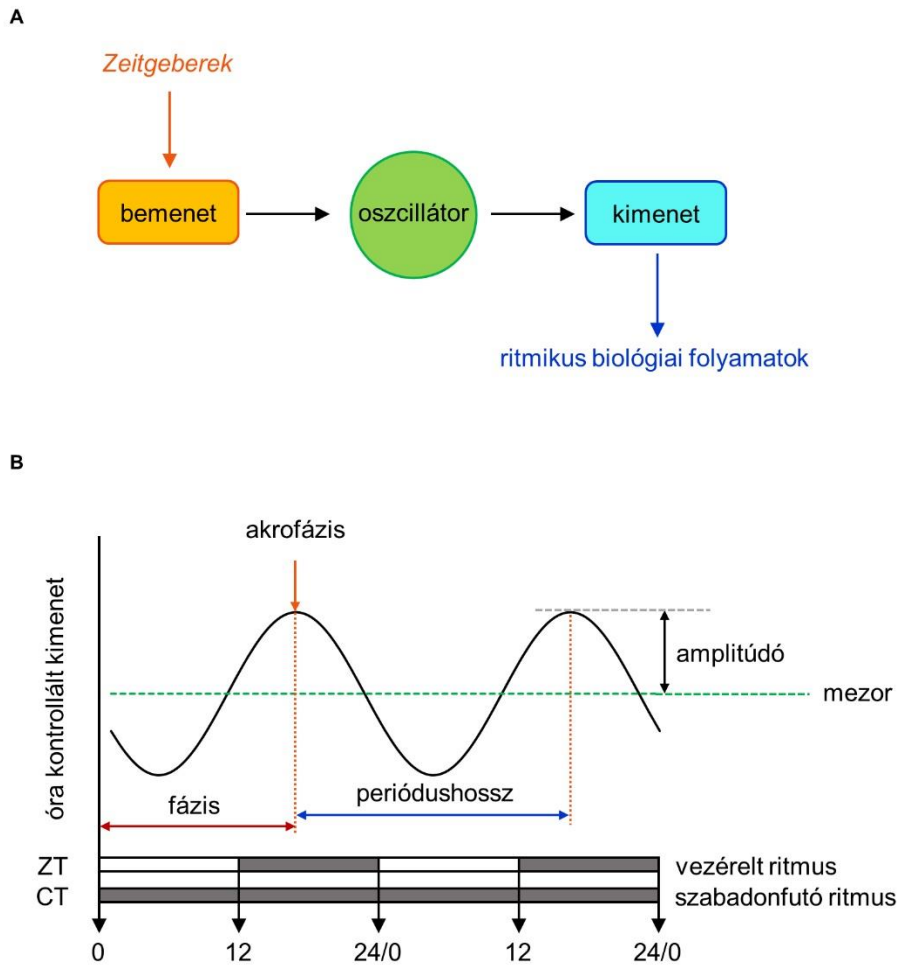
2. Bevezetés

A Föld tengely körüli forgása alapvetően befolyásolta az élőlények evolúcióját. Kialakult egy sejtszintű időmérő mechanizmus, a cirkadián óra, mely lehetővé teszi, hogy a szervezet előre felkészüljön a diurnális környezeti változásokra, ahelyett, hogy csak reagálna azokra. Ezáltal az élőlények képessé váltak viselkedésüket a külső környezet, így a fény-sötétség ciklusok, hőmérséklet, páratartalom, táplálékélérhetőség napszaki váltakozásaihoz igazítani, valamint belső biokémiai folyamataikat pontosan időzíteni, ami adaptációs előnyt biztosított számukra. A cirkadián órák jelentőségét mutatja, hogy a törzsféjlődés valamennyi szintjén megjelennek a cianobaktériumoktól kezdve az emberig (1).

2.1 A cirkadián ritmus jellemzői

Ahhoz, hogy egy ritmust cirkadiánnak tekinthessünk, meg kell felelnie bizonyos követelményeknek. Periódushossza körülbelül 24 óra, erre utal maga az elnevezés, ami a latin *circa* (körülbelül) és *dies* (nap) szavakból ered. A cirkadián ritmus konstans körülmények között, például állandó sötétségben is fennmarad (1. feltétel). Ez a tulajdonsága különbözteti meg más 24 órás ritmusoktól, melyeket külső tényezők periodikus változásaira adott válaszok hoznak létre. Állandó körülmények között szabadon futó ritmusról beszélünk, melynek periódushossza kissé eltér a 24 órától, emberek esetén hosszabb, mint egy nap, átlagosan 24,2 óra (2-4). Normál körülmények között a ritmus a külső környezethez igazodik (2. feltétel). A ciklikusan változó külső stimulusokat, melyek az óra fázisát állítani képesek *Zeitgebereknél* nevezzük, a német „időadó” szóból. A folyamat melynek során a *Zeitgeber* hatására a belső ritmus szinkronba kerül a külső környezettel az ún. *entrainment*. A cirkadián ritmusokat ezen túlmenően hőmérséklet kompenzáció jellemzi (3. feltétel). Ahhoz, hogy egy biológiai óra stabilan működhessen, fontos, hogy periódushosszát a hőmérséklet ne változtassa meg nagymértékben. A biokémiai reakciók hőmérsékletfüggését a Q10 értékkel jellemezhetjük, mely a reakciók adott hőmérsékleten, illetve attól 10 °C-kal alacsonyabb hőmérsékleten mért sebességének arányát adja meg. Míg a biokémiai reakciók esetében ez az érték általában 2-3 közötti, addig a cirkadián ritmusok Q10 értéke körülbelül 1 (5).

A sejtszinten működő cirkadián óra központi eleme a ritmust generáló oszcillátor, amelyet a bemeneti útvonalakon keresztül a *Zeitgeber*ek szinkronizálni képesek, és amelynek kimenetei a ritmikus biológiai folyamatok (1A ábra). Az ábra B részén egy reprezentatív oszcilláció látható, melyet a fázissal, a periódushosszal és az amplitúdóval jellemezhetünk. A fázis egy relatív pozíció, gyakran a biológiai aktivitás maximumának helyzete (akrofázis), melyet egy referenciaponthoz, például a fényszakasz kezdetéhez képest adunk meg. Két akrofázis közötti távolság a periódushossz, ami egy teljes ciklus ideje. A középvérték (mezor) és a csúcsvérték közötti különbség a ritmus amplitúdója. A cirkadián ritmusok vizsgálata váltakozó fény-sötétség ciklusok mellett, vagy állandó körülmények között (pl. teljes sötétségben) zajlik. Előbbi esetben az időt a fényszakasz kezdetétől számítva, mint *Zeitgeber time* (ZT) adjuk meg. 12 órás fény-sötétség ciklusok esetén ZT0 jelzi a fényszakasz, ZT12 a sötét szakasz kezdetét. Állandó körülmények között, szabadonfutó ritmus mellett a *circadian time* (CT) kifejezést használjuk. A szubjektív nappal CT0-kor, a szubjektív éjszaka CT12-kor kezdődik, a következő ciklus CT24/0-val indul.



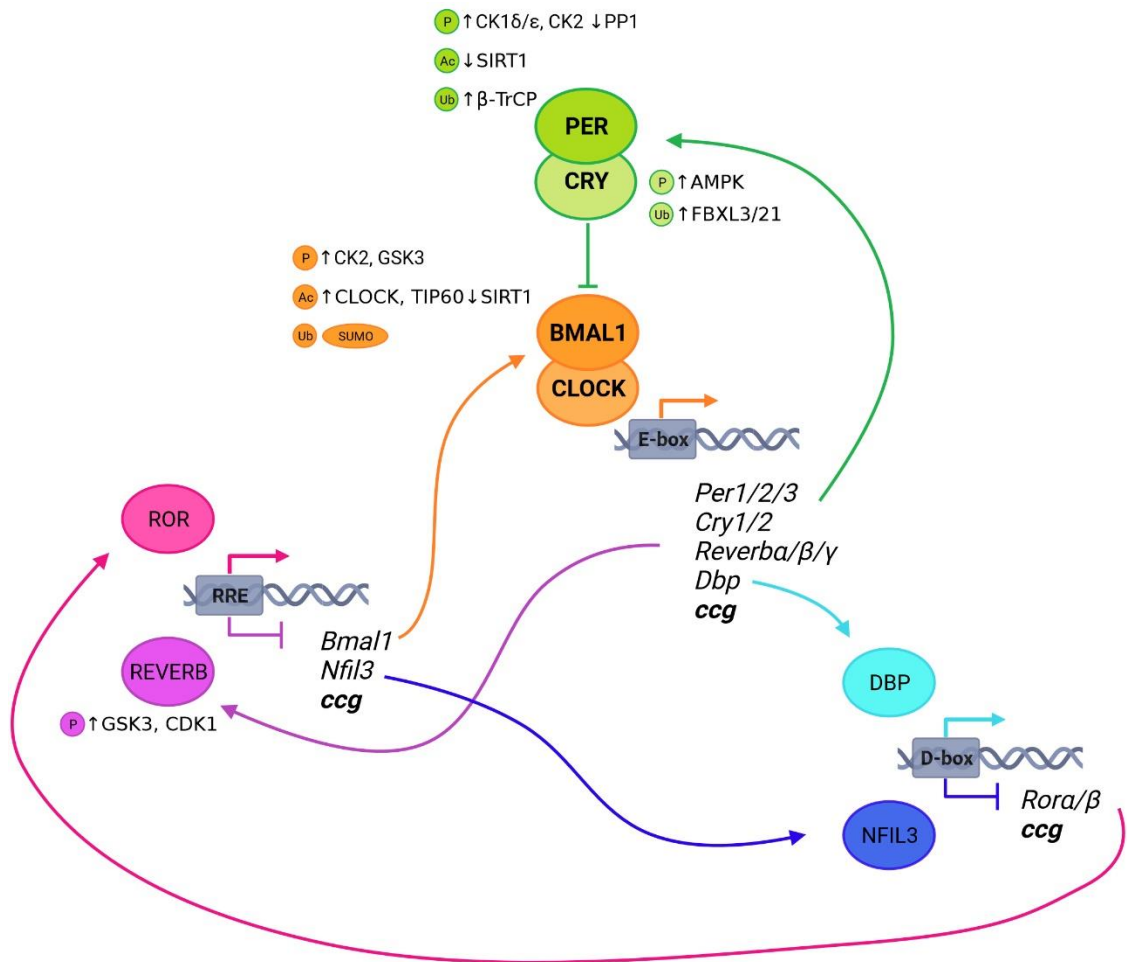
1. ábra: A cirkadián óra sematikus felépítése és a ritmus jellemzésére használt paraméterek

(A) A cirkadián óra központja az oszcillátor, melyet a bementi útvonalakon keresztül a *Zeitgeber* szinkronizálni képes, és amelynek kimenetei a ritmikus biológiai folyamatok.
 (B) A cirkadián ritmus jellemzésére használt paraméterek. Ábra (5) alapján. ZT=*Zeitgeber time*, CT=*circadian time*

2.2 Az emlős cirkadián óra molekuláris felépítése

A belső időmérés sejtszinten szerveződik, alapját transzkripció-transzlációs visszacsatolási hurkok alkotják. Általánosságban a visszacsatolás egyik szereplője a pozitív faktor, ami mint transzkripció faktor, indukálja a negatív faktor kifejeződését. A negatív faktor kellően magas koncentrációban gátolja a pozitív faktor további működését, ezáltal pedig saját maga keletkezését. A negatív faktorok érése és lebomlása után a pozitív faktor felszabadul a gátlás alól és egy újabb ciklus veszi kezdetét. Egy ciklus ideje a ritmus periódushosszával egyezik meg, azaz kb. 24 óra.

Emlősök esetében a központi hurok főszereplői a BMAL1 (brain and muscle ARNT-like protein-1) és CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput) transzkripciós faktorok (2. ábra). A BMAL1/CLOCK heterodimer az E-box promóter régióhoz kötődve aktiválja a *Period* (*Per1*, *Per2* és *Per3*) és *Cryptochrom* (*Cry1* és *Cry2*) géneket, melyek fehérje termékei gátolják a BMAL1/CLOCK komplex működését, ezáltal saját transzkripciójukat. A PER és CRY fehérjék szintjének csökkenésével a BMAL1/CLOCK felszabadul a gátlás alól és kezdetét veszi a következő ciklus. Ezen elsődleges negatív visszacsatolási struktúra mellett az óra működését további visszacsatolások stabilizálják. A BMAL1/CLOCK komplex irányítja a REVERB $\alpha/\beta/\gamma$ magreceptorok, valamint a DBP (D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein) kifejeződését is. A REVERB $\alpha/\beta/\gamma$ fehérjék gátolják a promóterükben RRE (REVERB/ROR response element) régiót tartalmazó gének, így a *Bmal1* valamint az *Nfil3* (nuclear factor, interleukin 3 regulated) átíródását. Az RRE régiókhoz kötődve a transzkripciós aktivátor ROR α/β (retinoic acid receptor-related orphan receptor) fehérjék elősegítik a génátíródást. A DBP a D-boxot tartalmazó gének, többek között a *Rora/\beta* átíródását serkenti, míg az NFIL3 gátolja a D-box-függő transzkripciót. Ennek a három egymással összekapcsolódó huroknak mindegyike szabályozza az ún. óra által kontrollált gének (clock controlled genes, ccg-k) transzkripcióját is, melyek működése végül a ritmikus fiziológiai folyamatokhoz vezet (6, 7).



2. ábra: Az emlős cirkadián óra molekuláris felépítése

Az emlős molekuláris órát egymáshoz kapcsolódó transzkripció-transzlációs visszacsatolási hurkok alkotják. Az elsődleges visszacsatolási struktúrában a BMAL1/CLOCK heterodimer aktiválja a *Per* és *Cry* géneket, melyek fehérje termékei gátolják a BMAL1/CLOCK komplex működését, ezáltal saját transzkripciójukat. Az RRE (REVERB/ROR response element) régió ható REVERB és ROR magreceptorok, illetve a D-box régió ható DBP és NFIL3 további szabályozó visszacsatolásokat hoznak létre. A szövetspecifikus cirkadián kimenet az óra által kontrollált gének (cgc-k) ritmikus kifejeződésének eredménye. Az óraműködés szabályozásában fontos szerep jut a poszttranszlációs módosításoknak is, melyek közül néhány az adott órafehérje mellett látható, P: foszforiláció, Ub: ubiquitináció, Ac: acetiláció, SUMO: szumoiláció, a poszttranszlációs módosítás hozzáadását (↑) és eltávolítását (↓) végző enzimmel együtt. Az ábra (6) alapján, BioRender programmal készült.

Az óraműködés szabályozásában fontos szerep jut a poszttranszkripció (8) és poszttranszlációs (9) módosításoknak. Utóbbiak alapvetően meghatározzák az órafehérjék stabilitását, aktivitását és sejten belüli elhelyezkedését. A poszttranszlációs módosítások közül néhány a 2. ábrán látható. Általánosságban elmondható, hogy a

periódushossz különösen érzékeny a PER fehérjék foszforiláltsági állapotára és a CRY fehérjék stabilitására. A PER foszforilációját a CK1 δ , CK1 ϵ és CK2 kazein kinázok végzik, mellyel a fehérje aktivitását és β -TrCP (beta-transducin repeats-containing protein) E3 ubiquitin ligáz általi proteozómális degradációját szabályozzák (10-15). Ezzel szemben a PER fehérjék lebomlását gátolja a foszoprotein foszfataz 1 (PP1) általi defoszforilációjuk (16). A PER2 degradációját segíti elő a sirtuin 1 (SIRT1) általi deacetiláció is (17). A CRY fehérjék stabilitását szintén meghatározza foszforiláltságuk (18). Az AMPK (adenozin-monofoszfát (AMP) által aktivált protein kináz) által foszforilált CRY fehérjék különböző E3 ubiquitin ligázok célfehérjéivé válnak (19-21). A BMAL1 szintén sokféle poszttranszlációs módosításon eshet át. A CK2 α általi foszforiláció elősegíti a sejtmagbeli felhalmozódását, míg a GSK3 (glikogén szintáz kináz 3) által más pozíciókban végzett foszforiláció a degradációjához vezet (22-24). Ezen felül szumoiláció és ubiquitináció is szabályozza a szintjét (25, 26), valamint acetiláltsági állapota befolyásolja transzkripciós aktivitását. A BMAL1 CLOCK általi acetilációja elősegíti a CRY1-el történő interakciót, míg a SIRT1 általi deacetiláció ezzel ellentétesen hat (27, 28). A REVERB α foszforilációja és a különböző E3 ligázok általi degradációja befolyásolja a cirkadián periódus hosszát és az amplitúdót is. A REVERB α -t a GSK3 általi foszforiláció védi a lebontástól, ellentétben a fehérje ciklin-dependens kináz 1 (CDK1) általi foszforilációjával (29-31). A poszttranszlációs módosítások, függően a módosítás minőségétől, pozíciójától és még az azt végző enzim variánsaitól is, számos lehetőséget biztosítanak az óra kinetikájának szabályozására. Ehhez hozzájárul még a transzkripciós faktorok ritmikus kötődése és az enhanszer régiók ritmikus hiszton-modifikációi (32), valamint az RNS polimeráz II DNS-hez történő cirkadián kötődése (33, 34) is. Ezenfelül a kromatin konformációjának ritmikus változása is befolyásolja az enhanszerek és promóterek közötti kölcsönhatásokat, és ezen keresztül hatással van a cirkadián ritmus periódushosszára is (35, 36).

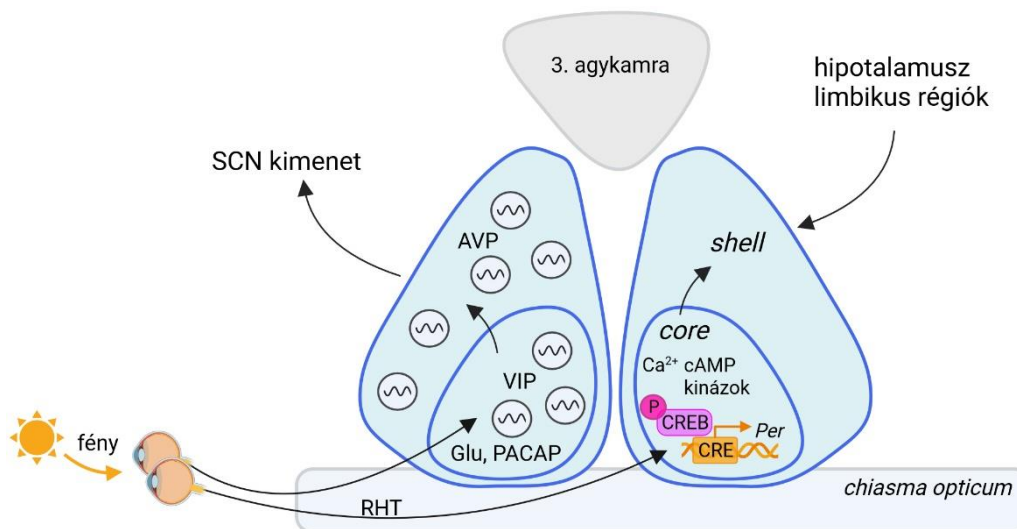
Az óra a fenti molekuláris mechanizmus szerint működik az egész szervezetben, azonban az általa kontrollált gének száma és fázisa is különbözik az egyes szövetekben, köszönhetően az óragének további szövetspecifikus transzkripciós faktorokkal való kölcsönhatásának (6). Ez a sejtszintű és önfenntartó óraműködés végül egy sejt, szövet és szervezet szinten kontrollált komplex rendszerré áll össze, amely biztosítja számos élettani folyamat aktivitásának megfelelő változását a nap folyamán.

2.3 A központi óra

Emlősökben a cirkadián óra hierarchikus felépítésű. A *nucleus suprachiasmaticusban* (SCN) található központi óra felelős a külső környezettel történő szinkronitásért és a fény-sötétség információ továbbításáért, valamint a hormonális és viselkedési ritmusok kialakításáért. Az SCN egy páros mag, ami az anterior hipotalamuszban helyezkedik el, közvetlenül a *chiasma opticum* felett, a III. agykamra két oldalán (37). Az SCN-t egy központi (*core*) és egy héj (*shell*) részre osztjuk (3. ábra). Az SCN *core* területén vazóaktív intesztinális peptidet (VIP) expresszáló sejtek találhatóak, melyeknek kiemelt szerepük van a retinából érkező fény-információ fogadásában és a szinkronitás kialakításában. A *shell* régió arginin-vazopresszint (AVP) expresszáló neuronokban gazdag, beidegzést kap a hipotalamusz, a limbikus régiók, valamint az SCN *core* felől, és a többi agyterület, illetve a perifériás órák fázisának beállításáért felel (38).

A ritmus lefutásának módosításáért felelős fény érzékelését a retinában található speciális, melanopszint (OPN4) tartalmazó ganglion sejtek (intrinsically photosensitive retinal ganglion cell, ipRGC) végzik, melyek a retinohipotalamikus pályán (*tractus retinohypothalamicus*, RHT) érik el az SCN-t. A pálya legfontosabb neurotranszmitterei a fény hatására felszabaduló glutamát és PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide), melyek kináz alapú jelpályákat aktiválnak, ezáltal megemelkedik többek között az intracelluláris Ca^{2+} és a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szintje. A folyamat végeredménye a *per1/2* gének CREB (cAMP response element-binding protein) mediált indukciója (37).

Az SCN fény általi aktivációja fázisfüggő, a hajnalban, illetve az alkonyatkor érzékelt fény jelentős hatással bír az óra fázisára, míg napközben ez a hatás igen kicsi. A hajnali fény az óra fázisát előrébb állítja, míg a kora esti fény az órát késlelteti (39). Mindezen folyamatok eredményeképp az SCN oszcillátora szinkronba kerül a szoláris idővel.



3. ábra: Az SCN sematikus felépítése

Az SCN egy központi (*core*) és egy héj (*shell*) részre osztható. A fényinformáció a retinából a *core-t* beidegző retinohypotalamikus pályán (RHT) érkezik. A *shell* régió beidegzést kap a hipotalamusz, a limbikus régiók és az SCN *core* felől, és a többi agyterület, illetve a perifériás órák fázisának beállításáért felel. Az ábra (40) alapján, BioRender programmal készült. SCN=*nucleus suprachiasmaticus* PACAP=pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, VIP=vasoactive intestinal peptide, AVP=arginine vasopressin, CRE=cAMP responsive element CREB=CRE-binding protein

2.4 A perifériás órák, az idegi és hormonális ritmusok

1998-ban írták le elsőként a cirkadián óra jelenlétét kultúrában fenntartott sejtekben (41). Azóta bebizonyosodott, hogy a cirkadián óra nem csak az SCN-ben működik, hanem gyakorlatilag minden perifériás sejtben megtalálható. Egereken végzett RNS szekvenáláson alapuló vizsgálatok alapján a fehérje-kódoló gének 43%-áról történik ritmikus transzkripció legalább egy szövetben (42). Ennél is jelentősebb az a tanulmány, melynek során egy diurnális főemlős, a pávián 22 szövetét vizsgálva a fehérje kódoló gének 82%-ának esetében mutatták ki az expresszió napi ritmusát legalább egy szövetben (43). A periférián található órák szinkronizációjához az SCN működése szükséges (44).

A fényinformációt az SCN neurális és hormonális utakon, valamint diffúzibilis faktorok segítségével továbbítja. Az SCN efferens rostjai révén a központi idegrendszer több régiójával közvetlen vagy közvetett kapcsolatban áll, többek között a hipotalamuszal, a hipofízissel, a tobozmiriggyel és a limbikus rendszerrel, a perifériás szerveket pedig sok esetben az autonóm idegrendszeren keresztül éri el (40). Az autonóm idegrendszer ritmikus aktivitása fontos szerepet tölt be például a mellékvese, a csontvelői

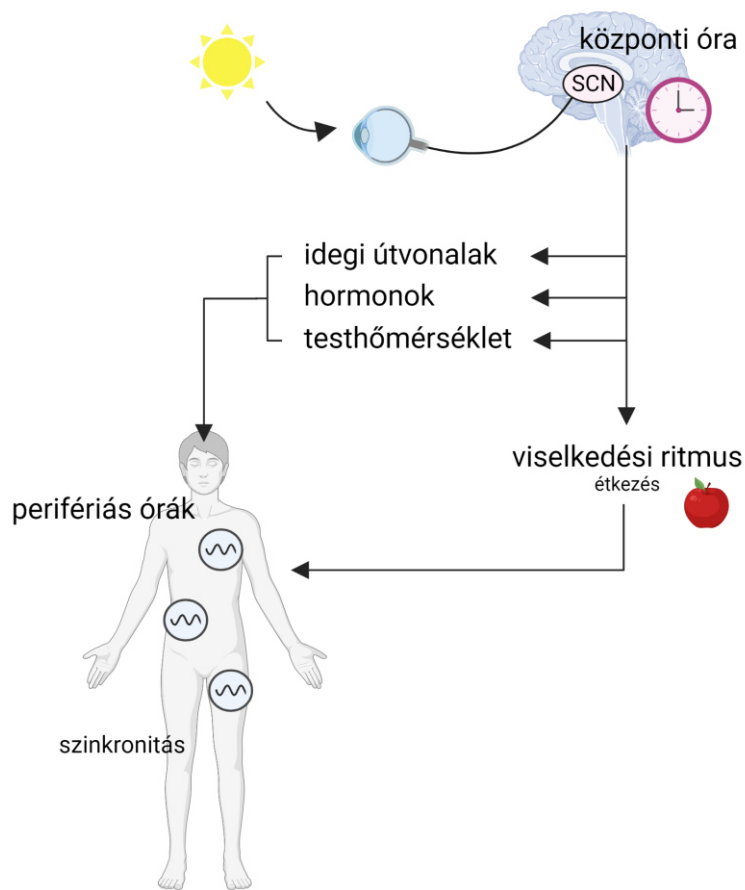
mikrokörnyezet vagy a szív működés szabályozásában. Kiterjedt idegi hálózatán túl az SCN a környező agyi területekkel parakrin faktorokkal is kommunikál, melyek révén a lokomotoros aktivitás ritmusát szabályozza (45). Az SCN megannyi hormon ritmikus szekréciójáért felel, ilyen például a melatonin, a kortizol (egerek esetén a kortikoszteron), a növekedési hormon vagy a prolaktin. A melatonin a tobozmirigyben termelődik cirkadián szabályozás alatt, mennyisége mind nokturnális, mind diurnális élőlényekben az éjszaka közepén, 24:00 és 3:00 között éri el a maximumát, termelődését és szekrécióját a fény gátolja (46). A melatonin receptorai (MT1 és MT2) a G-fehérje kapcsolt receptorok családjába tartoznak, az emlősök szervezetében sok szövetben megtalálhatóak, és nagy mennyiségben jelen vannak az SCN-ben is. A melatonin pozitív visszacsatolást biztosít az SCN számára, az MT1 receptoron keresztül gátolja az SCN neuronok tüzelését, míg az MT2 receptorokon keresztül az óra fázisát képes befolyásolni (47). Ennek megfelelően az exogén melatonin képes a cirkadián órát szinkronizálni (48-50), valamint az óra fázisát átállítani (51).

A kortizol a mellékvesekéregből szabadul fel az adrenokortikotrop hormon (ACTH) hatására. Az SCN egyrészt a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengelyen keresztül szabályozza az ACTH szekrécióját, másrészt az autonóm idegrendszeren keresztül befolyásolja a mellékvese ACTH érzékenységét (52). A kortizolszekréció kora reggel (nokturnális élőlények esetén kora este) éri el a maximumát (53). A glükokortikoid receptorok (GR) az SCN kivételével szinte minden szövetben megtalálhatóak (54). A glükokortikoidok a GR-hoz kötődve az óragénekre gyakorolt direkt hatáson keresztül befolyásolják a perifériás szövetek óraműködését (55, 56). A GR agonista dexametazon segítségével a kultúrában fenntartott sejtekben működő egyedi órák szinkronizálhatóak (54).

Az SCN a neurális és hormonális utakon felül a testhőmérséklet szabályozásán keresztül és a viselkedési ritmus befolyásolásával is hatással van a perifériás órák működésére. Emlősökben a testhőmérséklet az aktív fázis végéig emelkedik, majd az inaktív fázis során csökken, minimumát kb. 3 órával az ébredés előtt éri el (57). Az SCN rezisztens a hőmérséklet változásával szemben, azonban a perifériás órák fiziológiás hőmérséklet ciklusokkal szinkronizálhatóak (58, 59). A folyamatban szerepe van a cirkadián aktivitást mutató HSF1 (heat shock factor 1) transzkripció faktorának, valamint a CIRP (cold-inducible RNS-binding protein) általi transzlációs szabályozásnak (60-62).

Ezenfelül az SCN az alvás-ébrenlét szabályozásán keresztül befolyásolja a viselkedési ritmust és az étkezés idejét. Utóbbi fontos szinkronizáló stimulus számos perifériás szerv, elsősorban a máj számára. Kizárólag az inaktív fázisuk alatt, azaz nappal etetett egerekben a máj órája és az SCN óraműködése szétkapcsol, a máj órájának fázisa (a *Per1/2/3*, *Cry1*, *Dbp*, és *Reverba* expresszió fázisa) 12 órával eltolódik az SCN fázisához képest, mely utóbbira az étkezés időzítésének nincsen hatása (63). Az étkezés során felszabaduló hormonok és metabolitok, valamint a megváltozott redox-állapotok mind visszacsatolást biztosíthatnak az óra számára. Az inzulin hatására a májban kináz-függő jelpályák (Akt, MAPK (mitogén-aktivált protein kináz), PI3K (foszfátidilinozitol 3-kináz) útvonalak) aktiválódnak melyek az óraműködés elemeinek poszttranszkripció és poszttranszlációs módosításaihoz vezetnek (64). A sejt metabolizmustól függő oxidációs állapota (pl. nikotinamid-adenin-dinukleotid, NAD⁺/NADH hányados) is hatással van az óra működésére. A NAD⁺ szinttől függő deacetiláz SIRT1 a PER fehérjék degradációját segíti elő (17). Az ATP (adenozin-trifoszfát) érzékelő AMPK a CRY1 foszforilációjával és destabilizációjával biztosítja a sejt tápanyag ellátottsága és az óraműködés közötti kapcsolatot (18). A sejtek metabolizmusának és élettanának egyik központi regulátora, az mTOR (mammalian target of rapamycin) fehérje az óragének kifejeződésére gyakorolt hatásán keresztül szintén összeköttetést biztosít a metabolizmus és az óraműködés között (65).

A különböző szinkronizációs mechanizmusok eredőjeként a perifériás szövetek órái egymáshoz és a központhoz képest is optimális fázisban járnak, ami elengedhetetlen a szervezeti szintű egészséges működéshez (4. ábra).



4. ábra: A cirkadián óraműködés hierarchikus szerveződése

A *nucleus suprachiasmaticus*ban (SCN) található a központi óra, ami a retinából érkező fényinformáció segítségével igazodik a külső környezethez. Az SCN neurális és hormonális utakon, valamint a testhőmérséklet változásán keresztül szinkronizálja a perifériás órákat. Ezen felül az SCN a viselkedési ritmusok kialakításáért is felelős, így befolyásolja például az étkezés idejét, ami fontos szinkronizáló stimulus az anyagcserezervek számára. A cirkadián órák összehangolt működése elengedhetetlen a szervezeti szintű egészséges működéshez. Az ábra (37, 66) alapján, BioRender programmal készült.

2.5 Az alvás-ébrenléti ritmus és a kronotípus

Az emberi fiziológiában legtöbbet vizsgált ritmusos működés az alvás-ébrenlét váltakozása. Az alvást cirkadián és homeosztatikus tényezők együttesen szabályozzák. Az alvásszabályozás két-folyamat modelljének (*two-process model*) elemei az órafüggő cirkadián folyamat (*process C*) és az alvás- és ébrenlétfüggő homeosztatikus folyamat (*process S*) (67). A cirkadián rendszer a nap során egy ébrenléti jelet (*wake-promoting signal*) biztosít, ami este hirtelen csökken, miközben a melatonin szintje emelkedik és a testhőmérséklet csökken. Az alvás homeosztatikus szabályozó rendszere az ébren töltött

időt méri. Ahogy növekszik az ébren töltött idő, növekszik az alvási igény is, melynek mértéke az alvás során aztán gyorsan csökken (68). A pihentető éjszakai alváshoz és a nappali ébrenléthez a két folyamat megfelelő összjátéka szükséges (69).

Az alvás és az aktivitás időzítését, mely nagymértékben tükrözi az egyéni cirkadián jellemzőket, úgymint a periódushosszt és az *entrainment* fázisát, a kronotípussal jellemezzük (70, 71). Kronotípusuk szerint az emberek korai, késői és a kettő közötti intermedier típusba sorolhatóak. A kronotípus meghatározására a Roenneberg és munkatársai által kifejlesztett MCTQ (Munich Chronotype Questionnaire) kérdőív alapján meghatározható alvási középídjőt használjuk (70). A kérdőív egyszerű kérdéseket tartalmaz az alvás időzítéséről (úgymint mikor fekszik le, mennyi idő alatt alszik el és mikor kel fel az egyén), külön-külön a munka- és szabadnapokra vonatkozóan. A kronotípus a szabadnapi alvási középídjő (mid-sleep on freedays, MSF) alvási hiányra, a szabadnapokon mérhető megnövekedett alváshosszra korrigált értéke (sleep corrected MSF, MSFsc), amit a helyi idő szerint óra:perc-ben fejezünk ki. Egy átlagos esetben, például ha valakinek 3:30 a kronotípusa, az azt jelenti, hogy 8 óra alvás esetén szabadnapokon 23:30-kor fekszik le és 7:30-kor ébred.

A kronotípus egy dinamikus, adott környezetben jellemző biológiai sajátosság, amit belső és külső tényezők egyaránt befolyásolnak. A társadalomban a kronotípus normál eloszlást követ, a korai „pacsirta” és a késői „bagoly” típusok között folyamatos az átmenet, leggyakoribb az intermedier típus (70). Családi- és ikerkutatások alapján feltételezhető, hogy a kronotípusban megfigyelhető variabilitásért kb. 50%-ban a genetika felelős (72-74). Az elmúlt években nagy elemszámú mintákon végzett teljes genom asszociációs vizsgálatokkal egyre több lókuszt azonosítanak, melyek kapcsolatba hozhatóak a kronotípussal, köztük több találat is érinti a központi órakomponenseket, például a *per1/2/3*, *cry1* és *bmall* géneket (75, 76). A kronotípust jelentősen befolyásolja továbbá a kor és a nem. A gyermekek nemtől függetlenül korai típusúak, majd fejlődésük során fokozatosan későbbé válnak, míg 20-as éveikben kronotípusuk eléri a maximumát, ami után az idő előrehaladtával ismét koraiabbakká válnak (77). A férfiak egész felnőtt korukban átlagosan későbbi típusúak, mint a nők. Ez a nemek közti különbség 50 éves kor körül tűnik el, ami egybeesik a menopauza átlagos idejével. 60 év fölött az emberek átlagosan még koraiabbak lesznek, mint a gyermekek. A kronotípus koraal történő szisztematikus változása és a nemek között a pubertás és a menopauza közötti időszakban

megfigyelhető különbségek arra utalnak, hogy a kronotípus korral történő változása mögött endokrin faktorok is állhatnak (78).

Mivel a kronotípust mindig a helyi idő szerint fejezzük ki, így azt meghatározza az egyén földrajzi helyzete is. Míg biológiai óránkat a napfény állítja és a Nap nyugat felé haladva hosszúsági fokonként 4 perccel később kel, addig a szociális óra adott időzónán belül nem változik. Ennek megfelelően adott időzónán belül minél nyugatabbra vagyunk, annál későbbi a kronotípus átlagos értéke (78, 79).

2.6 A cirkadián ritmuszavarok és egészségügyi jelentőségük

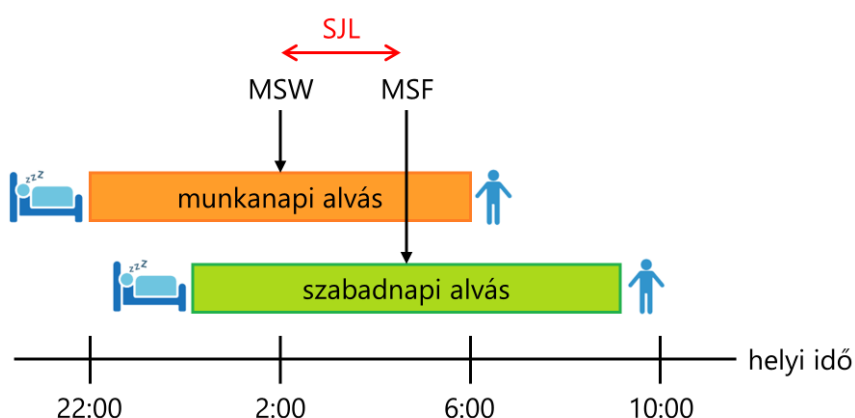
A cirkadián ritmuszavarok széles skálán helyezkednek el aszerint, hogy endogén, vagy külső környezeti és szociális hatások eredményezik őket. Endogén okok közé tartoznak az óragének polimorfizmusai és mutációi, melyek eredményeképpen a periódushossz lerövidül vagy meghosszabbodik. A familiáris előretolt alvásfázis szindrómában (familial advanced sleep phase syndrome, FASPS) érintettek esetében a periódushossz 3-4 órával rövidebb az átlagosnál, és emiatt a szociális normánál jóval korábban alszanak el és ébrednek fel (14). A FASPS hátterében többféle mutációt azonosítottak. Egy pontmutáció a PER2 CK1 ϵ -kötő régiójában (14), illetve a CK1 δ *missense* mutációja (80) is befolyásolja a PER2 foszforiláltsági állapotát és a periódushossz lerövidülését eredményezi. Egy másik pontmutáció a *cry2* génben megváltoztatja a fehérje konformációját és megnöveli affinitását az FBXL3 (E3 ubiquitin ligáz) felé, ezáltal elősegítve a CRY2 degradációját (81). A FASPS-nál kevésbé jól karakterizált, azonban több embert érintő probléma a késleltetett alvásfázis zavar (delayed sleep phase disorder, DSPD), melynek hátterében a *clock* és *per3* gének polimorfizmusai állhatnak (82, 83). A DSPD-t az inszomnia egy fajtájaként tartják számon, amelyet a szociális normához képest rendszertelen és késői elalvás jellemez (84). Teljes vakság esetén figyelhető meg nem 24 órás alvás-ébrenlét zavar (non-24-hour sleep-wake disorder, N24SWD). Ebben az esetben az SCN nem tud szinkronba kerülni a szoláris idővel, így a cirkadián rendszer a 24 óránál hosszabb endogén periódushossza szerint működik, és az alvás időzítése folyamatosan elcsúszik a szociális órához képest (85).

A külső környezet miatt bekövetkező cirkadián ritmuszavarok tipikus példája a *jetlag*. *Jetlag* esetén a gyors időzónaváltás következtében elcsúszik egymástól az endogén idő és a külső környezetre jellemző idő. A *jetlag* tünetei a késői elalvás vagy korai ébredés

(keleti, illetve nyugati irányba történő utazáskor), a fragmentált alvás, csökkent fizikai és mentális teljesítőképesség napközben, fáradtság, ingerlékenység és esetenként gyomorbél panaszok is (86). A modern társadalmak sok területen megkívánják a folyamatos munkavégzést, ami váltott műszakokkal valósítható meg. A különböző típusú váltott műszakban végzett munkák mellett az alvás-ébrenlét időzítése és a fény-sötétség viszonyok megváltozása is a cirkadián óra és a külső környezet közötti deszinkronizációhoz vezet. Éjszakai munkavégzés esetén a melatonin, kortizol, illetve a testhőmérséklet ritmusának fázisa alig változik, miközben amplitúdójuk csökken (87). A perifériás szövetek – pl. mononukleáris-, szájnyálkahártya- és szakáll szőrtüsző sejtek – ritmusának amplitúdója csökken, fázisa eltolódik, így a központi és perifériás órák szinkron működése megszűnik (88-90). A váltott műszakban végzett munka számos krónikus betegség kialakulásának rizikóját növeli. Az éjszakai munkavégzés növeli az emlőrák kockázatát (91-93), de kapcsolatba hozható a prosztaták és a vastagbélrák kialakulásával is (94-97). A váltott műszakban végzett munka, illetve a *jetlag* szimulációja gyorsítja az emlő-, tüdő- és csontokrák egérmodelljeiben a tumorfejlődést (98-100), illetve spontán kialakuló hepatocelluláris karcinomához vezet (101). A váltott műszakú munkavégzés növeli továbbá a kardiometabolikus zavarok kialakulásának kockázatát (102), többek között az elhízásét (103), a metabolikus szindrómáét (104, 105), a 2-es típusú diabéteszét (106, 107) és a kardiovaszkuláris betegségeket (108). Ezenfelül negatív hatással van a mentális egészségre és az általános közérzetre is (109, 110).

Nappali munkarend mellett is megfigyelhető az alvás eltérő időzítése hétköznapokon és hétvégén. Hétvégén, kötöttségek nélkül mindenki egyéni preferenciája, kronotípusa szerint időzítheti alvását. Ezzel szemben munkanapokon a szociális megkötések, a munka- vagy iskolakezdés ideje, azaz a szociális óra határozza meg az ébredés idejét. A munka- és szabadnapok között több órányi különbség lehet az alvás időzítésében, ez azzal egyenértékű, mintha minden hétvégén időzónákat utaznánk át. Emiatt a jelenséget szociális *jetlagnek* (social jetlag, SJL) nevezték el (5. ábra) (111). Az utazók által tapasztalt *jetlag* átmeneti, a biológiai óra napokon belül szinkronizálódik a megváltozott környezethez. Ezzel szemben a szociális *jetlag* krónikusan jelen lehet az egyén életében a kötelező tanulmányok, illetve a kötött idejű munkakezdés miatt. A nappali munkát végző társadalom csupán 13%-a nem szenved szociális *jetlagtól*, ami érzékelteti a cirkadián zavarok eme formájának népegészségügyi jelentőségét (112). Az

SJL összefüggést mutat metabolikus változásokkal, növeli az elhízás (112-114) és a 2-es típusú diabétesz rizikóját (115). Nagyobb SJL mellett alacsonyabb HDL-koleszterin és magasabb összkoleszterin, triglicerid és éhomi glükózsintek mérhetőek (116, 117). Ezen túlmenően az SJL mértéke korrelál a depresszió súlyosságával (118) és a figyelemhiányos hiperaktivitás-zavar (attention deficit hyperactivity disorder, ADHD) tüneteivel (119), továbbá negatívan befolyásolja a tanulmányi teljesítményt is (79, 120, 121).



5. ábra A szociális *jetlag*.

A leggyakoribb cirkadián ritmuszavar a szociális *jetlag* (SJL), az alvás időzítésének munka- és szabadnapi különbsége, melyet az egyén saját ritmusa és a szociális megkötések közötti ellentét okoz. A szociális *jetlaget* a szabadnapi alvási középítő (mid-sleep on free days, MSF) és a munkanapi alvási középítő (mid sleep on workdays, MSW) különbségeként órában és percben fejezzük ki. Az ábra (111) alapján készült.

Külső környezeti változás a tavaszi óráátállítás is, mely során a szociális órát előbbre állítjuk, miközben a szoláris óra nem változik. A nyári időszámítás során a későbbi sötétedésnek köszönhetően későbbre tolódik a biológiai óra fázisa, nő a cirkadián eltolódás és a szociális *jetlag* mértéke (122). Az óráátállítás akut hatása pedig megjelenik a balesetek, a hospitalizációk és a kardiovaszkuláris események megnövekedett számában (123-126). Kronobiológiai szempontból mindenképpen a tavaszi óráátállítás megszüntetése lenne kedvező (127).

Elektromos világítás nélkül élő társadalmakban az ébredés ideje a napfelkeltehez igazodik (128). A vidéki társadalmakban, ahol nagyobb a természetes megvilágítás alatt töltött órák száma és különösképpen a kora reggel természetes fényben töltött idő, a korai kronotípus gyakorisága nagyobb, míg a szociális *jetlag* mértéke kisebb, mint városi körülmények között (129). A modern társadalmakban az épületekben, korlátozott

természetes fény mellett töltött idő és a mesterséges világítás együttesen gyengítik a fény, mint *Zeitgeber* amplitúdóját és későbbre tolják az emberek kronotípusát (130). Mindemellett az egyéni fényérzékenység is változó, ugyanolyan erősségű fényexpozíció hatására bekövetkező melatonin szuppresszió mértékében jelentős interindividuális különbségek lehetnek (131-133). A késői kronotípusúak ráadásul nagyobb mértékben vannak kitéve esti megvilágításnak, ami még későbbre tolja a cirkadián ritmusuk fázisát (69). A cirkadián ritmuszavarokat a belső és külső tényezők komplex összjátéka eredményezi.

Mára már egyértelmű, hogy a cirkadián zavarok komoly hatással vannak mind a testi, mind a lelki egészségünkre. A cirkadián mechanizmus alapvetően hozzájárul a szövetek, szervek fiziológiás működéséhez, így zavara változatos metabolikus, kardiovaszkuláris, immunológiai, neurodegeneratív eltérésekhez, pszichés problémákhoz vezet, és növeli a rosszindulatú daganatok kialakulásának valószínűségét. *Vice versa*, különböző patológiás állapotok negatívan hathatnak az óraműködésre, aminek következtében sok krónikus betegség jár alvászavarral.

2.7 A cirkadián ritmus néhány kiemelt élettani vonatkozása

A továbbiakban a cirkadián óra élettani hatásait a dolgozatban szereplő vizsgálatok szempontjából fontos területek, a szív- és érrendszer, az anyagcsere és az immunrendszer vonatkozásában szeretném bemutatni.

2.7.1 A kardiovaszkuláris rendszer cirkadián vonatkozásai és a szívfrekvencia variabilitás

Az éjszaka során csökken a szívfrekvencia, a vérnyomás és a perctérfogat, míg ébredéskor hirtelen nő a szimpatikus aktivitás (134). Ezeket a napszaki ingadozásokat sokáig egyszerűen a viselkedési minta, a fizikai aktivitás időbeli változásával magyarázták, azonban laboratóriumi, konstans körülmények között bebizonyosodott, hogy a keringési rendszer számos komponensének ritmusa endogén eredetű. Így például a vérnyomás (135, 136), a szívfrekvencia (137), a keringő adrenalin és noradrenalin szintek (136, 138) és a vérlemezkék aggregációs készsége (139) is cirkadián ritmussal rendelkezik. A szív- és érrendszerben megfigyelhető napszaki ingadozások elsősorban az autonóm idegrendszer ritmikus aktivitását tükrözik. A szív autonóm idegi szabályozása

a szívfrekvencia variabilitáson (heart rate variability, HRV) keresztül jól vizsgálható. A szimpatikus és paraszimpatikus idegi impulzusok ütésről ütésre határozzák meg a szívfrekvenciát, aminek következtében két egymást követő R hullám között eltelt idő folyamatosan változik. Az ütések közötti idő változékonyságát, ezen keresztül pedig az autonóm idegrendszer aktivitását jellemzi a HRV. A szívfrekvencia és a szívfrekvencia variabilitás nappal magasabb, éjszaka alacsonyabb, mely változások mögött a cirkadián óraműködés és az alvás/ébrenlét ciklusok állnak (138, 140, 141). Az alvás során a HRV a különböző alvófázisokkal szinkronban változik. Az alvás szerkezetében REM (rapid eye movement) és NREM (non-REM) stádiumokat különböztetünk meg. A REM alvást gyors szemmozgások és alacsony izomtónus jellemzi, míg a NREM stádiumban nincsenek szemmozgások és az izomtónus kifejezettebb. A NREM alvást további szakaszokra oszthatjuk, a felületes N1, N2 szakaszokra, valamint a mély- vagy lassú hullámú alvásra (N3). Az alvás során a három NREM és a REM szakasz ciklikusan követi egymást, melyek során a HRV is változik, mértéke a mély alvás felé folyamatosan növekszik. Ezen túlmenően a HRV mértéke jellemző az általános kardiovaszkuláris állapotra, a szabályozás rugalmasságára. Az egészséges autonóm szabályozást a magasabb HRV jelzi, amit a paraszimpatikus dominancia eredményez, míg az alacsony HRV csökkent paraszimpatikus és fokozott szimpatikus aktivitásra utal, ami a kardiovaszkuláris megbetegedések ismert rizikófaktora (142, 143).

Az alvás és a cirkadián folyamatok kölcsönösen szabályozzák a kardiovaszkuláris rendszert és komoly szerepük van a szívbetegségek megelőzésében (144). Az akut kardiovaszkuláris események, a stroke (145, 146), a miokardiális infarktus (147-149), a kamrai ritmuszavarok (150) és a hirtelen szívhalál (148, 151) előfordulása reggel gyakoribb, továbbá a nap többi részéhez képest a reggel elszenvedett szívroham kimenetele kedvezőtlenebb és az infarktus mérete is nagyobb (152). A cirkadián szabályozás következtében ugyanazon körülményre (például testhelyzet változtatásra) a nap különböző szakaszaiban eltérő intenzitással válaszol a szív- és érrendszer (136, 153, 154), ami egészséges emberek esetében előnnyel jár, azonban kardiovaszkuláris rizikóval élőknel hozzájárul ahhoz, hogy a kardiovaszkuláris események a nap bizonyos időszakaiban nagyobb gyakorisággal fordulnak elő.

A cirkadián ritmus zavarai pedig növelik a kardiovaszkuláris megbetegedések (cardiovascular disease, CVD) rizikóját, amellett, hogy hajlamosítanak a metabolikus

elváltozásokra (például elhízásra) és az immunrendszer működését a gyulladás irányába terelik, amivel szintén hozzájárulnak a szívbetegségek kialakulásához. Epidemiológiai vizsgálatok alapján a váltott műszakú munkavégzés növeli a stroke (155) és a szívkoszorúér betegségek rizikóját (108, 156), továbbá az éjszakai műszakban a dolgozók vérnyomása magasabb, mint a nappali műszakban végzett munka esetén (157, 158). Laboratóriumi körülmények között, szimulált éjszakai munkavégzés hatására növekedett a résztvevők vérnyomása és csökkent az alvás alatti szívfrekvencia-esés mértéke, továbbá megemelkedett a CVD patomechanizmusában is fontos gyulladásos markerek (C-reaktív protein, tumor nekrosis faktor alfa (TNF α), rezisztin és interleukin-6 (IL-6)) szintje a vérben (159).

A cirkadián ritmuszavarok ráadásul sokszor alváshiánnyal járnak együtt. A rövid alvás a ritmuszavartól függetlenül is növeli a magas vérnyomás és a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásának valószínűségét (160-163). A különböző alvási rendellenességek, mint például az inszomnia (164), a periodikus lábmozgás zavar (165) és az alvásfüggő légzészavarok (166, 167) szintén rizikófaktorok a CVD szempontjából. Ezek a kórképek jellegzetesen gyakori ébredésekkel és az alvás hosszának csökkenésével, rossz alvásminőséggel járnak együtt. Az alvás közbeni mikroébredések igénybe veszik a kardiovaszkuláris rendszert, a szívfrekvencia, a vérnyomás és a szimpatikus aktivitás átmeneti megugrását okozzák (168, 169), míg az alvás mélyülésével az autonóm egyensúly a paraszimpatikus dominancia felé tolódik, ami helyreállító és védő hatással bír a szív- és érrendszerre (170).

2.7.2 Az anyagcsere cirkadián szabályozása

A metabolizmus kifejezett cirkadián ritmussal rendelkezik, amit a sejtszintű óramechanizmus és az étkezés ritmusa együttesen befolyásol. A cirkadián óra lehetővé teszi az összeférhetetlen biokémiai folyamatok időbeli elkülönülését és segít az anyagcsere útvonalak komponenseinek kifejeződését a szubsztrát elérhetőséghez vagy a metabolikus szükséglethez igazítani. Az anyagcsere útvonalak számos kulcsmolekulája és a sejt tápanyag szenzorai a központi óraműködésre is hatással vannak, kapcsolatot biztosítva a sejtanyagcsere és a cirkadián óra között (171).

Az óra és a metabolizmus viszonya megmutatkozik a különböző szövetspecifikus vagy teljes óragén hiányos egérmodellekben, melyek gyakran mutatnak metabolikus

eltéréseket, köztük a glükóz és lipid homeosztázis zavarát és inzulinrezisztenciát (172-176). Fordítva, az elhízás és más metabolikus eltérések modelljeiben az étkezés ritmusának felborulása és az óraműködés zavara figyelhető meg. Diéta indukált elhízás (diet induced obesity, DIO) modellben az egerek a táp nagy részét az inaktív fázisuk során fogyasztják el, ezzel ellapítva az étkezés-koplalás ritmusát. Ezzel párhuzamosan az óragének és az óra által kontrollált gének expressziója megváltozik (177). Leptin hiányos *ob/ob* egerek óragénjeinek oszcillációja a máj és zsírszövetben még azelőtt ellaposodik, hogy elhíznának az állatok (178). Ha a táplálkozás és a fény-sötétség ciklusok egymástól disszociálódnak, akkor a táplálkozással szinkronizálható szövetek fázisa elcsúszik a többi, SCN-hez igazodó perifériás órák fázisától (179). Patkányokat nappali aktivitásra kényszerítve az állatok elhízása figyelhető meg állandó táplálékellátás mellett (180), míg ezek a hatások elmaradnak, ha nappal nem táplálkozhatnak az állatok (181). Egerek táplálékellátásának nappalra korlátozása szintén az állatok elhízásával jár (182).

Populációs szinten is megfigyelhető a cirkadián zavarok anyagcserére gyakorolt hatása. A 2.6-os fejezetben már szerepelt, hogy a váltott műszakú munkavégzés és a szociális *jetlag* is növeli a metabolikus elváltozások rizikóját. Emellett a kronotípus metabolikus rendellenességekkel való összefüggéseire is vannak adatok. Késői kronotípusú emberek nagyobb eséllyel rendelkeznek nagyobb testtömeggel és magasabb testtömegindexszel (body mass index, BMI) (183), valamint fogékonyabbak a 2-es típusú diabéteszre (184, 185). 2-es típusú diabéteszrel rendelkező betegek közül a késői típusúak rosszabb glikémiás kontrollal rendelkeznek (186, 187). A *clock* gén bizonyos pontmutációi elhízásra és metabolikus szindrómára hajlamosítanak, míg mások védenek az elhízástól, mindazonáltal ezen pontmutációk szerepe és hatásmechanizmusa még nem tisztázott (188-190).

A táplálék, mint *Zeitgeber* hatása a táplálékbevitel időzítésével erősíthető. Állatokban a táplálékfelvétel aktív fázisra történő időzítése (time-restricted feeding, TRF) egyértelmű metabolikus előnyökkel jár (191). DIO modellben az egerek táplálékfelvételének aktív fázisra történő korlátozása helyreállítja az óragének és ccg-k oszcillációját, valamint a metabolikus regulátorok, a CREB, az mTOR és az AMPK által szabályozott útvonalak ritmusát. Bár ugyanannyi kalóriát fogyasztanak, a TRF egerek nem híznak el és egészségesebb a glükóz és a lipid homeosztázisuk, mint az *ad libitum* táplálékellátás mellett tartott társaiknak (192). A TRF más elhízást eredményező,

magas fruktóz, illetve magas szacharóz tartalmazó diéták metabolikus következményeit is enyhíti, valamint már obez és 2-es típusú diabéteszes egerek esetében visszafordítja a betegség progresszióját (193).

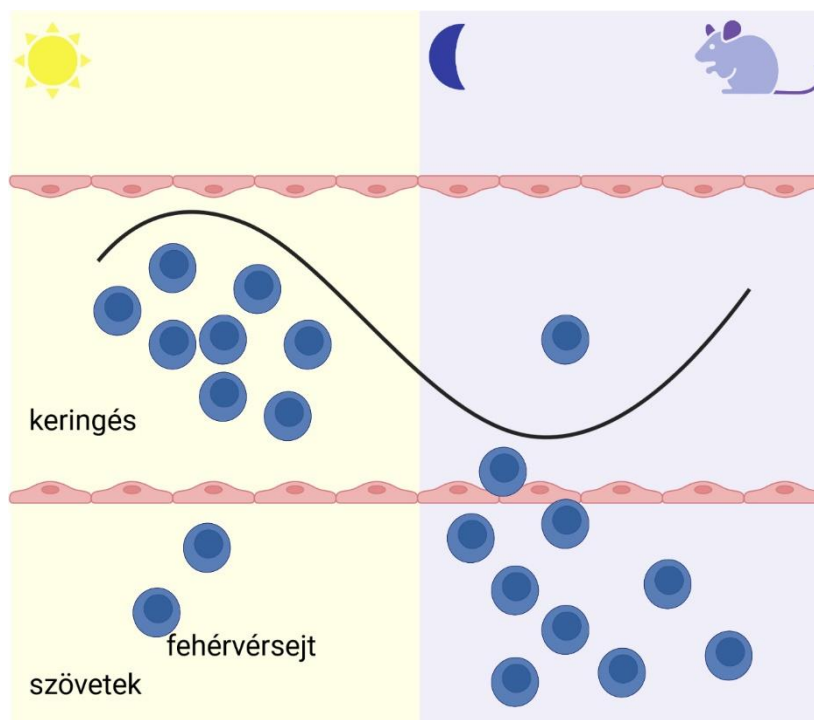
Az időben korlátozott étkezés (time-restricted eating, TRE) hatásának humán vizsgálata még gyerekcipőben jár, de már a korlátozott számú tanulmány alapján is látható, hogy a TRE csökkenti a testsúlyt, javítja a glükózintoleranciát, mérsékli a magas vérnyomás és a diszlipidémia mértékét (194). Egészséges felnőttek étkezési szokásait mobilapplikáció segítségével követve az látható, hogy a legtöbben gyakran és rendszertelenül táplálkoznak, a teljes kalória bevitel kevesebb, mint 25%-át fogyasztják el délelőtt, és több mint 25%-át este 6 után. A tanulmányban résztvevők felének esetében a táplálékbeviteli ablak meghaladta a 14,75 órát. Ezen felül az étkezés időzítésében is megfigyelhető a hétköznapok és hétvégék közötti különbség, a metabolikus *jetlag* jelensége (195). Az étkezési szokások minden bizonnyal hozzájárulnak a fejlett országokban oly gyakori metabolikus betegségekhez.

Habár tudjuk, hogy a szervezet egészséges működéséhez szükséges a cirkadián és metabolikus ritmusok szinkronja, azonban még mindig tisztázatlan, hogy a perifériás szövetek étkezés általi szinkronizációja pontosan hogyan zajlik. Egyre növekvő figyelem fordul a bélrendszer felé, ami képes a megemésztett táplálékról endokrin, immunológiai és neuronális útvonalakon keresztül információt közvetíteni a szövetek felé (191). A gasztrointesztinális traktus trilliónyi, a mikrobiomot kialakító baktériumnak ad otthont. A mikrobiom összetételében megfigyelhető diurnális változásokért a szervezet cirkadián működése felelős (196). A cirkadián ritmuzavarok mind egérmodellben, mind humán vizsgálatokban a bél mikrobiom diszbiózisával járnak (197-199), és viszont, a szervezet megfelelő cirkadián működéséhez diverz mikrobiom szükséges (200). A mikrobiom-gazdaszervezet cirkadián kölcsönhatásában bekövetkező változások fontos szerepet játszanak különböző betegségek, például a gyulladásos bélbetegség, az elhízás és az 1-es típusú diabétesz patológiájában (196).

2.7.3 Az immunrendszer cirkadián szabályozása

Az immunrendszer véd a patogének ellen és elősegíti a sérült szövetek regenerációját, azonban ezek a folyamatok megnövekedett metabolikus aktivitással és járulékos károkkal járnak a szervezet számára. A cirkadián óraműködésnek alapvető szerepe van abban, hogy az immunválasz optimális időben, megfelelő intenzitással játszódjon le. A veleszületett immunitás gyakorlatilag minden eleme cirkadián módon, azonban különböző fázisban oszcillál, elkerülendő a szinergista hatásokat és a túlzott immunválaszt, minimalizálva ezáltal a szövetkárosodás mértékét és az autoimmun hatásokat. A leukociták szövetek közé történő infiltrációja normál, homeosztatisztikus körülmények között és gyulladás vagy sérülés esetében is időzítetten zajlik, az immunreakciók idejét pedig a gyulladásos folyamatokban szereplő gének expressziójának időzítésével korlátozza a molekuláris óra (201). Ugyanakkor ez a kapcsolat is kétirányú, a gyulladásos állapotok az órára visszahatva a központi óragének ritmusának ellaposodását és az óra által kontrollált gének expressziójának megváltozását eredményezik (202).

A cirkadián óra szabályozó szerepe látványosan megmutatkozik a keringő leukociták számának napi ingadozásában (6. ábra). A vérben mérhető fehérvérsejtszám az inaktív periódusban, egerekben nappal, emberek esetében éjszaka éri el a maximumát (203, 204). Ez a ritmus egyrészt a leukociták érfalhoz történő kitapadásától (margináció) és a szövetekbe történő vándorlásuktól (migráció) függ, másrészt a sejtek csontvelőből történő kiáramlása és oda való visszatérésük (*homing*) is szabályozza. Ezen folyamatok mindegyikét befolyásolja a cirkadián óraműködés. Az aktív időszak kezdetén a keringő leukociták mennyisége lecsökken, ahogy a sejtek a perifériás szövetekbe és a csontvelőbe áramlanak, míg a nyugalmi fázis kezdetén a csontvelőből történő kiáramlás a meghatározó, mely a fehérvérsejtszámot emeli a perifériás vérben (205-208).



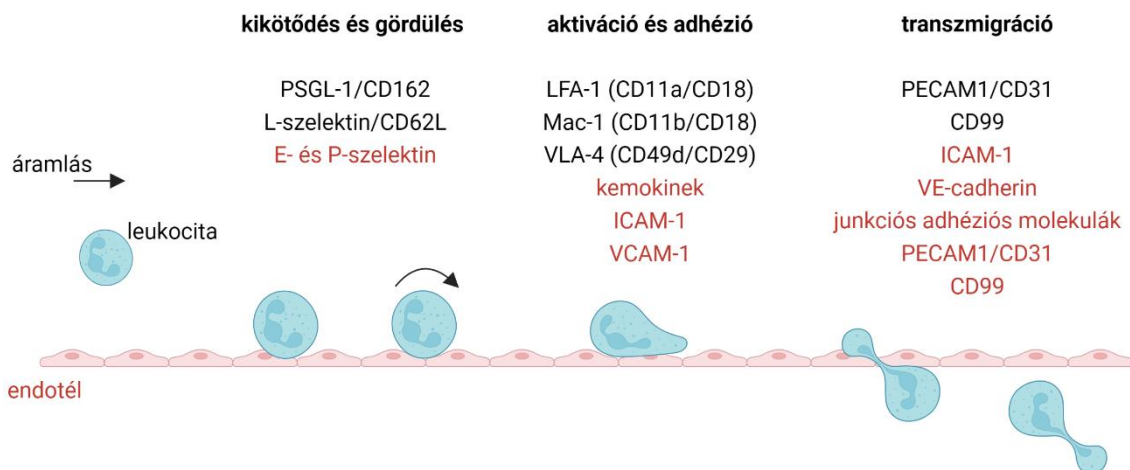
6. ábra: A keringő leukociták számának napi ingadozása

A fehérvérsejtek az inaktív időszakban nagyobb mennyiségben találhatóak meg a keringésben, míg az aktív időszakban a keringő leukociták száma lecsökken, ahogy a sejtek a perifériás szövetekbe és a csontvelőbe áramlanak. Az ábra (205) alapján, BioRender programmal készült.

A csontvelői vándorlás szabályozásában fontos szerepe van a központi órának, ami az autonóm idegrendszeren keresztül éri el a csontvelőt. A szimpatikus idegekből ritmikusan felszabaduló noradrenalin a sztrómasejtek $\beta 3$ receptorán keresztül csökkenti azok CXCL12 (CXC motif chemokine ligand 12) termelését, mely a haemopoetikus őssejtek és leukociták csontvelői vándorlásának fő szabályozó kemokinje (209). A ritmikus sejt vándorláshoz mindazonáltal a sejtek saját órájára is szükség van. A fehérvérsejtek szövetek közé történő kilépésében szerepet játszó migrációs faktorok expresszióját mind a leukocitákon, mind az endotélien az óra irányítja (205).

A vándorlási folyamat több lépésből áll (7. ábra). Elsőként a keringő leukociták kitapadnak az érfalhoz a felszínükön található P-szelektin glikoprotein ligand-1 (PSGL-1 vagy CD162) és az endotél felszínén megtalálható E- és P-szelektinek között kialakuló gyenge kapcsolatok révén. A sejtek így lelassulnak és a CD162, illetve az L-szelektin (CD62L) és az endoteliális szelektinek közötti kapcsolatoknak köszönhetően gördülni kezdenek az érfalon. A fehérvérsejtek az endoteliális kemokinek hatására aktiválódnak,

majd szorosan az érfalhoz tapadnak, mely folyamatban kiemelt szerepe van az LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1), Mac-1 (macrophage-1 antigen) és VLA-4 (very late antigen-4) integrineknek, valamint az endoteliális ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) és VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) adhéziós molekuláknak. Utolsó lépésként a sejtek átjutnak az érfalon, ami történhet két sejt között, de ritkábban transzcellulárisan is (205, 210).



7. ábra: A leukociták érfalon keresztüli átjutásának lépései

A leukociták és endotél közötti ligand-receptor kapcsolatok révén a fehérvérsejtek kikötődnek az érfalhoz, gördülnek az endotél felszínén, majd szoros adhéziós kapcsolatokat létesítenek az endotéllel, végül átjutnak az érfalon. A folyamatban résztvevő molekulák az egyes lépések alatt aszerint vannak feltüntetve, hogy melyik sejtípus fejezi ki őket: fekete-leukocita, piros-endotél. Az ábra (210, 211) alapján, BioRender programmal készült.

A következőkben néhány példát hozok a ritmikus sejt vándorlásnak és szabályozásának szemléltetésére. A neutrofil granulociták a csontvelőben érnek, majd az érett (posztmitotikus) sejtek a keringésbe lépnek, mely folyamatot CXCR2 és CXCR4 (CXC motif chemokine receptor) receptoraik irányítják. A CXCR4 ligandja, a CXCL12 a neutrofil granulociták visszatartását támogatja, míg a CXCR2-n keresztüli szignalizáció a sejtek csontvelőből történő kilépését eredményezi (212). Az aktív-inaktív fázis átmenetkor a szimpatikus idegek ritmikus aktivitásának köszönhetően a CXCL12 szintje lecsökken, a fiatal sejtek a keringésbe kerülnek, ahol folyamatosan érnek, amit a csökkenő CD62L és magas CXCR4 expressziójuk is jelez, majd kilépnek a keringésből (213). Az inaktív fázis végén a csontvelőbe visszatérő előregedett neutrofil granulocitákat

csontvelői makrofágok fagocitálják (208). A neutrofil granulocitákon kívül a B és NK sejtek is cirkadián módon vándorolnak a csontvelőbe (205).

A tüdőben mérhető leukocitaszám szintén cirkadián oszcillációt mutat, a neutrofil granulociták, B-sejtek, CD4+ T-sejtek és gyulladáshoz monociták megjelenése is ritmikus ebben a szövetben (205, 214). Gyulladáshoz modellben a neutrofil granulociták cirkadián infiltrációját a tüdő hámszövet Clara sejtjeinek ritmikus CXCL5 kemokin termelése irányítja, mely glükokortikoid szabályozás alatt áll (214).

Nyugalmi körülmények között a neutrofil granulociták és a gyulladáshoz monociták száma az aktív fázis elején éri el maximumát a szívben. Egérmodellben az ekkor előidézett miokardiális infarktus mérete nagyobb és több neutrofil granulocita és monocita infiltrációja kíséri, mint az inaktív fázisban. Az aktív fázis elején egyrészt nagyobb mennyiségben vannak jelen a neutrofil granulocitákon és a monocitákon a CXCR2, illetve a CCR2 (CC motív kemokin receptor 2) kemokin receptorok, másrészt az endotél felszínén is fokozottabb az adhéziós molekulák és kemokinek kifejeződése, mint az inaktív fázisban (215, 216).

A központi óragének a leukocitavándorlás mellett több ponton is közvetlenül befolyásolják az immunválaszt (202, 217). A *Bmal1* mieloid specifikus deléciója a gyulladáshoz monociták ritmusának megszűnését eredményezi, és növeli az egerek *Listeria monocytogenes* fertőzéssel szembeni fogékonyságát (218). A *Bmal1*^{-/-} neutrofil granulociták granulomösszetételének és a neutrofil extracelluláris csapdák (neutrophil extracellular traps, NET) képzésének ritmusa is megszűnik (219). Általánosságban a BMAL1 a BMAL1/CLOCK komplexen keresztüli transzkripciós aktivitása révén gyulladáshoz csökkentő hatással bír (202). A CLOCK BMAL1-hez való kötődése megakadályozza, hogy a CLOCK acetilálja és aktiválja a p65-öt, ezáltal csökkentve a transzkripcionálisan aktív nukleáris faktor - kappa B (NF- κ B) mennyiségét. A BMAL1 segíti a REVERB α és ROR α magreceptorok átíródását, melyek fontos szereppel bírnak a gyulladáshoz reakciók csökkentésében. A REVERB α gátolja az *Il6* és *Ccl2* (kemokin (C-C motív) ligand 2) átíródását (202). A REVERB α specifikus deléciója esetén a makrofágok ritmikus citokintermelése megszűnik, ehelyett a gyulladáshoz citokinek állandó, fokozott szekréciója figyelhető meg (214, 220). A ROR α serkenti az inhibitor κ B (I κ B) kifejeződését, ami az NF- κ B-t a citoplazmában tartja és megakadályozza, hogy az a sejtmagban aktiválja a gyulladáshoz citokinek expresszióját (202). Állatmodellek

bizonyítják, hogy az óraműködés zavara egyrészt kedvez a gyulladásos betegségek kialakulásának és súlyosítja azok tüneteit (221-224), másrészt hozzájárul az autoimmun betegségek kialakulásához és progressziójához is (225-228).

A cirkadián óraműködés és az immunrendszer kapcsolata különböző betegségek napszaki ingadozásaiban is megnyilvánul. Például az allergiás tünetek reggeli megjelenése gyakoribb (229), ahogy az asztma tünete is a hajnali órákban a legerősebbek, párhuzamosan az eozinofilek légúti váladékban mérhető megnövekedett számával és az IL-5 magasabb szintjével (230). Az egyik leggyakoribb autoimmun betegség, a reumatoid arthritis tünete szintén napszakfüggő megjelenést mutatnak. Az ízületi merevség és a fájdalom a reggeli órákban a legerősebbek, összhangban az IL-6 szérumban mérhető szintjével, ami a nap során ekkor a legmagasabb (231).

A váltott műszakban végzett munka az immunrendszer működésére is negatív hatással van. Nappali munkát végzőkkel összehasonlítva a váltott műszakban dolgozók keringésében magasabb összleukocita, neutrofil granulocita-, monocita- és limfocitaszámok mérhetőek (232-234), illetve emelkedett a szisztémás gyulladásra utaló markerek (a C-reaktív protein, valamint a TNF α , IL-6, IL-1 β és IL-10 citokinek) szintje (232). A több műszakban foglalkoztatottak fogékonyabbak a légúti megbetegedésekre, a náthára, influenzára és a COVID-19-re (koronavírus-betegség 2019) (235-237). A váltott műszakban végzett munka növeli a pikkelysömör (238), az irritábilis bél szindróma (239) és nőkben a reumatoid arthritis (240) kialakulásának kockázatát, valamint a fiatal korban végzett váltott műszakos munka növeli a szklerózis multiplex későbbi kialakulásának valószínűségét (241, 242).

Az immunrendszer kapocs lehet a cirkadián ritmuszavarok és bizonyos betegségek gyakoribb előfordulása között. Az óra zavarának immunrendszerre gyakorolt hatása hozzájárulhat a váltott műszakú munkavégzés negatív egészségügyi következményeihez, a metabolikus, kardiovaszkuláris és daganatos megbetegedések megnövekedett rizikójához.

2.8 Az immunrendszer és a metabolizmus összefüggései

Az immunrendszer szoros összefüggést mutat az anyagcserével, amely kapcsolatnak evolúciós háttere van (243). A két rendszer együttműködése segítette, hogy a rendkívül energiaigényes immunreakciók változó vagy kedvezőtlen tápanyag ellátottság esetén is biztosíthassák az élőlény túlélését. Az immunrendszer működése és a metabolikus szabályozás számos, a gerinctelenektől az emlősökig konzervált jelátviteli út révén kapcsolódik egymáshoz. Ezek közül az egyik legismertebb a TNF α receptorán és a *toll*-szerű receptorokon (toll-like receptors, TLRs) keresztül elinduló jelátviteli folyamatok gátló hatása az inzulin-receptor szignalizációjára (244). A modern korra jellemző állandó és túlzott táplálékélelérhetőség mellett az immunfolyamatok és a metabolizmus közötti egyensúly gyakran felborul, és a különböző metabolikus betegségeknek (elhízás, inzulin rezisztencia, 2-es típusú diabétesz) jellemző kísérői az egész szervezetet érintő gyulladással járó folyamatok (243). A zsírszöveti gyulladás hozzájárul a metabolikus betegségek progressziójához, például a TNF α az inzulin jelátviteli útvonalának (az IRS (insulin receptor substrate) fehérjék foszforilációján keresztüli) gátlásával fokozza a zsírszövetben az inzulinrezisztenciát (244). Metabolikus és gyulladással járó betegségek kezelése során ugyanakkor az anyagcsere megváltoztatásán keresztül hathatunk az immunrendszer működésére. Nagyszámú tanulmány alapján a tápanyagösszetétel megváltoztatása (makrotápanyagok arányának megváltoztatása, kiegészítő tápanyagok bevitele), illetve a hosszabb ideig tartó koplálás eredményes lehet többek között a metabolikus zavarok, a reumatoid artritisz, a szklerózis multiplex és a gyulladással járó bélbetegségek kezelésében (245-249), ugyanakkor ezen hatások sejtszintű mechanizmusai még tisztázatlanok. Bár ismert, hogy a cirkadián rendszer mind a metabolizmus, mind az immunrendszer működését szabályozza, a két rendszer ritmusának kapcsolatáról nagyon keveset tudunk.

3. Célkitűzés

Doktori tanulmányaim során a cirkadián deszinkronizáció különböző aspektusaival foglalkoztam. Egyrészt humán vizsgálatokat végeztünk a leggyakoribb ritmuszavar, az SJL kardiovaszkuláris szabályozásra és alvásminőségre gyakorolt hatásának elemzéséhez, másrészt egérmodellben vizsgáltuk a metabolikus ritmus és az immunrendszer kapcsolatát. A két munkában közös, hogy kismértékű, ugyanakkor nagy populációt érintő cirkadián ritmuszavarokkal foglalkozik, ezért, bár a hatások jobbra mérsékeltek, az összefüggések alapján levonható tanulságok társadalmi szempontból nagy jelentőséggel bírnak.

Munkánk kezdetén a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

I. Vizsgáljuk a leggyakoribb ritmuszavar, az egyetemi közegben különösen könnyen tetten érhető szociális *jetlag* alvásminőségre gyakorolt hatását fiatalokon, a lehető legkisebb beavatkozás mellett, természetes környezetben. Ehhez

1. résztvevőket keresünk és az MCTQ kérdőív segítségével felmérjük az alvási szokásaikat és kronobiológiai jellemzőiket.
2. egy hétköznapi és egy hétvégi napon, természetes környezetükben követjük az éjszaka folyamán az alanyok szívfrekvencia variabilitását, ami egyfelől a kardiovaszkuláris szabályozás minőségéről, másfelől az alvás mélységéről és minőségéről nyújt információt.
3. kérdőív segítségével felmérjük, hogy hogyan értékelik maguk a résztvevők alvásuk minőségét ugyanezen éjszakák alatt.
4. megvizsgáljuk, hogy mutat-e a szociális *jetlag* összefüggést az alvás alatti kardiovaszkuláris szabályozással és az alvás hatékonyságával, valamint a szubjektív alvásminőséggel.

II. A cirkadián rendszer és a metabolizmus élettani és patológiai szempontból is szoros összefüggést mutat, emellett mindkettő szabályozza az immunrendszer működését. Ezek alapján egérmodellen megvizsgáljuk, hogy hogyan hat a táplálékfelvétel időbeli korlátozása (TRF) – a tápanyagösszetétel és a kalóriabevitel megváltozása nélkül – az immunrendszer működésére szervezeti, illetve sejtszinten.

Ehhez

1. vizsgáljuk az általunk alkalmazott TRF hatását a metabolikus ritmusra.
2. vizsgáljuk a TRF hatását egy autoimmun betegségre, modellként a K/BxN szérum transzfer artritist használjuk.
3. vizsgáljuk a TRF hatását az immunrendszer általános aktivitására a léptömeg, a fehérvérsejtszám és a leukocitapopulációk vérben mérhető mennyiségének napszaki ingadozásán keresztül.
4. vizsgáljuk a TRF hatását a csontvelői óraműködésre.
5. vizsgáljuk a TRF hatását a leukociták aktivitására és vándorlására.

4. Módszerek

4.1 Az alvásminőség vizsgálat protokollja és a résztvevők kiválasztása

A tanulmányhoz egyetemi levelezőlistákon, illetve Facebook csoportokban kerestünk olyan résztvevőket, akik hétköznap és hétvégén is rendszeres időbeosztás szerint éltek. A vizsgálatban fiatal férfiak vettek részt, mindannyian egészségesek voltak, gyógyszert nem szedtek, nem volt alvászavaruk vagy kardiovaszkuláris megbetegedésük és a vizsgálat előtti hónapban nem vettek részt *jetlaggel* járó utazáson. A minta kor ($23,2 \pm 1,5$ év, átlag \pm szórás), BMI ($22,8 \pm 2,5$ átlag \pm szórás) és szociális helyzet (budapesti egyetemisták) szerint is homogénnek volt tekinthető. A résztvevőket kikérdeztük dohányzási, koffeinfoogyasztási és testmozgási szokásaikról, valamint vérnyomásukról és koleszterinszintjükéről. A válaszok alapján senkinél nem állt fenn kardiovaszkuláris kockázat. Arra kértük a résztvevőket, hogy a vizsgálat hetében ne fogyasszanak alkoholt és tartózkodjanak az extrém fizikai aktivitástól. Utólag kikérdeztük őket, hogy történt-e velük bármilyen váratlan esemény (akadt-e egészségügyi problémájuk vagy érte-e őket jelentős fizikai vagy érzelmi stressz a héten). Az eredeti 35 jelentkezőből utólag 2 embert zártunk ki, így végül 33 alany adatait elemeztük. A vizsgálat 2016/17 telén és 2017 tavaszán zajlott, az óraátállítás után 2 hétig szünetelt. Egy-egy résztvevő számára egy hétig tartott a vizsgálat, ez idő alatt az alanyok szokásos időbeosztásuk szerint éltek, hétköznapokon ébresztőóra keltek, míg hétvégén maguktól ébredtek. Egy hétköznapon (szerdán) és egy hétvégi napon (szombaton) éjszaka a mellkasukon egy kicsi, EKG alapú, szívfrekvenciát rögzítő készüléket (Actiheart) viseltek, majd másnap, ébredés után kitöltötték a Groningen alvásminőség kérdőívet (lásd később). Ezen felül ezeken a napokon a lefekvés előtti utolsó, illetve felkelés utáni első vizeletükből mintát tettek el. A kutatást a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá (az etikai engedély száma: 170/2016). Az alanyok írásbeli beleegyező nyilatkozatot tettek és részvételükért fizetséget kaptak.

4.2 Az alvási paraméterek meghatározása

A résztvevők előzetesen kitöltötték a kronotípus és az SJL meghatározására szolgáló MCTQ (Munich Chronotype Questionnaire) kérdőív magyar változatát (79). A kérdőív alapján meghatároztuk az alvási középido értékét szabadnapokon (MSF) és

munkanapokon (MSW), melyek különbsége adja az SJL (MSF-MSW) értékét, valamint a kronotípust, ami az MSF szabadnapokon mérhető megnövekedett alváshosszra korrigált értéke (MSF_{sc}) (111). A kérdőívben szereplő, a dolgozat szempontjából releváns állításokat és a segítségükkel meghatározható paramétereket az 1. táblázatban mutatom be.

1. táblázat: Az MCTQ-ban szereplő állítások és a segítségükkel meghatározható paraméterek. Az alsó indexben látható, hogy munkanapokra (*workday*, *w*) vagy szabadnapokra (*free day*, *f*) vonatkozik az adott változó.

változó	a kérdőívben szereplő állítás	rövidítés	mértékegység
a lefekvés időpontja (bed time)	__ óra __ perckor fekszem le	BT _{w/f}	hh:mm
az elalváshoz készülődés időpontja (time of preparing to sleep)	Általában __ óra __ perctől készülődöm elaludni.	SPrep _{w/f}	hh:mm
az elalváshoz szükséges idő (sleep latency)	__ percre van szükségem, hogy elaludjak.	SLat _{w/f}	min
az alvás vége (sleep end)	__ óra __ perckor ébredek	SE _{w/f}	hh:mm
az ébredés és a felkelés között eltelt idő (sleep inertia)	__ perc múlva kelek fel az ágyból.	SI _{w/f}	min
számított változó			
az alvás kezdete (sleep onset)	SPrep _{w/f} + SLat _{w/f}	SO _{w/f}	hh:mm
az alvás hossza (sleep duration)	SE _{w/f} – SO _{w/f}	SD _{w/f}	hh:mm
az alvási középido munkanapokon (midsleep on workday)	SO _w + SD _w /2	MSW	hh:mm
az alvási középido szabadnapokon (midsleep on freeday)	SO _f + SD _f /2	MSF	hh:mm
szociális jetlag (social jetlag)	MSF – MSW	SJL	hh:mm
átlagos heti alváshossz (average weekly sleep duration)	(SD _w × 5 + SD _f × 2)/7	SD _{week}	hh:mm
kronotípus (midsleep on freeday corrected for sleep debt on workdays)	ha SD _f ≤ SD _w : MSF ha SD _f > SD _w : MSF - (SD _f - SD _{week})	MSF_{sc}	hh:mm

A vizsgálat hetében a résztvevők alvásnaplót vezettek, ami alapján a vizsgálat hetére vonatkozó SJL-t is megállapíthattuk. Az átlagos SJL másfél óra volt, ami megfelel az ebben az életkorban korábban leírt SJL mértékének (79, 111, 250). A medián SJL (93 perc) szerint a résztvevőket kis ($SJL \leq 93$ perc), illetve nagy ($SJL > 93$ perc) SJL-ű csoportba osztottuk. Az előbbi csoport legmagasabb értéke és az utóbbi legalacsonyabb értéke között 10 perc különbség adódott. A mérési napokon az Actiheart szoftvere jelezte az elalvás, illetve az ébredés idejét, melyeket az alvásnaplóval is összevetettünk. A szoftveres időpontok segítségével kiszámítottuk a mérések napjaira vonatkozó pontos SJL-t, amit az SJL és a szívfrekvencia variabilitás közötti korrelációs elemzésekhez használtunk.

4.3 Melatonin

A résztvevők a lefekvés előtti utolsó, illetve a felkelés utáni első vizeletükből mintát vettek, amiket -20°C -on tároltunk. A mintákban enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálattal (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), a gyártói (IBL International) előírások szerint meghatároztuk a 6-szulfatoximelatonin, egy stabil melatonin metabolit koncentrációját. Az értékeket a minták enzimes módszer segítségével (Diagnosticum Zrt.) mért kreatinin koncentrációjára normalizáltuk (6-szulfatoxinmelatonin/kreatinin arány (nmol/mmol)).

4.4 HRV analízis

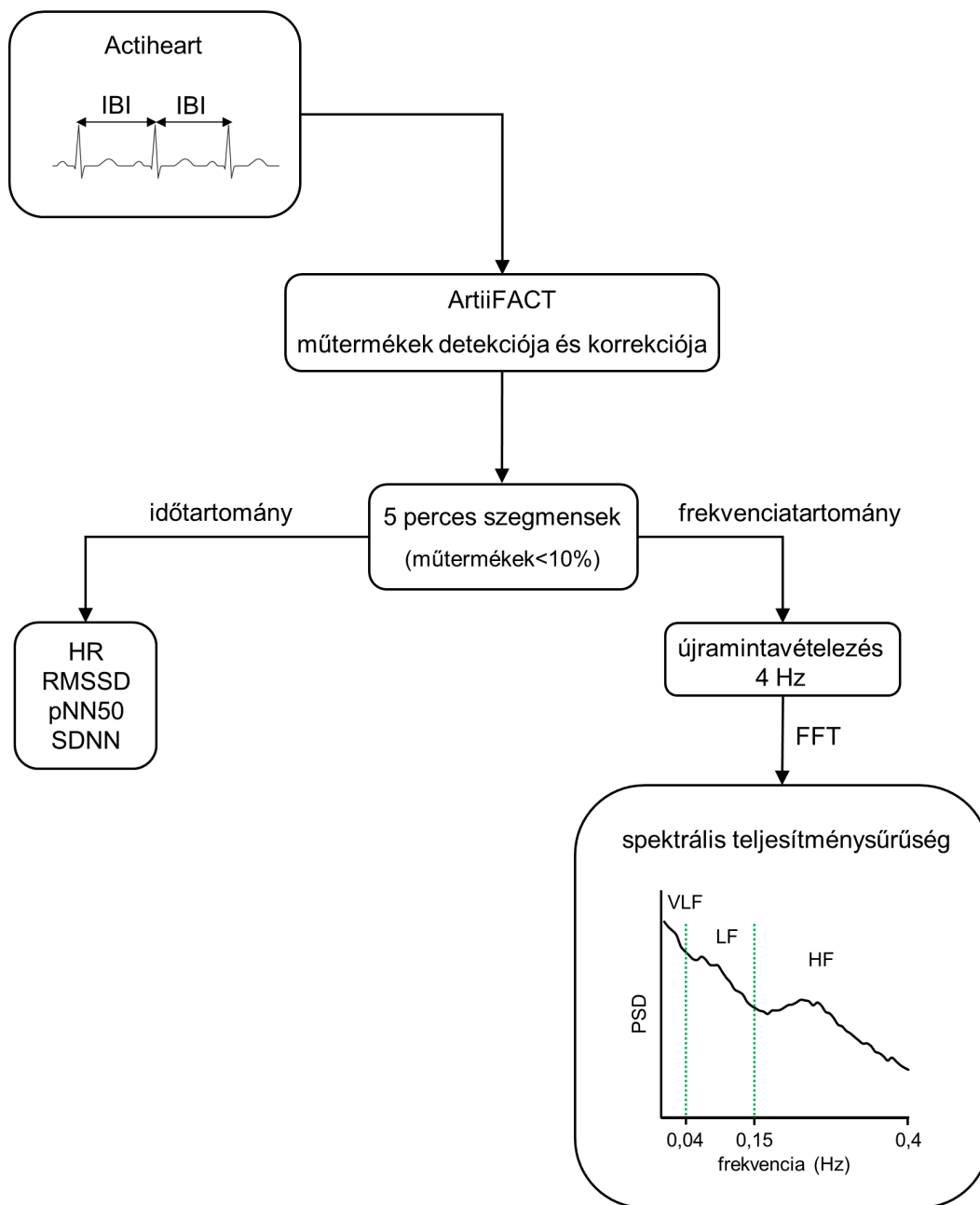
A szívfrekvencia variabilitás (HRV) az egymást követő szívdobbanások között eltelt idő változékonyságát jellemzi, ezáltal utal az autonóm idegrendszer aktivitására.

A HRV meghatározáshoz az Actiheart (CamNtech Ltd., UK) készüléket használtuk. A mérések előtt a résztvevők bejöttek a laborba, ahol felhelyeztük, kipróbáltuk és beprogramoztuk a műszert a felvétel kezdetére. A mérések között töltés és az adatok lementése céljából az alanyok visszahozták a készüléket.

Az Actiheart készülék a szívverések között eltelt időt rögzíti (interbeat interval, IBI). A különböző HRV paraméterek az IBI adatsorból számíthatóak. A HRV elemzését az európai, valamint észak-amerikai kardiológiai társaságok (European Society of Cardiology és North American Society of Pacing and Electrophysiology) által 1996-ban deklarált standardok (143) és a legújabb ajánlások (142) szerint végeztük. Elsőként

vizuális inspekcióval ellenőriztük a nyers adatok minőségét. A műtermékek konzisztens detekciójához és korrekciójához az ARTiiFACT szoftvert (Tobias Kaufmann és mtsai, Universität Würzburg, Németország) használtuk (251). Az adatsorunk inentől kezdve a szinusz ütések közötti intervallumok idejét tartalmazta. Az adatsorokat 5 perces szegmensekre daraboltuk. Az analízisből kizártuk azon szegmenseket, melyek 10%-nál nagyobb arányban tartalmaztak műtermékeket. Az 5 perces szegmensekre számított HRV paramétereket 1,5 vagy 2 órás blokkokban átlagoltuk az adott elemzéstől függően.

A HRV analízisére lehetőség van idő- és frekvenciatartományban is (8. ábra). Az időtartományban az SDNN, RMSSD és pNN50 paramétereket határoztuk meg az ARTiiFACT szoftver segítségével. Az SDNN (standard deviation of the normal to normal intervals) az egymást követő szinusz ütések idejének (NN intervallumok) a szórása. Az RMSSD (root mean square of successive differences) szintén egy szórás jellegű paraméter, az egymás utáni NN intervallum különbségek négyzetes középértéke, számításához az egymást követő NN intervallumok különbségének négyzetét vesszük, ezen négyzetes értékeket átlagoljuk, majd az átlagból gyököt vonunk. A pNN50 (percentage of successive normal to normal intervals differing by more than 50 ms) azon egymást követő intervallumok aránya a szegmensben, amelyek között 50 ms-nál nagyobb a különbség (143).



8. ábra: A HRV elemzésének folyamatábrája

Az Actiheart készülék a szívütések között eltelt időt (IBI) rögzítette. Az ARTiiFACT program detektálta és korigálta az esetleges műtermékeket. A kezelt adatsorokat a HRV számítás előtt 5 perces szegmensekre daraboltuk. Az időtartománybeli paramétereket az ARTiiFACT segítségével kaptuk meg. A frekvenciatartománybeli elemzéseket a DADiSP szoftverrel végeztük. Az adatsorok 4 Hz-re történő újamintavételezése után Fast Fourier transzformációt végeztünk, hogy megkapjuk a spektrális teljesítmény-sűrűség eloszlást (PSD). Konvenció szerint a frekvenciatartományt három részre osztjuk: nagyon alacsony (VLF), alacsony (LF) és magas (HF) frekvenciasávokat különböztetünk meg.

A HRV elemezhető a frekvenciatartományban is, ilyenkor a szívütések között eltelt időszakok, azaz az IBI adatsor spektrumát vizsgáljuk. Minden adatsor felírható különböző frekvenciájú, amplitúdójú és fázisú szinusz hullámok (úgynevezett spektrális komponensek) összegeként. A szinusz komponensek amplitúdóját a frekvenciájuk függvényében ábrázolva kapjuk meg az adatsor spektrumát. A komponensek megtalálását, azaz az időbeli adatsor frekvenciabeli spektrumának meghatározását a Fourier transzformáció végzi. A frekvenciatartománybeli elemzéseket a DADiSP 6.7 szoftverrel (DSP Development Corporation, MA, USA) végeztük. Az IBI adatsor minden pontjának értéke az előző adatpont pillanatától eltelt idő, így az adatpontok jellegükből fakadóan időben nem egyenletes távolságra vannak egymástól. A spektrum számításához első lépésként szükséges az adatok újramintavételezése, hogy az adatpontok egymástól egyenletes távolságokra helyezkedjenek el az időtengelyen. Ehhez harmadfokú interpolációt (kőbös *spline*) használtunk, 4 Hz újramintavételezési frekvenciát választva, így másodpercenként 4 adatpontot kaptunk. A spektrális analízis további előfeltételeinek teljesítéséhez alapvonal korrekciót és Hanning-ablakos simítást végeztünk. Ezek után az 5 perces szegmenseken (1200 adatpont az újramintavételezés után) Fast Fourier transzformációt (FFT) futtattunk, melynek eredményeként a 0-2 Hz frekvenciatartományban 600 frekvenciapont (azaz bin) felbontással megkaptuk a spektrumot, melyből spektrális teljesítménysűrűség eloszlást (power spectral density, PSD) számoltunk. A PSD megadja, hogy az eredeti jel varianciájához az egyes binek mekkora részben járulnak hozzá. Konvenció szerint a frekvenciatartományt három részre osztjuk: nagyon alacsony (VLF - very low frequency, 0,0033-tól 0,04 Hz-ig), alacsony (LF - low frequency, 0,04-től 0,15 Hz-ig) és magas (HF - high frequency, 0,15-től 0,4 Hz-ig) frekvenciasávokat különböztetünk meg. Az 5 perces szegmensek átlag PSD-ét numerikusan integráltuk, hogy ezen sávok abszolút teljesítményét, valamint az LF normalizált értékét (LFnu) megkapjuk. Az említett HRV paramétereket a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat: Az idő- és frekvenciatartományban kiszámított HRV paraméterek. (NN: normal to normal, SNS: szimpatikus idegrendszer, PNS: paraszimpatikus idegrendszer, nu: normalized unit, VLF: very low frequency, LF: low frequency, HF: high frequency)

paraméter	magyarázat	jelleg	mértékegység
SDNN	az NN intervallumok szórása	PNS, SNS	ms
RMSSD	az egymás utáni NN-intervallum különbségek négyzetes középértéke	PNS	ms
pNN50	azon egymást követő NN intervallumok százaléka a szegmensben, melyek több, mint 50 ms-mal különböznek egymástól	PNS	%
VLF	teljesítmény a VLF frekvenciasávban	hosszútávú regulációs mechanizmusokat feltételeznek mögötte	ms ²
LF	teljesítmény az LF frekvenciasávban	SNS, PNS	ms ²
HF	teljesítmény a HF frekvenciasávban	PNS	ms ²
LFnu	az LF aránya az LF és HF összteljesítményhez képest $LFnu=LF/(LF+HF)$	a szimpatikus moduláció közelítésére használatos	-

4.5 A szubjektív alvásminőség értékelése

Az alvásminőség megítélésére a Groningen Alvásminőség Skála (Groningen Sleep Quality Scale, GSQS) magyar változatát alkalmaztuk (252, 253) (9. ábra). A GSQS egy kérdőív, mely eldöntendő állításokat tartalmaz az előző éjszaka alvására vonatkozóan. A válaszoktól függően maximum 14 pont érhető el, a magasabb pontszám rosszabb alvásminőséget jelez. A kérdőívet a résztvevők a mérési éjszakát követően, közvetlenül ébredés után töltötték ki.

A Groningen Alvásminőség Skála

Kérjük, válaszoljon az alábbi kérdésekre!

1. Az éjjel mélyen aludtam.	Igaz	Nem igaz
2. Úgy érzem, rosszul aludtam az éjjel.	Igaz	Nem igaz
3. Több, mint fél órába telt, amíg este el tudtam aludni.	Igaz	Nem igaz
4. Többször is felébredtem az éjjel.	Igaz	Nem igaz
5. Ma reggel fáradtan ébredtem.	Igaz	Nem igaz
6. Úgy érzem nem aludtam eleget az éjjel.	Igaz	Nem igaz
7. Felébredtem az éjszaka közepén.	Igaz	Nem igaz
8. Ma reggel kipihenten ébredtem.	Igaz	Nem igaz
9. Azt hiszem, csak néhány órát aludtam az éjjel.	Igaz	Nem igaz
10. Azt hiszem, jól aludtam az éjjel.	Igaz	Nem igaz
11. Egy szemhunyásnyit sem aludtam az éjjel.	Igaz	Nem igaz
12. Tegnap este könnyen elaludtam.	Igaz	Nem igaz
13. Amikor éjjel felébredtem, nehezen aludtam vissza.	Igaz	Nem igaz
14. Egész éjjel ide-oda forgolódtam az ágyban.	Igaz	Nem igaz
15. Az éjjel nem alhattam többet 5 óránál.	Igaz	Nem igaz

9. ábra: A Groningen Alvásminőség Skála

A kérdőív az előző éjszaka minőségére vonatkozóan tartalmaz 15 állítást. Az első kérdés nem számít bele az értékelésbe, a 8,10,12-es állítások esetén a „nem igaz”, a többi állítás esetén az „igaz” válasz egy pontot ér, így összesen 14 pont érhető el a skálán. A magasabb pontszám rosszabb alvásminőséget jelez (253).

4.6 Kísérleti állatok

Állatkísérletes munkánkat konvencionális állatházban, 12/12 órás fény/sötétség megvilágításban tenyésztett és nevelt, hím C57BL/6 egereken végeztük. A nap folyamán az órákat ZT rövidítéssel jelöljük (*Zeitgeber time*), a ZT0 a fény felkapcsolásának időpontja, ZT12 a fényszakasz kezdetétől eltelt 12 óra, ami egyben a sötét szakasz kezdete is. Állataink számára *ad libitum* biztosítottuk a táplálékkelérhetőséget, majd 60-80 napos korukban két csoportot hoztunk létre. Az állatok egy része továbbra is *ad libitum* (AL csoport), másik része időben korlátozott módon (TRF csoport), csak az aktív fázisuk első 10 órájában (ZT12-22 között) jutott táplálékhoz. Az ivóvízhez mindkét csoportnak állandó hozzáférést biztosítottunk és a koprofágia elkerülése végett rácson tartottuk az állatokat. Az egerek tömegét és az elfogyasztott táplálék mennyiségét hetente mértük. Az

ad libitum és TRF módon etetett egerek minden kísérlet alkalmával párhuzamosan kezdték meg az etetési periódust. Kísérleteinket 4 hét etetési periódus után végeztük. A párhuzamosan indult ketrecekben az *ad libitum* etetett állatok felét, illetve a TRF etetett állatok felét használtuk fel egy időpontban, majd másik felüket egy 12 órával későbbi időpontban. Például egyik nap éjfélkor (ZT17) végeztük a kísérleteket, majd a rákövetkező napon délben (ZT5). Ugyanígy egy másik etetési periódus lejártakor este 8-kor (ZT13) majd másnap reggel 8-kor (ZT1) vagy délután 4-kor (ZT9) és hajnali 4-kor (ZT21) végeztük a kísérleteket. Egy ZT időpontban végzett kísérlet során az állatoktól először vért vettünk, majd az állatokat termináltuk és szöveteiket eltávolítottuk. Minden vizsgálat esetén az eredmények összesítésekor egy ZT időpontban legalább 3 független kísérletben indult ketrecből származó egerek adatait átlagoltuk. Az esti időpontokban az egerek által nem érzékelt vörös fényű megvilágítás alatt dolgoztunk. A kísérletsorozatot az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá (az etikai engedély száma: PE/EA/1967-2/2017).

4.7 Intraperitoneális glükóztolerancia teszt

Egereinknek 16 óra éhezés után intraperitoneális glükóz injekciót adtunk (1 mg glükóz/g testtömeg). A vér glükózszintjét közvetlenül az injekció beadása előtt, majd 1, illetve 2 óra elteltével automata vércukorszintmérő készülékkel (Dcont TREND) mértük.

4.8 Génexpresszió vizsgálata

Génexpressziós vizsgálatokat zsírszöveti, illetve csontvelői mintákon végeztünk. A viscerális zsírszövetet izolálás után azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogénben, majd -80°C-on tároltuk a mintákat. A minták feldolgozásakor a folyékony nitrogén alatt feltört zsírszövetet és a csontvelői mintákat közvetlenül TriPure reagensben lizáltuk, majd -80°C-on tároltuk őket, míg a gyártói leírás szerint teljes RNS-t izoláltunk. Az RNS-ből DNáz kezelést követően Quantitect reverz transzkripció kit (Quiagen) segítségével cDNS-t írtunk. A *per2*, *reverb*, *leptin* és *cxcl12* gének relatív expresszióját Light Cycler 480 rendszer (Roche) használatával mértük, TaqMan hidrolízis próbák alkalmazásával. Referenciagénként az *rplp0*-t (ribosomal protein lateral stalk subunit P0) alkalmaztuk. A primerek és TaqMan hidrolízis próbák szekvenciái a 3. táblázatban láthatóak. Az adatok

elemzését a LightCycler Relative Quantification Software (Roche) segítségével a „második derivált maximuma” módszerrel végeztük.

3. táblázat: A génextpressziós mérések során használt primerek és TaqMan hidrolízis próbák szekvenciái. (F: forward primer, R:reverse primer)

gén		szekvencia
<i>rplp0</i>	F	5'-CTCGCTTTCTGGAGGGTGTC-3'
	R	5'-AGTCTCCACAGACAATGCCA-3'
	próba	5'FAM-TGCCTCGGTGCCACACTCCA-TAMRA3'
<i>per2</i>	F	5'-GCTTCCGCCCTGGAGTGT-3'
	R	5'-TCTCCTCCATGCACTCCTGAG-3'
	próba	5'FAM-CAGCGGCTTAGATTC-MGB3'
<i>reverta</i>	F	5'-GACCTTTCTCAGCACGACC-3'
	R	5'-CATCACTGTCTGGTCCTTCAC-3'
	próba	5'FAM-CAAAGCGCACCATCAGCACCTC-TAMRA3'
<i>leptin</i>	F	5'-AGCCTCACTCTACTCCACAG-3'
	R	5'-CCTCTACATGATTCTTGGGAGC-3'
	próba	5'FAM-TCAGCATTCAGGGCTAACATCCAAC-TAMRA3'

4.9 K/BxN szérumszint artritisz

A kísérleti állatokban 250 µl K/BxN szérumszint egyszeri injekálásával (ZT5-ben) autoimmun artritist indukáltunk. A szérumszint egy ízületi antigén, a glükóz-6-foszfát-izomeráz elleni autoantitesteket tartalmaz, mely egészséges egyedekben is ízületi gyulladást vált ki (254). A szérumszint Dr. Mócsai Attila (Simmelweis Egyetem, Élettani Intézet) laborjából származott, preparálás a korábbiakban leírt módon zajlott (255). Az etetési protokollokat az artritisz vizsgálata alatt is folytattuk. Az ízületi gyulladás súlyosságát a 0. napi indukció után 6 napon keresztül követtük. A vizsgálatokat ketten, egymástól függetlenül végeztük. A gyulladás klinikai tüneteit mindegyik végtag esetén 1-től 10-ig pontoztuk (fél pontokat is alkalmazva), valamint egy tapintókaros mérőórával (Kroeplin) mértük a hátsó bokák vastagságát. A vizsgálatokat minden nap ZT5-ben végeztük. A két vizsgáló által adott klinikai pontszámokat összegeztük, a mért bokavastagság értékeit átlagoltuk, az eredményeket az indukció napjáról (0. nap) származó értékekre normalizáltuk.

4.10 A leukocita populációk, adhéziós molekulák és kemokin receptorok áramlási citometriás vizsgálata

Közvetlenül a 4 hetes etetési protokoll kezdete előtt és vége után az egerektől farkuk végének lecsipentésével vérmintát vettünk és meghatároztuk a teljes leukocitaszámot valamint áramlási citometriás méréssel azonosítottuk a leukocita populációkat. Az éjszakai vérvételeket (ZT13, 17 és 21) az egerek által nem érzékelt vörös fény alatt végeztük. A leukocitákon (CD45+ sejtek) belül meghatároztuk a neutrofil granulociták (Ly6G+ (lymphocyte antigen 6 family member G)), T- (CD3+) és B-sejtek (CD19+), valamint a monociták (CD11b+, CD115+, Ly6C+) arányát. A monocitákon belül az Ly6C (lymphocyte antigen 6 family member C) jelölődés intenzitása alapján megkülönböztettük az Ly6C^{hi} gyulladósos (*inflammatory monocyte*) és Ly6C^{low} nem gyulladósos monocitákat. Az adhéziós molekulák és kemokin receptorok sejt felszíni expresszióját neutrofil granulocitákon (Ly6G+) és monocitákon (CD11b+, Ly6G-, SSC^{low}) vizsgáltuk. A felhasznált antitesteket a 4. táblázat tartalmazza. A méréseket CytoFLEX (Beckman Coulter) áramlási citométeren végeztük, az adatokat a Kaluza Analysis Softwer (Beckman Coulter) segítségével elemeztük.

4. táblázat: Az áramlási citométeres mérések során használt antitestek.

Antitest	Klón	Konjugátum	Katalógusszám
CD45	30-F11	FITC	11-0451
CD45	30-F11	PE	12-0451
CD45	30-F11	PECy7	25-0451
CD45.2	104	FITC	11-0454
Ly-6G	1A8-Ly6g	PE	12-9668
Ly-6G	1A8-Ly6g	APC	17-9668
CD62L	MEL-14	PECy7	25-0621
CD115	AFS98	APC	17-1152
CD11b	M1/70	eFluor 450	48-0112
Ly-6C	HK1.4	APC-eFluor 780	47-5932
CD3	17A2	FITC	11-0032
CD19	eBio1D3 (1D3)	PECy7	25-0193
CD162	4RA10	PE	12-1621
CD11a	M17/4	eFluor 450	48-0111
CD49d	R1-2	PerCP-eFluor 710	46-0492
CD29	HMb1-1	APC-eFluor 780	47-0291
CXCR4	L276F12	APC	BZ-146507
CXCR2	IL-8RB	PerCP	FAB2164C

4.11 Csontvelői és szérumban CXCL12 szintek meghatározása

Teljes csontvelői extracelluláris folyadék izolálásához a combcsontot 1 ml hideg foszfátpufferrel (PBS) kimostuk, majd egy centrifugálási lépés után (500g, 3 perc, 4°C) a felülúszókat külön gyűjtöttük és -80°C-on tároltuk. A mintákban a CXCL12 koncentrációját ELISA módszerrel határoztuk meg (R&D Systems). Az értékeket a felülúszó DC Protein Assay (Bio-Rad) segítségével mért teljes fehérjemennyiségére normalizáltuk.

Szérumbinták gyűjtéséhez az egerektől izoflurán anesztézia mellett retro-orbitális punkcióval az állat nagyságától függően maximum 1 ml vért vettünk. A mintákat szobahőmérsékleten történő 1 órás inkubáció után lecentrifugáltuk (1500g, 10 perc, 4°C), majd a szérumbot -80°C-on tároltuk. A CXCL12 koncentrációját ELISA módszerrel határoztuk meg (R&D Systems).

4.12 Marginált és szöveti leukociták meghatározása a tüdőben

Izoflurán anesztézia alatt a szemzug mögötti vénás plexusba adott injekcióval anti-CD45-PECy7 antitesteket (9 µg/200 µl) juttattunk az egerek keringésébe. 5 perc elteltével az egereket termináltuk, a bal kamra átmetszése után a jobb kamrán keresztül 15 ml PBS-sel átmostuk a tüdő keringését, majd eltávolítottuk a tüdőt. Kisebb tüdődarabokat 15 µg/30 µl anti-CD45.2-FITC antitestben felaprítottunk, majd emésztő oldatban inkubáltuk őket 37°C-on, 10 percig (mintánként 1 ml PBS: 1% BSA, 1 mg DNáz I és 0,1 mg tripszin inhibitor). Ezután 0,1 mg kollagenáz XI enzimet adtunk a mintákhoz, majd további 20 percig inkubáltuk őket. A mintákat 40 µm-es szűrőn szűrtük át és áramlási citometria segítségével meghatároztuk az abszolút leukocita számot (CytoFLEX, Beckman Coulter). A sejteket live/dead-APC vitális festékekkel valamint anti-Ly6G-PE antitestekkel jelöltük. A módszer segítségével elkülönítettük a marginált, érfalhoz tapadt dupla pozitív (CD45-PECy7+, CD45.2-FITC+) sejteket és a szöveti (intersticiális és alveoláris) leukocitákat (CD45-PECy7-, CD45.2-FITC+). A makrofágokat magas autofluoreszcenciájuk alapján azonosítottuk. A méréseket CytoFLEX (Beckman Coulter) áramlási citométeren végeztük, az adatokat Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter) segítségével elemeztük.

4.13 Cosinor analízis

A cosinor analízis a kronobiológiában általánosan elfogadott módszer a ritmus elemzésére. Feltételezzük, hogy az idősorunk 24 órás periódushosszú oszcillációval leírható és ennek ellenőrzésére nem-lineáris regresszió segítségével koszinusz görbét illesztünk adatainkra. A görbe minden pontjának értéke ($Y(t)$) a változó átlagértékének (M , mint *mezo*), az amplitúdónak (A) és az akrofázisnak (a maximumhoz tartozó fázisnak (φ)) a függvénye:

$$Y(t) = M + A \cdot \cos\left(\frac{2\pi}{\tau} \cdot (t - \varphi)\right) + e(t)$$

ahol τ a periódushossz és $e(t)$ a hiba (256). Ha az analízis eredményeként kapott $p < 0,05$, az illeszkedést szignifikánsnak tekintjük.

A módszer előnye, hogy információt nyújt az illeszkedés jóságáról (p érték) és segítségével a ritmus számszerűleg jellemezhető. A cosinor analízist Matlab R2021a programban futtattuk (MathWorks, MA, USA).

4.14 Statisztikai analízis

A statisztikai analízishez a Statistica szoftvert használtuk (StatSoft Statistica, TIBCO Software Inc., CA, USA). Az alvási idők, 6-szulfatoximelatonin szintek, GSQG értékek és HRV adatok normalitását Kolmogorov-Smirnov teszttel ellenőriztük. A 6-szulfatoximelatonin szintek statisztikai analíziséhez a Mann-Whitney U tesztet használtuk. A binenkénti spektrális adatokat normalizáltuk a statisztikai analízis előtt. A továbbiakban és a többi adat esetén paraméteres próbákat alkalmaztunk a következők szerint. A hétköznapi és hétvégi adatok közötti különbségek elemzéséhez páros t-próbát, a csoportok összehasonlítására kétmintás t-próbát alkalmaztunk. A HRV adatok egymást követő blokkokban történő elemzését ismétléses varianciaanalízissel és *post hoc* Fisher-féle LSD (Fisher's Least Significant Difference) vizsgálattal végeztük. Az SJL alvásminőséggel, illetve HRV-vel való összefüggéseit Pearson korrelációval vizsgáltuk. A szabad- és munkanapi normalizált PSD adatok különbségét a frekvencia tengelyen (0-0,4 Hz) fejeztük ki. Annak megítélésére, hogy a különbségek szignifikánsan eltérnek-e a null hipotézistől (miszerint nincs különbség), egymintás t-próbát használtunk.

Állatkísérletes eredményeink elemzésekor a csoportok összehasonlítására kétmintás t-próbát alkalmaztunk. A nap folyamán több időpontban is mért paraméterek

esetén egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) és cosinor analízist használtunk az idő hatás vizsgálatához és kétszempontos ANOVA-t a csoport hatás ellenőrzésére. Az intraperitoneális glükóztolerancia teszt és az artritisz eredmények elemzésére (amikor a különböző időpontokhoz tartozó adatok azonos egyedtől származtak) ismétléses varianciaanalízist és post hoc Fisher-féle LSD (Fisher's least significant difference) vizsgálatot végeztünk.

Minden esetben a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. Az ábrákon az átlag értékek és SD (standard deviation, szórás), vagy SEM (standard error of the mean, standard hiba) értékek szerepelnek az ábrafeliratban feltüntetett módon.

5. Eredmények

A fejezetben doktori tanulmányom során végzett vizsgálatainkat a célkitűzéseknek megfelelően két fejezetben ismertetem. Elsőként a szociális *jetlag* alvásminőséggel és alvás alatti kardiovaszkuláris szabályozással való összefüggéseit elemző tanulmányunkat, majd az időzített etetés immunrendszerre gyakorolt hatásainak vizsgálatával kapcsolatos eredményeinket mutatom be.

5.1 A szociális *jetlag* és az alvás alatti kardiovaszkuláris szabályozás, valamint az alvásminőség összefüggései

5.1.1 Az SJL alvásminőségre gyakorolt hatásának vizsgálatában résztvevők alapvető jellemzői, napi ritmusuk és alvási paramétereik

Az alanyok jelentkezésükkor kitöltötték az általános alvási szokásaikat felmérő kronotípus kérdőívet, az MCTQ-t (Munich Chronotype Questionnaire). Elsőként a résztvevők kérdőívéből nyert paramétereit hasonlítottuk össze a vizsgálat hetében vezetett alvásnaplójukkal, hogy megtudjuk, vajon a vizsgálat alatt is a szokásos ritmusuk szerint éltek-e. A két forrás adatai között megbízható korrelációt találtunk mind a kronotípus, mind az SJL esetében (5. táblázat).

5. táblázat: Az MCTQ és az alvásnapló alapján számított paraméterek korrelációja. Átlag (SD), Pearson-féle korreláció, $n=33$. (MCTQ: Munich Chronotype Questionnaire, MSF_{sc}: sleep corrected mid-sleep on free days, SJL: social jetlag)

	MCTQ	alvásnapló	korreláció	
			r	p
kronotípus (MSF _{sc}) (hh:mm)	04:31 (01:01)	04:24 (01:01)	0,702	<0,001
SJL (hh:mm)	01:30 (00:45)	01:32 (00:53)	0,763	<0,001

A résztvevőket az alvásnaplójuk alapján számított SJL szerint kis és nagy SJL-ű csoportba osztottuk. A két csoport sem kor, sem BMI alapján nem különbözött szignifikánsan (6. táblázat).

6. táblázat: A résztvevők kor, BMI és SJL adatai. Átlag (SD).

	minden résztvevő n=33	kis SJL-ű csoport n=17	nagy SJL-ű csoport n=16
kor (év)	23,2 (1,5)	23,3 (1,9)	23,1 (0,9)
BMI	22,8 (2,54)	22,1 (2,7)	23,6 (2,1)
SJL (hh:mm)	1:32 (0:53)	00:49 (00:29)	2:17 (0:32)

A résztvevők alvásminőségét, alvás alatti szívfrekvencia variabilitását és melatonin szintjét egy vizsgálati héten két mérési napon, egy munkanapon (hétköznap) és egy szabadnapon (hétvégén) vizsgáltuk. A kis és nagy SJL-ű csoportok mérési napokra vonatkozó alvási adatait (időzítés és időtartam) a 7. táblázat tartalmazza. Látható, hogy míg hétköznap nem mutatkozott különbség a két csoport között, addig hétvégén a nagy SJL-ű csoport szignifikánsan később tért nyugovóra, később aludt el és később ébredt, mint a másik csoport. Mind a két csoport többet aludt hétvégén, mint hétköznap.

7. táblázat: Az alvás időzítése és időtartama a mérési napokon a két csoportban. Az alvás időzítésének és időtartamának összehasonlítása a csoportok között munka- és szabadnapokon. A lefekvés ideje az alvásnaplóból származik, az elalvás és ébredés idejét az Actiheart szoftvere adta meg. A szoftver által becsült adatokat az alvásnapló bejegyzéseivel erősítettük meg. *Átlag (SD), kétmintás t-próba, $n_{kis\ SJL}=17$ és $n_{nagy\ SJL}=16$.*

idő (hh:mm)	munkanap			szabadnap		
	kis SJL	nagy SJL	p	kis SJL	nagy SJL	p
lefekvés	23:45 (00:52)	23:51 (00:49)	0,775	23:56 (00:48)	01:27 (00:52)	<0,0001
elalvás	23:57 (00:50)	00:03 (00:51)	0,713	00:09 (00:50)	01:36 (00:51)	<0,0001
ébredés	07:09 (00:39)	07:02 (00:28)	0,540	08:45 (01:09)	10:00 (01:40)	0,019
alvás hossza	07:13 (00:56)	06:59 (00:43)	0,433	08:35 (01:11)	08:25 (01:27)	0,706

A homeosztatisz alvásszabályozás fontos eleme, hogy mekkora az alvási igény, ezért összehasonlítottuk a mérések előtt ébren töltött időt is a két csoportban, azonban sem csoport hatást, sem csoport \times nap kölcsönhatást nem találtunk (8. táblázat).

8. táblázat: Az alvás előtt ébren töltött idő a két csoportban. A mérési napokon történő alvás előtt ébren töltött időben nem volt különbség a csoportok között. *Átlag (SEM), kétszemponos ANOVA, csoport hatás $p=0,682$, csoport \times nap hatás $p=0,628$, $n_{kis\ SJL}=17$ és $n_{nagy\ SJL}=16$.*

	kis SJL		nagy SJL	
	munkanap	szabadnap	munkanap	szabadnap
ébren töltött idő (hh:mm)	16:35 (00:15)	15:21 (00:16)	16:34 (00:09)	15:07 (00:19)

A cirkadián ritmus markereként megmértük a melatonin elválasztást jól jellemző metabolit, a 6-szulfatoximelatonin koncentrációját a vizeletben. A reggeli és esti minták között a vártak megfelelően jelentős különbséget találtunk, a koncentrációk átlagos egyéni reggeli/esti hányadosa ($6,75 \pm 0,75$, átlag \pm SEM) fiziológiás ritmusra utal. Ugyanakkor a csoportok között nem mutatkozott különbség (9. táblázat).

9. táblázat: Melatonin az esti és reggeli vizeletben. A vizelet 6-szulfatoximelatonin kreatininre normalizált mennyiségének összehasonlítása a csoportok között a két mérési napon. *Átlag (SEM), Mann-Whitney U-teszt, $n_{kis\ SJL}=17$ és $n_{nagy\ SJL}=16$.*

	munkanap			szabadnap		
	kis SJL	nagy SJL	p	kis SJL	nagy SJL	p
6-szulfatoxi melatonin /kreatinin (nmol/mmol)						
esti	2,143 (0,645)	2,293 (0,410)	0,242	3,654 (0,715)	3,988 (1,048)	0,796
reggeli	10,557 (1,354)	10,791 (1,718)	0,858	16,021 (4,165)	12,502 (2,318)	0,648

5.1.2 A HRV analízise az időtartományban

Az alvásidőzítés alvás alatti kardiovaszkuláris szabályozásra gyakorolt hatásának vizsgálatához először az alanyok alvás alatti átlagos szívfrekvenciáját (HR) és szívfrekvencia variabilitását hasonlítottuk össze a munka- és szabadnapok között. Az átlagos szívfrekvencia nem különbözött a két éjszaka között egyik csoportban sem. Ezzel szemben a HRV általános jellemzésére használatos szórási paraméter, az SDNN a nagy SJL-ű csoportban szignifikánsan nagyobb volt a hétvégén, mint hétköznap (10. táblázat).

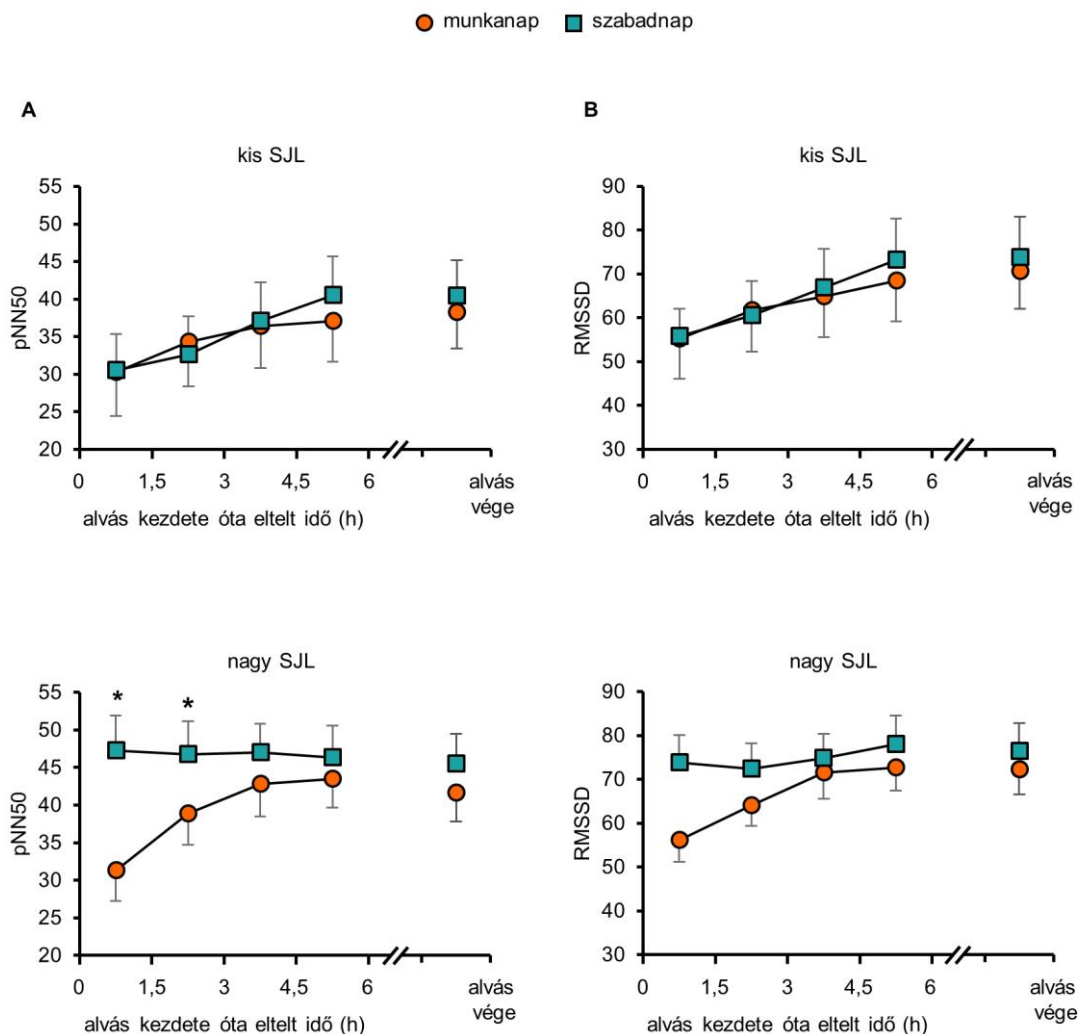
10. táblázat: Szívfrekvencia és HRV paraméterek az alvás teljes ideje alatt. A szívfrekvenciát (HR) és a HRV paramétereket az alvás teljes idejére átlagoltuk. Csoporton belül összehasonlítottuk a munka- és szabadnapokról származó értékeket. *Átlag (SEM), páros t-próba $n_{kis\ SJL}=17$ és $n_{nagy\ SJL}=16$.* (SJL: social jetlag, SDNN: standard deviation of the normal to normal intervals, RMSSD: root mean square of successive differences, pNN50: percentage of successive normal to normal intervals differing by more than 50 ms)

	kis SJL			nagy SJL		
	munkanap	szabadnap	p	munkanap	szabadnap	p
HR (1/min)	59,1 (2,1)	58,1 (1,3)	0,520	57,8 (1,8)	57,2 (2,1)	0,739
SDNN	86,8 (7,3)	95,1 (6,4)	0,088	91,5 (6,2)	102,2 (6,9)	0,018
RMSSD	61,1 (8,3)	64,9 (7,4)	0,422	64,1 (4,5)	72,8 (5,4)	0,092
pNN50	32,8 (5,1)	35,2 (4,3)	0,540	37,7 (3,6)	44,2 (3,9)	0,107

A továbbiakban szeretnénk volna a variabilitást az éjszaka folyamán vizsgálni, ehhez az elalvástól kezdve a HRV paramétereket 1,5 órás blokkokban átlagoltuk. Mivel a legrövidebb alváshossz 6 óras volt, 4 egymást követő blokk munkanapi és szabadnapi adatait hasonlítottuk össze mindkét csoportban. A 10. ábrán a paraszimpatikus aktivitást leginkább jellemző RMSSD és pNN50 paraméterek alakulása látható. Az adatokon végzett 3 faktoros (csoport, nap, alvási blokk) ismétléses ANOVA alapján a fő faktorok közül az alvási blokk hatása mutatkozott szignifikánsnak ($p<0,001$) mindkét mutató esetében. A faktorok kölcsönhatásainál a csoport \times nap \times alvási blokk interakciónak volt szignifikáns hatása a pNN50 esetében ($p=0,015$). Míg az alacsony SJL-lel rendelkezők esetében az értékek együtt futnak hétköznap és hétvégén, addig a nagyobb SJL-lel

rendelkezőknek az első két alvási blokkban szignifikánsan alacsonyabbak a pNN50 értékeik (10A ábra). Az RMSSD esetében nagyon hasonló tendencia látható, azonban itt a kölcsönhatás (csoport \times nap \times alvási blokk) nem érte el a szignifikancia szintjét ($p=0,059$) (10B ábra).

Adataink azt mutatják, hogy a nagyobb SJL-lel rendelkezők munkanapi alvásának első felét alacsonyabb paraszimpatikus aktivitás jellemezte, mint a szabadnapi alvásuk elejét. Annak ellenőrzésére, hogy az alvás elején tapasztalt különbséget nem kompenzálja-e ellentétes irányú eltérés az alvás későbbi időszakában, egy további analízist végeztünk. Ennek során összehasonlítottuk a HRV-t a hétköznapi ébredés előtti 1,5 órában és az ennek megfelelő hétvégi időszakban. Ez azt jelenti, hogy a vizsgált alvási időszak az adott személynél ugyanannyi idővel az elalvás kezdete után volt hétvégén, mint hétköznap (10A, B ábra, a tengely megszakítása után). Például ha valaki hétköznap 23 órától másnap 6:30-ig aludt, akkor esetében aznap az 5-6:30 közötti időszakot vizsgáltuk, ami az elalvása után 6 órával kezdődött. Ha ugyanez a személy hétvégén éjfélkor aludt el, akkor hétvégén az elalvása után 6 órával kezdődő, azaz a 6-7:30-ig tartó időszakot elemeztük, függetlenül attól, hogy később ébredt fel. Ebben az alvás végi időblokkban nem láttunk különbséget a két éjszaka között egyik csoport esetében sem, azaz az alvás elején tapasztalt két nap közötti eltérés nem kompenzálódott a későbbiekben.



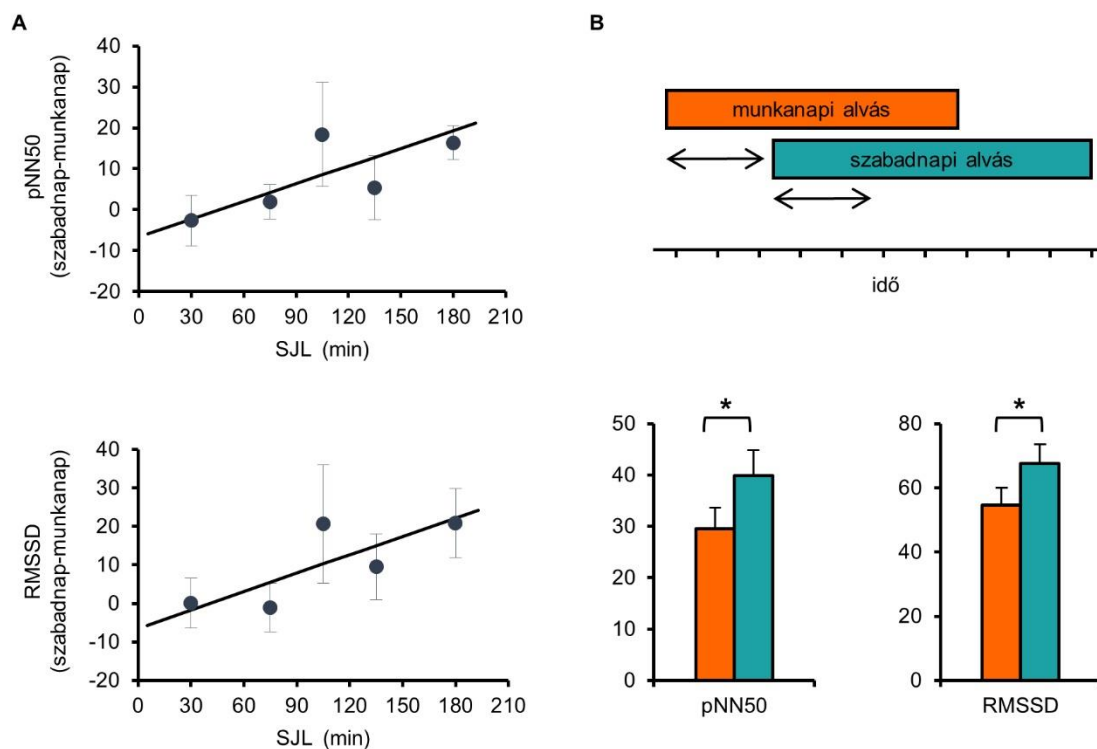
10. ábra: A HRV alakulása az alvás folyamán

A paraszimpatikus aktivitást jellemző pNN50 (A) és RMSSD (B) értékek az elalvástól kezdve másfél órás blokkokban átlagolva láthatók a kis SJL-lel (felső panel) és nagy SJL-lel (alsó panel) rendelkezők körében. Az utolsó másfél órás alvási blokk a tengely megszakítása után látható. *Átlag +/- SEM, az alvás első 6 órája: ismétléses ANOVA 3 szinttel (nap, blokk, csoport), post hoc Fischer teszt, * $p < 0,05$; az alvás utolsó másfél órája: páros t-próba; $n_{kis\ SJL} = 15$ és $n_{nagy\ SJL} = 11$. (publikáció (I)) SJL=social jetlag, HRV=heart rate variability, pNN50=percentage of successive normal to normal intervals differing by more than 50 ms, RMSSD=root mean square of successive differences*

A továbbiakban az SJL és az előbbieken látott szabad- és munkanapok közötti HRV különbségek összefüggéseire összpontosítottunk. Az alvás első 3 óráját vizsgálva (az előzőleg bemutatott első két alvási blokknak megfelelően) az SJL és az egyéni szabadnapi-hétköznapi pNN50 különbség pozitív korrelációt mutatott (Pearson korreláció, $r=0,39$, $p=0,033$, $n=33$). Amennyiben az elemzést az alvás első két órájára

korlátoztuk, mind az RMSSD, mind a pNN50 különbségek korreláltak az SJL mértékével (11A ábra). Azaz a nagyobb SJL nagyobb HRV különbséggel járt együtt. Ahogy az a 7. táblázatban is látható, a magas SJL-lel rendelkező résztvevők hétköznap nem aludtak kevesebbet, mint a kis SJL-lel rendelkezők, hanem valószínűleg annak tudatában, hogy másnap időre kell kelniük, saját preferenciájuknál korábban aludtak el. Ezt a korai alvási időszakot pedig alacsonyabb paraszimpatikus aktivitás kísérte a szabadnapi első szakaszhoz képest.

A következőkben a HRV-t az alvás azon első időszakában elemeztük, amelynek hosszúsága megfelelt a két nap közötti elalvási időpont különbségének (11B ábra, felső panel). Ebben az elemzésben csoporttól függetlenül minden alany adata szerepel, akinél a két nap között volt legalább 25 perc különbség az elalvás idejében. Mind az RMSSD mind a pNN50 szignifikánsan magasabb volt a hétfégi napon ebben az alvási időablakban is (11B ábra, alsó panel).

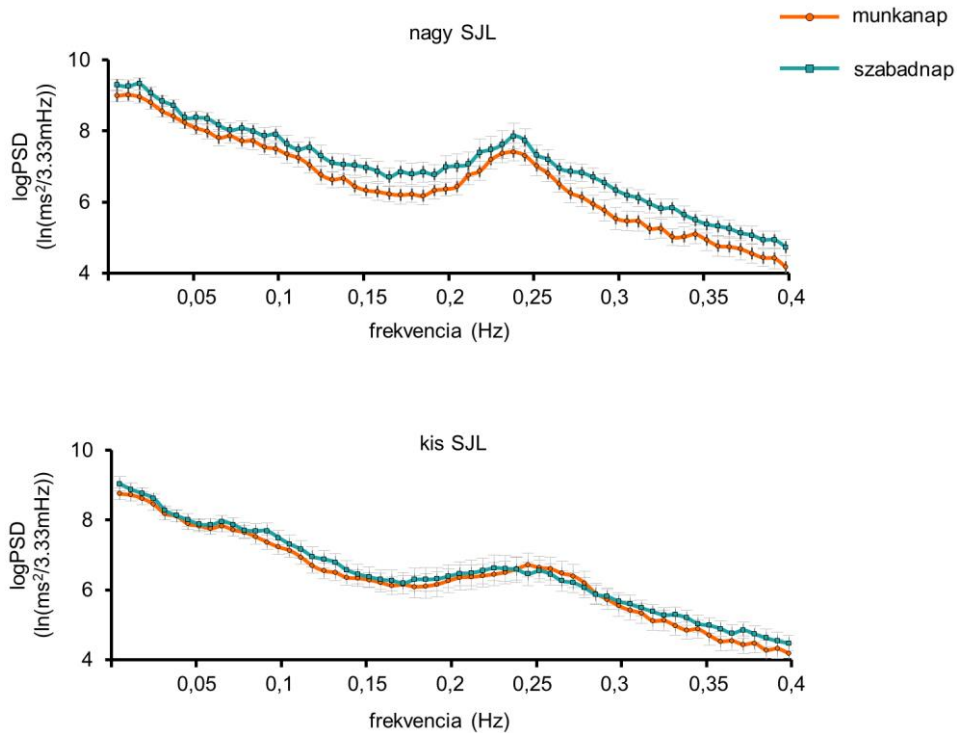


11. ábra: A szabad- és munkanapi HRV különbségek és az SJL összefüggései
(A) Az SJL és a HRV szabad- és munkanapok közti különbségének korrelációja. A paraszimpatikus aktivitást jellemző pNN50 és RMSSD értékeket az alvás első két órájára átlagoltuk, majd ezen paraméterek egyénenkénti szabadnap-munkanap különbséget

korreláltattuk az SJL mértékével. *Átlag ± SEM 30 vagy 60 perces SJL intervallumban, a lineáris regresszió egyenese. Pearson korreláció, pNN50: $r=0,4135$, $p=0,023$, $n=30$; RMSSD $r=0,365$, $p=0,047$, $n=30$ (B)* A hétköznapi korai lefekvés alacsonyabb HRV-vel jár együtt. A felső panelen az analizált időszakot ábrázoltuk sematikusán. A két nyíl azonos időtartamot jelöl. A pNN50 és RMSSD értékeket a két nap között a lefekvés idejében látható különbség időtartamára átlagoltuk és összehasonlítottuk a munka- és szabadnapok között (alsó panel). *Átlag + SEM, Páros t-próba, $n=18$. (publikáció (I))* HRV=heart rate variability, pNN50=percentage of successive normal to normal intervals differing by more than 50 ms, RMSSD=root mean square of successive differences

5.1.3 A HRV analízise a frekvenciatartományban

A továbbiakban a HRV különbségek részletesebb elemzéséhez frekvenciaanalízist végeztünk az alanyok alvásának első két órájában. Ennek során megállapíthatjuk, hogy a variabilitáshoz milyen frekvenciájú komponens milyen teljesítménnyel járul hozzá. Az eredmény a spektrális teljesítménysűrűség (PSD), amely a teljesítmény eloszlását mutatja a frekvencia függvényében. A PSD-t ábrázolva azt láttuk, hogy míg a kis SJL-lel rendelkezők csoportjában a szabad- és munkanapi görbék egymásra fekszenek, addig a nagy SJL-lel rendelkezők hétvégi görbéje a hétköznapiénál feljebb fut (12. ábra).

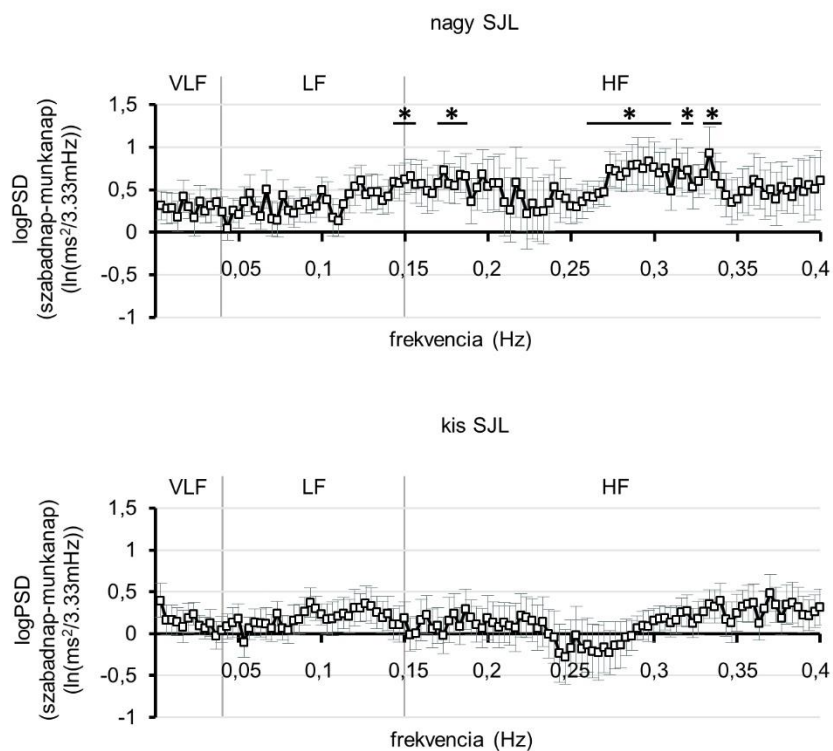


12. ábra: A HRV spektrális teljesítménysűrűsége az alvás első két órájában

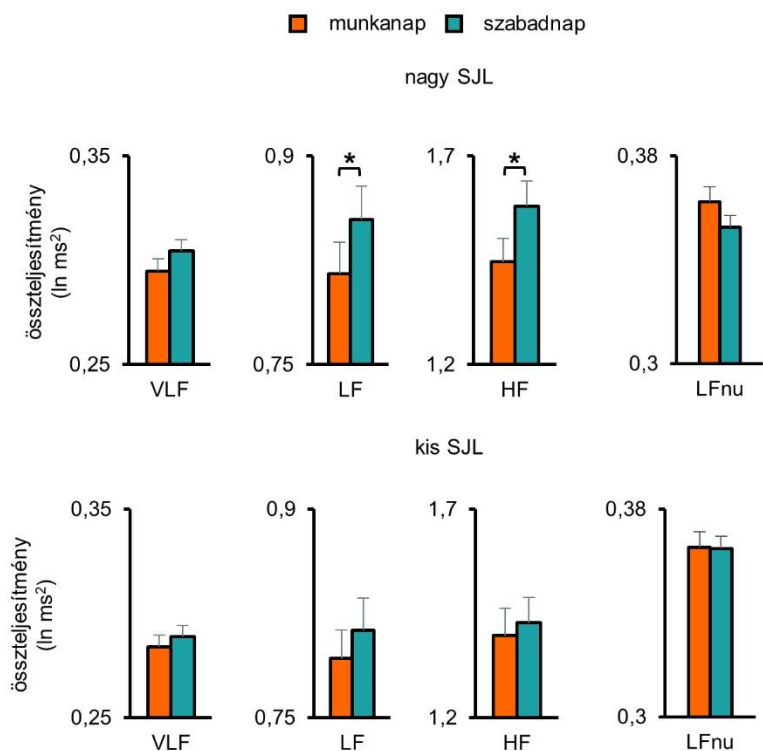
A felső diagramm a nagy, az alsó a kis SJL-el rendelkezők adatait mutatja. *Átlag ± SEM*, $n_{nagy\ SJL}=13$ és $n_{kis\ SJL}=17$. (publikáció (I)) SJL=social jetlag, HRV=heart rate variability, PSD=power spectral density

A HRV különbség statisztikai elemzéséhez minden alany esetében kiszámítottuk a hétfélig-hétköznapis spektrális teljesítménysűrűség különbségét. A nagy SJL-lel rendelkezők csoportjában a két nap közötti különbség széles frekvenciatartományban szignifikánsnak mutatkozott, míg az alacsony SJL-lel rendelkezők esetében nem láttuk különbséget (13A ábra). Konvenció szerint a frekvenciatartományt három részre osztjuk: nagyon alacsony (VLF), alacsony (LF) és magas (HF) frekvenciasávokra. Ezen sávokat külön-külön vizsgálva látható, hogy mind a HF, mind az LF tartományok szerepet játszanak a nagy SJL-lel rendelkezők hétfélig HRV emelkedésében, de a VLF tartomány nem. A kis SJL-ű csoportban egyik sávban sem figyelhető meg különbség (13B ábra).

A



B



13. ábra: A HRV elemzése a frekvenciatartományban az alvás első két órájában

(A) A HRV spektrális teljesítménysűrűségének szabadnap-munkanap különbsége a nagy (felső panel) és kis (alsó panel) SJL-lel rendelkezők csoportjában. *Átlag ± SEM, egymintás t-próba, *p<0,05, n_{nagy SJL}=13 és n_{kis SJL}=17.* (B) A standard frekvenciasávok összteljesítménye munka- és szabadnapokon. *Átlag + SEM, páros t-próba, *p<0,05, n_{nagy SJL}=13 és n_{kis SJL}=17.* (publikáció (I)) SJL=social jetlag, PSD=power spectral density, VLF=very low frequency, LF=low frequency, HF=high frequency, nu=normalized unit

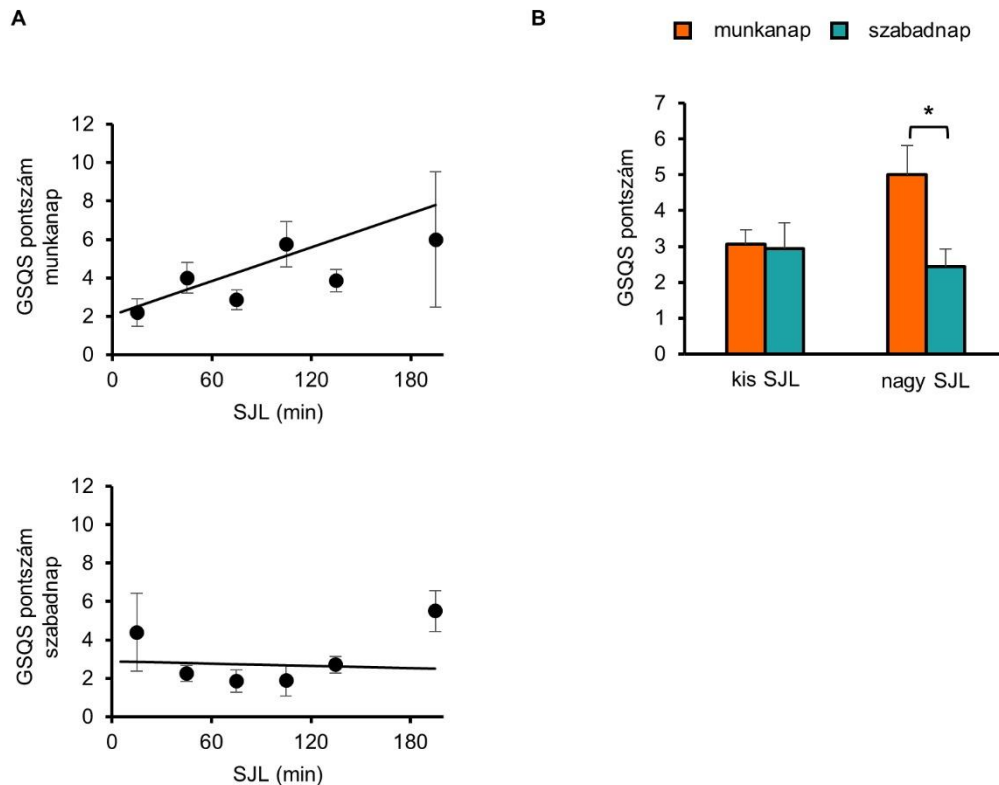
A szívfrekvenciát ütésről ütésre meghatározó különböző (direkt és indirekt) szabályozó mechanizmusok hatásai más-más frekvenciában jelennek meg. A VLF hosszútávú szabályozó mechanizmusokat tükröz, termoregulációs, renin-angiotenzin és endotél eredetű hatásokat is feltételeznek mögötte. Az LF komponens értékéhez a paraszimpatikus és szimpatikus idegrendszer aktivitása egyaránt hozzájárul (257). A HF sáv egyértelműen a *vagus* efferens hatását tükrözi (142, 143, 257), ahogy azt a *vagus* elektromos stimulációjával, muszkarinos receptor blokáddal, illetve vagotómiával végzett korai kísérletes megfigyelések megmutatták (258-260). A szimpatikus aktivitás megítélésére az LF normalizált értéke (LFnu) használatos, mely az LF arányát adja meg az LF és HF összteljesítményhez képest. Az LFnu értékek az alvás alatt érhető módon alacsonyok voltak (261, 262), és egyik csoportban sem mutattak különbséget a két nap között (13B ábra).

Ezen eredményeink, összhangban az időtartománybeli elemzésekkel arra utalnak, hogy a nagy SJL-ű csoportra kisebb mértékű paraszimpatikus moduláció jellemző az éjszaka első két órájában hétköznap, mint hétvégén. Mindez kedvezőtlenebb kardiovaszkuláris szabályozást jelent e csoportban a hétköznapokon, mint szabadnapokon.

5.1.4 Az SJL és a szubjektív alvásminőség összefüggései

A tanulmányban résztvevők a vizsgálat hetében, a hétköznapi és hétvégi mérési éjszakákat követően, ébredés után kitöltötték a Groningen kérdőívet (9. ábra). A kérdőív alapján az előző éjszakára vonatkozó alvásminőséget egy 14 pontos skálán osztályozzuk (GSQS pontszám), a magasabb pontszám rosszabb, az alacsonyabb jobb alvásminőséget jelent (252, 253). Az SJL hétköznapokon összefüggést mutatott a szubjektív alvásminőséggel, a nagyobb SJL-hez rosszabb alvásminőség társult. Szabadnapokon azonban nem mutatkozott összefüggés (14A ábra).

Míg a kis SJL-lel rendelkezők hasonló alvásminőségről számoltak be a két napon, addig a nagy SJL-ű csoportba tartozók alvásminősége szignifikánsan rosszabb volt hétköznap, mint hétvégén (14B ábra). Ha a két csoport alvásminőségét hasonlítjuk össze, ott is jelentős különbség látható, a nagy SJL-ű csoport pontszámai szignifikánsan magasabbak hétköznap, mint a másik csoporté (kétmintás t-próba, $p=0,043$).



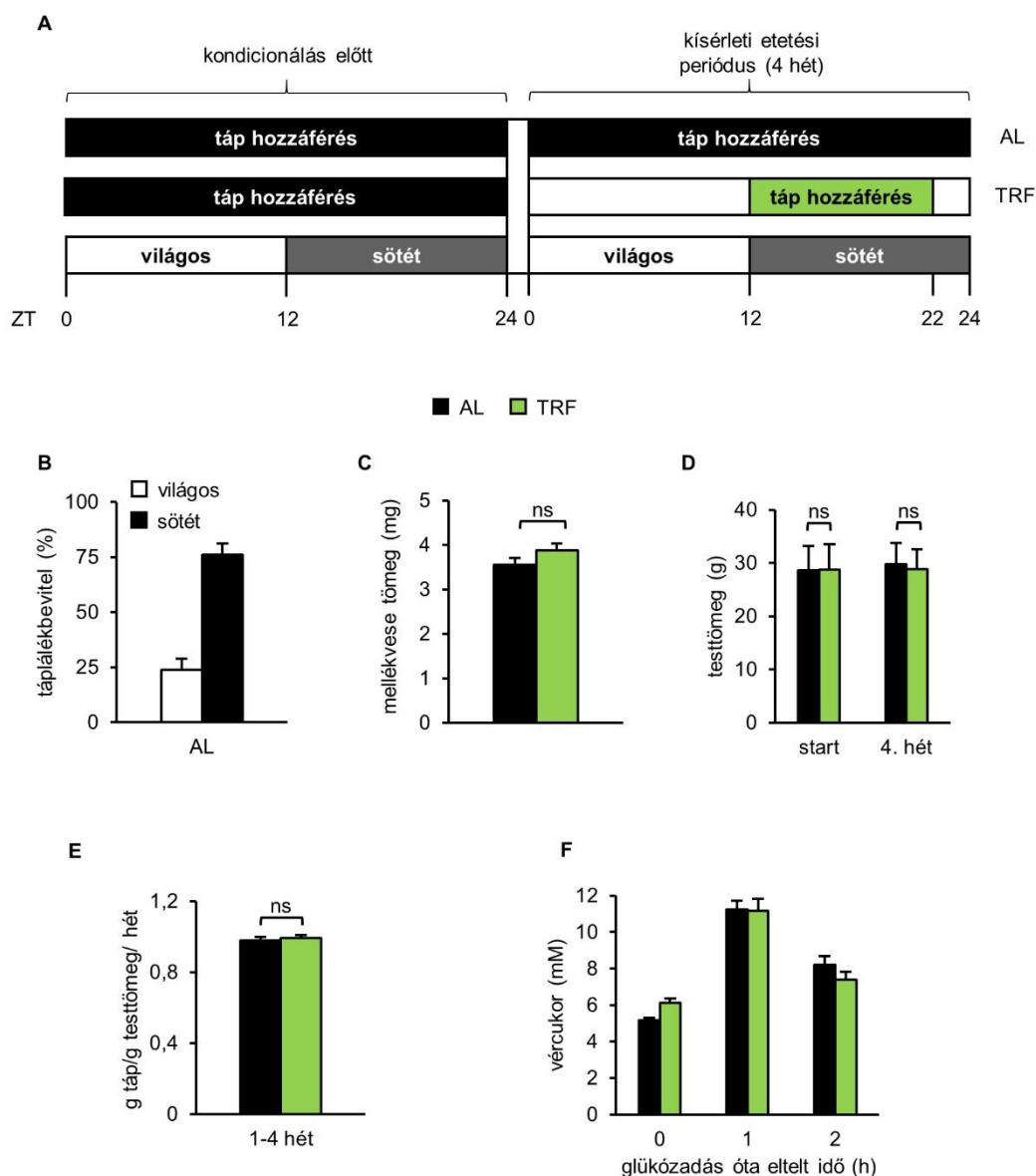
14. ábra: Az SJL és a szubjektív alvásminőség összefüggései

(A) A Groningen Alvásminőség Skálán (GSQS) kapott pontszám és az SJL korrelációja munkanapokon (felső panel) és szabadnapokon (alsó panel). *Átlag ± SEM 30 vagy 60 perces SJL intervallumban, a lineáris regresszió egyenese. Pearson korreláció, munkanap: $r=0,404$, $p=0,02$, $n=33$; szabadnap: $r=-0,041$, $p=0,82$, $n=33$.* (B) Átlagos GSQS pontszámok a két csoportban hétköznap, illetve hétvégén. *Átlag + SEM, páros t-próba; $n_{kis\ SJL}=17$ és $n_{nagy\ SJL}=15$.* (publikáció (I) SJL=social jetlag

5.2 Az időzített etetés hatása az autoimmun artritisz lefolyására, valamint az immunrendszer válaszkészségére

5.2.1 A TRF alapvető metabolikus paraméterekre és a metabolikus ritmusra gyakorolt hatása

Állatainkat 12 órás fény/sötétség megvilágításban tartottuk, egy részük *ad libitum* módon jutott táplálékhoz (AL csoport), másik részük táplálékfelvételi lehetőségét az aktív fázisuk első 10 órájára korlátoztuk (TRF csoport). Az állatokat 4 hétig kondicionáltuk a táplálék megváltozott elérhetőségéhez (15A ábra). Az *ad libitum* etetett állatok a táp 25%-át fogyasztották el napközben, inaktív fázisuk alatt, ami megfelel a korábbi irodalmi adatoknak (263) (15B ábra). A 4. hét végén megmértük az állatok mellékveséjének tömegét, mint krónikus stressz indikátort (264). A két csoport között nem találtunk különbséget, amiből arra következtettünk, hogy az etetési protokoll nem okozott jelentős stresszt a TRF állatainknak (15C ábra). Az egerek általános metabolikus állapotát követendő, hetente mértük testtömegüket valamint az elfogyasztott táp mennyiségét, majd 4 hét elteltével glükóztolerancia tesztet végeztünk. A csoportok között nem mutatkozott testtömegbeli különbség sem az etetési protokoll előtt, sem 4 hét elteltével, azaz korábbi tanulmányokhoz hasonlóan (192) az általunk alkalmazott rövid idejű TRF nem befolyásolta szignifikánsan a testtömeget (15D ábra). A TRF és AL állatok hasonló mennyiségű tápot fogyasztottak, megerősítve, hogy nem történt kalóriamegvonás a TRF csoportban (15E ábra). A negyedik hét végén végzett intraperitoneális glükóztolerancia teszt alapján a két csoport vércukorszintje nem különbözött és minden időpontban a normál tartományon belül maradt (15F ábra).



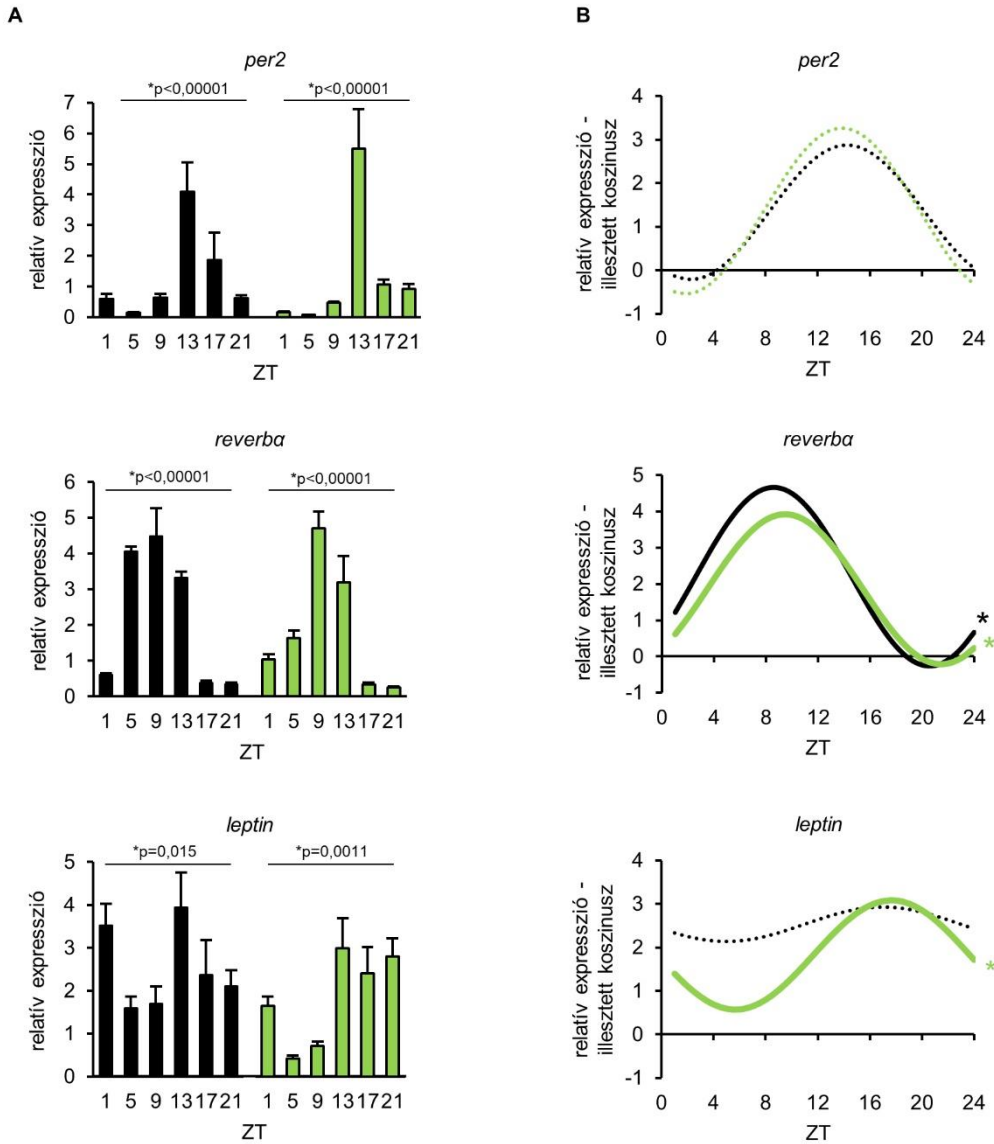
15. ábra: A TRF alapvető metabolikus paraméterekre gyakorolt hatása

(A) Az etetési protokoll sematikus ábrázolása. (B) Az *ad libitum* etetett állatok táplálékfelvétele a világos és a sötét időszakokban (átlag + SD, $n=5$ ketrec). (C) A mellékvesék tömege a 4 hetes etetési periódus végén (átlag + SD, $n_{AL}=15$, $n_{TRF}=13$, kétmintás *t*-próba, $p=0,154$). (D) Az állatok tömege az etetési periódus elején és a 4. hét végén (átlag + SD, $n_{AL}=75$, $n_{TRF}=82$, kétmintás *t*-próba, $p=0,871$ az etetés elején és $p=0,137$ a 4. hét végén). (E) Az átlagos heti elfogyasztott tápmennyiség a testtömegre normalizálva (átlag + SEM, $n_{AL}=24$, $n_{TRF}=28$, kétmintás *t*-próba, $p=0,571$). (F) Intraperitoneális glükóztolerancia teszt 16 óra éhezés után. Átlagos vércukorszintek a glükóz beadása előtt, majd 1 és 2 óra elteltével (átlag + SEM, $n_{AL}=7$, $n_{TRF}=9$, ismétléses varianciaanalízis, idő hatás $p<0,001$, csoport hatás $p=0,986$). (publikáció (II)) ns=nem szignifikáns, AL=*ad libitum*, TRF=time restricted feeding

A TRF májanyagcserére és ritmusra gyakorolt hatásáról már több irodalmi adat is rendelkezésre áll, ezért mi a metabolizmus szempontjából szintén központi szereppel bíró viszcerális zsírszövetet vizsgáltuk. A metabolikus ritmus nyomon követésének céljából 4 órás felbontásban mértük az óraműködésben központi szerepet játszó *per2* és *reverb*a, valamint az óra által kontrollált gén *leptin* expresszióját. Az időzített etetés hatására a *per2* ritmusa kifejezettebbé vált, míg a *reverb*a fázisa eltolódott. A *leptin* expressziója a TRF hatására ritmikussá vált, miközben átlagos értéke kb. 30%-kal alacsonyabb volt, mint az AL csoportban (16A, B ábra, 11. táblázat). A zsírszövet óraműködését az időzített etetés egyértelműen befolyásolta.

Összességében azt tapasztaltuk, hogy az általunk alkalmazott viszonylag rövid és kismértékű TRF változást hozott a zsírszöveti működés – így a metabolizmus – ritmusában, de a vércukorszint szabályozásában nem okozott eltérést.

■ AL ■ TRF



16. ábra: A TRF viscerális zsírszövetre gyakorolt hatása

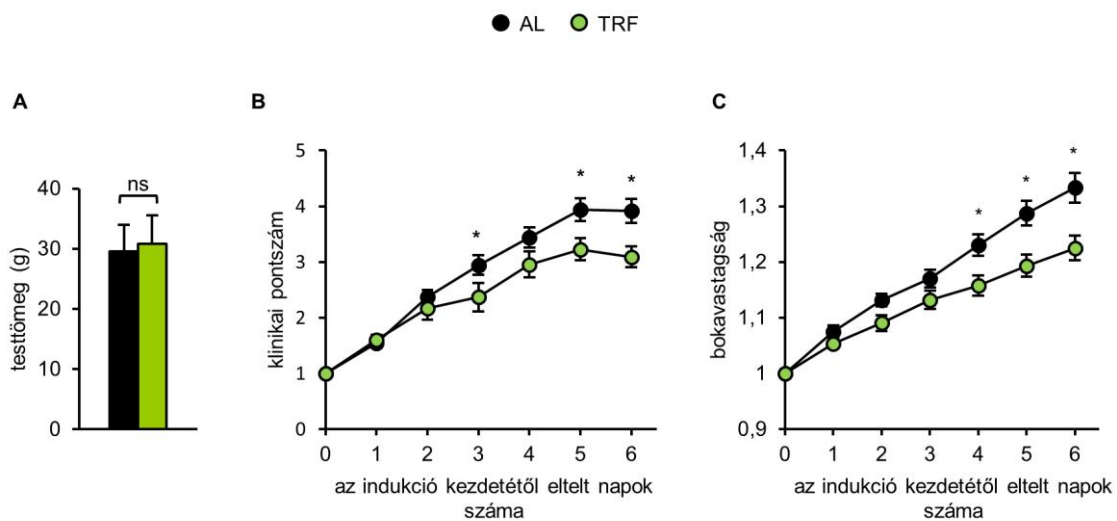
(A) A *per2*, *reverba*, és *leptin* relatív expressziója a zsírszövetben a nap folyamán (átlag + SEM, $n_{AL}=3-9$, $n_{TRF}=6-11$, egyszempontos ANOVA, a szignifikáns idő hatást * jelöli). (B) Az ábra (A) részén található adatokra illesztett koszinusz görbék. Vastag vonal és * jelöli a szignifikáns-, és pontozott vonal a nem szignifikáns görbe illeszkedést. A görbék paramétereit a 11. táblázat tartalmazza. (publikáció (II)) ZT=Zeitgeber time, AL=ad libitum, TRF=time restricted feeding

11. táblázat: A 16. ábra B részén látható koszinusz görbék adatai.

	<i>per2</i>		<i>reverta</i>		<i>leptin</i>	
	AL	TRF	AL	TRF	AL	TRF
mezor	13,35	13,63	22,05	18,61	25,40	18,28
amplitúdó	15,40	19,06	24,68	20,72	3,96	12,53
akrofázis (ZT)	14,23	13,84	8,57	9,45	16,97	17,66
koszinusz illeszkedés, p-érték	0,071	0,165	0,000	0,011	0,771	0,018

5.2.2 A TRF hatása az autoimmun K/BxN szérum transzfer artritisz tüneteire

A különböző étrendek autoimmun és gyulladásos betegségekre gyakorolt hatása régóta kutatott terület, azonban ma már az is ismeretes, hogy a táplálkozás gyakorisága és időzítése is hatással van a tünetek súlyosságára (245, 247, 248, 265). Mindezek alapján kíváncsiak voltunk, hogy az általunk alkalmazott enyhe TRF önmagában, kalóriamegvonás vagy a tápanyagösszetétel megváltoztatása nélkül hogyan hat egy autoimmun betegség lefolyására. Négy hét kondicionálás után az állatokban autoimmun K/BxN szérum injektálásával a humán reumatoid artritiszhez hasonló ízületi gyulladást váltottunk ki (266). Mivel az ízületre nehezedő testtömeg hatással lehet az ízületi gyulladásra, az állatok tömegét rendszeresen mértük, de a két csoport között nem mutatkozott testtömegbeli különbség (17A ábra). Az artritisz lefolyását naponta követtük klinikai pontozással és a bokavastagság mérésével. Mindkét mutató szignifikáns eltérést mutatott a két csoport között az indukciót követő 3., illetve 4. naptól kezdve (17B, C ábra). A 6. napon, amikor a gyulladás a legintenzívebb, a TRF csoportban a klinikai pontszám és a bokavastagság az AL csoport értékeinek 77%, illetve 70%-át érte csak el. Ezen eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy időzített etetés mellett a K/BxN szérum-transzfer artritisz tünetei mérsékeltebbek, mint AL etetés esetén.



17. ábra: A TRF enyhíti az autoimmun artritisz tüneteit

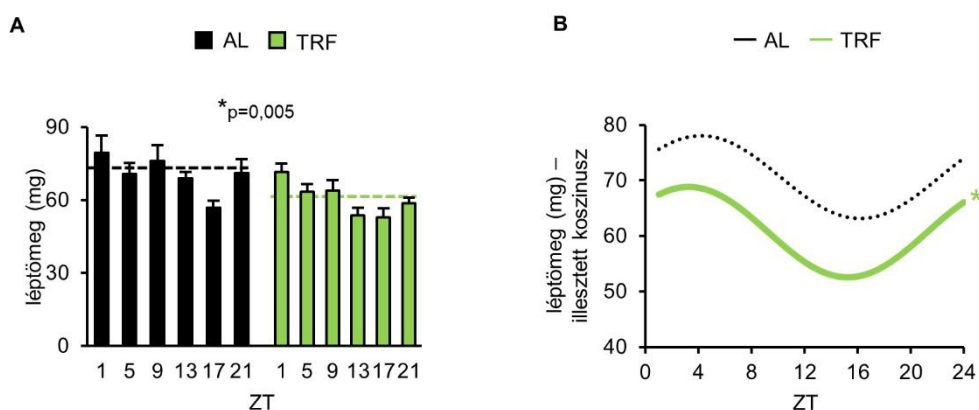
(A) Az egerek testtömege az artritisz indukciója előtt (átlag + SD, $n_{AL}=25$, $n_{TRF}=23$, kétmintás *t*-próba, $p=0,348$). ns=nem szignifikáns. A K/BxN szérum injektálása a 0. napon történt. Az artritisz lefolyását klinikai pontozással (B) és bokavastagság méréssel (C) követtük. Az adatokat a 0. napi értékekre normalizáltuk. Átlag ± SEM, $n_{AL}=25$, $n_{TRF}=23$, ismétléses ANOVA, klinikai pontszám: csoport hatás $p=0,053$, csoport × nap hatás $p=0,0001$; bokavastagság: csoport hatás $p=0,0056$, csoport × nap hatás $p=0,0003$; post hoc Fisher-teszt * $p<0,05$. (publikáció (II)) AL=*ad libitum*, TRF=*time restricted feeding*

5.2.3 A TRF hatása a lép tömegének és a fehérvérsejtek eloszlásának napi ingadozására

Mivel a rendszertelen étkezés és a metabolikus zavarok gyakori kísérői az egész szervezetet érintő gyulladási folyamatoknak, feltételeztük, hogy az *ad libitum* etetés a metabolikus ritmus ellaposodása mellett egy kismértékű szisztémás gyulladással járhat együtt, melynek következménye lehet a megfigyelt, súlyosabb lefolyású artritisz. Célunk volt ezért, hogy 4 hét etetési kondicionálás után, még gyulladás előtti állapotban megvizsgáljuk, van-e különbség az AL és TRF állatok immunrendszerének válaszkészségében.

Az immunrendszer általános aktivitásának vizsgálatához először 4 óras felbontásban mértük az egerek lépének tömegét. A lép a vörösvértestek mellett jelentős mennyiségű fehérvérsejtet is tárol. Kismértékű szisztémás gyulladás esetén a lépben a fehérvérsejtek akkumulációja és a lép megnagyobbodása figyelhető meg (267, 268). Az

időzített etetés szignifikánsan csökkentette az átlagos léptömeget (18A ábra), amely általánosan egy alacsonyabb gyulladási állapotot jelez a TRF csoportban. Ezen felül a léptömeg ingadozását figyeltük meg a nap folyamán (18B ábra, 12. táblázat), mely valószínűsíthetően a fehérvérsejtek ki- és bevándorlási intenzitásának napi változásaiból adódik. A ritmicitás csak a TRF csoportban adódott statisztikailag szignifikánsnak, ami arra utal, hogy az időben korlátozott etetés javítja a lép ritmikus működését.



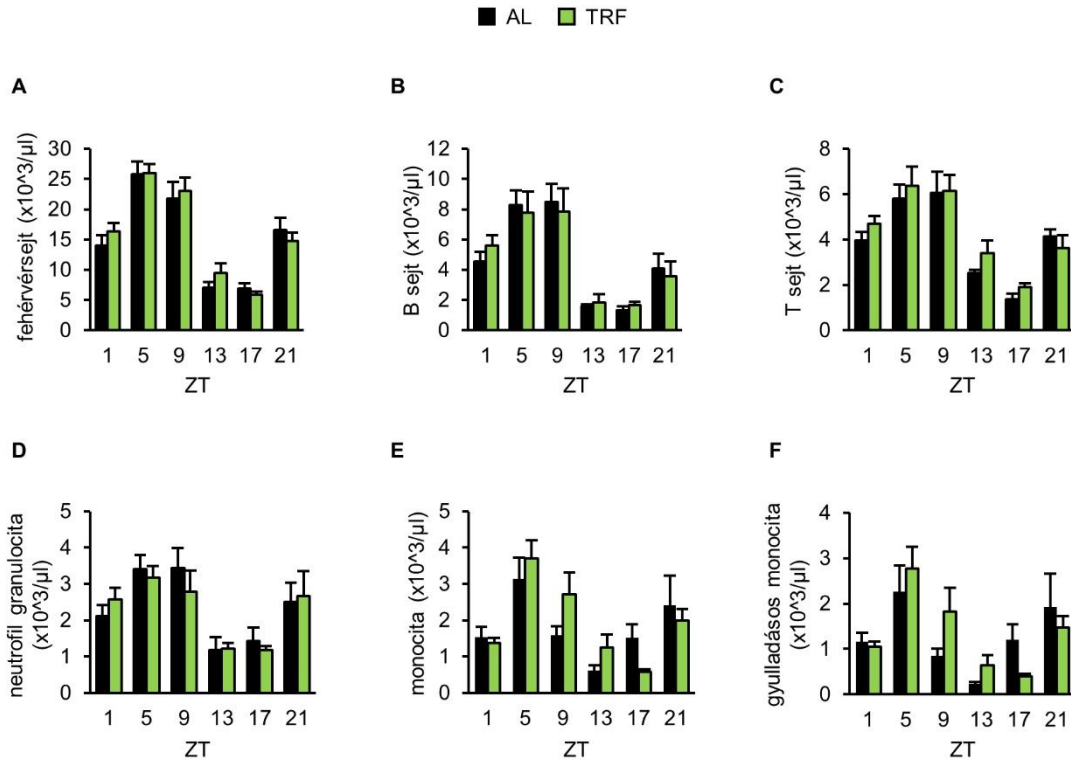
18. ábra: A TRF csökkenti a lép tömegét

(A) A lép tömege a nap során (átlag + SEM, $n_{AL}=3-11$, $n_{TRF}=6-13$, kétszemponos ANOVA, idő hatás $p=0,008$, a * a szignifikáns csoport hatást jelöli). A szaggatott vonalak az átlagos napi léptömeget jelölik. (B) Az ábra (A) részén található adatokra illesztett koszinusz görbék. Vastag vonal és * jelöli a szignifikáns-, és pontozott vonal a nem szignifikáns görbe illeszkedést. A görbék paramétereit a 12-es táblázat tartalmazza. (publikáció (II)). AL=*ad libitum*, TRF=*time restricted feeding*, ZT=*Zeitgeber time*, ZT0 a fényszakasz, ZT12 a sötét szakasz kezdete

12. táblázat: A 18. ábra B részén látható koszinusz görbék adatai.

	léptömeg	
	AL	TRF
mezor	70,64	60,67
amplitúdó	7,45	8,18
akrofázis (ZT)	4,18	3,24
koszinusz illeszkedés, p-érték	0,114	0,015

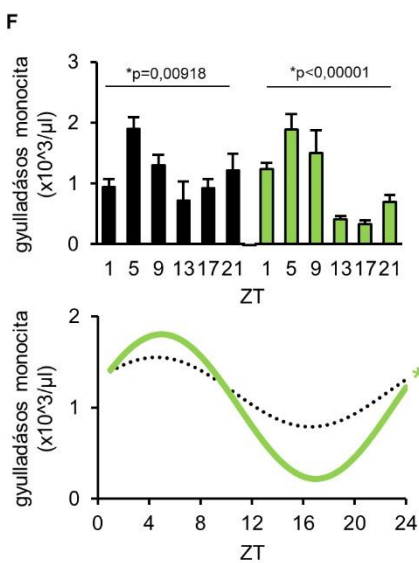
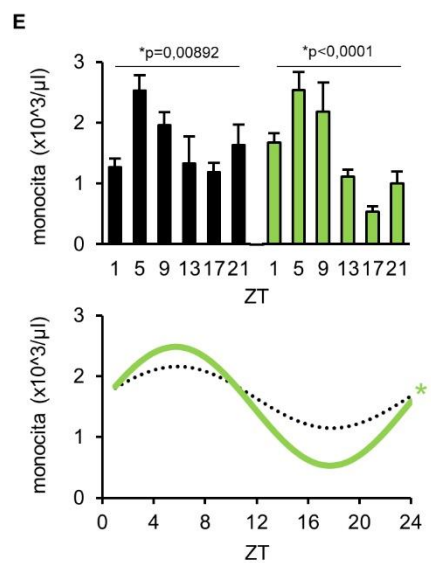
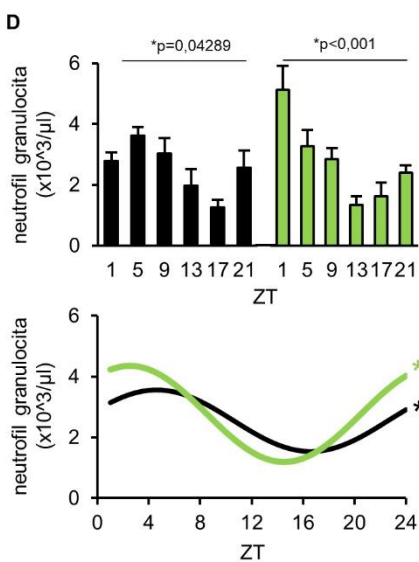
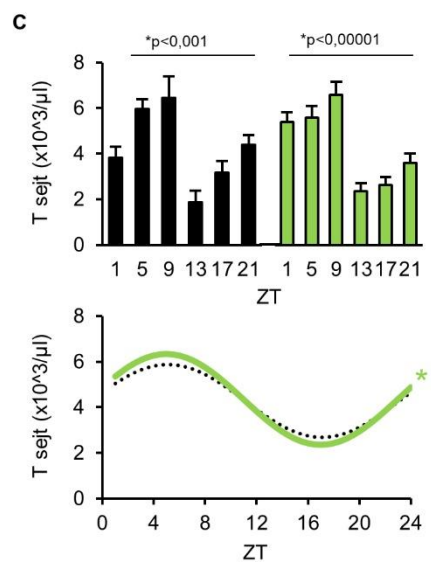
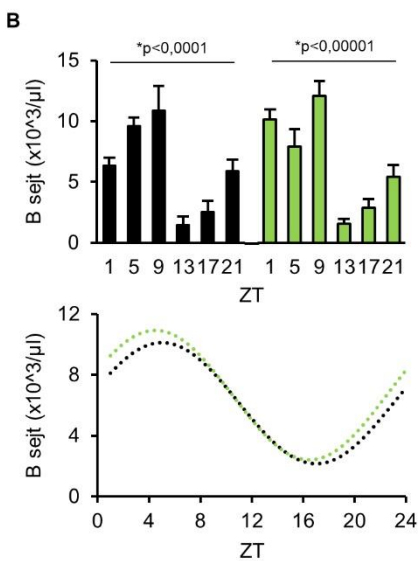
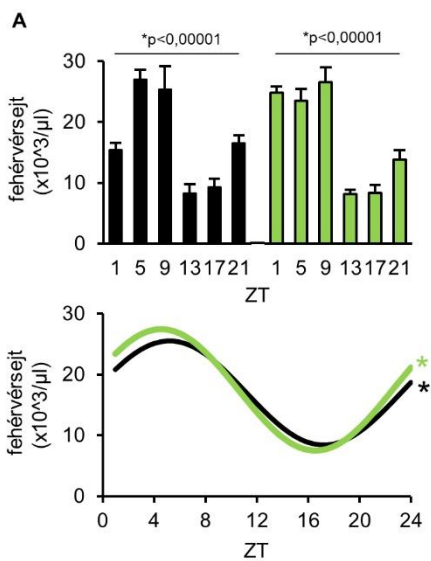
Az immunrendszer működésének alapvető jellemzőjeként meghatároztuk a különböző fehérvérsejtek számát a vérben a nap folyamán. 4 órás felbontásban követtük a monocita, neutrofil granulocita, B- és T-sejt mennyiséget, illetve a teljes fehérvérsejtszámot az etetési kondicionálás megkezdése előtt, majd a különböző etetési protokollok után a 4. hét végén. Míg kiinduláskor a leukocitaszámok alakulása nem mutatott különbséget a két csoport között (19. ábra), addig a 4. hét elteltével kifejezettebb oszcillációt figyeltünk meg a TRF csoportban (20. ábra, 13. táblázat). A leukocita populációk külön-külön történő vizsgálata szintén rámutatott a TRF ritmust erősítő hatására, mely legerőteljesebben a monociták (56%-os amplitúdó emelkedés) és a neutrofil granulociták (93%-os amplitúdó emelkedés) esetén figyelhető meg (13. táblázat). A monocita populáció további vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a teljes monocitaszámban látható amplitúdó növekedésének hátterében az Ly6C^{high} gyulladásozó monociták kifejezettebb ritmusa áll. Ezen adataink alapján az időzített etetés hatását gyakorol a leukociták vándorlására.



19. ábra: A perifériás fehérvérsejtszámok nem különböztek a csoportok között az etetési protokoll megkezdése előtt

(A) Összes fehérvérsejt (CD45+) (B) B-sejt (CD19+) (C) T-sejt (CD3+) (D) neutrofil granulocita (Ly6G+) (E) monocita (CD11b+, CD115+, Ly6C+) (F) gyulladásozó monocita (CD11b+, CD115+, Ly6C^{hi}) mennyisége a perifériás vérben a nap során az etetési protokoll kezdőnapján (átlag + SEM, $n_{AL}=3-9$, $n_{TRF}=6-11$, kétszemponos ANOVA, nem szignifikáns). (publikáció (II)) AL=*ad libitum*, TRF=*time restricted feeding*, ZT=*Zeitgeber time*, ZT0 a fényszakasz, ZT12 a sötét szakasz kezdete

■ AL ■ TRF



20. ábra: A TRF erősíti a vérben mérhető fehérvérsejtszám oszcillációját

(A-F) A felső paneleken a perifériás fehérvérsejtszámok alakulása látható a nap folyamán a 4 hetes etetési periódus végén. Az alsó paneleken a felső panelen látható adatokra illesztett koszinusz görbék láthatóak. **Felső panelek:** (A) Összes fehérvérsejt (CD45+) (B) B-sejt (CD19+) (C) T-sejt (CD3+) (D) neutrofil granulocita (Ly6G+) (E) monocita (CD11b+, CD115, Ly6C+) (F) gyulladásoos monocita (CD11b+, CD115+, Ly6C^{hi}) mennyisége a perifériás vérben a nap során (átlag + SEM, $n_{AL}=3-9$, $n_{TRF}=6-11$, egyszempontos ANOVA, a szignifikáns idő hatást * jelöli). **Alsó panelek:** a felső paneleken látható adatokra illesztett koszinusz görbék. Vastag vonal és * jelöli a szignifikáns-, és pontozott vonal a nem szignifikáns görbe illeszkedést. A görbék paramétereit a 13. táblázat tartalmazza. (publikáció (II)) AL=*ad libitum*, TRF=*time restricted feeding*, ZT=*Zeitgeber time*, ZT0 a fényszakasz, ZT12 a sötét szakasz kezdete

13. táblázat: A 20. ábra alsó panelein látható koszinusz görbék adatai.

	összfehérvérsejt		B-sejt		T-sejt	
	AL	TRF	AL	TRF	AL	TRF
mezor	17,00	17,54	6,13	6,67	4,29	4,35
amplitúdó	8,59	9,99	3,99	4,26	1,60	1,99
akrofázis (ZT)	5,22	4,57	5,02	4,49	5,09	4,97
koszinusz illeszkedés, p-érték	0,042	0,009	0,053	0,078	0,160	0,022
amplitúdó növekedés (%)		16		7		24

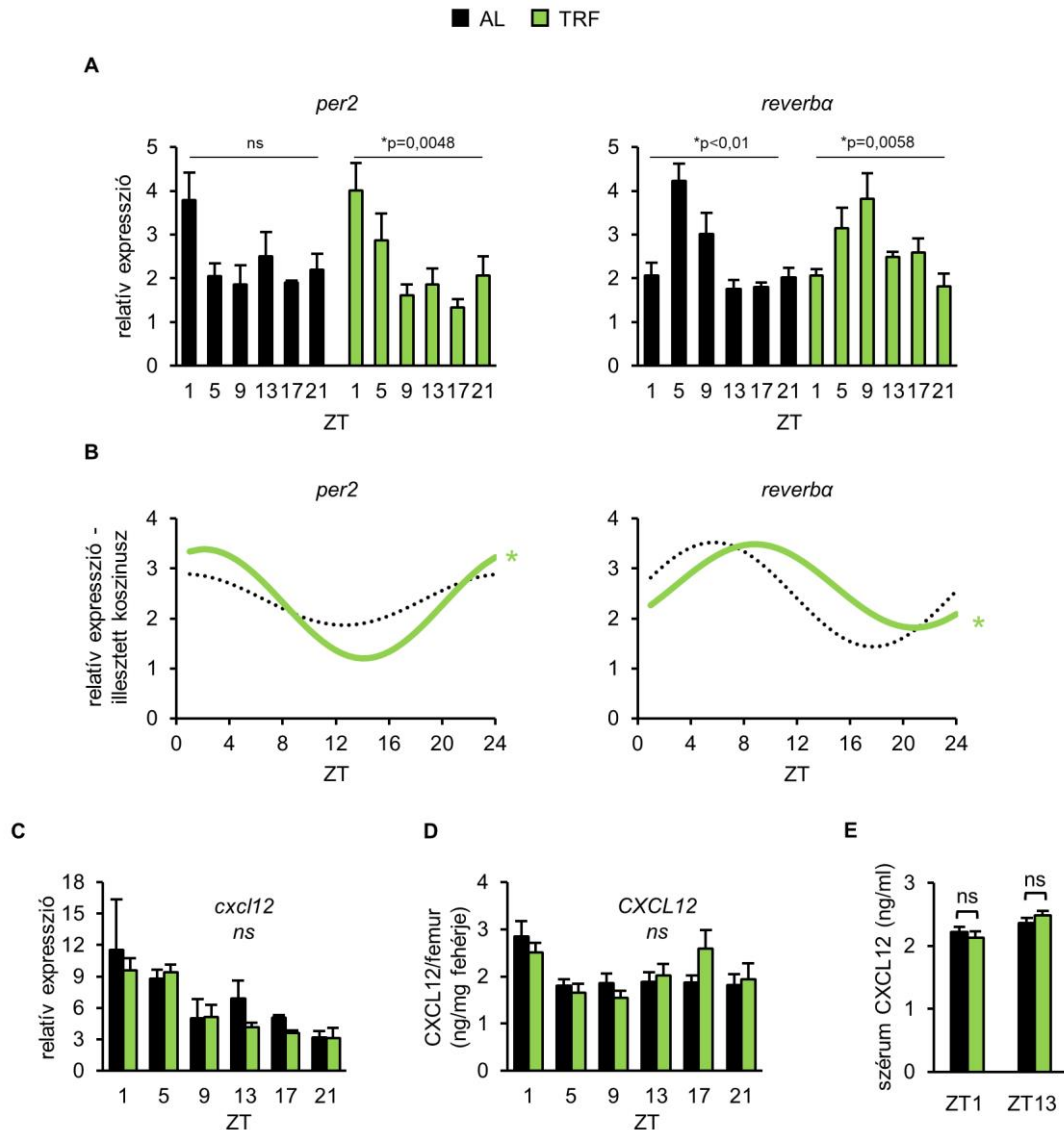
	neutrofil granulocita		monocita		gyulladásoos monocita	
	AL	TRF	AL	TRF	AL	TRF
mezor	2,54	2,77	1,65	1,51	1,17	1,01
amplitúdó	1,01	1,58	0,51	0,98	0,38	0,79
akrofázis (ZT)	4,60	2,50	5,84	5,70	4,59	4,98
koszinusz illeszkedés, p-érték	0,004	0,016	0,120	0,000	0,17	0,001
amplitúdó növekedés (%)		56		93		101

5.2.4 A TRF hatása a csontvelői óraműködésre és a CXCL12 ritmusára

A csontvelő működése ritmikus, a sejtek csontvelőből történő kiáramlása és visszatérése is óra által szabályozott folyamatok, így felmerült, hogy a TRF csoportban látott kifejezettebb neutrofil granulocita ritmus háttérében a megváltozott csontvelői működés állhat.

A csontvelői óra vizsgálatához a *per2* és *reverb*a expresszióját 4 órás felbontásban követtük a nap folyamán (21A ábra). Hasonlóan a zsírszövetben látottakhoz, a TRF állatok esetében a *per2* oszcillációja kifejezettebbé vált, míg a *reverb*a expressziójának fázisa eltolódott (21B ábra, 14. táblázat), rámutatva, hogy a csontvelő óraműködése függ a táplálékfelvétel időzítésétől.

A csontvelői környezetben ritmusosan termelődő CXCL12 kemokin a neutrofil granulociták vándorlásának fő regulátora. Receptorának, a CXCR4-nek kifejeződése a sejtfelszínen szintén oszcillál (208). Emelkedett CXCL12 szintek gátolják a fiatal neutrofil granulociták kiáramlását és elősegítik az idős sejtek perifériáról történő visszatérését. A CXCL12 termelődését a leptin is befolyásolja a LepR+ (leptin receptor pozitív) sztróma sejtek aktiválásán keresztül (269). Mivel kifejezettebb leptin ritmust figyeltünk meg a TRF csoportban, a CXCL12 csontvelői expresszióját is megvizsgáltuk a nap folyamán. A CXCL12 szintjének napi ingadozása mindkét csoportban megfigyelhető, azonban nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között sem RNS (21C ábra), sem fehérje (21D ábra) szinten. Ezen felül a szérumban ZT1-ben és ZT13-ban mért CXCL12 is hasonlóan bizonyult az AL és a TRF csoportban (21E ábra). Ezek alapján az etetés időzítése feltehetőleg nem befolyásolja a CXCL12 termelődését, és a vér neutrofil granulocita számának ingadozásában megfigyelt különbség mögött nem a csontvelői CXCL12 szintek megváltozása áll.



21. ábra: A TRF befolyásolja a csontvelői óraműködést, de nem változtatja meg a CXCL12 expresszióját

(A) A *per2* és a *reverba* relatív expressziója a csontvelőben a nap folyamán (átlag + SEM, $n_{AL}=3-8$, $n_{TRF}=6-9$, egyszempontos ANOVA, a szignifikáns idő hatást * jelöli). (B) Az ábra (A) részén található adatokra illesztett koszinusz görbék. Vastag vonal és * jelöli a szignifikáns-, és pontozott vonal a nem szignifikáns görbe illeszkedést. A görbék paramétereit a 14. táblázat tartalmazza. (C) A *cxcl12* relatív expressziója a csontvelőben (átlag + SEM, $n_{AL}=3-8$, $n_{TRF}=6-9$, kétszempontos ANOVA, idő hatás $p=0,005$, csoport hatás ns). (D) A CXCL12 fehérje mennyisége a csontvelőben (átlag + SEM, $n_{AL}=5-10$, $n_{TRF}=7-11$, kétszempontos ANOVA, idő hatás $p=0,007$, csoport hatás ns). (E) A CXCL12 koncentrációja a szérumban két időpontban (átlag + SEM, $n_{AL}=4-8$, $n_{TRF}=3-11$, kétmintás *t*-próba, ns). (publikáció (II)) ns=nem szignifikáns, AL=*ad libitum*, TRF=*time restricted feeding*, ZT=*Zeitgeber time*, ZT0 a fényszakasz, ZT12 a sötét szakasz kezdete

14. táblázat: A 21. ábra B részén látható koszinusz görbék adatai.

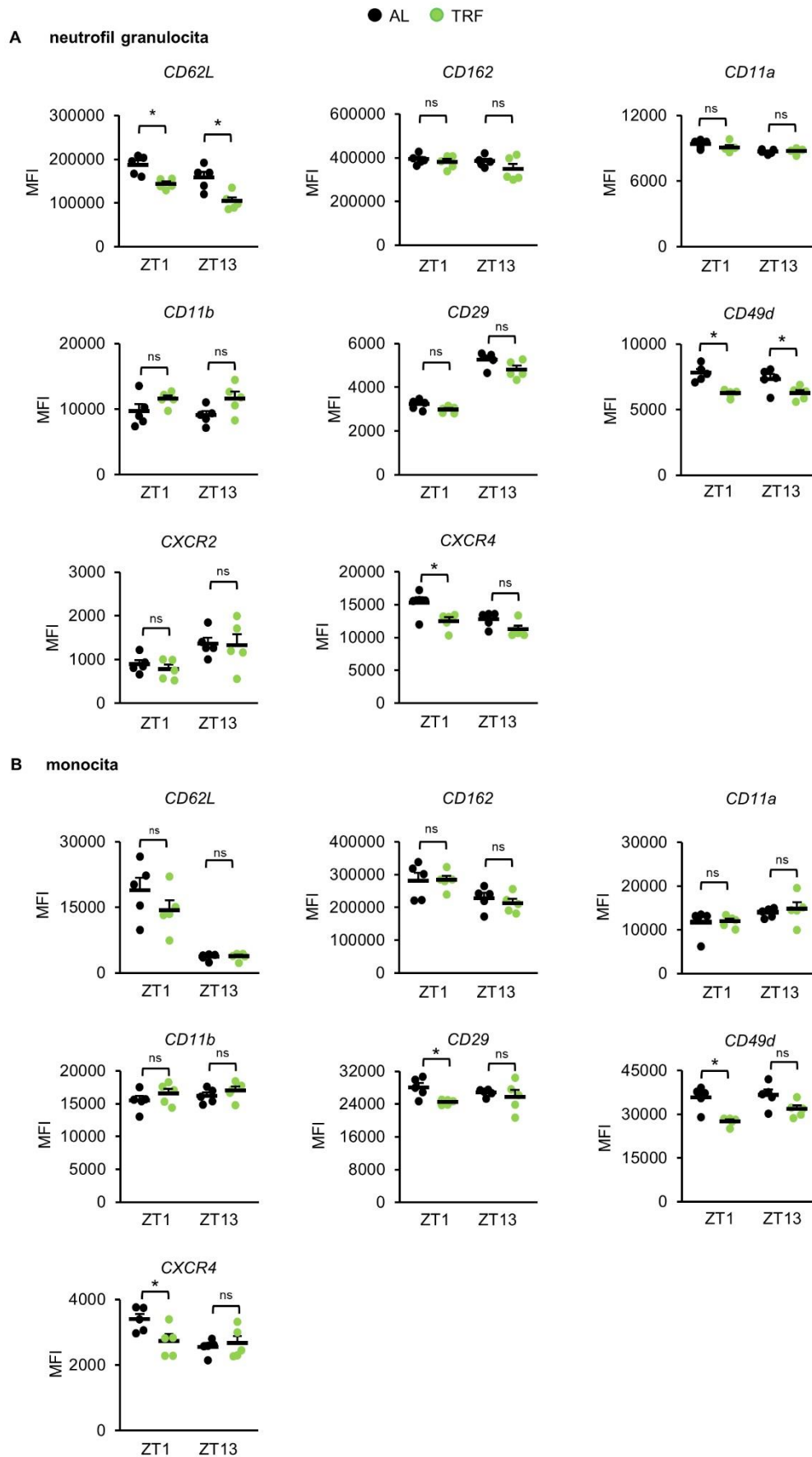
	<i>per2</i>		<i>reverta</i>	
	AL	TRF	AL	TRF
mezor	2,38	2,29	2,48	2,65
amplitúdó	0,51	1,09	1,05	0,83
akrofázis (ZT)	0,62	2,09	5,74	8,84
koszinusz illeszkedés, p-érték	0,408	0,037	0,050	0,024

5.2.5 A TRF hatása a vérben keringő neutrofil granulociták és monociták felszínén megjelenő adhéziós molekulák kifejeződésére

A fehérvérsejtek szövetekbe történő kiáramlása a leukociták és endotél sejtek felszínén időzítetten kifejeződő adhéziós molekulák révén ritmusosan zajlik. Ha a neutrofil granulociták és monociták vándorlását elősegítő kemokin receptorok és adhéziós molekulák expressziója megváltozik, az okozhat időfüggő változásokat a perifériás vérben mért sejtek számában, illetve befolyásolhatja a sejtek válaszkészségét. Ezen megfontolásból áramlási citometriával vizsgáltuk a keringő neutrofil granulociták és monociták felszínén található szelektinek (CD62L, CD162), integrinek (CD11a, CD11b, CD29, CD49d) és kemokin receptorok (CXCR2, CXCR4) szintjét két időpontban, az aktív időszak kezdetén (ZT13), illetve az inaktív fázis elején (ZT1).

A TRF csoportban mindkét időpontban szignifikánsan alacsonyabb CD62L és CD49d expressziót mértünk a neutrofil granulociták felszínén, mint az AL csoportból származó sejteken. Ezen felül a CXCR4 szintje is alacsonyabb volt a TRF neutrofil granulocitákon ZT1-ben (22A ábra). A monocitákon a CD29, CD49d és CXCR4 csökkent expresszióját figyeltünk meg ZT1-ben a TRF csoportban (22B ábra). A CD11a, CD11b integrin-láncok, valamint a CD162 és a CXCR2 megjelenésében nem mutatkozott különbség a TRF hatására (22A, B ábra).

Az adhéziós molekulák (CD62L, CD29, CD49d) és a CXCR4 kemokin receptor expressziójában megfigyelt különbség alapján feltételezhetjük, hogy az időzített etetés mind az érfalhoz történő kitapadást (margináció), mind a szöveti akkumulációt befolyásolja.

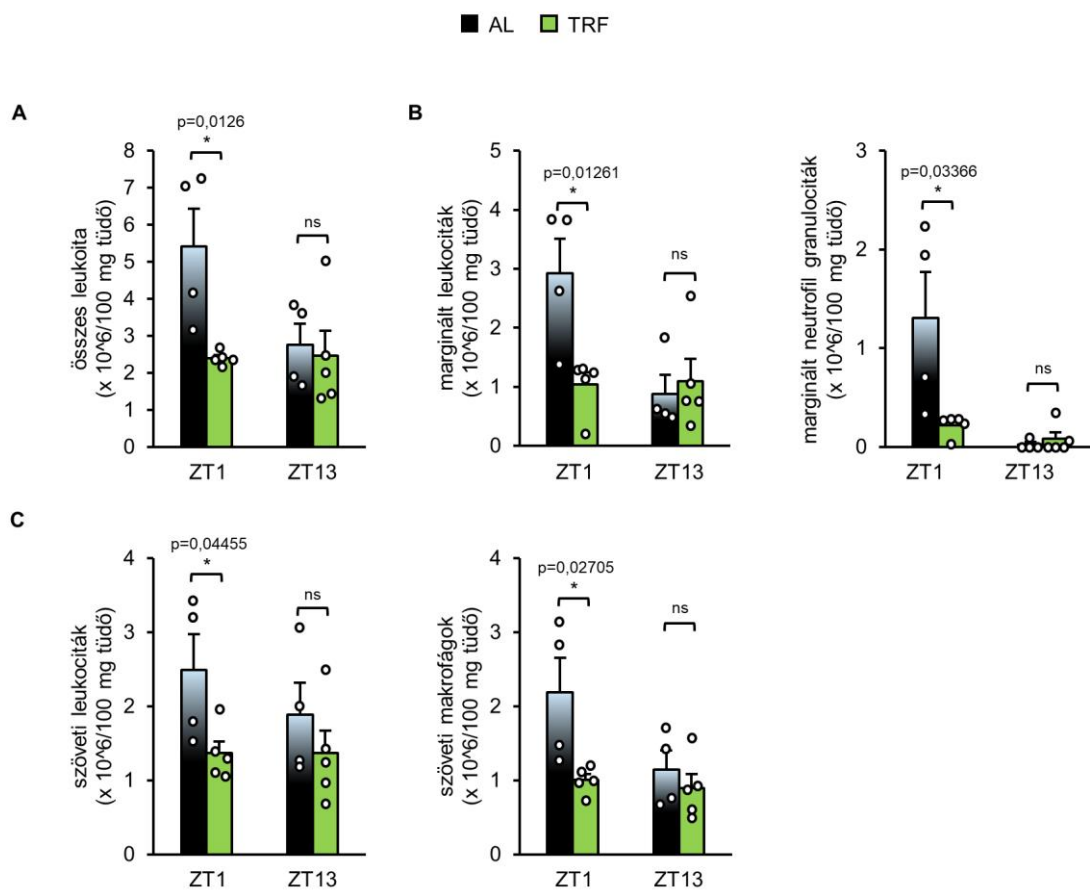


22. ábra: A TRF megváltoztatja egyes adhéziós molekulák kifejeződését

Szelektinek (CD62L, CD162), integrinek (CD11a, CD11b, CD29, CD49d) és kemokin receptorok (CXCR2, CXCR4) kifejeződése két időpontban a neutrofil granulociták (A) és a monociták (B) felszínén. A mérés áramlási citometriával történt átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) alapján. *Átlag + SEM, n_{AL}=5, n_{TRF}=5, kétmintás t-próba, *p<0,05.* (publikáció (II)) MFI=mean fluorescence intensity, ns=nem szignifikáns, AL=*ad libitum*, TRF=time restricted feeding, ZT=Zeitgeber time, ZT1 az inaktív fázis eleje, ZT13 az aktív fázis eleje

5.2.6 A TRF hatása a leukociták tüdőszöveti megoszlására

A következőkben a leukociták szöveti akkumulációjának tanulmányozása céljából a sejtek megoszlását vizsgáltuk a tüdőszövetben. Olyan módszert alkalmaztunk, amely lehetőséget biztosít a marginált és szöveti leukociták elkülönítésére. A kísérletet két időpontban, ZT1-ben és ZT13-ban végeztük. A tüdőben mért összleukocitaszám az inaktív fázis elején, ZT1-ben fele annyi volt a TRF csoportban mint az AL csoportban (23A ábra). TRF hatására mind a marginált leukociták (CD45-PECy7+, CD45.2-FITC+), mind a neutrofil granulociták száma jelentősen lecsökkent ZT1-ben (23B ábra). Ezen felül a szöveti leukocita populáció (CD45-PECy7-, CD45.2-FITC+) is szignifikánsan kisebb volt az *ad libitum* etetett állatokéhoz képest ZT1-ben, melyhez hozzájárulhat, hogy a TRF csoportban kisebb a szöveti makrofág populáció, mint az AL állatok tüdejében (23C ábra).



23. ábra: A TRF csökkenti a tüdőszöveti leukocitapopulációt

(A) Összleukocitaszám (B) marginált (érfalhoz tapadt) leukociták és neutrofil granulociták (C) szöveti leukociták és makrofágok mennyisége a tüdőben két időpontban. Átlag + SEM, $n_{AL}=4$, $n_{TRF}=5$, kétmintás *t*-próba, $*p<0,05$. ns=nem szignifikáns, AL=*ad libitum*, TRF=*time restricted feeding*, ZT=*Zeitgeber time*, ZT1 az inaktív fázis eleje, ZT13 az aktív fázis eleje

A TRF csoportban mért alacsonyabb adhéziós molekula expresszió összhangban van a tüdőben tapasztalt csökkent szöveti sejtszámmal és magasabb keringő neutrofil granulocita számmal, és ezen adatok együttesen a szövetek mérsékeltebb gyulladós válaszkészségére utalnak.

6. Megbeszélés

A földi élet jellemzője a ciklikusság, váltakoznak a nappalok és éjszakák, a hold fázisai és az évszakok. Az evolúció során kialakult az élőlények biológiai órája, aminek segítségével fiziológias működéseik ritmusát összehangolják és a külső környezethez igazítják. Az elmúlt 200 évben társadalmunk modernizációjával azonban drasztikusan megváltozott a környezetünk és megjelentek a cirkadián ritmuszavarok. Az elektromosság és mesterséges világításnak (a 2000-es évek óta különösképpen a LED lámpáknak és kijelzőknek) köszönhetően este is sok a fényinger, míg napközben egyre kevesebb időt töltünk a szabadban, az épületekben tartózkodva pedig csak mérsékelt természetes fény ér bennünket. A folyamatosan pörgő gazdaság életre hívta a műszakokban való munkavégzést, és a technikai fejlődésnek hála, időzónákon átívelő távolságokat tehetünk meg órák alatt. Utóbbiak komoly cirkadián ritmuszavarok kialakulásához vezetnek, melyek káros hatásai már a köztudatban is ismertek. 2007 óta már az Egészségügyi Világszervezet (WHO) is számon tartja a váltott műszakos munkarendet, mint a daganatos megbetegedések kialakulásának kockázati tényezőjét (270). A kismértékű cirkadián zavarokról azonban sokáig kevés szó esett, holott rendkívül széles réteget érintenek. Az emberek többsége iskolai, munkahelyi és szociális elvárásoknak eleget téve saját természetes ritmusától eltérő életmódot folytat. Az iparosodott országokban a népesség 70%-a szenved legalább 1 óra nagyságú szociális *jetlagtól* (271). Az SJL egészségromboló hatásához ráadásul hozzájárul az SJL-t kísérő egészségtelen életmód. A nagy szociális *jetlaggel* rendelkezők körében gyakoribb a dohányzás, a nagy mennyiségű koffeinfogyasztás (111) és jellemző az egészségtelen étkezés, ami több magas kalória- és cukortartalmú étel és kevesebb zöldség és gyümölcs fogyasztásában nyilvánul meg (116, 272-274).

Munkatársaim 2014-ben validálták a kronotípus és szociális *jetlag* meghatározására alkalmas MCTQ kérdőív magyar változatát és leírták, hogy az SJL negatív korrelációt mutat egyetemisták tanulmányi teljesítményével (79). Munkám során az SJL és az alvás kapcsolatára koncentráltunk, ezen belül a szubjektív alvásminőségen felül célunk volt az éjszakai szívfrekvencia variabilitást és ezen keresztül a paraszimpatikus aktivitást és alváshatékonyságot vizsgálni. A vegetatív idegrendszeri szabályozás és az alvás ugyanis szorosan összefüggenek. Az ébredést és az elalvást,

valamint az alvási stádiumok közötti átmeneteket egyértelmű autonóm változások kísérik (275). Elalvás során az autonóm egyensúly a paraszimpatikus dominancia felé tolódik, ezt tükrözi a HRV fokozatos növekedése az ébrenléti állapottól a lassú hullámú alvás stádiumáig (275-278), amit a legpihentetőbb alvófázisnak tekintünk (170, 279). Ezáltal a HRV az alvás minőségének és hatékonyságának vizsgálatára is használható.

Az SJL mértéke szorosan korrelál a kronotípussal, a késői típusok nagyobb szociális *jetlagtól* szenvednek (111). A kronotípus az életkorral változik, átlagosan a 20-as években mérhető az egyén legkésőbbi kronotípusa (111), így az SJL a fiatal felnőtteket kiemelten érinti. Ezt figyelembe véve vizsgálatunkhoz fiatal egyetemista férfiak körében kerestünk résztvevőket. Az adatok rögzítése az alanyok saját otthonában történt. A vizsgálati hét alatt a résztvevők szokásos időbeosztásuk szerint éltek, amit megerősített az MCTQ és az alvásnapló alapján számított kronotípus és SJL értékek korrelációja.

Az éjszaka folyamán egy kis hordozható készülékkel rögzítettük az alanyok szívverései között eltelt időt, amiből a HRV számítható. A HRV elterjedten használt módszer az autonóm idegrendszeri szabályozás jellemzésére. Mértéke nem csak az egészséges szívfunkciót jelzi, hanem különböző kognitív funkciókkal és hatékonyabb érzelmi regulációval is összefüggést mutat (142, 280, 281). Alapértéke egészséges emberek között igen eltérő lehet (282), mértéke részben örökletes (283), de egyénen belül hosszú távon állandó (284). Emiatt az egyénen belüli HRV követés ajánlatosabb, mint az egyének közötti különbségek elemzése (142, 285). Ebben az esetben a nyugalmi szívfrekvencia, a vérnyomás és a szívfrekvencia variabilitás csatoltsága sem befolyásoló tényező (285).

Analízisünk során az egyéni hétvégi-hétköznapi különbségekre fókuszáltunk, mindazonáltal az is látható, hogy a magas SJL-lel rendelkező csoportban a hétköznapi és a hétvégi mérési éjszakákon is magasabb volt a HRV mértéke, mint az alacsony SJL-lel rendelkezők esetén. Hogy a jelenség háttérében mi állhat és van-e összefüggés a kronotípus és a HRV mértéke között, azt egy nagyobb elemszámú külön tanulmány során lehetne megvizsgálni.

A vizsgálati hét során egy szerdai és egy szombati éjszaka monitoroztuk a résztvevők szívfrekvenciáját. A variabilitást másfél órás blokkokban elemeztük az alvás során és a nagy SJL-lel rendelkezők csoportjában azt találtuk, hogy szombati éjszakájuk folyamán az első két blokkban a paraszimpatikus aktivitásra utaló pNN50 értékek

magasabbak, mint hétköznap. Ezzel szemben a kis SJL-lel rendelkezők csoportjában nem láttunk különbséget a napok között. A HRV alakulását megvizsgáltuk az alvás végén is, ellenőrizendő, hogy az alvás eleji HRV emelkedést nem kompenzálja-e később egy HRV csökkenés. Az alvás utolsó másfél órájában azonban egyik csoport esetében sem mutatkozott különbség a napok között. A különböző HRV paraméterek szabadnapi-munkanapi különbsége korrelációt mutatott az SJL mértékével, azaz minél nagyobb volt az SJL, annál nagyobb a paraszimpatikus aktivitás mértékének növekedése hétköznapról szabadnapra. A frekvenciatartománybeli analízisünk is megerősítette az időtartományban tett megfigyeléseinket, a magasabb SJL-lel rendelkezők szívfrekvencia variabilitásának spektrális teljesítménysűrűsége (PSD) eltérő volt hétvégén és hétköznap. A különbségek a magasabb frekvenciáknál jelentkeztek, ami a paraszimpatikus aktivitás mértékében való eltérésre utal. A sávok szerinti elemzésnél az LF és HF is szignifikánsan magasabbnak adódott hétvégén, mint hétköznap a nagy SJL-lel rendelkezők esetében. Ezzel szemben alacsony SJL mellett a két éjszaka PSD görbéi egymás mellett futottak, és egyik frekvenciasávban sem kaptunk különbséget a napok között. Ezen elemzéseink is arra utalnak, hogy a nagy SJL-ű csoportban kisebb mértékű paraszimpatikus moduláció jellemző az éjszaka első két órájában hétköznap, mint hétvégén.

A hétvégi alvásidő az SJL mértékétől függetlenül hosszabbnak bizonyult, és az alvás előtt ébren töltött idő sem különbözött a két csoport között. Így feltehetőleg a HRV-ben látott különbségekért nem a homeosztatis, hanem a cirkadián alvásszabályozás a felelős. Az alvás elején látott HRV eltérések az alvás szerkezetének megváltozására utalnak. Ebben az időben hétköznap a nagy SJL-ű, egyben késői kronotípusú emberek biológiai órája még valószínűleg nem támogatja a mély alvást. Hétvégén, amikor a késői típusúak is saját ritmusuk szerint időzíthetik alvásukat, már éjszakájuk elejét is nagyobb paraszimpatikus aktivitás, ezáltal hatékonyabb alvás jellemzi. Egy 2018-as tanulmány alapján az alvás időzítése befolyással bír az alvásfázisok arányára (286). A másik oldalról maga a minőségi alvás az egészséges kardiovaszkuláris szabályozás, valamint a mentális és érzelmi jólét mutatója (287, 288). A nagy SJL-lel rendelkezők számára az a tény, hogy külső megkötések nélkül alhatnak, pozitívan hathat mind az autonóm funkcióra, mind az alvásminőségre.

Összességében adataink arra utalnak, hogy az SJL és az alvás időzítésének változása a paraszimpatikus aktivitás különbözőségéhez vezet a munka- és szabadnapok

között az alvás első néhány órájában, aminek hatása lehet a kardiovaszkuláris szabályozás rugalmasságára. A HRV egészséges és patológiás körülmények között is információt nyújt a szív- és érrendszer működéséről. Egészséges férfiakban a paraszimpatikus aktivitást kifejező HRV paraméterek összefüggést mutattak az endotél funkcióval (289). Egy 8 tanulmányon alapuló, 22000 alany adatát összegző metaanalízis szerint a normál tartományon belüli, de alacsony HRV egészséges emberekben is növeli a későbbi CVD kialakulásának valószínűségét (290). Egy középkorúakat 26 éven keresztül követő prospektív kohorszvizsgálat 9700 résztvevőn szintén negatív összefüggést mutatott ki a HRV mértéke és a CVD kockázata között (291). Ezen felül az autonóm reguláció megváltozása hozzájárulhat a magas vérnyomás (292) kialakulásához, a koszorúerek meszesedésének súlyosbodásához (293), valamint a kamrai aritmia és a szívelégtelenség kifejlődéséhez (294-296).

A HRV ugyanakkor az alvás hatékonyságára és minőségére is utal. Az alvás minősége önmagában fontos a kardiovaszkuláris egészség szempontjából. Az Amerikai Szív Szövetség (American Heart Association) 2022 óta az alvást, mint a kardiovaszkuláris egészség megőrzésének egyik alappillérét tartja számon az étrend, testmozgás, dohányzás, elhízás, koleszterinszint, vércukorszint és vérnyomás mellett (297).

A Groningen kérdőíves felmérés alapján a szociális *jetlag* negatívan hat a hétköznapi alvásminőségre. Egy 2018-as tanulmányban több száz résztvevővel töltették ki az MCTQ-t és a Pittsburg alvásminőség kérdőívet (Pittsburg Sleep Quality Index, PSQI). Adataik alapján a hétköznapiakra vonatkozó alvásminőség szignifikánsan rosszabb, mint a hétvégi, és a napok közötti különbséget az SJL mediálja (250). Eredményeink kiegészítik egymást, noha a GSQS az előző éjszakát, a PSQI az elmúlt hónap éjszakáit vizsgálja és a megválaszolandó kérdésekben is különböznek. Adataink együttesen arra utalnak, hogy az SJL negatívan befolyásolja az alvás minőségét hétköznapi.

Összeségében elmondhatjuk, hogy az alvási ritmus szociális megkötések miatti krónikus megváltozása negatívan hat a hétköznapi alvásra. Ezt jelzi a szívfrekvencia variabilitás, azaz a paraszimpatikus moduláció mértékének különbsége a munka- és szabadnapok között, valamint a hétköznapi rosszabb szubjektív alvásminőség.

A vizsgálat során az elemszámunk viszonylag alacsony volt, ezt részben kompenzálta, hogy az egyéneken belüli különbségekre koncentráltunk. Tanulmányunk limitációi közé tartozik továbbá, hogy vizsgálatunkban a kor szerinti homogenitás

céljából és az infradián női ciklus hatásainak elkerülése végett kizárólag fiatal férfiak vettek részt.

A társadalom modernizációjával nem csak az alvási ritmusunk változott meg, hanem étkezési szokásaink is. Az emberek gyakran és rendszertelenül étkeznek a nap folyamán és a kalória nagy részét este viszik be (195).

A táplálékfelvétel aktív időszakra történő időzítése mind állatkísérletek, mind humán vizsgálatok alapján jótékony hatással bír a metabolizmusra. Javítja a glükóz- és lipid homeosztázist, megakadályozza az elhízást, illetve segít a kialakult elhízás és a kapcsolt metabolikus zavarok kezelésében (191, 298). Egyrésről a táplálékfelvétel időzítése hatékony *Zeitgeber* a metabolizmusban központi szerepet betöltő szervek, a máj és a zsírszövet számára, másrésről a cirkadián óra segíti az anyagcsere folyamatok összehangolását, aminek köszönhetően egymással antagonisztikus anyagcsere útvonalak, például az anabolikus és katabolikus folyamatok időben szeparáltan zajlanak.

Az állatházakban *ad libitum* módon normál tápon tartott egerek a táp nagyobb részét (60-80%-át) éjszaka, aktív időszakuk alatt fogyasztják el, ami számottevő táplálék bevitelét jelenti a világos időszakban is. TRF esetén az állatok táplálékélérhetőségét 2 és 12 óra közötti időszakra korlátozzák. Ha az időablak legalább 8 órás, az állatok ugyanannyi táplálékot fogyasztanak, mint AL etetett társaik, ez az etetési mód kalóriamegvonással nem jár együtt (263). Az obezitás és a velejáró metabolikus zavarok vizsgálatára elterjedten alkalmazott módszer az állatok zsírban gazdag táppal történő etetése, akik így 8-12 héten belül elhízhatnak. Azonban ez a jelenség nem csak a táp összetételének köszönhető. A nagy zsírtartalmú táppal etetett állatok ugyanis egész nap nassolnak, ami az anyagcsere folyamataik (különösen a májban zajló folyamatok) cirkadián zavarát okozza. 10 órás TRF mellett magas zsírtartalmú tápon tartott állatok védettek az elhízástól és jobb anyagcsere funkciókkal rendelkeznek, például normál glükóztoleranciát és alacsonyabb szérum koleszterin szinteket mutatnak *ad libitum* tartott társaikkal szemben (192, 263).

A cirkadián óra szerepe kiemelt az immunrendszer működésének szabályozásában. Az 1960-as, 70-es években születtek az első megfigyelések, miszerint az egerek patogénekre és bakteriális toxinokra adott reakciója napszakfüggő. Ezek a tanulmányok megmutatták, hogy az egerek érzékenysége az aktív fázisuk elején, kora este a legmagasabb, amikor a leukociták nagyobb számban találhatóak meg a szövetek között.

A cirkadián óra az immunsejtek csontvelő, vér és szövetek közti megoszlásának fő regulátora, és ezen felül is több szinten befolyásolja a veleszületett és az adaptív immunitást. Napszakfüggő például a neutrofil granulociták szuperoxid termelése (299), a makrofágok fagocitotikus aktivitása (300), illetve citokintermelése (301), valamint a vakcináció időzítése befolyásolja a T- és B-sejtes immunválaszt (302). Régóta megfigyelt jelenség a tünetek napszaki ingadozása is krónikus megbetegedések esetén. A reumatoid artritiszben szenvedő betegek kora reggel tapasztalnak ízületi merevséget, ami egybeesik az ekkor mérhető magasabb szérum IL6- és TNF α szintekkel (303). Az allergiás rhinitis, az asztma és a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) tünetei szintén hajnalban a legerősebbek (304, 305). A stroke és a miokardiális infarktus előfordulása gyakoribb a reggeli órákban (149, 306), illetve az ekkor történő infarktusok mérete is kiterjedtebb (152, 307). Az immunrendszer és az óra közötti kapcsolat kétirányú. Az óra zavara a gyulladásos folyamatok erősödésével jár (202, 221), és fertőzések esetén, illetve gyulladásos környezetben a ritmus kevésbé kifejezetté válik, amplitúdója csökken (7).

A metabolizmus és az immunrendszer működése szintén szorosan összefügg (308, 309). Elhízás, inzulin rezisztencia és 2-es típusú diabétesz esetén rendellenes citokintermelés, az akut fázis fehérjék megemelkedett szintje és a gyulladásos jelátviteli útvonalak aktiválódása figyelhető meg, továbbá magasabb a fertőzések kockázata. Ugyanakkor az is ismert, hogy ebben az esetben a zsírszöveti gyulladás hozzájárul a metabolikus zavarokhoz (243, 310). Metabolikus, valamint autoimmun és gyulladásos betegségek kezelésében egyaránt alkalmaztak sikerrel hosszabb éhezéssel és kalóriamegvonással együtt járó diétákat (245, 247, 248, 265). Arról azonban nem volt ismeretünk, hogy a táplálékfelvétel egy jól tolerálható időablakba történő korlátozása kalóriamegvonás nélkül milyen hatással bír egy gyulladásos betegségre és az immunrendszer válaszkészségére.

Ennek vizsgálatához 4 héten át korlátoztuk a táplálékfelvétel idejét a tápanyag összetételének megváltoztatás nélkül (10 órás TRF), és arra voltunk kíváncsiak, hogy ez milyen hatással van az immunrendszer működésére szervezeti, illetve sejtszinten. Elsőként megállapítottuk, hogy az általunk alkalmazott TRF nem okozott jelentős stresszt állatainknak, és a legalapvetőbb metabolikus mutatók, mint a testsúly, az elfogyasztott táp mennyisége és a glükóztolerancia nem különbözött a TRF és AL csoportok között. A zsírszövet ritmusára és működésére azonban jelentős hatással bírt a táplálékfelvétel

idejének korlátozása. A központi óragének expressziója megváltozott, a *leptin* szint időbeli változásának amplitúdója jelentősen megnőtt, miközben átlagos mennyisége lecsökkent. A zsírszövet egyrészt fontos metabolikus szerv, másrészt adipokin termelése révén kapcsolatot tart az anyagcsere és az immunrendszer között. Régóta ismert, hogy metabolikus eltérések (pl. elhízás) esetén a zsírszövet által termelt gyulladáscitokinek szintje megemelkedik, ezért csoportunk a vizcerális zsírszövetben vizsgálta az NF- κ B útvonal függő *tnfa*, valamint az *nlrp3*, *il-1 β* és *il-18* napi kifejeződését, továbbá az *adipszin* expresszióját is. Ezeket a méréseket nem én végeztem, ezért az eredmények a dolgozatban nem kerültek bemutatásra, azonban itt röviden ismertetem őket, hogy tágabb kontextusban lehessen az adatokat értelmezni. Az NLRP3 inflammaszómát a homeosztázis megváltozása aktiválja, többek között a metabolikus változásokra (koleszterin, a zsírsavak és a reaktív oxigénszármazékok koncentrációjára) is érzékenyen reagál (311). Stimuláció hatására az NLRP3 az inflammaszómához toborozza a kaspáz-1 enzimet, amely aktiválja az IL-1 β és IL-18 gyulladáscitokineket.

Munkatársaim vizsgálata alapján ugyan az *il-1 β* szintje nem különbözött, azonban az *nlrp3* és az *il-18* valamint a *tnfa* expressziója is szignifikánsan alacsonyabb volt a TRF, mint az AL csoportban. Ezen adataink alapján a TRF nem csak a metabolikus ritmusra van hatással, hanem a zsírszövet gyulladáscitokinek szintjét is csökkenti.

Az adipszin az adipociták differenciációját elősegítő adipokin, valamint a humán D-faktor megfelelője, a komplementrendszer alternatív útvonalának fontos szereplője. Az adipszin szintje szintén alacsonyabbnak bizonyult a TRF csoportban. Az adipszinnal kapcsolatban kimutatták, hogy a K/BxN szérumszűrő artritisz kialakulásában alapvető szerepet játszik (312). Fehér- és barnazsírszövet hiányos egerek teljesen védettek a betegséggel szemben, ahogy az adipszin KO egerek is. A K/BxN szérumszűrő módszerrel kialakuló ízületi gyulladás fontos szereplői a neutrofil granulociták és a monocita/makrofág sejtek. A komplement aktiváció elősegíti az ízületi neutrofil granulocita infiltrációt, ahol az aktivált sejtek fokozzák a gyulladást (266). Adipszin hiányos egerekben azonban a neutrofil granulociták nem jelennek meg az ízületben a K/BxN szérumszűrő hatására (312). Ezzel összhangban modellünkben úgy találtuk, hogy az *ad libitum* etetett egerekhez képest a TRF állatainkban kevésbé súlyos lefolyású autoimmun artritisz alakult ki.

További vizsgálataink is az immunrendszer aktivitásának különbségére utaltak az

AL és TRF állatok között a gyulladás előtti állapotban. Az *ad libitum* etetett állatokban átlagosan nagyobb léptömeget mértünk és a léptömeg kevésbé kifejezett ingadozását figyeltük meg, mint a TRF csoportban, emellett pedig a keringő és a szöveti leukociták mennyiségében is különbségeket találtunk a két csoport között.

A perifériás leukociták vizsgálatokor minden sejtpopuláció esetén kifejezettebb napi ingadozást figyeltünk meg az időzített etetés hatására. Az amplitúdó növekedése azonban a neutrofil granulociták és a gyulladásos monociták esetében volt a legjelentősebb. A monocitákat két alcsoportra oszthatjuk, a gyulladásos $Ly6C^{hi}$ monocitákra, amelyek az $Ly6C^{+}$ monocita progenitorok leszármazottai, valamint nem gyulladásos $Ly6C^{low}$ monocitákra, melyek a keringésben differenciálódnak az $Ly6C^{hi}$ monocitákból. Az $Ly6C^{low}$ monocitákra az érfalban történő járőrözés jellemző, kiemelt szerepük van a sérült endotél sejtek eltávolításában és ezáltal az érfal integritásának megőrzésében. A gyulladásos monociták ($Ly6C^{hi}$) nyugalmi (gyulladásmentes) állapotban is kilépnek a szövetek közé, és ott látnak el megfigyelő feladatot differenciálatlanul (313).

A leukociták mennyiségének napszakfüggő változását a sejtek csontvelő és vér közötti vándorlása és a szövetekbe történő kilépésük okozza, így utánajártunk, hogy ezen folyamatok közül mi állhat az általunk tapasztalt különbségek hátterében. A csontvelőben 4 órás felbontásban vizsgáltuk az óraműködést, valamint a *cxcl12* RNS expressziót és megmértük a CXCL12 fehérjeszinteket is, illetve a két csoportban összehasonlítottuk a neutrofil granulocitákon és monocitákon kifejeződő adhézións molekulák mennyiségét. A csontvelői ritmus vizsgálatokor a TRF hatására kifejezettebb óraműködést tapasztaltunk. Ugyan a neutrofil granulociták csontvelői vándorlását irányító CXCL12 szintje nem különbözött a két csoportban, a TRF sejteken ZT1-ben megfigyelt alacsonyabb CXCR4 (CXCL12 receptor) expresszió okozhatja az ekkor látott magasabb sejtszámot a keringésben.

Az adhézións molekulák egy része (CD62L, CD29, CD49d) szintén kisebb mennyiségben volt jelen a TRF, mint az AL sejteken, míg a többiek esetében (CD162, CD11a, CD11b) nem tapasztaltunk különbséget. Az adhézións molekulák alacsonyabb expressziója csökkentheti a marginált és szöveti leukociták mennyiségét, és ezzel párhuzamosan okozhatja a vérben látott magasabb fehérvérsejtszámot. A margináció és migráció azonban nem csak a leukocitákon kifejeződő adhézións molekuláktól függ,

hanem a kitapadáshoz szükséges endoteliális struktúráktól is. Az ICAM-1 és VCAM-1 endoteliális adhéziós molekulák sejtfelszíni megjelenése ritmikus, ami a leukociták szöveti felhalmozódását eredményezi az aktív időszakban (204). Ezek alapján a jövőben érdemes lenne abban az irányban is vizsgálatokat végezni, hogy a TRF befolyásolja-e az endoteliális adhéziós molekulák kifejeződését.

A továbbiak során tüdőmodellben vizsgáltuk a sejtek szöveti megjelenését két időpontban. Az AL csoportban a marginált és szöveti leukociták emelkedett szintjét mértük az inaktív fázis elején, ZT1-ben, akkor, amikor a perifériás sejtzámban a legszembetűnőbb különbséget tapasztaltuk az AL és TRF csoport között. A leukociták cirkadián megjelenése szükséges a kiegyensúlyozott szöveti immunitáshoz, fertőzések során a megnövekedett neutrofil granulocita infiltráció és a sejtváándorlás ritmusának zavara túlzott tüdőszöveti károsodáshoz vezet (214). Eredményeink felvetik a lehetőséget, hogy az időzített etetésnek védő hatása van és megakadályozza az immunrendszer túlműködését *steady-state* állapotban. A szöveti makrofágok is nagyobb mennyiségben voltak jelen a tüdőben ZT1-ben AL állatainkban. A tüdő makrofágok egy nagyon heterogén sejtcsoport, mind a gyulladásos folyamatokban, mind a szöveti regenerációban fontos szerepük van (314), mindazonáltal feltételezhető, hogy a nagyobb mennyiségű makrofág egy nagyobb szöveti károsodással járó gyulladásos állapot kialakulásához vezethet.

Az AL csoportban magasabb zsírszöveti *leptin* expressziót mértünk. A leptin széleskörű immunológiai funkciókkal bír, a legtöbb fehérvérsejtre stimuláló hatással van, köztük a neutrofil granulocitákra és a monocitákra is (315). A leptin túlélési szignál a neutrofil granulociták számára és késlelteti az idős sejtek apoptózisát (316), ezen kívül kimutatták, hogy az exogén leptin fokozza a neutrofil granulociták migrációját (317). Munkatásaim a génexpressziós mérésekkel összhangban a szérumban is emelkedett leptin szinteket mértek az AL állatokban, valamint *in vitro* kísérletekben leptin kezelés hatására a neutrofil granulocitákon a CD49d, a monocitákon pedig mind a CD49d, mind a CXCR4 megnövekedett expresszióját tapasztalták. Ezek alapján az AL csoportban látott magasabb leptin szintek hozzájárulhatnak a neutrofil granulociták megnövekedett aktivitásához és migrációs kapacitásához.

Összességében az időzített etetés enyhítette a K/BxN szérum transzfer artritisz lefolyását és szinkronizáló hatással bírt a zsírszövet és az immunrendszer működésére. A

TRF hatására a fehérvérsejtek oszcillációja erősödött, míg gyulladáshatásos potenciáljuk csökkent, így elképzelhető, hogy az időzített táplálékfelvétel az autoimmun betegségeknek is hatásos kiegészítő terápiás eszköze lehetne.

PhD munkám során viszonylag mérsékelt, de nagy populációt érintő cirkadián ritmuszavarokkal foglalkoztam. Fiatalokkal végzett humán tanulmányunk alapján a szociális *jetlag* negatívan hat az alvásminőségre és az alvás alatti autonóm szabályozásra. Egérmodellen végzett kísérleteink alapján pedig valószínűsíthető, hogy az időzített etetés a túlzott aktiváció megakadályozásával támogatja a kiegyensúlyozott immunműködést.

Dolgozatommal szeretném felhívni a figyelmet arra a lehetőségre, hogy cirkadián óraműködésünk erősítésén keresztül támogathatjuk szervezetünk megfelelő működését, ami népegészségügyi szempontból is fontos lenne. Segíthetné a rugalmas munkakezdés, a későbbi iskolakezdés, a tavaszi óraátállítás eltörlése és folyamatosan a téli időszámítás alkalmazása. Egyénenként pedig odafigyelhetünk a megfelelő alvás higiéniára, az esti fény csökkentésére és étkezéseink minősége mellett annak időzítésére is. A 10 órás időablakban történő étkezés esetünkben is viszonylag könnyen megvalósítható diétát jelent, aminek talán preventív jelentősége is lenne gyulladáshatásos megbetegedések és metabolikus diszfunkciók esetében.

7. Következtetések

Az SJL kardiovaszkuláris szabályozásra és alvásminőségre gyakorolt hatásának vizsgálata alapján az alábbi megállapításokat tehetjük:

1. A nagy SJL-ű csoport hétvégén szignifikánsan később aludt el és később ébredt, mint a kis SJL-ű csoport, azonban hétköznap az alvás időzítésében nem volt különbség a két csoport között. Az alvás hossza és a melatoninelválasztást jellemző metabolit, a 6-szulfatoximelatonin éjszakai kiválasztása nem különbözött a két csoportban.
2. A nagy SJL-ű csoport alvásának első felét hétköznap alacsonyabb paraszimpatikus aktivitás jellemezte, mint hétvégén. Ez a különbség korrelált az SJL mértékével. A kisebb SJL-lel rendelkezők között nem mutatkozott különbség a napok között.
3. Az alvás első két órájában a szívfrekvencia variabilitás spektrális teljesítménysűrűség görbéje hétvége és hétköznap között a paraszimpatikus aktivitást tükröző magasabb frekvenciáknál széles tartományban különbözött a nagy SJL-lel rendelkezők körében, míg az alacsony SJL-ű csoportban nem mutatkozott különbség.
4. Az SJL hétköznapokon összefüggést mutatott a szubjektív alvásminőséggel, a nagyobb SJL-hez rosszabb alvásminőség társult. Szabadnapokon nem volt összefüggés. Hétköznapokon a nagy SJL-lel rendelkezők rosszabbul aludtak, mint hétvégén.

Az időzített etetés (TRF) immunrendszer működésére gyakorolt hatásának vizsgálata alapján az alábbi megállapításokat tehetjük:

1. A TRF az alapvető metabolikus paraméterekben (testtömeg, vércukor) nem okozott eltérést, azonban a zsírszöveti génexpresszió (*per2*, *reverbA*, *leptin*) alapján egyértelmű hatással volt a metabolikus ritmusra.
2. Időzített etetés mellett a K/BxN szérumszintje magasabb volt, mint AL etetés esetén.

3. TRF mellett a léptömeg napszaki ingadozása ritmikussá vált, miközben az átlagos léptömeg csökkent. TRF hatására a perifériás fehérvérsejtszámok, elsősorban a neutrofil granulocita és monocita populációk napszaki változása kifejezettebbé vált.
4. A TRF hatással volt a csontvelői óraműködésre, azonban a CXCL12 ritmusát nem befolyásolta.
5. A TRF csoportban a keringő neutrofil granulociták és monociták felszínén megjelenő egyes adhéziós molekulák (a neutrofil granulocitákon a CD62L és CD49d, a monocitákon a CD29 és CD49d) és a CXCR4 kemokin receptor expressziója alacsonyabb volt, mint az AL csoportban. Ezzel összhangban, a tüdőszövetben az inaktív fázis elején a teljes leukocita mennyiség, a marginált leukociták, ezen belül a marginált neutrofil granulociták, valamint a szöveti leukociták mennyisége is alacsonyabb volt a TRF csoportban.

8. Összefoglalás

A cirkadián óraműködés egy sejtszintű mechanizmus, mely révén az élőlény viselkedését és belső biokémiai folyamatait időzíteni képes, ezáltal előre felkészülhet a környezetben megfigyelhető napszaki váltakozásokra. A cirkadián ritmus alapvetően befolyásolja az élettani folyamatokat, szabályozza többek között az alvást, az anyagcserét és az immunrendszer működését is. Az iparosodott társadalmakban az alvási és étkezési szokások megváltozásával a környezet és a szervezet óraműködése közötti összhang gyakran és akár tartósan megbomlik, ami cirkadián ritmuszavarok kialakulásával jár. Az egyéni ritmus és a szociális megkötések közötti ellentét a munka- és szabadnapos alvásidőzítés különbségéhez, szociális *jetlaghez* (SJL) vezet. A modern életvitelre jellemző gyakori és rendszertelen étkezés pedig megzavarja az anyagcsere ritmusát.

Vizsgálataink szerint az SJL negatívan befolyásolja az alvásminőséget, aminek hosszútávú következményei lehetnek. Az alvás alatti szívfrekvencia variabilitás alapján nagyobb SJL mellett nagyobb különbség mutatkozott a hétvégi és hétköznapi alvás első óráiban a paraszimpatikus aktivitásban. A hétköznapi alvás azon időszakát, amikor saját, belső ritmusuk szerinti időablakuknál korábban aludtak el a résztvevők, kedvezőtlenebb autonóm reguláció kísérte, ami egyúttal rosszabb alváshatékonytságot is jelent. Ezenfelül hétköznapiokon a nagyobb SJL-hez rosszabb szubjektív alvásminőség is társult.

Az étkezés időzítése fontos szinkronizáló stimulus az anyagcserezervek számára és a táplálékbevitel korlátozásával erősíthető a metabolikus óraműködés. Habár mind a metabolizmus, mind a cirkadián óra alapvetően befolyásolja az immunműködést, az étkezés időzítésének immunrendszerre gyakorolt hatása nem tisztázott. Ezirányú, egérmodellen végzett vizsgálataink alapján az időzített etetés (TRF) mérsékli az autoimmun artritisz tüneteit, valamint kifejezettebbé teszi a zsírszövet és az immunrendszer működésének ritmusát. TRF hatására erősödött a fehérvérsejtek oszcillációja, miközben gyulladási válaszkészségük csökkent.

Adataink elsőként utalnak arra, hogy az SJL negatív hatással lehet a kardiovaszkuláris rendszer működésére. Állatmodellen végzett vizsgálataink alapján az időben korlátozott táplálékfelvétel segít megelőzni az immunrendszer túlműködését, ami felveti a lehetőségét, hogy autoimmun betegségek esetén kiegészítő terápiás eszközként szolgáljon.

9. Summary

The circadian clock is a cell-autonomous mechanism that enables organisms to anticipate the daily changes in the environment and time their behavior and biochemical processes accordingly. Circadian clocks are fundamental regulators of physiological processes, including sleep, metabolism and the immune system. Changes in sleeping and eating patterns in industrial societies cause misalignment between the organism and the environment, leading to circadian disruptions. The discrepancy between an individual's own biological rhythm and the daily timing determined by social constraints leads to differences in sleep timing between workdays and free days, known as social jetlag (SJL). Frequent and irregular eating schedule, characteristics of modern lifestyle, causes disruption in metabolic rhythms.

Our data indicate that SJL has a negative effect on sleep quality, which can have long-term consequences. Heart rate variability during sleep exhibited greater workday/free day differences in participants with high SJL, indicating lower parasympathetic cardiac control in the first few hours of sleep on workday. During this period of the workday night, participants with higher SJL had an earlier bedtime than their innate preference and they had less favorable autonomic control, indicating lower quality of sleep. Moreover, on workdays SJL showed a negative correlation with subjective sleep quality.

Timing of food intake acts as a synchronizer for organs involved in metabolism, and temporal restriction of food intake strengthens circadian clock function. Although both metabolism and the circadian clock have profound influence on the immune system, the effect of time-restricted food intake on immune reactions is largely unexplored. According to our study on mice, time restricted feeding (TRF) attenuates the symptoms of autoimmune arthritis and strengthens the rhythm of adipose tissue and the immune system. TRF enhanced the oscillation of leukocyte count while reducing the cells' inflammatory potential.

Our data is the first to indicate that SJL may negatively affect the physiology of the heart. Based on our animal study, TRF helps to prevent the over-activation of the immune system, raising the possibility for TRF to contribute to the therapy of human autoimmune diseases.

10. Irodalomjegyzék

1. Schibler U, Gotic I, Saini C, Gos P, Curie T, Emmenegger Y, et al. Clock-Talk: Interactions between Central and Peripheral Circadian Oscillators in Mammals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2015;80:223-32.
2. Duffy JF, Cain SW, Chang AM, Phillips AJ, Munch MY, Gronfier C, et al. Sex difference in the near-24-hour intrinsic period of the human circadian timing system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108 Suppl 3(Suppl 3):15602-8.
3. Czeisler CA, Duffy JF, Shanahan TL, Brown EN, Mitchell JF, Rimmer DW, et al. Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker. *Science.* 1999;284(5423):2177-81.
4. Carskadon MA, Labyak SE, Acebo C, Seifer R. Intrinsic circadian period of adolescent humans measured in conditions of forced desynchrony. *Neurosci Lett.* 1999;260(2):129-32.
5. Kuhlman SJ, Craig LM, Duffy JF. *Introduction to Chronobiology.* Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018;10(9).
6. Patke A, Young MW, Axelrod S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(2):67-84.
7. Rijo-Ferreira F, Takahashi JS. Genomics of circadian rhythms in health and disease. *Genome Med.* 2019;11(1):82.
8. Kojima S, Shingle DL, Green CB. Post-transcriptional control of circadian rhythms. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 3):311-20.
9. Mehra A, Baker CL, Loros JJ, Dunlap JC. Post-translational modifications in circadian rhythms. *Trends Biochem Sci.* 2009;34(10):483-90.
10. Shirogane T, Jin J, Ang XL, Harper JW. SCFbeta-TRCP controls clock-dependent transcription via casein kinase 1-dependent degradation of the mammalian period-1 (Per1) protein. *J Biol Chem.* 2005;280(29):26863-72.
11. Ohsaki K, Oishi K, Kozono Y, Nakayama K, Nakayama KI, Ishida N. The role of beta-TrCP1 and beta-TrCP2 in circadian rhythm generation by mediating degradation of clock protein PER2. *J Biochem.* 2008;144(5):609-18.
12. Eide EJ, Woolf MF, Kang H, Woolf P, Hurst W, Camacho F, et al. Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated

- PER2 degradation. *Mol Cell Biol.* 2005;25(7):2795-807.
13. Maier B, Wendt S, Vanselow JT, Wallach T, Reischl S, Oehmke S, et al. A large-scale functional RNAi screen reveals a role for CK2 in the mammalian circadian clock. *Genes Dev.* 2009;23(6):708-18.
 14. Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM, et al. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science.* 2001;291(5506):1040-3.
 15. Zhou M, Kim JK, Eng GW, Forger DB, Virshup DM. A Period2 Phosphoswitch Regulates and Temperature Compensates Circadian Period. *Mol Cell.* 2015;60(1):77-88.
 16. Gallego M, Kang H, Virshup DM. Protein phosphatase 1 regulates the stability of the circadian protein PER2. *Biochem J.* 2006;399(1):169-75.
 17. Asher G, Gatfield D, Stratmann M, Reinke H, Dibner C, Kreppel F, et al. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell.* 2008;134(2):317-28.
 18. Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DF, et al. AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science.* 2009;326(5951):437-40.
 19. Busino L, Bassermann F, Maiolica A, Lee C, Nolan PM, Godinho SI, et al. SCFFbx13 controls the oscillation of the circadian clock by directing the degradation of cryptochrome proteins. *Science.* 2007;316(5826):900-4.
 20. Godinho SI, Maywood ES, Shaw L, Tucci V, Barnard AR, Busino L, et al. The after-hours mutant reveals a role for Fbx13 in determining mammalian circadian period. *Science.* 2007;316(5826):897-900.
 21. Siepka SM, Yoo SH, Park J, Song W, Kumar V, Hu Y, et al. Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression. *Cell.* 2007;129(5):1011-23.
 22. Tamaru T, Hattori M, Honda K, Nakahata Y, Sassone-Corsi P, van der Horst GT, et al. CRY Drives Cyclic CK2-Mediated BMAL1 Phosphorylation to Control the Mammalian Circadian Clock. *PLoS Biol.* 2015;13(11):e1002293.
 23. Tamaru T, Hirayama J, Isojima Y, Nagai K, Norioka S, Takamatsu K, et al. CK2alpha phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. *Nat Struct*

- Mol Biol. 2009;16(4):446-8.
24. Sahar S, Zocchi L, Kinoshita C, Borrelli E, Sassone-Corsi P. Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3beta-mediated phosphorylation. PLoS One. 2010;5(1):e8561.
 25. Lee J, Lee Y, Lee MJ, Park E, Kang SH, Chung CH, et al. Dual modification of BMAL1 by SUMO2/3 and ubiquitin promotes circadian activation of the CLOCK/BMAL1 complex. Mol Cell Biol. 2008;28(19):6056-65.
 26. Cardone L, Hirayama J, Giordano F, Tamaru T, Palvimo JJ, Sassone-Corsi P. Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. Science. 2005;309(5739):1390-4.
 27. Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, Sahar S, Hirayama J, Chen D, et al. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. Cell. 2008;134(2):329-40.
 28. Hirayama J, Sahar S, Grimaldi B, Tamaru T, Takamatsu K, Nakahata Y, et al. CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. Nature. 2007;450(7172):1086-90.
 29. DeBruyne JP, Baggs JE, Sato TK, Hogenesch JB. Ubiquitin ligase Siah2 regulates RevErbalpha degradation and the mammalian circadian clock. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(40):12420-5.
 30. Zhao X, Hirota T, Han X, Cho H, Chong LW, Lamia K, et al. Circadian Amplitude Regulation via FBXW7-Targeted REV-ERBalpha Degradation. Cell. 2016;165(7):1644-57.
 31. Yin L, Wang J, Klein PS, Lazar MA. Nuclear receptor Rev-erbalpha is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. Science. 2006;311(5763):1002-5.
 32. Fang B, Everett LJ, Jager J, Briggs E, Armour SM, Feng D, et al. Circadian enhancers coordinate multiple phases of rhythmic gene transcription in vivo. Cell. 2014;159(5):1140-52.
 33. Le Martelot G, Canella D, Symul L, Migliavacca E, Gilardi F, Liechti R, et al. Genome-wide RNA polymerase II profiles and RNA accumulation reveal kinetics of transcription and associated epigenetic changes during diurnal cycles. PLoS Biol. 2012;10(11):e1001442.

34. Koike N, Yoo SH, Huang HC, Kumar V, Lee C, Kim TK, et al. Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science*. 2012;338(6105):349-54.
35. Mermet J, Yeung J, Hurni C, Mauvoisin D, Gustafson K, Jouffe C, et al. Clock-dependent chromatin topology modulates circadian transcription and behavior. *Genes Dev*. 2018;32(5-6):347-58.
36. Kim YH, Marhon SA, Zhang Y, Steger DJ, Won KJ, Lazar MA. Rev-erb α dynamically modulates chromatin looping to control circadian gene transcription. *Science*. 2018;359(6381):1274-7.
37. Hastings MH, Maywood ES, Brancaccio M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Rev Neurosci*. 2018;19(8):453-69.
38. Evans JA, Suen TC, Callif BL, Mitchell AS, Castanon-Cervantes O, Baker KM, et al. Shell neurons of the master circadian clock coordinate the phase of tissue clocks throughout the brain and body. *BMC Biol*. 2015;13:43.
39. Ashton A, Foster RG, Jagannath A. Photic Entrainment of the Circadian System. *Int J Mol Sci*. 2022;23(2).
40. Lu Q, Kim JY. Mammalian circadian networks mediated by the suprachiasmatic nucleus. *FEBS J*. 2022;289(21):6589-604.
41. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*. 1998;93(6):929-37.
42. Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME, Hogenesch JB. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(45):16219-24.
43. Mure LS, Le HD, Benegiamo G, Chang MW, Rios L, Jillani N, et al. Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. *Science*. 2018;359(6381).
44. Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, et al. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(15):5339-46.
45. Silver R, LeSauter J, Tresco PA, Lehman MN. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms.

- Nature. 1996;382(6594):810-3.
46. Gnocchi D, Bruscalupi G. Circadian Rhythms and Hormonal Homeostasis: Pathophysiological Implications. *Biology (Basel)*. 2017;6(1).
 47. Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci*. 2003;8:d1093-108.
 48. Lockley SW, Dressman MA, Licamele L, Xiao C, Fisher DM, Flynn-Evans EE, et al. Tasimelteon for non-24-hour sleep-wake disorder in totally blind people (SET and RESET): two multicentre, randomised, double-masked, placebo-controlled phase 3 trials. *Lancet*. 2015;386(10005):1754-64.
 49. Lockley SW, Skene DJ, James K, Thapan K, Wright J, Arendt J. Melatonin administration can entrain the free-running circadian system of blind subjects. *J Endocrinol*. 2000;164(1):R1-6.
 50. Redman J, Armstrong S, Ng KT. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science*. 1983;219(4588):1089-91.
 51. Lewy AJ, Ahmed S, Jackson JM, Sack RL. Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase-response curve. *Chronobiol Int*. 1992;9(5):380-92.
 52. Kalsbeek A, Palm IF, La Fleur SE, Scheer FA, Perreau-Lenz S, Ruitter M, et al. SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms*. 2006;21(6):458-69.
 53. Dickmeis T. Glucocorticoids and the circadian clock. *J Endocrinol*. 2009;200(1):3-22.
 54. Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, et al. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*. 2000;289(5488):2344-7.
 55. Torra IP, Tsibulsky V, Delaunay F, Saladin R, Laudet V, Fruchart JC, et al. Circadian and glucocorticoid regulation of Rev-erb α expression in liver. *Endocrinology*. 2000;141(10):3799-806.
 56. Yamamoto T, Nakahata Y, Tanaka M, Yoshida M, Soma H, Shinohara K, et al. Acute physical stress elevates mouse period1 mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element. *J Biol Chem*. 2005;280(51):42036-43.

57. Refinetti R, Menaker M. The circadian rhythm of body temperature. *Physiol Behav.* 1992;51(3):613-37.
58. Brown SA, Zumbrunn G, Fleury-Olela F, Preitner N, Schibler U. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr Biol.* 2002;12(18):1574-83.
59. Refinetti R. Entrainment of circadian rhythm by ambient temperature cycles in mice. *J Biol Rhythms.* 2010;25(4):247-56.
60. Morf J, Rey G, Schneider K, Stratmann M, Fujita J, Naef F, et al. Cold-inducible RNA-binding protein modulates circadian gene expression posttranscriptionally. *Science.* 2012;338(6105):379-83.
61. Reinke H, Saini C, Fleury-Olela F, Dibner C, Benjamin IJ, Schibler U. Differential display of DNA-binding proteins reveals heat-shock factor 1 as a circadian transcription factor. *Genes Dev.* 2008;22(3):331-45.
62. Buhr ED, Yoo SH, Takahashi JS. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science.* 2010;330(6002):379-85.
63. Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 2000;14(23):2950-61.
64. Zhang S, Dai M, Wang X, Jiang SH, Hu LP, Zhang XL, et al. Signalling entrains the peripheral circadian clock. *Cell Signal.* 2020;69:109433.
65. Ramanathan C, Kathale ND, Liu D, Lee C, Freeman DA, Hogenesch JB, et al. mTOR signaling regulates central and peripheral circadian clock function. *PLoS Genet.* 2018;14(5):e1007369.
66. Finger AM, Kramer A. Mammalian circadian systems: Organization and modern life challenges. *Acta Physiol (Oxf).* 2021;231(3):e13548.
67. Borbely AA. A two process model of sleep regulation. *Hum Neurobiol.* 1982;1(3):195-204.
68. Dijk DJ, Czeisler CA. Paradoxical timing of the circadian rhythm of sleep propensity serves to consolidate sleep and wakefulness in humans. *Neurosci Lett.* 1994;166(1):63-8.
69. Meyer N, Harvey AG, Lockley SW, Dijk DJ. Circadian rhythms and disorders of

- the timing of sleep. *Lancet*. 2022;400(10357):1061-78.
70. Roenneberg T, Wirz-Justice A, Mrosovsky M. Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. *J Biol Rhythms*. 2003;18(1):80-90.
 71. Duffy JF, Rimmer DW, Czeisler CA. Association of intrinsic circadian period with morningness-eveningness, usual wake time, and circadian phase. *Behav Neurosci*. 2001;115(4):895-9.
 72. Barclay NL, Eley TC, Buysse DJ, Archer SN, Gregory AM. Diurnal preference and sleep quality: same genes? A study of young adult twins. *Chronobiol Int*. 2010;27(2):278-96.
 73. Vink JM, Groot AS, Kerkhof GA, Boomsma DI. Genetic analysis of morningness and eveningness. *Chronobiol Int*. 2001;18(5):809-22.
 74. Koskenvuo M, Hublin C, Partinen M, Heikkila K, Kaprio J. Heritability of diurnal type: a nationwide study of 8753 adult twin pairs. *J Sleep Res*. 2007;16(2):156-62.
 75. Jones SE, Lane JM, Wood AR, van Hees VT, Tyrrell J, Beaumont RN, et al. Genome-wide association analyses of chronotype in 697,828 individuals provides insights into circadian rhythms. *Nat Commun*. 2019;10(1):343.
 76. Kalmbach DA, Schneider LD, Cheung J, Bertrand SJ, Kariharan T, Pack AI, et al. Genetic Basis of Chronotype in Humans: Insights From Three Landmark GWAS. *Sleep*. 2017;40(2).
 77. Roenneberg T, Kuehnle T, Pramstaller PP, Ricken J, Havel M, Guth A, et al. A marker for the end of adolescence. *Curr Biol*. 2004;14(24):R1038-9.
 78. Roenneberg T, Kuehnle T, Juda M, Kantermann T, Allebrandt K, Gordijn M, et al. Epidemiology of the human circadian clock. *Sleep Med Rev*. 2007;11(6):429-38.
 79. Haraszti RA, Ella K, Gyongyosi N, Roenneberg T, Kaldi K. Social jetlag negatively correlates with academic performance in undergraduates. *Chronobiol Int*. 2014;31(5):603-12.
 80. Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, Jones CR, Wu SC, Saigoh N, et al. Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature*. 2005;434(7033):640-4.
 81. Hirano A, Shi G, Jones CR, Lipzen A, Pennacchio LA, Xu Y, et al. A Cryptochrome 2 mutation yields advanced sleep phase in humans. *Elife*. 2016;5.

82. Katzenberg D, Young T, Finn L, Lin L, King DP, Takahashi JS, et al. A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference. *Sleep*. 1998;21(6):569-76.
83. Archer SN, Carpen JD, Gibson M, Lim GH, Johnston JD, Skene DJ, et al. Polymorphism in the PER3 promoter associates with diurnal preference and delayed sleep phase disorder. *Sleep*. 2010;33(5):695-701.
84. Weitzman ED, Czeisler CA, Coleman RM, Spielman AJ, Zimmerman JC, Dement W, et al. Delayed sleep phase syndrome. A chronobiological disorder with sleep-onset insomnia. *Arch Gen Psychiatry*. 1981;38(7):737-46.
85. Uchiyama M, Lockley SW. Non-24-Hour Sleep-Wake Rhythm Disorder in Sighted and Blind Patients. *Sleep Med Clin*. 2015;10(4):495-516.
86. Waterhouse J, Reilly T, Atkinson G, Edwards B. Jet lag: trends and coping strategies. *Lancet*. 2007;369(9567):1117-29.
87. Boivin DB, Boudreau P, Kosmadopoulos A. Disturbance of the Circadian System in Shift Work and Its Health Impact. *J Biol Rhythms*. 2022;37(1):3-28.
88. Hattamaru M, Tahara Y, Kikuchi T, Okajima K, Konishi K, Nakajima S, et al. The effect of night shift work on the expression of clock genes in beard hair follicle cells. *Sleep Med*. 2019;56:164-70.
89. Koshy A, Cuesta M, Boudreau P, Cermakian N, Boivin DB. Disruption of central and peripheral circadian clocks in police officers working at night. *FASEB J*. 2019;33(6):6789-800.
90. Cuesta M, Boudreau P, Cermakian N, Boivin DB. Rapid resetting of human peripheral clocks by phototherapy during simulated night shift work. *Sci Rep*. 2017;7(1):16310.
91. Wei F, Chen W, Lin X. Night-shift work, breast cancer incidence, and all-cause mortality: an updated meta-analysis of prospective cohort studies. *Sleep Breath*. 2022;26(4):1509-26.
92. Schernhammer ES, Kroenke CH, Laden F, Hankinson SE. Night work and risk of breast cancer. *Epidemiology*. 2006;17(1):108-11.
93. Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, et al. Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(20):1563-8.

94. Papantoniou K, Devore EE, Massa J, Strohmaier S, Vetter C, Yang L, et al. Rotating night shift work and colorectal cancer risk in the nurses' health studies. *Int J Cancer*. 2018;143(11):2709-17.
95. group IMV. Carcinogenicity of night shift work. *Lancet Oncol*. 2019;20(8):1058-9.
96. Mancio J, Leal C, Ferreira M, Norton P, Lunet N. Does the association of prostate cancer with night-shift work differ according to rotating vs. fixed schedule? A systematic review and meta-analysis. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2018;21(3):337-44.
97. Behrens T, Rabstein S, Wichert K, Erbel R, Eisele L, Arendt M, et al. Shift work and the incidence of prostate cancer: a 10-year follow-up of a German population-based cohort study. *Scand J Work Environ Health*. 2017;43(6):560-8.
98. Filipski E, Delaunay F, King VM, Wu MW, Claustrat B, Grechez-Cassiau A, et al. Effects of chronic jet lag on tumor progression in mice. *Cancer Res*. 2004;64(21):7879-85.
99. Papagiannakopoulos T, Bauer MR, Davidson SM, Heimann M, Subbaraj L, Bhutkar A, et al. Circadian Rhythm Disruption Promotes Lung Tumorigenesis. *Cell Metab*. 2016;24(2):324-31.
100. Van Dycke KC, Rodenburg W, van Oostrom CT, van Kerkhof LW, Pennings JL, Roenneberg T, et al. Chronically Alternating Light Cycles Increase Breast Cancer Risk in Mice. *Curr Biol*. 2015;25(14):1932-7.
101. Kettner NM, Voicu H, Finegold MJ, Coarfa C, Sreekumar A, Putluri N, et al. Circadian Homeostasis of Liver Metabolism Suppresses Hepatocarcinogenesis. *Cancer Cell*. 2016;30(6):909-24.
102. Kervezee L, Kosmadopoulos A, Boivin DB. Metabolic and cardiovascular consequences of shift work: The role of circadian disruption and sleep disturbances. *Eur J Neurosci*. 2020;51(1):396-412.
103. Antunes LC, Levandovski R, Dantas G, Caumo W, Hidalgo MP. Obesity and shift work: chronobiological aspects. *Nutr Res Rev*. 2010;23(1):155-68.
104. Wang Y, Yu L, Gao Y, Jiang L, Yuan L, Wang P, et al. Association between shift work or long working hours with metabolic syndrome: a systematic review and dose-response meta-analysis of observational studies. *Chronobiol Int*.

- 2021;38(3):318-33.
105. Khosravipour M, Khanlari P, Khazaie S, Khosravipour H, Khazaie H. A systematic review and meta-analysis of the association between shift work and metabolic syndrome: The roles of sleep, gender, and type of shift work. *Sleep Med Rev.* 2021;57:101427.
 106. Gao Y, Gan T, Jiang L, Yu L, Tang D, Wang Y, et al. Association between shift work and risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and dose-response meta-analysis of observational studies. *Chronobiol Int.* 2020;37(1):29-46.
 107. Vetter C, Dashti HS, Lane JM, Anderson SG, Schernhammer ES, Rutter MK, et al. Night Shift Work, Genetic Risk, and Type 2 Diabetes in the UK Biobank. *Diabetes Care.* 2018;41(4):762-9.
 108. Vetter C, Devore EE, Wegrzyn LR, Massa J, Speizer FE, Kawachi I, et al. Association Between Rotating Night Shift Work and Risk of Coronary Heart Disease Among Women. *JAMA.* 2016;315(16):1726-34.
 109. Brown JP, Martin D, Nagaria Z, Verceles AC, Jobe SL, Wickwire EM. Mental Health Consequences of Shift Work: An Updated Review. *Curr Psychiatry Rep.* 2020;22(2):7.
 110. James SM, Honn KA, Gaddameedhi S, Van Dongen HPA. Shift Work: Disrupted Circadian Rhythms and Sleep-Implications for Health and Well-Being. *Curr Sleep Med Rep.* 2017;3(2):104-12.
 111. Wittmann M, Dinich J, Meroow M, Roenneberg T. Social jetlag: misalignment of biological and social time. *Chronobiol Int.* 2006;23(1-2):497-509.
 112. Roenneberg T, Allebrandt KV, Meroow M, Vetter C. Social jetlag and obesity. *Curr Biol.* 2012;22(10):939-43.
 113. Stoner L, Beets MW, Brazendale K, Moore JB, Weaver RG. Social Jetlag Is Associated With Adiposity in Children. *Glob Pediatr Health.* 2018;5:2333794X18816921.
 114. Parsons MJ, Moffitt TE, Gregory AM, Goldman-Mellor S, Nolan PM, Poulton R, et al. Social jetlag, obesity and metabolic disorder: investigation in a cohort study. *Int J Obes (Lond).* 2015;39(5):842-8.
 115. Koopman ADM, Rauh SP, van 't Riet E, Groeneveld L, van der Heijden AA, Elders PJ, et al. The Association between Social Jetlag, the Metabolic Syndrome,

- and Type 2 Diabetes Mellitus in the General Population: The New Hoorn Study. *J Biol Rhythms*. 2017;32(4):359-68.
116. Mota MC, Silva CM, Balieiro LCT, Fahmy WM, Crispim CA. Social jetlag and metabolic control in non-communicable chronic diseases: a study addressing different obesity statuses. *Sci Rep*. 2017;7(1):6358.
 117. Wong PM, Hasler BP, Kamarck TW, Muldoon MF, Manuck SB. Social Jetlag, Chronotype, and Cardiometabolic Risk. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(12):4612-20.
 118. Levandovski R, Dantas G, Fernandes LC, Caumo W, Torres I, Roenneberg T, et al. Depression scores associate with chronotype and social jetlag in a rural population. *Chronobiol Int*. 2011;28(9):771-8.
 119. McGowan NM, Voinescu BI, Coogan AN. Sleep quality, chronotype and social jetlag differentially associate with symptoms of attention deficit hyperactivity disorder in adults. *Chronobiol Int*. 2016;33(10):1433-43.
 120. Tamura N, Komada Y, Inoue Y, Tanaka H. Social jetlag among Japanese adolescents: Association with irritable mood, daytime sleepiness, fatigue, and poor academic performance. *Chronobiol Int*. 2022;39(3):311-22.
 121. Diaz-Morales JF, Escribano C. Social jetlag, academic achievement and cognitive performance: Understanding gender/sex differences. *Chronobiol Int*. 2015;32(6):822-31.
 122. Kantermann T, Juda M, Merrow M, Roenneberg T. The human circadian clock's seasonal adjustment is disrupted by daylight saving time. *Curr Biol*. 2007;17(22):1996-2000.
 123. Sipila JO, Ruuskanen JO, Rautava P, Kyto V. Changes in ischemic stroke occurrence following daylight saving time transitions. *Sleep Med*. 2016;27-28:20-4.
 124. Kirchberger I, Wolf K, Heier M, Kuch B, von Scheidt W, Peters A, et al. Are daylight saving time transitions associated with changes in myocardial infarction incidence? Results from the German MONICA/KORA Myocardial Infarction Registry. *BMC Public Health*. 2015;15:778.
 125. Manfredini R, Fabbian F, De Giorgi A, Zucchi B, Cappadona R, Signani F, et al. Daylight saving time and myocardial infarction: should we be worried? A review

- of the evidence. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(3):750-5.
126. Ferrazzi E, Romualdi C, Ocello M, Frighetto G, Turco M, Vigolo S, et al. Changes in Accident & Emergency Visits and Return Visits in Relation to the Enforcement of Daylight Saving Time and Photoperiod. *J Biol Rhythms*. 2018;33(5):555-64.
 127. Meira ECM, Miyazawa M, Manfredini R, Cardinali D, Madrid JA, Reiter R, et al. Impact of Daylight Saving Time on circadian timing system: An expert statement. *Eur J Intern Med*. 2019;60:1-3.
 128. Yetish G, Kaplan H, Gurven M, Wood B, Pontzer H, Manger PR, et al. Natural sleep and its seasonal variations in three pre-industrial societies. *Curr Biol*. 2015;25(21):2862-8.
 129. Carvalho FG, Hidalgo MP, Levandovski R. Differences in circadian patterns between rural and urban populations: an epidemiological study in countryside. *Chronobiol Int*. 2014;31(3):442-9.
 130. Roenneberg T, Merrow M. The Circadian Clock and Human Health. *Curr Biol*. 2016;26(10):R432-43.
 131. Higuchi S, Ishibashi K, Aritake S, Enomoto M, Hida A, Tamura M, et al. Inter-individual difference in pupil size correlates to suppression of melatonin by exposure to light. *Neurosci Lett*. 2008;440(1):23-6.
 132. Phillips AJK, Vidafar P, Burns AC, McGlashan EM, Anderson C, Rajaratnam SMW, et al. High sensitivity and interindividual variability in the response of the human circadian system to evening light. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(24):12019-24.
 133. Chellappa SL. Individual differences in light sensitivity affect sleep and circadian rhythms. *Sleep*. 2021;44(2).
 134. Rana S, Prabhu SD, Young ME. Chronobiological Influence Over Cardiovascular Function: The Good, the Bad, and the Ugly. *Circ Res*. 2020;126(2):258-79.
 135. Shea SA, Hilton MF, Hu K, Scheer FA. Existence of an endogenous circadian blood pressure rhythm in humans that peaks in the evening. *Circ Res*. 2011;108(8):980-4.
 136. Scheer FA, Hu K, Evoniuk H, Kelly EE, Malhotra A, Hilton MF, et al. Impact of the human circadian system, exercise, and their interaction on cardiovascular function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(47):20541-6.

137. Krauchi K, Wirz-Justice A. Circadian rhythm of heat production, heart rate, and skin and core temperature under unmasking conditions in men. *Am J Physiol.* 1994;267(3 Pt 2):R819-29.
138. Scheer F, Chellappa SL, Hu K, Shea SA. Impact of mental stress, the circadian system and their interaction on human cardiovascular function. *Psychoneuroendocrinology.* 2019;103:125-9.
139. Scheer FA, Michelson AD, Frelinger AL, 3rd, Evoniuk H, Kelly EE, McCarthy M, et al. The human endogenous circadian system causes greatest platelet activation during the biological morning independent of behaviors. *PLoS One.* 2011;6(9):e24549.
140. Hu K, Ivanov P, Hilton MF, Chen Z, Ayers RT, Stanley HE, et al. Endogenous circadian rhythm in an index of cardiac vulnerability independent of changes in behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(52):18223-7.
141. Vandewalle G, Middleton B, Rajaratnam SM, Stone BM, Thorleifsdottir B, Arendt J, et al. Robust circadian rhythm in heart rate and its variability: influence of exogenous melatonin and photoperiod. *J Sleep Res.* 2007;16(2):148-55.
142. Laborde S, Mosley E, Thayer JF. Heart Rate Variability and Cardiac Vagal Tone in Psychophysiological Research - Recommendations for Experiment Planning, Data Analysis, and Data Reporting. *Front Psychol.* 2017;8:213.
143. Malik M. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation.* 1996;93(5):1043-65.
144. Belloir J, Makarem N, Shechter A. Sleep and Circadian Disturbance in Cardiovascular Risk. *Curr Cardiol Rep.* 2022;24(12):2097-107.
145. Elliott WJ. Circadian variation in the timing of stroke onset: a meta-analysis. *Stroke.* 1998;29(5):992-6.
146. Manfredini R, Boari B, Smolensky MH, Salmi R, la Cecilia O, Maria Malagoni A, et al. Circadian variation in stroke onset: identical temporal pattern in ischemic and hemorrhagic events. *Chronobiol Int.* 2005;22(3):417-53.
147. Goldberg RJ, Brady P, Muller JE, Chen ZY, de Groot M, Zonneveld P, et al. Time of onset of symptoms of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.*

- 1990;66(2):140-4.
148. Muller JE, Tofler GH, Willich SN, Stone PH. Circadian variation of cardiovascular disease and sympathetic activity. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1987;10 Suppl 2:S104-9; discussion S10-1.
 149. Muller JE, Stone PH, Turi ZG, Rutherford JD, Czeisler CA, Parker C, et al. Circadian variation in the frequency of onset of acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1985;313(21):1315-22.
 150. Twidale N, Taylor S, Heddle WF, Ayres BF, Tonkin AM. Morning increase in the time of onset of sustained ventricular tachycardia. *Am J Cardiol.* 1989;64(18):1204-6.
 151. Willich SN, Goldberg RJ, Maclure M, Perriello L, Muller JE. Increased onset of sudden cardiac death in the first three hours after awakening. *Am J Cardiol.* 1992;70(1):65-8.
 152. Suarez-Barrientos A, Lopez-Romero P, Vivas D, Castro-Ferreira F, Nunez-Gil I, Franco E, et al. Circadian variations of infarct size in acute myocardial infarction. *Heart.* 2011;97(12):970-6.
 153. Jones H, Atkinson G, Leary A, George K, Murphy M, Waterhouse J. Reactivity of ambulatory blood pressure to physical activity varies with time of day. *Hypertension.* 2006;47(4):778-84.
 154. Hu K, Scheer FA, Laker M, Smales C, Shea SA. Endogenous circadian rhythm in vasovagal response to head-up tilt. *Circulation.* 2011;123(9):961-70.
 155. Brown DL, Feskanich D, Sanchez BN, Rexrode KM, Schernhammer ES, Lisabeth LD. Rotating night shift work and the risk of ischemic stroke. *Am J Epidemiol.* 2009;169(11):1370-7.
 156. Knutsson A. Health disorders of shift workers. *Occup Med (Lond).* 2003;53(2):103-8.
 157. Fialho G, Cavichio L, Povoia R, Pimenta J. Effects of 24-h shift work in the emergency room on ambulatory blood pressure monitoring values of medical residents. *Am J Hypertens.* 2006;19(10):1005-9.
 158. Su TC, Lin LY, Baker D, Schnall PL, Chen MF, Hwang WC, et al. Elevated blood pressure, decreased heart rate variability and incomplete blood pressure recovery after a 12-hour night shift work. *J Occup Health.* 2008;50(5):380-6.

159. Morris CJ, Purvis TE, Hu K, Scheer FA. Circadian misalignment increases cardiovascular disease risk factors in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(10):E1402-11.
160. Cappuccio FP, Cooper D, D'Elia L, Strazzullo P, Miller MA. Sleep duration predicts cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Eur Heart J*. 2011;32(12):1484-92.
161. Itani O, Jike M, Watanabe N, Kaneita Y. Short sleep duration and health outcomes: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Sleep Med*. 2017;32:246-56.
162. Meng L, Zheng Y, Hui R. The relationship of sleep duration and insomnia to risk of hypertension incidence: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Hypertens Res*. 2013;36(11):985-95.
163. Guo X, Zheng L, Wang J, Zhang X, Zhang X, Li J, et al. Epidemiological evidence for the link between sleep duration and high blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *Sleep Med*. 2013;14(4):324-32.
164. Chien KL, Chen PC, Hsu HC, Su TC, Sung FC, Chen MF, et al. Habitual sleep duration and insomnia and the risk of cardiovascular events and all-cause death: report from a community-based cohort. *Sleep*. 2010;33(2):177-84.
165. Koo BB, Blackwell T, Ancoli-Israel S, Stone KL, Stefanick ML, Redline S, et al. Association of incident cardiovascular disease with periodic limb movements during sleep in older men: outcomes of sleep disorders in older men (MrOS) study. *Circulation*. 2011;124(11):1223-31.
166. Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet*. 2005;365(9464):1046-53.
167. Shahar E, Whitney CW, Redline S, Lee ET, Newman AB, Nieto FJ, et al. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(1):19-25.
168. Huo J, Quan SF, Roveda J, Li A. Coupling analysis of heart rate variability and cortical arousal using a deep learning algorithm. *PLoS One*. 2023;18(4):e0284167.
169. Goff EA, O'Driscoll DM, Simonds AK, Trinder J, Morrell MJ. The cardiovascular

- response to arousal from sleep decreases with age in healthy adults. *Sleep*. 2008;31(7):1009-17.
170. Baranwal N, Yu PK, Siegel NS. Sleep physiology, pathophysiology, and sleep hygiene. *Prog Cardiovasc Dis*. 2023;77:59-69.
 171. Panda S. Circadian physiology of metabolism. *Science*. 2016;354(6315):1008-15.
 172. Grimaldi B, Bellet MM, Katada S, Astarita G, Hirayama J, Amin RH, et al. PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPARgamma. *Cell Metab*. 2010;12(5):509-20.
 173. Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, et al. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. 2010;466(7306):627-31.
 174. Lamia KA, Storch KF, Weitz CJ. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(39):15172-7.
 175. Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB, et al. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol*. 2004;2(11):e377.
 176. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*. 2005;308(5724):1043-5.
 177. Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y, et al. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab*. 2007;6(5):414-21.
 178. Ando H, Kumazaki M, Motosugi Y, Ushijima K, Maekawa T, Ishikawa E, et al. Impairment of peripheral circadian clocks precedes metabolic abnormalities in ob/ob mice. *Endocrinology*. 2011;152(4):1347-54.
 179. Arble DM, Ramsey KM, Bass J, Turek FW. Circadian disruption and metabolic disease: findings from animal models. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010;24(5):785-800.
 180. Salgado-Delgado R, Angeles-Castellanos M, Buijs MR, Escobar C. Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats. *Neuroscience*. 2008;154(3):922-31.
 181. Salgado-Delgado R, Angeles-Castellanos M, Saderi N, Buijs RM, Escobar C.

- Food intake during the normal activity phase prevents obesity and circadian desynchrony in a rat model of night work. *Endocrinology*. 2010;151(3):1019-29.
182. Arble DM, Bass J, Laposky AD, Vitaterna MH, Turek FW. Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17(11):2100-2.
183. Teixeira GP, Guimaraes KC, Soares A, Marqueze EC, Moreno CRC, Mota MC, et al. Role of chronotype in dietary intake, meal timing, and obesity: a systematic review. *Nutr Rev*. 2022;81(1):75-90.
184. Yu JH, Yun CH, Ahn JH, Suh S, Cho HJ, Lee SK, et al. Evening chronotype is associated with metabolic disorders and body composition in middle-aged adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(4):1494-502.
185. Merikanto I, Lahti T, Puolijoki H, Vanhala M, Peltonen M, Laatikainen T, et al. Associations of chronotype and sleep with cardiovascular diseases and type 2 diabetes. *Chronobiol Int*. 2013;30(4):470-7.
186. Osonoi Y, Mita T, Osonoi T, Saito M, Tamasawa A, Nakayama S, et al. Morningness-eveningness questionnaire score and metabolic parameters in patients with type 2 diabetes mellitus. *Chronobiol Int*. 2014;31(9):1017-23.
187. Reutrakul S, Hood MM, Crowley SJ, Morgan MK, Teodori M, Knutson KL, et al. Chronotype is independently associated with glycemic control in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36(9):2523-9.
188. Lopez-Guimera G, Dashti HS, Smith CE, Sanchez-Carracedo D, Ordovas JM, Garaulet M. CLOCK 3111 T/C SNP interacts with emotional eating behavior for weight-loss in a Mediterranean population. *PLoS One*. 2014;9(6):e99152.
189. Sookoian S, Gemma C, Gianotti TF, Burgueno A, Castano G, Pirola CJ. Genetic variants of Clock transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(6):1606-15.
190. Scott EM, Carter AM, Grant PJ. Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(4):658-62.
191. Zarrinpar A, Chaix A, Panda S. Daily Eating Patterns and Their Impact on Health and Disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2016;27(2):69-83.
192. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, et al. Time-

- restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab.* 2012;15(6):848-60.
193. Chaix A, Zarrinpar A, Miu P, Panda S. Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. *Cell Metab.* 2014;20(6):991-1005.
 194. Chaix A, Manoogian ENC, Melkani GC, Panda S. Time-Restricted Eating to Prevent and Manage Chronic Metabolic Diseases. *Annu Rev Nutr.* 2019;39:291-315.
 195. Gill S, Panda S. A Smartphone App Reveals Erratic Diurnal Eating Patterns in Humans that Can Be Modulated for Health Benefits. *Cell Metab.* 2015;22(5):789-98.
 196. Teichman EM, O'Riordan KJ, Gahan CGM, Dinan TG, Cryan JF. When Rhythms Meet the Blues: Circadian Interactions with the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Cell Metab.* 2020;31(3):448-71.
 197. Liu Z, Wei ZY, Chen J, Chen K, Mao X, Liu Q, et al. Acute Sleep-Wake Cycle Shift Results in Community Alteration of Human Gut Microbiome. *mSphere.* 2020;5(1).
 198. Mortas H, Bilici S, Karakan T. The circadian disruption of night work alters gut microbiota consistent with elevated risk for future metabolic and gastrointestinal pathology. *Chronobiol Int.* 2020;37(7):1067-81.
 199. Voigt RM, Forsyth CB, Green SJ, Mutlu E, Engen P, Vitaterna MH, et al. Circadian disorganization alters intestinal microbiota. *PLoS One.* 2014;9(5):e97500.
 200. Thaiss CA, Zeevi D, Levy M, Zilberman-Schapira G, Suez J, Tengeler AC, et al. Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell.* 2014;159(3):514-29.
 201. Man K, Loudon A, Chawla A. Immunity around the clock. *Science.* 2016;354(6315):999-1003.
 202. Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P, O'Neill LA. Circadian clock proteins and immunity. *Immunity.* 2014;40(2):178-86.
 203. Born J, Lange T, Hansen K, Molle M, Fehm HL. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *J Immunol.* 1997;158(9):4454-64.

204. Scheiermann C, Kunisaki Y, Lucas D, Chow A, Jang JE, Zhang D, et al. Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity*. 2012;37(2):290-301.
205. He W, Holtkamp S, Hergenhan SM, Kraus K, de Juan A, Weber J, et al. Circadian Expression of Migratory Factors Establishes Lineage-Specific Signatures that Guide the Homing of Leukocyte Subsets to Tissues. *Immunity*. 2018;49(6):1175-90 e7.
206. Druzd D, de Juan A, Scheiermann C. Circadian rhythms in leukocyte trafficking. *Semin Immunopathol*. 2014;36(2):149-62.
207. Pick R, He W, Chen CS, Scheiermann C. Time-of-Day-Dependent Trafficking and Function of Leukocyte Subsets. *Trends Immunol*. 2019;40(6):524-37.
208. Casanova-Acebes M, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chevre R, N AG, et al. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell*. 2013;153(5):1025-35.
209. Mendez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*. 2008;452(7186):442-7.
210. Vestweber D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(11):692-704.
211. Manning JE, Lewis JW, Marsh LJ, McGettrick HM. Insights Into Leukocyte Trafficking in Inflammatory Arthritis - Imaging the Joint. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:635102.
212. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest*. 2010;120(7):2423-31.
213. Ovadia S, Ozcan A, Hidalgo A. The circadian neutrophil, inside-out. *J Leukoc Biol*. 2023;113(6):555-66.
214. Gibbs J, Ince L, Matthews L, Mei J, Bell T, Yang N, et al. An epithelial circadian clock controls pulmonary inflammation and glucocorticoid action. *Nat Med*. 2014;20(8):919-26.
215. Schloss MJ, Hilby M, Nitz K, Guillamat Prats R, Ferraro B, Leoni G, et al. Ly6C(high) Monocytes Oscillate in the Heart During Homeostasis and After Myocardial Infarction-Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.

- 2017;37(9):1640-5.
216. Schloss MJ, Horckmans M, Nitz K, Duchene J, Drechsler M, Bidzhekov K, et al. The time-of-day of myocardial infarction onset affects healing through oscillations in cardiac neutrophil recruitment. *EMBO Mol Med*. 2016;8(8):937-48.
 217. Scheiermann C, Gibbs J, Ince L, Loudon A. Clocking in to immunity. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(7):423-37.
 218. Nguyen KD, Fentress SJ, Qiu Y, Yun K, Cox JS, Chawla A. Circadian gene *Bmal1* regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science*. 2013;341(6153):1483-8.
 219. Adrover JM, Aroca-Crevillen A, Crainiciuc G, Ostos F, Rojas-Vega Y, Rubio-Ponce A, et al. Programmed 'disarming' of the neutrophil proteome reduces the magnitude of inflammation. *Nat Immunol*. 2020;21(2):135-44.
 220. Gibbs JE, Blaikley J, Beesley S, Matthews L, Simpson KD, Boyce SH, et al. The nuclear receptor REV-ERB α mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(2):582-7.
 221. Scheiermann C, Kunisaki Y, Frenette PS. Circadian control of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):190-8.
 222. Castanon-Cervantes O, Wu M, Ehlen JC, Paul K, Gamble KL, Johnson RL, et al. Dysregulation of inflammatory responses by chronic circadian disruption. *J Immunol*. 2010;185(10):5796-805.
 223. Pagel R, Bar F, Schroder T, Sunderhauf A, Kunstner A, Ibrahim SM, et al. Circadian rhythm disruption impairs tissue homeostasis and exacerbates chronic inflammation in the intestine. *FASEB J*. 2017;31(11):4707-19.
 224. Ando N, Nakamura Y, Aoki R, Ishimaru K, Ogawa H, Okumura K, et al. Circadian Gene Clock Regulates Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice. *J Invest Dermatol*. 2015;135(12):3001-8.
 225. Hashiramoto A, Yamane T, Tsumiyama K, Yoshida K, Komai K, Yamada H, et al. Mammalian clock gene Cryptochrome regulates arthritis via proinflammatory cytokine TNF- α . *J Immunol*. 2010;184(3):1560-5.
 226. Amir M, Chaudhari S, Wang R, Campbell S, Mosure SA, Chopp LB, et al. REV-ERB α Regulates T(H)17 Cell Development and Autoimmunity. *Cell Rep*.

- 2018;25(13):3733-49 e8.
227. Sutton CE, Finlay CM, Raverdeau M, Early JO, DeCoursey J, Zaslona Z, et al. Loss of the molecular clock in myeloid cells exacerbates T cell-mediated CNS autoimmune disease. *Nat Commun.* 2017;8(1):1923.
 228. Cao Q, Zhao X, Bai J, Gery S, Sun H, Lin DC, et al. Circadian clock cryptochrome proteins regulate autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(47):12548-53.
 229. Nakao A, Nakamura Y, Shibata S. The circadian clock functions as a potent regulator of allergic reaction. *Allergy.* 2015;70(5):467-73.
 230. Panzer SE, Dodge AM, Kelly EA, Jarjour NN. Circadian variation of sputum inflammatory cells in mild asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(2):308-12.
 231. Gibbs JE, Ray DW. The role of the circadian clock in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(1):205.
 232. Atwater AQ, Immergluck LC, Davidson AJ, Castanon-Cervantes O. Shift Work Predicts Increases in Lipopolysaccharide-Binding Protein, Interleukin-10, and Leukocyte Counts in a Cross-Sectional Study of Healthy Volunteers Carrying Low-Grade Systemic Inflammation. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(24).
 233. Wirth MD, Andrew ME, Burchfiel CM, Burch JB, Fekedulegn D, Hartley TA, et al. Association of shiftwork and immune cells among police officers from the Buffalo Cardio-Metabolic Occupational Police Stress study. *Chronobiol Int.* 2017;34(6):721-31.
 234. Lu LF, Wang CP, Tsai IT, Hung WC, Yu TH, Wu CC, et al. Relationship between shift work and peripheral total and differential leukocyte counts in Chinese steel workers. *J Occup Health.* 2016;58(1):81-8.
 235. Fatima Y, Bucks RS, Mamun AA, Skinner I, Rosenzweig I, Leschziner G, et al. Shift work is associated with increased risk of COVID-19: Findings from the UK Biobank cohort. *J Sleep Res.* 2021;30(5):e13326.
 236. Mohren DC, Jansen NW, Kant IJ, Galama J, van den Brandt PA, Swaen GM. Prevalence of common infections among employees in different work schedules. *J Occup Environ Med.* 2002;44(11):1003-11.
 237. Loeff B, van Baarle D, van der Beek AJ, Sanders EAM, Bruijning-Verhagen P, Proper KI. Shift Work and Respiratory Infections in Health-Care Workers. *Am J*

- Epidemiol. 2019;188(3):509-17.
238. Li WQ, Qureshi AA, Schernhammer ES, Han J. Rotating night-shift work and risk of psoriasis in US women. *J Invest Dermatol.* 2013;133(2):565-7.
 239. Nojkov B, Rubenstein JH, Chey WD, Hoogerwerf WA. The impact of rotating shift work on the prevalence of irritable bowel syndrome in nurses. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(4):842-7.
 240. Puttonen S, Oksanen T, Vahtera J, Pentti J, Virtanen M, Salo P, et al. Is shift work a risk factor for rheumatoid arthritis? The Finnish Public Sector study. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(4):779-80.
 241. Gustavsen S, Sondergaard HB, Oturai DB, Laursen B, Laursen JH, Magyari M, et al. Shift work at young age is associated with increased risk of multiple sclerosis in a Danish population. *Mult Scler Relat Disord.* 2016;9:104-9.
 242. Hedstrom AK, Akerstedt T, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L. Shift work at young age is associated with increased risk for multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2011;70(5):733-41.
 243. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444(7121):860-7.
 244. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature.* 2017;542(7640):177-85.
 245. Calle MC, Andersen CJ. Assessment of Dietary Patterns Represents a Potential, Yet Variable, Measure of Inflammatory Status: A Review and Update. *Dis Markers.* 2019;2019:3102870.
 246. Gubatan J, Kulkarni CV, Talamantes SM, Temby M, Fardeen T, Sinha SR. Dietary Exposures and Interventions in Inflammatory Bowel Disease: Current Evidence and Emerging Concepts. *Nutrients.* 2023;15(3).
 247. Khanna S, Jaiswal KS, Gupta B. Managing Rheumatoid Arthritis with Dietary Interventions. *Front Nutr.* 2017;4:52.
 248. Mattson MP, Allison DB, Fontana L, Harvie M, Longo VD, Malaisse WJ, et al. Meal frequency and timing in health and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(47):16647-53.
 249. Zielinska M, Michonska I. Effectiveness of various diet patterns among patients with multiple sclerosis. *Postep Psychiatr Neurol.* 2023;32(1):49-58.

250. Pilz LK, Keller LK, Lenssen D, Roenneberg T. Time to rethink sleep quality: PSQI scores reflect sleep quality on workdays. *Sleep*. 2018;41(5).
251. Kaufmann T, Sutterlin S, Schulz SM, Vogele C. ARTiFACT: a tool for heart rate artifact processing and heart rate variability analysis. *Behav Res Methods*. 2011;43(4):1161-70.
252. Meijman TF, de Vries-Griever AH, de Vries G. The evaluation of the Groningen Sleep Quality Scale. Groningen: Heymans Bulletin. 1988(HB 88-13-EX).
253. Simor P, Köteles F, Bódizs R, Bárdos G. A szubjektív alvásminőség kérdőíves vizsgálata: a Groningen Alvásminőség Skála hazai validálása. *Mentálhigiéné és Pszichoszomatika* 2009;10(3):249-61.
254. Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell*. 1996;87(5):811-22.
255. Jakus Z, Simon E, Frommhold D, Sperandio M, Mocsai A. Critical role of phospholipase Cgamma2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. *J Exp Med*. 2009;206(3):577-93.
256. Refinetti R, Lissen GC, Halberg F. Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biol Rhythm Res*. 2007;38(4):275-325.
257. Shaffer F, Ginsberg JP. An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms. *Front Public Health*. 2017;5:258.
258. Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Berger AC, Cohen RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science*. 1981;213(4504):220-2.
259. Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation*. 1991;84(2):482-92.
260. Pomeranz B, Macaulay RJ, Caudill MA, Kutz I, Adam D, Gordon D, et al. Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis. *Am J Physiol*. 1985;248(1 Pt 2):H151-3.
261. Stein PK, Pu Y. Heart rate variability, sleep and sleep disorders. *Sleep Med Rev*. 2012;16(1):47-66.
262. Brandenberger G, Viola AU, Ehrhart J, Charloux A, Geny B, Piquard F, et al. Age-related changes in cardiac autonomic control during sleep. *J Sleep Res*.

- 2003;12(3):173-80.
263. Manoogian ENC, Panda S. Circadian rhythms, time-restricted feeding, and healthy aging. *Ageing Res Rev.* 2017;39:59-67.
 264. Everds NE, Snyder PW, Bailey KL, Bolon B, Creasy DM, Foley GL, et al. Interpreting stress responses during routine toxicity studies: a review of the biology, impact, and assessment. *Toxicol Pathol.* 2013;41(4):560-614.
 265. Calder PC, Albers R, Antoine JM, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, et al. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr.* 2009;101 Suppl 1:S1-45.
 266. Christensen AD, Haase C, Cook AD, Hamilton JA. K/BxN Serum-Transfer Arthritis as a Model for Human Inflammatory Arthritis. *Front Immunol.* 2016;7:213.
 267. Buchan L, St Aubin CR, Fisher AL, Hellings A, Castro M, Al-Nakkash L, et al. High-fat, high-sugar diet induces splenomegaly that is ameliorated with exercise and genistein treatment. *BMC Res Notes.* 2018;11(1):752.
 268. Bronte V, Pittet MJ. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity.* 2013;39(5):806-18.
 269. Frodermann V, Rohde D, Courties G, Severe N, Schloss MJ, Amatullah H, et al. Exercise reduces inflammatory cell production and cardiovascular inflammation via instruction of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med.* 2019;25(11):1761-71.
 270. Straif K, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, et al. Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting. *Lancet Oncol.* 2007;8(12):1065-6.
 271. Caliandro R, Streng AA, van Kerkhof LWM, van der Horst GTJ, Chaves I. Social Jetlag and Related Risks for Human Health: A Timely Review. *Nutrients.* 2021;13(12).
 272. Cetiner O, Yildirim G, Kalyoncu ZB. Social Jetlag Is Associated with the Frequency of Consumption of Sugar-Sweetened Beverages and a High BMI Percentile in Adolescents: Results of the Cross-Sectional Family Life, Activity, Sun, Health, and Eating (FLASHE) Study. *J Acad Nutr Diet.* 2021;121(9):1721-31 e1.
 273. Mathew GM, Hale L, Chang AM. Social jetlag, eating behaviours and BMI among

- adolescents in the USA. *Br J Nutr.* 2020;124(9):979-87.
274. Zeron-Ruggerio MF, Cambras T, Izquierdo-Pulido M. Social Jet Lag Associates Negatively with the Adherence to the Mediterranean Diet and Body Mass Index among Young Adults. *Nutrients.* 2019;11(8).
275. Tobaldini E, Nobili L, Strada S, Casali KR, Braghiroli A, Montano N. Heart rate variability in normal and pathological sleep. *Front Physiol.* 2013;4:294.
276. Chouchou F, Desseilles M. Heart rate variability: a tool to explore the sleeping brain? *Front Neurosci.* 2014;8:402.
277. Trinder J, Kleiman J, Carrington M, Smith S, Breen S, Tan N, et al. Autonomic activity during human sleep as a function of time and sleep stage. *J Sleep Res.* 2001;10(4):253-64.
278. Elsenbruch S, Harnish MJ, Orr WC. Heart rate variability during waking and sleep in healthy males and females. *Sleep.* 1999;22(8):1067-71.
279. Akerstedt T, Hume K, Minors D, Waterhouse J. Good sleep--its timing and physiological sleep characteristics. *J Sleep Res.* 1997;6(4):221-9.
280. Thayer JF, Yamamoto SS, Brosschot JF. The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. *Int J Cardiol.* 2010;141(2):122-31.
281. Thayer JF, Ahs F, Fredrikson M, Sollers JJ, 3rd, Wager TD. A meta-analysis of heart rate variability and neuroimaging studies: implications for heart rate variability as a marker of stress and health. *Neurosci Biobehav Rev.* 2012;36(2):747-56.
282. Goldberger JJ, Challapalli S, Tung R, Parker MA, Kadish AH. Relationship of heart rate variability to parasympathetic effect. *Circulation.* 2001;103(15):1977-83.
283. Golosheykin S, Grant JD, Novak OV, Heath AC, Anokhin AP. Genetic influences on heart rate variability. *Int J Psychophysiol.* 2017;115:65-73.
284. Bertsch K, Hagemann D, Naumann E, Schachinger H, Schulz A. Stability of heart rate variability indices reflecting parasympathetic activity. *Psychophysiology.* 2012;49(5):672-82.
285. Quintana DS, Heathers JA. Considerations in the assessment of heart rate variability in biobehavioral research. *Front Psychol.* 2014;5:805.

286. Akerstedt T, Lekander M, Nilsson G, Tamm S, D'Onofrio P, Kecklund G, et al. Effects of late-night short-sleep on in-home polysomnography: relation to adult age and sex. *J Sleep Res.* 2018;27(4):e12626.
287. Cespedes Feliciano EM, Quante M, Rifas-Shiman SL, Redline S, Oken E, Taveras EM. Objective Sleep Characteristics and Cardiometabolic Health in Young Adolescents. *Pediatrics.* 2018;142(1).
288. Massar SAA, Liu JCJ, Mohammad NB, Chee MWL. Poor habitual sleep efficiency is associated with increased cardiovascular and cortisol stress reactivity in men. *Psychoneuroendocrinology.* 2017;81:151-6.
289. Pinter A, Horvath T, Sarkozi A, Kollai M. Relationship between heart rate variability and endothelial function in healthy subjects. *Auton Neurosci.* 2012;169(2):107-12.
290. Hillebrand S, Gast KB, de Mutsert R, Swenne CA, Jukema JW, Middeldorp S, et al. Heart rate variability and first cardiovascular event in populations without known cardiovascular disease: meta-analysis and dose-response meta-regression. *Europace.* 2013;15(5):742-9.
291. Kubota Y, Chen LY, Whitsel EA, Folsom AR. Heart rate variability and lifetime risk of cardiovascular disease: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Ann Epidemiol.* 2017;27(10):619-25 e2.
292. Schroeder EB, Liao D, Chambless LE, Prineas RJ, Evans GW, Heiss G. Hypertension, blood pressure, and heart rate variability: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Hypertension.* 2003;42(6):1106-11.
293. Rodrigues TC, Ehrlich J, Hunter CM, Kinney GL, Rewers M, Snell-Bergeon JK. Reduced heart rate variability predicts progression of coronary artery calcification in adults with type 1 diabetes and controls without diabetes. *Diabetes Technol Ther.* 2010;12(12):963-9.
294. Fukuda K, Kanazawa H, Aizawa Y, Ardell JL, Shivkumar K. Cardiac innervation and sudden cardiac death. *Circ Res.* 2015;116(12):2005-19.
295. Florea VG, Cohn JN. The autonomic nervous system and heart failure. *Circ Res.* 2014;114(11):1815-26.
296. Chen PS, Chen LS, Fishbein MC, Lin SF, Nattel S. Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: pathophysiology and therapy. *Circ Res.*

- 2014;114(9):1500-15.
297. Lloyd-Jones DM, Allen NB, Anderson CAM, Black T, Brewer LC, Foraker RE, et al. Life's Essential 8: Updating and Enhancing the American Heart Association's Construct of Cardiovascular Health: A Presidential Advisory From the American Heart Association. *Circulation*. 2022;146(5):e18-e43.
 298. Longo VD, Panda S. Fasting, Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan. *Cell Metab*. 2016;23(6):1048-59.
 299. Ella K, Csepanyi-Komi R, Kaldi K. Circadian regulation of human peripheral neutrophils. *Brain Behav Immun*. 2016;57:209-21.
 300. Oliva-Ramirez J, Moreno-Altamirano MM, Pineda-Olvera B, Cauich-Sanchez P, Sanchez-Garcia FJ. Crosstalk between circadian rhythmicity, mitochondrial dynamics and macrophage bactericidal activity. *Immunology*. 2014;143(3):490-7.
 301. Keller M, Mazuch J, Abraham U, Eom GD, Herzog ED, Volk HD, et al. A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(50):21407-12.
 302. Downton P, Early JO, Gibbs JE. Circadian rhythms in adaptive immunity. *Immunology*. 2020;161(4):268-77.
 303. Cutolo M. Chronobiology and the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2012;24(3):312-8.
 304. Krakowiak K, Durrington HJ. The Role of the Body Clock in Asthma and COPD: Implication for Treatment. *Pulm Ther*. 2018;4(1):29-43.
 305. Smolensky MH, Lemmer B, Reinberg AE. Chronobiology and chronotherapy of allergic rhinitis and bronchial asthma. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(9-10):852-82.
 306. Gupta A, Shetty H. Circadian variation in stroke - a prospective hospital-based study. *Int J Clin Pract*. 2005;59(11):1272-5.
 307. Reiter R, Swingen C, Moore L, Henry TD, Traverse JH. Circadian dependence of infarct size and left ventricular function after ST elevation myocardial infarction. *Circ Res*. 2012;110(1):105-10.
 308. Ganeshan K, Chawla A. Metabolic regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:609-34.
 309. De Rosa V, Galgani M, Santopaolo M, Colamatteo A, Laccetti R, Matarese G.

- Nutritional control of immunity: Balancing the metabolic requirements with an appropriate immune function. *Semin Immunol.* 2015;27(5):300-9.
310. Falagas ME, Kompoti M. Obesity and infection. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(7):438-46.
311. Haneklaus M, O'Neill LA. NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation. *Immunol Rev.* 2015;265(1):53-62.
312. Li Y, Zou W, Brestoff JR, Rohatgi N, Wu X, Atkinson JP, et al. Fat-Produced Adipsin Regulates Inflammatory Arthritis. *Cell Rep.* 2019;27(10):2809-16 e3.
313. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity.* 2014;41(1):21-35.
314. Hou F, Xiao K, Tang L, Xie L. Diversity of Macrophages in Lung Homeostasis and Diseases. *Front Immunol.* 2021;12:753940.
315. Taylor EB. The complex role of adipokines in obesity, inflammation, and autoimmunity. *Clin Sci (Lond).* 2021;135(6):731-52.
316. Bruno A, Conus S, Schmid I, Simon HU. Apoptotic pathways are inhibited by leptin receptor activation in neutrophils. *J Immunol.* 2005;174(12):8090-6.
317. Souza-Almeida G, D'Avila H, Almeida PE, Luna-Gomes T, Liechocki S, Walzog B, et al. Leptin Mediates In Vivo Neutrophil Migration: Involvement of Tumor Necrosis Factor-Alpha and CXCL1. *Front Immunol.* 2018;9:111.

11. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk:

- I. **Súdy Ágnes Réka**, Ella Krisztina, Bódizs Róbert, Káldi Krisztina.
Association of Social Jetlag With Sleep Quality and Autonomic Cardiac Control During Sleep in Young Healthy Men.
Frontiers in Neuroscience 2019;13:950.
IF: 3,7

- II. Ella Krisztina*, **Súdy Ágnes Réka***, Búr Zsófia, Koós Bence, Kisiczki Ármin Szabolcs, Mócsai Attila, Káldi Krisztina.
Time restricted feeding modifies leukocyte responsiveness and improves inflammation outcome.
Frontiers in Immunology 2022;13:924541.
IF: 7,3
*megosztott első szerzős közlemény

Az ábrafeliratokban a fenti publikációkra római számokkal hivatkozom.

Az értekezéshez nem kapcsolódó publikáció:

- III. Czárán Domonkos, Sasvári Péter, Horváth Ádám István, Ella Krisztina, **Súdy Ágnes Réka**, Borbély Éva, Csépanyi-Kömi Roland.
Lacking ARHGAP25 mitigates the symptoms of autoantibody-induced arthritis in mice.
Frontiers in Immunology 2023;14:1182278.
IF:7,3

12. Társszerzők közötti munkamegosztás

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények többünk közös munkájának eredménye, ezért röviden összefoglalom a szerzők közötti munkamegosztást.

A szociális *jetlag* és az alvás alatti kardiovaszkuláris szabályozás, valamint az alvásminőség összefüggéseit vizsgáló tanulmányt Dr. Káldi Krisztina és Dr. Ella Krisztina tervezte. A résztvevők toborzását és bevonását Dr. Ella Krisztinával végeztük. A melatonin szinteket Dr. Ella Krisztinával mértük. Az adatok elemzését és statisztikai analízisét Dr. Bódizs Róbert iránymutatásával végeztem. A kéziratot Dr. Káldi Krisztinával, Dr. Ella Krisztinával és Dr. Bódizs Róberttel közösen írtuk meg.

„Az időzített etetés hatása az autoimmun artritisz lefolyására, valamint az immunrendszer válaszkészségére” projektet Dr. Káldi Krisztina és Dr. Ella Krisztina tervezte és felügyelte. A kísérleteket Dr. Ella Krisztinával együtt terveztük meg. Az artritisz követését és a tüdő leukocita populációk elemzését Dr. Ella Krisztinával együtt végeztük. A további kísérleteinket és értékelésüket szerzőtársaimmal közösen végeztük. Az RNS izolálását és a génexpressziós méréseket döntően Dr. Búr Zsófia és Dr. Koós Bence, a szérummintákhoz történő vérvételt Dr. Búr Zsófia végezte. Az adatok statisztikai elemzését én végeztem. Dr. Ella Krisztinával és Dr. Káldi Krisztinával értelmeztük az eredményeket és írtuk meg a kéziratot. Munkacsoportunk azon eredményeit, melyek keletkezésében nem vettem részt az eredmények fejezetben nem mutattam be, azonban a teljesebb kép kialakítása végett a megbeszélés részben rájuk is kitértem.

13. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Káldi Krisztinának a bizalmát, hogy biomérnök diplomával a zsebemben munkacsoportjába fogadott, mint PhD hallgató. Köszönöm, hogy irányította szakmai fejlődésemet, mindvégig biztatott és emberséges és törődő természetével családi légkört biztosított. A laborunk nevében is hálával tartozom a kicsi zöld kávéfőzőért, amit karácsonyra kaptunk tőle.

Szerencsésnek érzem magam, hogy együtt dolgozhattam Dr. Ella Krisztinával és tanulhattam tőle. Köszönöm, hogy végtelen türelmével, letörhetetlen optimizmusával és szakmaszeretetével példát mutatott. Személyében nem csak mentorra, hanem igaz barátira leltem, akivel ráadásul világbajnokok lehetnének szinkronpipettázásban.

Köszönöm Szőke Anitának a PhD-hallgatók rögzös útján szerzett sok közös élményt és hogy mindig számíthattam rá.

Köszönöm szerzőtársaimnak, köztük Dr. Búr Zsófiának, Dr. Koós Bencének és Dr. Kisiczki Árminnak a munkájukat és az azzal járó jó hangulatot. A közös kísérletezések, az éjszakai egerezések és a piros lámpa alatt piros egérvér pipettázásának élménye örök emlékként marad meg.

Köszönöm Dr. Bódizs Róbertnek a közös munkát, ami során rengeteget tanulhattam tőle a szakma matematikai oldaláról.

Szeretném megköszönni laborunk minden további munkatársának és TDK hallgatójának, Sárkány Orsolyának, Nagy Ritának, Kányási Nórának, Lumniczky Zalának, Dr. Pál Hangának és Dr. Kovács Adriennek a közös munkát, segítségüket és társaságukat.

Köszönöm az Élettani Intézet volt és jelenlegi vezetőinek, Prof. Hunyady Lászlónak és Prof. Mócsai Attilának, hogy lehetővé tették a munkámat. Köszönöm továbbá Prof. Ligeti Erzsébetnek és Prof. Hunyady Lászlónak, hogy doktori programvezetőként segítették munkámat.

Hálával tartozom az Élettani Intézet összes munkatársának, amiért befogadó, barátságos és szakmailag kiemelkedő munkahelyet teremtettek. Külön köszönettel tartozom a Ligeti-, Mócsai-, Geiszt- és Jakus labor munkatársainak, akik számos alkalommal önzetlenül segítették munkámat.

Szeretném megköszönni legelső témavezetőmnek, Dr. Szarka Andrásnak, hogy kis elsőévesként bevezetett a kísérletezés csodálatos világába, megtanított az alapokra és elindított a tudományos kutatás útján.

Közvetlen munkatársaimnak külön is szeretném megköszönni, hogy várandósságom során vigyáztak rám és rengeteg terhet levettek a vállamról.

Férjemnek, Erdős Bencének feltétel nélküli odaadása és támogatása mellett köszönöm, hogy idejét az Actiheart készülékek szerelésére, valamint az időzített egéretetőink tervezésére, építésére és programozására fordította. Szeretném megköszönni szüleimnek, Bencének és édesanyjának, hogy kislányommal külön foglalkoztak, míg ez a dolgozat íródott. Hálás vagyok szüleimnek, testvéreimnek, minden családtagomnak és a barátaimnak szeretetükért, biztatásukért és támogatásukért.



Association of Social Jetlag With Sleep Quality and Autonomic Cardiac Control During Sleep in Young Healthy Men

Ágnes Réka Sűdy¹, Krisztina Ella¹, Róbert Bódizs^{2,3} and Krisztina Káldi^{1,4*}

¹ Department of Physiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary, ² Institute of Behavioural Sciences, Semmelweis University, Budapest, Hungary, ³ National Institute of Clinical Neurosciences, Budapest, Hungary, ⁴ Department of Laboratory Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary

OPEN ACCESS

Edited by:

Phyllis Kravet Stein,
Washington University in St. Louis,
United States

Reviewed by:

Paolo Castiglioni,
Fondazione Don Carlo Gnocchi Onlus
(IRCCS), Italy
Dirk Cysarz,
Witten/Herdecke University, Germany

*Correspondence:

Krisztina Káldi
kaldi.krisztina@
med.semmelweis-univ.hu

Specialty section:

This article was submitted to
Autonomic Neuroscience,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 16 May 2019

Accepted: 22 August 2019

Published: 06 September 2019

Citation:

Sűdy ÁR, Ella K, Bódizs R and
Káldi K (2019) Association of Social
Jetlag With Sleep Quality
and Autonomic Cardiac Control
During Sleep in Young Healthy Men.
Front. Neurosci. 13:950.
doi: 10.3389/fnins.2019.00950

Social jetlag (SJL), the difference in sleep timing between work and free days is a consequence of the discrepancy between the individual's circadian rhythm and the social clock. SJL is considered a chronic stress factor and has been linked to various health problems. In this field study, we examined for the first time the association between SJL and cardiac regulation during sleep. 33 healthy young men aged 20–26 years participated in the study. The median SJL was used as a cut-off value to assign the participants into two groups with either lower or higher SJL. As a marker of autonomic control we analyzed heart rate variability (HRV) and addressed intra-individual differences between workdays and free days. In subjects with higher SJL, pNN50, an indicator of vagal activity was lower in the first 3 h of sleep on workday as compared to free day (day \times sleep block \times group, $p = 0.015$), indicating a more adaptable regulation on free days, when subjects slept according to their own preference. However, in subjects with lower SJL, no HRV differences were found between the two nights. SJL showed correlation with the free day-workday differences of both pNN50 and another vagal index, RMSSD in the first 2 h of sleep ($p = 0.023$ and 0.047 , respectively). In subjects with higher SJL, a different HF power on workdays and free days ($p = 0.031$) also indicated that a shift in sleep timing is accompanied by an altered parasympathetic activity in the first few hours of sleep. Furthermore, subjective sleep quality on workdays was negatively associated with SJL ($p = 0.02$), and subjects with higher SJL reported worse sleep quality on workday than on free day ($p = 0.027$). Taken together, our data call attention on the potential effect of SJL on sleep quality and vagal activity during sleep.

Keywords: autonomic nervous system, heart rate variability, sleep quality, circadian misalignment, social jetlag, cardiovascular risk factor

INTRODUCTION

The circadian clock is a fundamental tool enabling organisms to track time internally and thus to adapt their physiology to daily fluctuations in the environment. Circadian time-keeping is organized at the cellular level by the action of molecular oscillators. In mammals, cellular oscillators of peripheral tissues are governed by the central clock located in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. A misalignment between the organism's internal clock and the environmental

time is often followed by desynchronization between tissue clocks. Circadian misalignment is considered as a stress factor (Wittmann et al., 2006; Puttonen et al., 2010), and has been linked to the development of various pathological states including cardiovascular diseases (Morris et al., 2017; Strohmaier et al., 2018), metabolic disturbances (Biggi et al., 2008; Vetter et al., 2015), different malignancies (Schernhammer et al., 2006; Papantoniou et al., 2018) and psychological problems (Shields, 2002).

Social jetlag (SJL) is defined as the time difference between the midpoint of sleep on workdays (MSW) and on free days, and it is a consequence of the discrepancy between an individual's own biological rhythm and the daily timing determined by social constraints (Roenneberg et al., 2003; Wittmann et al., 2006). SJL affects the majority of the adolescent and adult population worldwide. In Europe, more than 30% of the population suffer from an SJL larger than 2 h (Roenneberg et al., 2012). SJL was found to correlate with a higher risk for the development of depression (Levandovski et al., 2011), adverse metabolic changes including obesity and type 2 diabetes (Roenneberg et al., 2012; Rutters et al., 2014; Parsons et al., 2015; Wong et al., 2015; Koopman et al., 2017), and shows association with health-impairing habits such as smoking and excessive caffeine consumption (Wittmann et al., 2006). In addition, our and others' data indicate that SJL negatively impacts academic performance (Haraszti et al., 2014; Diaz-Morales and Escribano, 2015).

Both epidemiological and laboratory studies indicate that severe forms of circadian misalignment such as shift work or jetlag adversely affect the circulatory system and therefore increase the risk of the development of cardiovascular diseases (Knutsson, 2003; Grimaldi et al., 2016; Morris et al., 2016; Vetter et al., 2016; Hulsegege et al., 2018). SJL is the most frequent type of circadian misalignment, therefore its negative impact on the cardiovascular system would represent a public health concern.

The analysis of heart rate variability (HRV) is a well-established method to assess autonomic cardiac control (Malik, 1996; Laborde et al., 2017). A key advantage of this method is that well-validated programmable measuring devices are available for application in field studies without causing any discomfort for the subjects. HRV represents the change in the time interval between successive heartbeats, which is modulated by the sympathetic and parasympathetic nervous system (Malik, 1996). Therefore, HRV is used as a tool to assess autonomic function at the level of the heart. Healthy cardiovascular control is signaled by higher HRV, indicating a stronger parasympathetic activity, whereas low HRV indicates reduced vagal modulation and increased sympathetic activity, which are established risk factors of cardiovascular diseases (Malik, 1996; Thayer et al., 2010). As autonomic control and sleep regulation are interconnected, HRV may be indicative for sleep quality, and efficiency as well. Falling asleep is accompanied by the shift of autonomic balance toward a parasympathetic dominance, measurable in HRV as it increases from wake to slow wave sleep (Elsenbruch et al., 1999; Trinder et al., 2001; Tobaldini et al., 2013; Chouchou and Desseilles, 2014), which is considered to be the most restorative sleep stage (Akerstedt et al., 1997).

In this study, we hypothesized that sleeping out of the endogenous phase on workdays affects cardiovascular regulation and sleep efficiency. To this end we analyzed sleep-related HRV indices and subjective sleep quality in healthy men forming a homogenous sample with respect to age, BMI, and social situation but differing in the extent of SJL, and addressed individual differences between workdays and free days.

MATERIALS AND METHODS

Participants and Protocol

Participants with regular weekly schedule were recruited via advertisements in social media (Facebook groups) and mailing list of university students. Initially 35 students participated in the study, but two of them were excluded either due to experiencing high emotional stress or for lack of appropriate cooperation. Therefore, data of 33 subjects were involved in the final analysis. The sample was homogenous with respect to age (mean \pm SD of 23.2 ± 1.5 years), BMI (mean \pm SD of 22.8 ± 2.5), and social situation (university students in Budapest). All subjects were healthy and none of them were taking medication. None of the subjects had a history of sleep disorder or cardiovascular problem and neither one of them experienced jetlag in the last month prior to the study. In a short interview, participants were asked about smoking habits, caffeine consumption, physical activity, blood pressure, and cholesterol levels. Answers did not indicate notable cardiovascular risk factors in any participants. Participants were asked not to undergo extreme physical activity, and to avoid drinking alcohol during the study week. Following the measurements, participants were interviewed about any unexpected events (high psychical and physical stress or any health problems). The study protocol was approved by the Semmelweis University Regional and Institutional Committee of Science and Research Ethics (Ethical approval 170/2016). Participants gave written consent prior to entering the study and were paid for their participation. The study took place in winter (2016/2017) and in the first half of spring (2017) and was paused for 2 weeks after changing to daylight saving time. The number of participants with lower and higher SJL was similar in every month. The study for each subject lasted for a week, during which the participants performed their daily activities according to their usual habit, including waking to an alarm clock on workdays but waking on their own on free days. On a workday (Wednesday) and a free day (Saturday) participants wore an ambulatory heart rate recorder (Actiheart, CamNtech Ltd., United Kingdom) during the night and filled out a sleep quality questionnaire upon waking on the next day. On the days of HRV detection, subjects collected urine samples in the evening before going to bed and in the morning directly after getting up.

Assessment of Sleep Timing

To recruit participants with different SJL and regular weekly schedule, students were asked to fill out the Hungarian version of the Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ) (Haraszti et al., 2014). Chronotype was assessed as the midpoint of sleep on free days (MSF) corrected for oversleep on free days (MSFsc),

and SJL was calculated by subtracting the midpoint of sleep on workdays (MSW) from MSE, based on Wittmann et al. (2006). During the week of the study each participant kept a sleep diary, based on which the SJL characteristic for the study period was calculated. The mean SJL \pm SD was 92.1 ± 52.9 min, which fits well with previously reported SJL values for this age group (Wittmann et al., 2006; Haraszti et al., 2014; Pilz et al., 2018). The median SJL (93 min) was used as a cut-off value to divide the participants into two groups with either lower (SJL \leq 93 min) or higher SJL (SJL $>$ 93 min). Using this cut-off value resulted in a 10-minutes gap between the two groups. There was no significant difference between the two groups regarding age (23.3 ± 1.9 and 23.1 ± 0.9 years mean \pm SD for the lower and the higher SJL group, respectively) and BMI (22.1 ± 2.7 and 23.6 ± 2.1 years mean \pm SD for the lower and the higher SJL group, respectively). Sleep onset and waking time on the days of HRV detection were estimated by the Actiheart software. These time points were controlled by comparing them with data from the sleep diary. The estimated sleep onset and waking times were used to calculate exact SJL for the days the measurements were performed. This SJL value was used to investigate correlation between SJL and HRV parameters.

Urinary Melatonin

Urine samples collected by the subjects in the evening and morning were stored at -20°C before analysis. Urinary 6-sulfatoxymelatonin, a stable melatonin metabolite, was measured by competitive ELISA according to the instructions of the manufacturer (IBL International). The creatinine concentration of the samples was determined by enzymatic assay (Diagnosticum Zrt., Budapest) to obtain a normalized 6-sulfatoxymelatonin/creatinine ratio (nmol/mmol).

HRV Analysis

The Actiheart monitor was used for the recording of heart rate. Prior to the measurements, participants came into the laboratory where a signal test was performed along with the programming of the device to start recording in the evening. On the next day participants brought the device back for data collection and recharge, before taking it again for the weekend. The Actiheart monitor collects inter-beat-interval (IBI) data, which can be further processed and used for the calculation of HRV parameters. Studies comparing Actiheart and standard ECG recordings did not find any significant difference in IBI detection (Brage et al., 2005; Barreira et al., 2009; Kristiansen et al., 2011). All HRV analyses were performed according to the standards of measurements (Malik, 1996) and the recent recommendations by Laborde et al. (2017). First, reliability of raw data was checked by visual inspection. To ensure a consistent artifact detection and correction, the ARTiiFACT software was used (Kaufmann et al., 2011). According to the international guidelines the data were decomposed into 5 min long segments for analysis of HRV parameters in both the time and frequency domains (Malik, 1996). Segments with more than 10% artifact ratio were excluded. Excluded segments and loss of electrode contact resulted in slightly varying sample sizes in the different analyses. Parameters calculated for the 5 min long segments were

averaged for either 1.5- or 2-h blocks, depending on the analysis performed, as indicated in the text and legends.

In the time domain the standard deviation of the normal to normal interval (SDNN), the root mean square of successive differences (RMSSD), and the percentage of successive normal to normal intervals differing by more than 50 ms (pNN50) were calculated using the ARTiiFACT software. For the analysis of HRV in the frequency domain the DADiSP 6.7 software (DSP Development Corp., United States) was used. IBI data were first resampled to 4 Hz using cubic spline interpolation, detrended and tapered with a Hanning window. Power spectral density (PSD) was then calculated with mixed-radix Fast Fourier Transformation, yielding 600 frequency bins in the range of 0–2 Hz. From the average PSD of the successive 5 min segments very low frequency (VLF, 0.003–0.04 Hz), low frequency (LF, 0.04–0.15 Hz), and high frequency (HF, 0.15–0.4 Hz) absolute powers were calculated by numerical integration of the respective frequency ranges. Normalized units of LF (LFnu = LF/LF + HF) were also calculated. Bin-wise and band-wise PSD values were log normalized (natural base logarithm) before the statistical analyses. In our subjects respiratory rate, determined on the basis of the peak in the high frequency region of the FFT plot, was between 0.2 and 0.3 Hz (12–18/min). At this respiratory rate (resting state) HF corresponds to vagal activity, and correction of the HRV parameters for respiration is not required (Larsen et al., 2010; Bertsch et al., 2012; Laborde et al., 2017).

Assessment of Subjective Sleep Quality

For the assessment of subjective sleep quality, we used the Groningen Sleep Quality Scale (GSQS) (Meijman et al., 1988). The Hungarian version of the questionnaire translated from English was validated by Simor et al. (2009). The participants filled out the GSQS questionnaire directly upon waking following the nights with HRV measurements. The questionnaire contains 15 short, true or false questions about the previous night's sleep. The first question is not evaluated, therefore the GSQS is scored between 0 and 14, a higher score indicating lower quality of sleep.

Statistics

Normality of data (sleep times, HRV measures, questionnaire scores, and 6-sulfatoxymelatonin levels) was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. 6-sulfatoxymelatonin and bin-wise spectral HRV data showed non-normal distribution. For the analysis of the former the non-parametric Mann-Whitney *U* test was used. Bin-wise spectral HRV data was log normalized to achieve normality. If normal distribution was present, we used parametric statistical procedures as follows. Workday-free day differences were assessed by paired sample *t*-tests. Group differences were tested by two sample *t*-tests. For the analysis of HRV data in consecutive time blocks, repeated measures analysis of variance (ANOVA) was performed. Fisher's LSD test was used as *post hoc* test. In addition, the association of SJL with sleep quality and HRV was examined by Pearson's correlation. Log-normalized bin-wise spectral data was expressed as a difference (free day – workday) over the frequency axis (0–0.4 Hz). One-sample *t*-tests were run in order to test if the differences were significantly deviating from the null hypothesis (difference = 0).

Inflation of Type-I error in this case was handled by the procedure of descriptive data analysis (Abt, 1987). Statistical significance threshold was set at $p < 0.05$. If not otherwise indicated, data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using Statistica software version 13.2 (StatSoft, Tulsa, OK, United States).

RESULTS

Basic Rhythm and Sleep Characteristics of the Participants

To control that the participants' actual sleep schedule during the study week was similar to their usual sleep timing, data from the sleep diary recorded during the study week were compared with data from the MCTQ filled in prior to the study. Reliable correlation for both chronotype (indicated by MSFsc) and SJL were obtained (Supplementary Table S1). Participants were divided into two groups based on the median SJL of the whole sample. Table 1 shows sleep data (timing and duration) for both the workday and free day when subjective sleep quality and HRV were assessed. On workdays the two groups displayed no differences in sleep timing and duration, whereas on free days the group with higher SJL had a significantly later bedtime, sleep onset, and waking time than the other group. Both groups had longer sleep duration on free day compared to workday. As a factor of homeostatic sleep regulation we calculated the time spent awake on the days before the HRV measurements.

However, neither a group nor a group \times day effect was obtained (Supplementary Table S2).

As a marker of circadian rhythm, urinary levels of 6-sulfatoxymelatonin, the stable metabolite of melatonin, were determined in evening, and morning urinary samples. The marked difference in the levels of 6-sulfatoxymelatonin between the morning and evening samples (mean individual morning/evening ratios \pm SEM, 6.75 ± 0.75) confirmed the rhythmic physiology of our participants. However, neither the evening nor the morning excretion of 6-sulfatoxymelatonin was associated with SJL (Supplementary Table S3).

Time-Domain Analysis of HRV

To assess how sleep timing affects autonomic cardiac control during sleep, individual HRV parameters were compared between workdays and free days. Average heart rate (HR) for the whole sleep period did not differ between the two days in either group of participants. However, in the group with higher SJL, SDNN, a basic measure of HRV, was significantly higher on the free day than on the workday (Table 2). To analyze HRV in the course of sleep, we calculated mean HRV parameters for consecutive 1.5-h sleep blocks from the time point of falling asleep. As the minimum sleep length on both days was 6 h, four sleep blocks were analyzed for each night and the data sets of workdays and free days were compared. Figure 1 shows data for RMSSD and pNN50, the time-domain parameters most commonly used for the characterization of vagal control of heart function (Malik, 1996; Laborde et al., 2017). Repeated measures

TABLE 1 | Sleep characteristics of the two groups of participants on the days of the measurements.

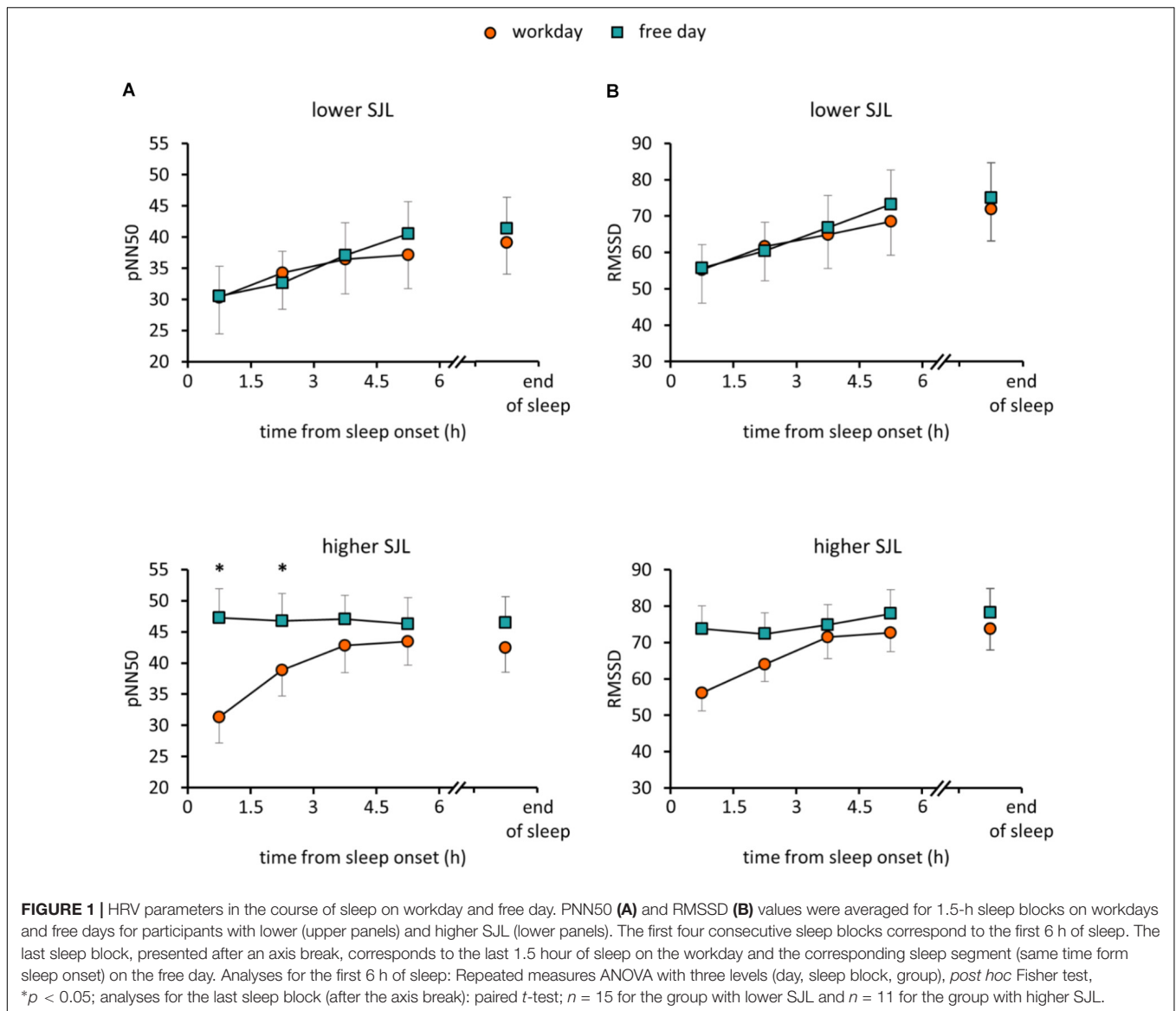
Time (hh:mm)	Workday		Free day		Comparisons	
	Lower SJL	Higher SJL	Lower SJL	Higher SJL	Workday	Free day
					p	p
Bedtime	23:45 (00:52)	23:51 (00:49)	23:56 (00:48)	01:27 (00:52)	0.775	<0.0001
Sleep onset	23:57 (00:50)	00:03 (00:51)	00:09 (00:50)	01:36 (00:51)	0.713	<0.0001
Waking up	07:09 (00:39)	07:02 (00:28)	08:45 (01:09)	10:00 (01:40)	0.540	0.019
Sleep duration	07:13 (00:56)	06:59 (00:43)	08:35 (01:11)	08:25 (01:27)	0.433	0.706

Comparison of sleep timing and duration between groups with lower and higher SJL on workday and free day. Bedtime was indicated by entries of the sleep diary, whereas sleep onset and waking up were estimated by the Actiheart software and verified by diary data. Mean (SD), two-sample t -test, $n = 17$ and 16 for the group with lower and higher SJL, respectively.

TABLE 2 | HR and HRV data for the whole sleep period.

	Lower SJL		Higher SJL		Comparisons	
	Workday	Free day	Workday	Free day	Lower SJL	Higher SJL
					p	p
HR (1/min)	59.1 (2.1)	58.1 (1.3)	57.8 (1.8)	57.2 (2.1)	0.520	0.739
SDNN	86.8 (7.3)	95.1 (6.4)	91.5 (6.2)	102.2 (6.9)	0.088	0.018
RMSSD	61.1 (8.3)	64.9 (7.4)	64.1 (4.5)	72.8 (5.4)	0.422	0.092
pNN50	32.8 (5.1)	35.2 (4.3)	37.7 (3.6)	44.2 (3.9)	0.540	0.107

Mean HR and HRV data were averaged for the time period from sleep onset to waking up. Data for the workday and the free day were compared within both groups of participants. Mean (SEM), paired t -test, $n = 17$ and 14 for the group with lower and higher SJL, respectively.

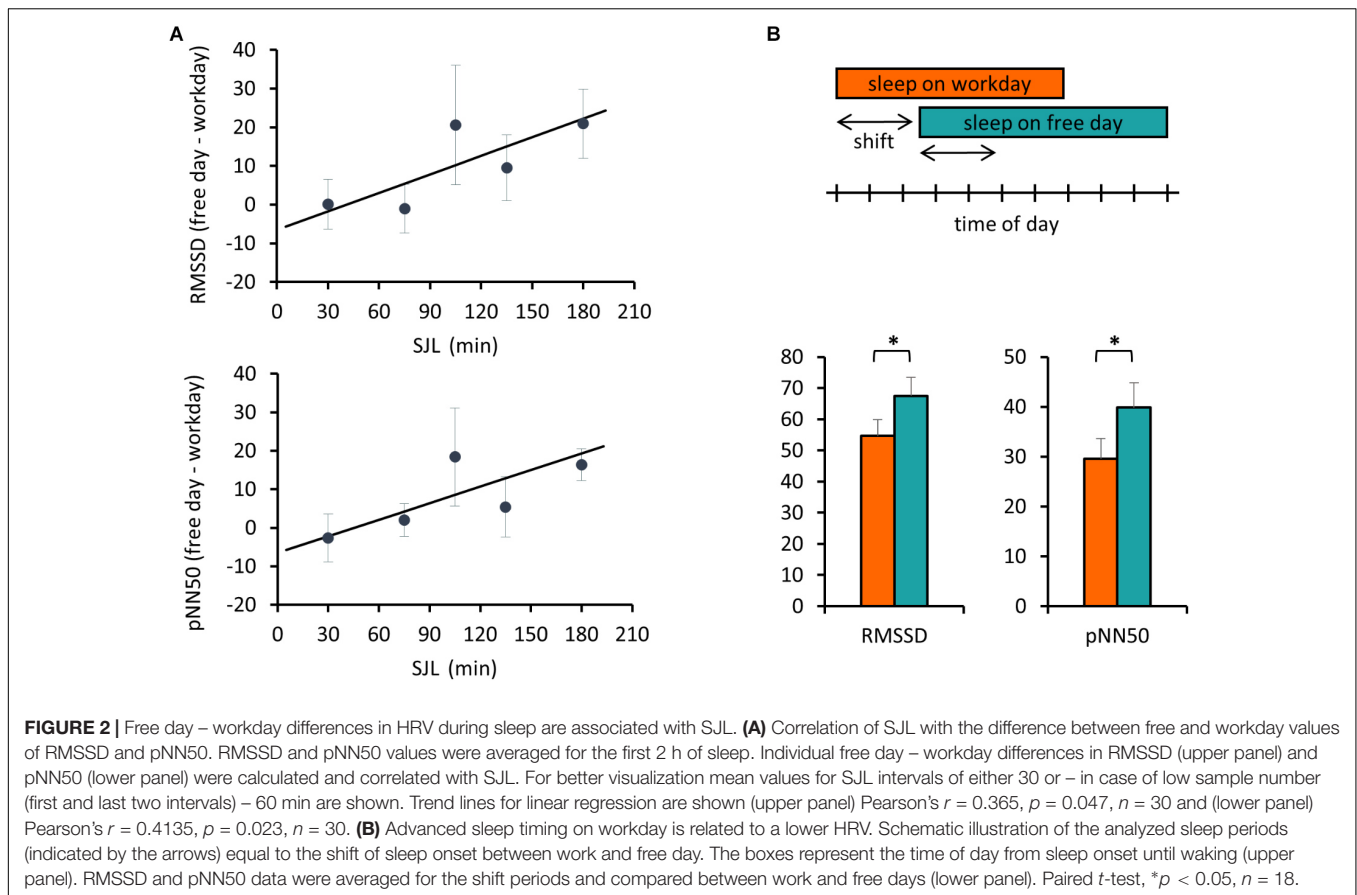


of ANOVA with three factors (group, day, and sleep block) revealed no significant effect of group or day, only sleep block showed significance among the main factors (**Supplementary Table S4**). Furthermore, a day \times sleep block \times group interaction was obtained ($p = 0.015$; $F(3,72) = 3.74$) for pNN50. While the HRV values nearly overlapped in the group with lower SJL, in the first two time blocks data of subjects with higher SJL showed intra-individual differences as their values were significantly lower on the workday than on the free day (**Figure 1A**) (higher SJL, workday, first block: 31.3 ± 4.1 ; second block: 38.9 ± 4.2 ; free day, first block: 47.3 ± 4.7 , second block: 46.8 ± 4.4). *Post hoc* test did not reveal difference between the two groups in any sleep block. RMSSD showed a similar tendency, as values diverged in the first two blocks in the group with higher SJL, however, the interaction did not reach the level of significance [$p = 0.059$; $F(3,72) = 2.59$] (**Figure 1B**). To exclude that the HRV difference was counteracted by an opposite HRV difference after the sleep

period previously analyzed (first 6 h), we performed a further analysis comparing the average HRV in the last 1.5 h of sleep on the workday and in the corresponding sleep segment (same time form sleep onset) on the free day (**Figures 1A,B**). However, the end-of-sleep HRV data did not display differences between workday and free day.

Next, we addressed the relationship between SJL and the HRV difference between the workday and the free day. Analyzing HRV parameters for the first 3 h, corresponding to the first two sleep blocks in **Figure 1**, a positive correlation between SJL and the free day-workday differences in pNN50 was obtained (Pearson's $r = 0.39$, $p = 0.033$, $n = 30$). When the analysis was restricted to the first 2 h, both RMSSD and pNN50 differences were positively correlated with SJL ($r = 0.365$, $p = 0.047$, $n = 30$ for RMSSD and $r = 0.4135$, $p = 0.023$, $n = 30$ for pNN50) (**Figure 2A**).

In the next analysis, we compared the beginning of sleep for a duration equal to the difference of sleep onset between the 2 days,



referred as shift of sleep onset (**Figure 2B**). Data of all participants with more than 25 min shift were involved in this comparison. Both RMSSD and pNN50 parameters were significantly lower on the workday than on the free day (54.7 ± 5.3 and 67.5 ± 6.0 , $p = 0.016$ for RMSSD, and 29.6 ± 4.1 and 39.8 ± 5.0 , $p = 0.009$ for pNN50).

Frequency-Domain Analysis of HRV

To further characterize the HRV differences in the two groups of participants, frequency domain analyses were also performed. When the PSD of HRV was plotted for the first 2 h of sleep for the work and free day, the curves overlapped in the group with lower SJL, whereas they differed in the group with higher SJL (**Supplementary Figure S1**). We calculated the individual bin-wise free day – workday differences in the PSD. The difference was significant in several frequency ranges in subjects with higher SJL, but not in those with lower SJL (**Figure 3A**). The frequency band-based analysis of PSD showed that both LF [0.82 ± 0.02 and 0.85 ± 0.02 ($\ln\text{ms}^2$) on workday and free day, respectively, $p = 0.027$] and HF [1.45 ± 0.06 and 1.58 ± 0.06 ($\ln\text{ms}^2$) on workday and free day, respectively, $p = 0.031$], but not VLF [0.29 ± 0.01 and 0.30 ± 0.01 ($\ln\text{ms}^2$) on workday and free day, $p = 0.103$] bands were involved in the free day elevation of HRV of subjects with higher SJL (**Figure 3B**). In contrast, no differences between work and free day were found in the group with lower SJL [**Figure 3B**; VLF, 0.28 ± 0.01 and 0.29 ± 0.01 ; LF, 0.79 ± 0.02

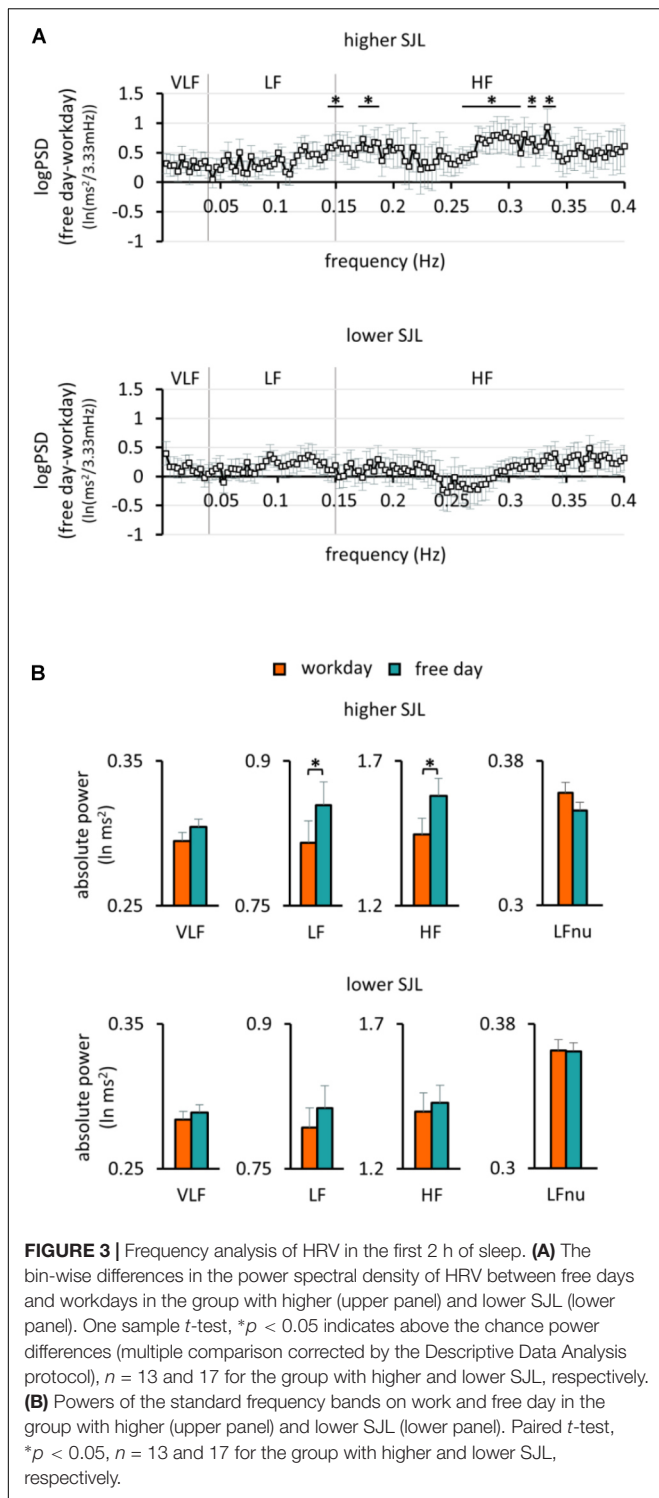
and 0.81 ± 0.02 ; HF, 1.40 ± 0.07 and 1.43 ± 0.06 ($\ln\text{ms}^2$) on workday and free day, respectively]. To approach sympathetic modulation, normalized units of LF were also calculated. LFnu powers were relatively low as expected during sleep in healthy young people (Brandenberger et al., 2003; Stein and Pu, 2012). Workday and free day LFnu powers did not differ significantly in either group (**Figure 3B**).

Examination of the Association Between SJL and Subjective Sleep Quality

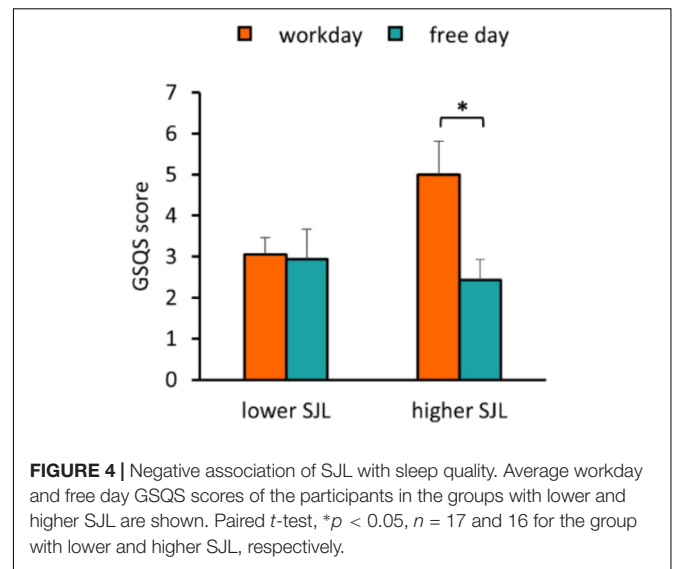
To assess sleep quality, we used the GSQS where a higher score indicates worse quality of sleep. We found that SJL was positively associated with the GSQS score on workday, whereas no association was obtained on the free day (**Supplementary Figure S2**). While participants in the group with lower SJL reported similar sleep quality for both days, participants with higher SJL had a significantly worse sleep quality on the workday than on the free day ($p = 0.027$) (**Figure 4**), and their workday scores were also significantly higher than those of the other group (two-sample t -test, $p = 0.043$).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study indicating an interrelationship between SJL and the control of cardiac function.



SJL affects most people in our society for shorter or longer periods throughout their life. As a strong and positive correlation between SJL and chronotype was found, and chronotype peaks between ages 20 and 26 years, SJL affects young adults most intensively (Wittmann et al., 2006). Therefore, for this field study we recruited male university students and addressed whether



differences in sleep timing between workdays and free days show associations with sleep-related autonomic regulation and subjective sleep quality. Importantly, the measurements were performed in the participants' home environment and subjects kept their usual sleep schedules both on workdays and on free days. This was confirmed by the correlation of both chronotype (MSFsc) and SJL determined on the basis of the MCTQ (usual sleep timing) and the sleep diary (sleep timing in the study week).

We analyzed HRV, as it is a sensitive marker of the plasticity of the autonomic control of cardiac function. According to literature data, the baseline HRV can show high variations among healthy individuals and the source of these inter-individual differences is largely unclear (Goldberger et al., 2001). Beside the plasticity of autonomic control, other factors such as structural and functional properties of the brain were suggested to influence absolute HRV values (Thayer et al., 2012; Kumral et al., 2019). Therefore, intra-individual HRV changes may be more informative than inter-individual differences in absolute HRV values. Nevertheless, it is interesting to note, that in the group with higher SJL the average HRV was higher in both nights compared to the group with lower SJL. Larger sample and further investigations would be needed to analyze whether a higher HRV during sleep is characteristic for people with higher SJL and/or later chronotype.

When we examined individual changes in HRV between the workday and the free day, we found that in the first 3 h of sleep in the group with higher SJL both RMSSD and pNNS50 were lower on workday than on free day. HRV parameters can display circadian variations (Hilton et al., 2000; Vandewalle et al., 2007; Scheer et al., 2009). As we had recordings from only 1/3rd of a day, we cannot assess the daily rhythm of HRV in our subjects. Nevertheless, it might be possible that in the group with higher SJL a decrease in HRV in later sleep segments leads to compensation of the high HRV observed in the first sleep blocks. However, in the end of sleep HRV showed no differences between the 2 days, suggesting that the HRV divergence in the first 3 h

of sleep was not counteracted in later sleep segments. A positive correlation between SJL and the free day-workday difference in various HRV parameters suggested that a higher SJL is associated with a larger increase of parasympathetic modulation from the workday to the free day. Results of the frequency-domain analysis were consistent with the time-domain data, as subjects with higher SJL showed different PSD of HRV on free day compared to workday, dominantly in higher frequency regions reflecting the vagal activity (Scholz et al., 1997; Montano et al., 2009; Laborde et al., 2017). Although the sleep duration of most participants was longer on free days than on workdays, this was not dependent on SJL, indicating that there were no differences in sleep deprivation during workdays between the groups of participants. Time spent awake, a main component of homeostatic sleep regulation, was also similar in the two groups. These data suggest that differences in the circadian rather than in the homeostatic sleep regulation are responsible for the workday-free day differences of HRV parameters in people with higher SJL. The apparent deviation of HRV parameters in the first two sleep blocks resulting in a different pattern of HRV in the course of sleep between workday and free day may reflect a difference in sleep structure. In this early period of workday's night, the biological clock of people with higher SJL (and later chronotype) may not promote sleep. However, the shift of sleep onset from the socially forced earlier time to the preferred later bedtime may cause a deeper sleep with greater vagal tone on free day's night compared to workday's night. A recent work showed that timing of sleep onset is associated with changes in the proportion of sleep stages (Akerstedt et al., 2018). In addition, the positive psychological effect of sleep timing without restrictions may also beneficially influence both the autonomic function and the sleep quality of participants with higher SJL.

Altogether, we suggest that SJL and the chronic changes in sleep timing cause a difference in vagal activity between work and free days' sleep and may affect the plasticity of cardiac regulation in the first few hours of sleep.

HRV parameters were found to reflect the functional properties of the cardiovascular system in both healthy populations and under pathological conditions. In young male subjects a positive correlation was obtained between vagal indices of HRV and endothelial functions (Pinter et al., 2012). Results of a recent meta-analysis based on eight studies with a total number of almost 22 000 subjects showed that low (but still normal) HRV in healthy populations, i.e., without known cardiovascular diseases, is associated with increased risk of a later cardiovascular event (Hillebrand et al., 2013). Moreover, autonomic dysregulation of the heart may contribute to hypertension (Schroeder et al., 2003), coronary artery calcification (Colhoun et al., 2001), arrhythmias, and congestive heart failure (Chen et al., 2014; Florea and Cohn, 2014; Fukuda et al., 2015).

As autonomic control and sleep regulation are interconnected, HRV can serve as an indicator of sleep quality as well. On the other hand, good subjective sleep quality *per se* is considered a marker of both healthy cardiovascular control and emotional wellbeing (Massar et al., 2017; Cespedes Feliciano et al., 2018). Our results based on the GSQS showed that SJL negatively impacts sleep quality on workdays. In a recent study using the

Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI), Pilz et al. (2018) found that SJL mediates the effect of chronotype on the differences in sleep quality between workdays and free days. As GSQS and PSQI differ in both the items to be answered and the referred period (while the GSQS refers to the sleep quality of the previous night, the PSQI is an instrument assessing sleep quality over the last month), results of Pilz et al. (2018), and our data are complementary and together strongly indicate that SJL negatively impacts sleep quality on workdays.

Data from this study should be interpreted by considering some limitations. The sample size was relatively low. To exclude a possible effect of cycle-dependent changes in sexual hormones, only men were involved in this study. Therefore, it is possible that the interactions examined are characteristic only for men but not for women. Further studies may examine possible sex differences. In order to have a relative homogenous sample, only young adults were involved in the study. Impact of age on the associations found in our study could be the subject of future investigations.

In summary, we suggest that the chronic changes in sleep-wake patterns due to social constraints are associated with lessening of the restorative capacity of sleep on workdays. This is reflected by the differences of autonomic cardiac control between workdays and free days and the lower sleep quality during workday nights. In addition, our findings provide further support for the recent claim indicating that the cardiovascular system is particularly sensitive to circadian variation (Scheer et al., 2009; Janszky et al., 2012; Grimaldi et al., 2016).

Considering the very high prevalence of SJL in both the adolescent and the adult population, our findings together with literature data about the adverse health effects of SJL stress the requirement to develop social strategies for the reduction of SJL. Even small changes or more flexibility in school and work schedules may lessen the harmful effect of SJL. Due to shifting the phase of the circadian clock, daylight saving time (DST) also aggravates SJL and negatively affects health (Kantermann et al., 2007). Therefore, initiatives to abolish DST are currently under consideration. Individual strategies may also be important tools for the reduction of SJL. For example, increasing morning and decreasing evening light exposure can shift the biological clock to an earlier phase and thus lessen SJL. As meal acts as an effective *Zeitgeber*, appropriate meal timing could also help to adjust the body clock.

DATA AVAILABILITY

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Semmelweis University Regional and Institutional Committee of Science and Research Ethics (Ethical approval 170/2016). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KE and KK designed the study. ÁS and KE collected the data. ÁS, KE, and RB analyzed the data. KK, ÁS, KE, and RB wrote the manuscript and approved its final version.

FUNDING

This work was supported by the National Research, Development and Innovation Office – NKFIH (K115953) and the Higher Education Institutional Excellence Programme of the Ministry of Human Capacities in Hungary, within the framework of the FIKP programme of the Semmelweis University. KK, KE, and RB are Merit Scholars of the Semmelweis University.

REFERENCES

- Abt, K. (1987). Descriptive data analysis: a concept between confirmatory and exploratory data analysis. *Methods Inf. Med.* 26, 77–88. doi: 10.1055/s-0038-1635488
- Akerstedt, T., Hume, K., Minors, D., and Waterhouse, J. (1997). Good sleep—its timing and physiological sleep characteristics. *J. Sleep Res.* 6, 221–229. doi: 10.1111/j.1365-2869.1997.00221.x
- Akerstedt, T., Lekander, M., Nilsson, G., Tamm, S., D’Onofrio, P., Kecklund, G., et al. (2018). Effects of late-night short-sleep on in-home polysomnography: relation to adult age and sex. *J. Sleep Res.* 27:e12626. doi: 10.1111/jsr.12626
- Barreira, T. K., Kang, M., Caputo, J. L., Farley, R. S., and Renfrow, M. S. (2009). Validation of the actiheart monitor for the measurement of physical activity. *Int. J. Exerc. Sci.* 2, 60–71.
- Bertsch, K., Hagemann, D., Naumann, E., Schachinger, H., and Schulz, A. (2012). Stability of heart rate variability indices reflecting parasympathetic activity. *Psychophysiology* 49, 672–682. doi: 10.1111/j.1469-8986.2011.01341.x
- Biggi, N., Consonni, D., Galluzzo, V., Sogliani, M., and Costa, G. (2008). Metabolic syndrome in permanent night workers. *Chronobiol. Int.* 25, 443–454. doi: 10.1080/07420520802114193
- Brage, S., Brage, N., Franks, P. W., Ekelund, U., and Wareham, N. J. (2005). Reliability and validity of the combined heart rate and movement sensor Actiheart. *Eur. J. Clin. Nutr.* 59, 561–570. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602118
- Brandenberger, G., Viola, A. U., Ehrhart, J., Charloux, A., Geny, B., Piquard, F., et al. (2003). Age-related changes in cardiac autonomic control during sleep. *J. Sleep Res.* 12, 173–180. doi: 10.1046/j.1365-2869.2003.00353.x
- Cespedes Feliciano, E. M., Quante, M., Rifas-Shiman, S. L., Redline, S., Oken, E., and Taveras, E. M. (2018). Objective sleep characteristics and cardiometabolic health in young adolescents. *Pediatrics* 142:e20174085. doi: 10.1542/peds.2017-4085
- Chen, P. S., Chen, L. S., Fishbein, M. C., Lin, S. F., and Nattel, S. (2014). Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: pathophysiology and therapy. *Circ. Res.* 114, 1500–1515. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303772
- Chouchou, F., and Desseilles, M. (2014). Heart rate variability: a tool to explore the sleeping brain? *Front. Neurosci.* 8:402. doi: 10.3389/fnins.2014.00402
- Colhoun, H. M., Francis, D. P., Rubens, M. B., Underwood, S. R., and Fuller, J. H. (2001). The association of heart-rate variability with cardiovascular risk factors and coronary artery calcification: a study in type 1 diabetic patients and the general population. *Diabetes Care* 24, 1108–1114. doi: 10.2337/diacare.24.6.1108
- Diaz-Morales, J. F., and Escibano, C. (2015). Social jetlag, academic achievement and cognitive performance: understanding gender/sex differences. *Chronobiol. Int.* 32, 822–831. doi: 10.3109/07420528.2015.1041599
- Elsenbruch, S., Harnish, M. J., and Orr, W. C. (1999). Heart rate variability during waking and sleep in healthy males and females. *Sleep* 22, 1067–1071. doi: 10.1093/sleep/22.8.1067

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Till Roenneberg, Norbert Gyöngyösi, and Anita Szőke for helpful comments on the manuscript. We also thank Barna Vásárhelyi for advising in 6-sulfatoxymelatonin measurements and reading of the manuscript. We are especially grateful to Bence Erdős for helping in data processing and critical reading of the manuscript and to Éva Szabó for statistical advice. We also thank Adrienn Kovács and Péter Soós for helping in subjects’ recruitment.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00950/full#supplementary-material>

- Florea, V. G., and Cohn, J. N. (2014). The autonomic nervous system and heart failure. *Circ. Res.* 114, 1815–1826. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302589
- Fukuda, K., Kanazawa, H., Aizawa, Y., Ardell, J. L., and Shivkumar, K. (2015). Cardiac innervation and sudden cardiac death. *Circ. Res.* 116, 2005–2019. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304679
- Goldberger, J. J., Challapalli, S., Tung, R., Parker, M. A., and Kadish, A. H. (2001). Relationship of heart rate variability to parasympathetic effect. *Circulation* 103, 1977–1983. doi: 10.1161/01.cir.103.15.1977
- Grimaldi, D., Carter, J. R., Van Cauter, E., and Leproult, R. (2016). Adverse Impact of sleep restriction and circadian misalignment on autonomic function in healthy young adults. *Hypertension* 68, 243–250. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06847
- Haraszti, R. A., Ella, K., Gyongyosi, N., Roenneberg, T., and Kaldi, K. (2014). Social jetlag negatively correlates with academic performance in undergraduates. *Chronobiol. Int.* 31, 603–612. doi: 10.3109/07420528.2013.879164
- Hillebrand, S., Gast, K. B., de Mutsert, R., Swenne, C. A., Jukema, J. W., Middeldorp, S., et al. (2013). Heart rate variability and first cardiovascular event in populations without known cardiovascular disease: meta-analysis and dose-response meta-regression. *Europace* 15, 742–749. doi: 10.1093/europace/eus341
- Hilton, M. F., Umali, M. U., Czeisler, C. A., Wyatt, J. K., and Shea, S. A. (2000). Endogenous circadian control of the human autonomic nervous system. *Comput. Cardiol.* 27, 197–200.
- Hulsege, G., Gupta, N., Proper, K. I., van Lobenstein, N., IJzelenberg, W., Hallman, D. M., et al. (2018). Shift work is associated with reduced heart rate variability among men but not women. *Int. J. Cardiol.* 258, 109–114. doi: 10.1016/j.ijcard.2018.01.089
- Janszky, I., Ahnve, S., Ljung, R., Mukamal, K. J., Gautam, S., Wallentin, L., et al. (2012). Daylight saving time shifts and incidence of acute myocardial infarction—swedish register of information and knowledge about swedish heart intensive care admissions (RIKS-HIA). *Sleep Med.* 13, 237–242. doi: 10.1016/j.sleep.2011.07.019
- Kantermann, T., Juda, M., Merrow, M., and Roenneberg, T. (2007). The human circadian clock’s seasonal adjustment is disrupted by daylight saving time. *Curr. Biol.* 17, 1996–2000. doi: 10.1016/j.cub.2007.10.025
- Kaufmann, T., Sutterlin, S., Schulz, S. M., and Vogele, C. (2011). ARTiiFACT: a tool for heart rate artifact processing and heart rate variability analysis. *Behav. Res. Methods* 43, 1161–1170. doi: 10.3758/s13428-011-0107-7
- Knutsson, A. (2003). Health disorders of shift workers. *Occup. Med.* 53, 103–108. doi: 10.1093/occmed/kgq048
- Koopman, A. D. M., Rauh, S. P., van ’t Riet, E., Groeneveld, L., van der Heijden, A. A., Elders, P. J., et al. (2017). The association between social jetlag, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus in the general population: the new hoorn study. *J. Biol. Rhythms* 32, 359–368. doi: 10.1177/0748730417713572
- Kristiansen, J., Korshoj, M., Skotte, J. H., Jespersen, T., Sogaard, K., Mortensen, O. S., et al. (2011). Comparison of two systems for long-term heart rate

- variability monitoring in free-living conditions—a pilot study. *Biomed. Eng. Online* 10:27. doi: 10.1186/1475-925X-10-27
- Kumral, D., Schaare, H. L., Beyer, F., Reinelt, J., Uhlig, M., Liem, F., et al. (2019). The age-dependent relationship between resting heart rate variability and functional brain connectivity. *Neuroimage* 185, 521–533. doi: 10.1016/j.neuroimage.2018.10.027
- Laborde, S., Mosley, E., and Thayer, J. F. (2017). Heart rate variability and cardiac vagal tone in psychophysiological research - recommendations for experiment planning, data analysis, and data reporting. *Front. Psychol.* 8:213. doi: 10.3389/fpsyg.2017.00213
- Larsen, P. D., Tzeng, Y. C., Sin, P. Y., and Galletly, D. C. (2010). Respiratory sinus arrhythmia in conscious humans during spontaneous respiration. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 174, 111–118. doi: 10.1016/j.resp.2010.04.021
- Levandovski, R., Dantas, G., Fernandes, L. C., Caumo, W., Torres, I., Roenneberg, T., et al. (2011). Depression scores associate with chronotype and social jetlag in a rural population. *Chronobiol. Int.* 28, 771–778. doi: 10.3109/07420528.2011.602445
- Malik, M. (1996). Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task force of the European society of cardiology and the North American society of pacing and electrophysiology. *Circulation* 93, 1043–1065. doi: 10.1161/01.cir.93.5.1043
- Massar, S. A. A., Liu, J. C. J., Mohammad, N. B., and Chee, M. W. L. (2017). Poor habitual sleep efficiency is associated with increased cardiovascular and cortisol stress reactivity in men. *Psychoneuroendocrinology* 81, 151–156. doi: 10.1016/j.psyneuen.2017.04.013
- Meijman, T. F., de Vries-Griever, A. H., and de Vries, G. (1988). *The evaluation of the Groningen Sleep Quality Scale*. Groningen: Heymans Bulletin (HB 88-13-EX).
- Montano, N., Porta, A., Cogliati, C., Costantino, G., Tobaldini, E., Casali, K. R., et al. (2009). Heart rate variability explored in the frequency domain: a tool to investigate the link between heart and behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 71–80. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.07.006
- Morris, C. J., Purvis, T. E., Hu, K., and Scheer, F. A. (2016). Circadian misalignment increases cardiovascular disease risk factors in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, E1402–E1411. doi: 10.1073/pnas.1516953113
- Morris, C. J., Purvis, T. E., Mistretta, J., Hu, K., and Scheer, F. (2017). Circadian misalignment increases C-reactive protein and blood pressure in chronic shift workers. *J. Biol. Rhythms* 32, 154–164. doi: 10.1177/0748730417697537
- Papantoniou, K., Devore, E. E., Massa, J., Strohmaier, S., Vetter, C., Yang, L., et al. (2018). Rotating night shift work and colorectal cancer risk in the nurses' health studies. *Int. J. Cancer* 143, 2709–2717. doi: 10.1002/ijc.31655
- Parsons, M. J., Moffitt, T. E., Gregory, A. M., Goldman-Mellor, S., Nolan, P. M., Poulton, R., et al. (2015). Social jetlag, obesity and metabolic disorder: investigation in a cohort study. *Int. J. Obes.* 39, 842–848. doi: 10.1038/ijo.2014.201
- Pilz, L. K., Keller, L. K., Lenssen, D., and Roenneberg, T. (2018). Time to rethink sleep quality: PSQI scores reflect sleep quality on workdays. *Sleep* 41:zsy029. doi: 10.1093/sleep/zsy029
- Pinter, A., Horvath, T., Sarkozi, A., and Kollai, M. (2012). Relationship between heart rate variability and endothelial function in healthy subjects. *Auton. Neurosci.* 169, 107–112. doi: 10.1016/j.autneu.2012.05.005
- Puttonen, S., Harma, M., and Hublin, C. (2010). Shift work and cardiovascular disease - pathways from circadian stress to morbidity. *Scand. J. Work Environ. Health* 36, 96–108. doi: 10.5271/sjweh.2894
- Roenneberg, T., Allebrandt, K. V., Mewes, M., and Vetter, C. (2012). Social jetlag and obesity. *Curr. Biol.* 22, 939–943. doi: 10.1016/j.cub.2012.03.038
- Roenneberg, T., Wirz-Justice, A., and Mewes, M. (2003). Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. *J. Biol. Rhythms* 18, 80–90. doi: 10.1177/0748730402239679
- Rutters, F., Lemmens, S. G., Adam, T. C., Bremner, M. A., Elders, P. J., Nijpels, G., et al. (2014). Is social jetlag associated with an adverse endocrine, behavioral, and cardiovascular risk profile? *J. Biol. Rhythms* 29, 377–383. doi: 10.1177/0748730414550199
- Scheer, F. A., Hilton, M. F., Mantzoros, C. S., and Shea, S. A. (2009). Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 4453–4458. doi: 10.1073/pnas.0808180106
- Schernhammer, E. S., Kroenke, C. H., Laden, F., and Hankinson, S. E. (2006). Night work and risk of breast cancer. *Epidemiology* 17, 108–111.
- Scholz, U. J., Bianchi, A. M., Cerutti, S., and Kubicki, S. (1997). Vegetative background of sleep: spectral analysis of the heart rate variability. *Physiol. Behav.* 62, 1037–1043. doi: 10.1016/s0031-9384(97)00234-5
- Schroeder, E. B., Liao, D., Chambless, L. E., Prineas, R. J., Evans, G. W., and Heiss, G. (2003). Hypertension, blood pressure, and heart rate variability: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Hypertension* 42, 1106–1111. doi: 10.1161/01.HYP.0000100444.71069.73
- Shields, M. (2002). Shift work and health. *Health Rep.* 13, 11–33.
- Simor, P., Koteles, F., Bodizs, R., and Bardos, G. (2009). A questionnaire based study of subjective sleep quality: the psychometric evaluation of the Hungarian version of the Groningen sleep quality scale. *Mentálhigiéné és Pszichoszomatika* 10, 249–261. doi: 10.1556/mental.10.2009.3.5
- Stein, P. K., and Pu, Y. (2012). Heart rate variability, sleep and sleep disorders. *Sleep Med. Rev.* 16, 47–66. doi: 10.1016/j.smrv.2011.02.005
- Strohmaier, S., Devore, E. E., Zhang, Y., and Schernhammer, E. S. (2018). A review of data of findings on night shift work and the development of DM and CVD events: a synthesis of the proposed molecular mechanisms. *Curr. Diab. Rep.* 18:132. doi: 10.1007/s11892-018-1102-5
- Thayer, J. F., Ahs, F., Fredrikson, M., Sollers, J. J. III, and Wager, T. D. (2012). A meta-analysis of heart rate variability and neuroimaging studies: implications for heart rate variability as a marker of stress and health. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 747–756. doi: 10.1016/j.neubiorev.2011.11.009
- Thayer, J. F., Yamamoto, S. S., and Brosschot, J. F. (2010). The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. *Int. J. Cardiol.* 141, 122–131. doi: 10.1016/j.ijcard.2009.09.543
- Tobaldini, E., Nobili, L., Strada, S., Casali, K. R., Braghiroli, A., and Montano, N. (2013). Heart rate variability in normal and pathological sleep. *Front. Physiol.* 4:294. doi: 10.3389/fphys.2013.00294
- Trinder, J., Kleiman, J., Carrington, M., Smith, S., Breen, S., Tan, N., et al. (2001). Autonomic activity during human sleep as a function of time and sleep stage. *J. Sleep Res.* 10, 253–264. doi: 10.1046/j.1365-2869.2001.00263.x
- Vandewalle, G., Middleton, B., Rajaratnam, S. M., Stone, B. M., Thorleifsdottir, B., Arendt, J., et al. (2007). Robust circadian rhythm in heart rate and its variability: influence of exogenous melatonin and photoperiod. *J. Sleep Res.* 16, 148–155. doi: 10.1111/j.1365-2869.2007.00581.x
- Vetter, C., Devore, E. E., Ramin, C. A., Speizer, F. E., Willett, W. C., and Schernhammer, E. S. (2015). Mismatch of sleep and work timing and risk of Type 2 diabetes. *Diabetes Care* 38, 1707–1713. doi: 10.2337/dc15-0302
- Vetter, C., Devore, E. E., Wegrzyn, L. R., Massa, J., Speizer, F. E., Kawachi, I., et al. (2016). Association between rotating night shift work and risk of coronary heart disease among women. *JAMA* 315, 1726–1734. doi: 10.1001/jama.2016.4454
- Wittmann, M., Dinich, J., Mewes, M., and Roenneberg, T. (2006). Social jetlag: misalignment of biological and social time. *Chronobiol. Int.* 23, 497–509. doi: 10.1080/07420520500545979
- Wong, P. M., Hasler, B. P., Kamarck, T. W., Muldoon, M. F., and Manuck, S. B. (2015). Social jetlag, chronotype, and cardiometabolic risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, 4612–4620. doi: 10.1210/jc.2015-2923

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Südy, Ella, Bódizs and Káldi. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Material

Table S1. Correlation of MSFsc and SJL obtained by the MCTQ and the sleep diary

	MCTQ	Diary	Correlation	
			r	p
Chronotype (MSFsc) (hh:mm)	04:31 (01:01)	04:24 (01:01)	0.702	<0.001
Social jetlag (hh:mm)	01:30 (00:45)	01:32 (00:53)	0.763	<0.001

Mean (SD), Pearson's correlation, n=33.

(MCTQ, Munich Chronotype Questionnaire; MSF, midpoint of sleep on free days; MSFsc, MSF corrected for oversleep; SJL, social jetlag)

Table S2. Time spent awake before sleep on the days of measurements

	Lower SJL		Higher SJL	
	workday	free day	workday	free day
time awake (hh:mm)	16:35 (00:15)	15:21 (00:16)	16:34 (00:09)	15:07 (00:19)

Time spent awake before sleep on the days (workday and free day) the measurements were performed. Mean (SEM), two-way ANOVA shows neither group ($p=0.682$) nor group x day effect ($p=0.628$). (SJL, social jetlag)

Table S3. 6-sulfatoxymelatonin levels in evening and morning urinary samples

6-sulfatoxymelatonin/ creatinine ratio (mmol/nmol)					Comparisons	
	Workday		Free day		Workday	Free day
	Lower SJL	Higher SJL	Lower SJL	Higher SJL	p	p
Evening	2.143 (0.645)	2.293 (0.410)	3.654 (0.715)	3.988 (1.048)	0.242	0.796
Morning	10.557 (1.354)	10.791 (1.718)	16.021 (4.165)	12.502 (2.318)	0.858	0.648

Comparison of melatonin levels (urinary 6-sulfatoxymelatonin normalized to creatinine) between groups with lower and higher SJL on workday and free day. Mean (SEM), Mann-Whitney U test, n = 17 and 14 for the group with lower and higher SJL, respectively. (SJL, social jetlag)

Table S4. Significance levels for the statistical analyses of HRV parameters pNN50 and RMSSD in the course of sleep

Effect	Variable	
	pNN50	RMSSD
	p	p
group	0.217	0.512
day	0.207	0.219
sleep block	<0.001	<0.001
day x group	0.285	0.380
sleep block x group	0.648	0.612
day x sleep block	0.116	0.245
day x sleep block x group	0.015	0.059

Significance levels for the repeated measures of ANOVA with three levels (group, day, sleep block) used for the analyses of the HRV parameters pNN50 and RMSSD in the course of sleep (see Figure1).

Fig.S1

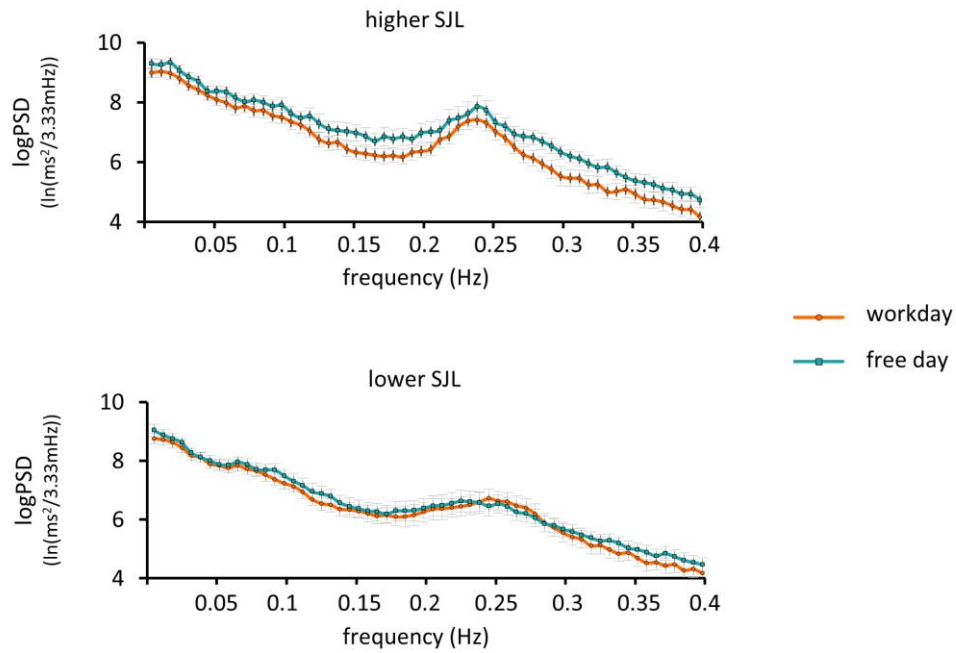


Figure S1. Power spectral density of HRV in the first two hours of sleep
Power spectral density of HRV on workdays and free days in the group with higher (upper panel) and lower SJL (lower panel). n = 13 (group with higher SJL) and n =17 (group with lower SJL)

Fig.S2

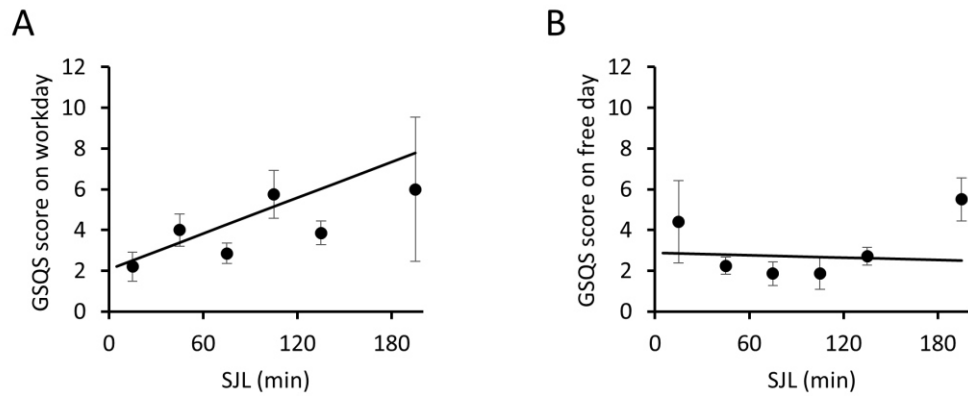


Figure S2. The association of SJL with sleep quality

(A) Association of SJL with GSQS scores on workday. Pearsons' $r=0.404$, $p=0.02$, $n=33$

(B) Association of SJL with GSQS scores on free day Pearsons' $r=-0.041$, $p=0.82$, $n=33$

For better visualization mean values for SJL intervals of either 30 or – in case of low sample number (last interval) – 180 min are shown. Trend lines for linear regression are shown.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Satoshi Hachimura,
The University of Tokyo, Japan

REVIEWED BY
Cameron McAlpine,
Icahn School of Medicine at Mount
Sinai, United States
Julie Elizabeth Gibbs,
The University of Manchester,
United Kingdom

*CORRESPONDENCE
Krisztina Ella
ella.krisztina@med.semmelweis-univ.hu
Krisztina Káldi
kaldi.krisztina@med.semmelweis-univ.hu

†These authors have contributed
equally to this work and share
first authorship

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Nutritional Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 20 April 2022
ACCEPTED 30 September 2022
PUBLISHED 02 November 2022

CITATION
Ella K, Sűdy AR, Bűr Z, Koós B,
Kisiczki S, Műcsai A and Kldi K
(2022) Time restricted feeding
modifies leukocyte responsiveness and
improves inflammation outcome.
Front. Immunol. 13:924541.
doi: 10.3389/fimmu.2022.924541

COPYRIGHT
 2022 Ella, Sűdy, Bűr, Koós, Kisiczki,
Műcsai and Kldi. This is an open-
access article distributed under the
terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](#). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use,
distribution or reproduction is
permitted which does not comply with
these terms.

Time restricted feeding modifies leukocyte responsiveness and improves inflammation outcome

Krisztina Ella^{*†}, Ágnes R. Sűdy[†], Zsofia Bűr, Bence Kos,
rmin S. Kisiczki, Attila Műcsai and Krisztina Kldi^{*}

Department of Physiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Time restricted eating, the dietary approach limiting food intake to a maximal 10-hour period of daytime is considered beneficial in metabolic dysfunctions, such as obesity and diabetes. Rhythm of food intake and parallel changes in serum nutrient levels are also important entrainment signals for the circadian clock, particularly in tissues involved in metabolic regulation. As both the metabolic state and the circadian clock have large impact on immune functions, we investigated in mice whether time restricted feeding (TRF) affects systemic inflammatory potential. TRF slackened the symptoms in K/BxN serum-transfer arthritis, an experimental model of human autoimmune joint inflammation. Compared to *ad libitum* conditions TRF reduced the expression of inflammatory mediators in visceral adipose tissue, an integrator and coordinator of metabolic and inflammatory processes. Furthermore, TRF strengthened the oscillation of peripheral leukocyte counts and alongside decreased the pool of both marginated and tissue leukocytes. Our data suggest that the altered leukocyte distribution in TRF mice is related to the attenuated expression of adhesion molecules on the surface of neutrophils and monocytes. We propose that TRF modifies both rhythm and inflammatory potential of leukocytes which contribute to the milder reactivity of the immune system and therefore time-restricted eating could serve as an effective complementary tool in the therapy of autoinflammatory processes.

KEYWORDS

adipocyte, arthritis, circadian, metabolic rhythm, neutrophil, inflammation, leptin

Introduction

The circadian clock is an endogenous time-measuring system which controls the daily rhythm of basic physiological processes and thereby it is a crucial factor of adaptation to oscillating environmental changes (1). External cues (called *Zeitgebers*) such as light and temperature changes or food intake can reset the phase of the circadian

rhythm through the *entrainment* process (2, 3). Molecular components of the circadian clock and rhythmic molecular changes were detected in almost all tissues in mammals. The tissue clocks are organized in a hierarchical system. The central clock - located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) - receives input from the retina and different brain regions and by integrating photic and non-photic information it synchronizes the clocks of the peripheral tissues through humoral and neuronal signals (3–5).

Operation of the molecular oscillators depends on transcriptional/translational feedback mechanisms. In the core oscillator the BMAL1/CLOCK complex induces the expression of the *Cryptochrome* (*Cry*) and the *Period* (*Per*) genes. PER and CRY form the negative factor complex, which enters the nucleus and with a certain delay inhibits the activity of the BMAL1/CLOCK complex and thereby its own expression. Following the degradation of PER and CRY, the positive element is reactivated and a new cycle begins. Through nuclear receptors, additional feedback loops can stabilize the system, as REVERBs inhibit, whereas RORs activate the transcription of BMAL1. As a result of these molecular events, most clock components show rhythmic oscillation at both the RNA and the protein levels (3–5). The BMAL1/CLOCK complex can induce the transcription of *clock controlled genes* (*ccg*) as well, which convert internal time information to rhythmic operation of different physiological processes (5, 6). In mammals more than 80% of the genes are under the control of the circadian clock at least in one tissue (7).

Disturbed circadian rhythm due to an altered molecular clock function or misalignment between the endogenous and the environmental rhythm is associated with health risks (6). Cardiovascular diseases, metabolic problems like obesity or diabetes, malignant transformations and inflammatory diseases show increased incidence in the population with circadian rhythm disturbances (6, 8–14). The prevalence of exogenous clock disruptions is increasing in our society, they affect more than half of the population for shorter or longer periods (12, 15, 16).

Circadian regulation, metabolism and the immune system form a network with pairwise interactions between the components. The bidirectional link between metabolism and the circadian clock is supported by both epidemiological and experimental data. On one hand, nutrient composition and feeding time act as efficient *Zeitgebers*, on the other hand, the circadian clock coordinates the timing of different metabolic activities (17, 18). Due to the precise temporal regulation, antagonistic pathways such as catabolic and anabolic processes are separated in time. While light is the ultimate *Zeitgeber* of the SCN, nutrient availability and feeding rhythm may constitute the primary input for the circadian clock of the liver and the adipose tissue, the central players of metabolism (19–21). As a consequence, contradictory time cues may lead to desynchrony between the central and peripheral clocks (19, 20). As an

important breakthrough in the field, Panda and co-workers showed that in mice fed a high-fat diet, disruption of the normal feeding cycle by feeding in the resting (light) phase or *ad libitum* leads to obesity and the development of metabolic disorders (22). In contrast, preserving natural feeding rhythms *via* time-restricted feeding (TRF) prevented disturbance of the metabolic state without altering caloric intake (22). Also, irregular timing of food intake, which is a common practice in the modern society can profoundly perturb the human metabolic rhythm (21).

The circadian clock impacts different levels of the immune response. Disrupted clock operation is often associated with upregulation of inflammatory processes (9, 23–26). At the cellular level, the circadian clock has been shown to influence both the temporal pattern and the intensity of leukocyte responses and also the trafficking of the immune cells (4, 26–30). This can be behind the fact that the outcome of microbial infections varies depending on the time of the day when the microbial exposure occurred (31–33). Furthermore, several immune-related diseases show circadian variations in the exacerbations of symptoms; e.g. symptoms of allergic rhinitis, bronchial asthma and rheumatoid arthritis typically worsen during the late night and in the early morning (34–39).

Metabolism and immune functions are also tightly interconnected (40, 41). It is well known that in metabolic disorders such as metabolic syndrome and diabetes, several levels of the immune functions are negatively affected and the incidence of infections is increased (42, 43). On the other hand, inflammatory processes, such as low-grade inflammation of the visceral adipose tissue in obesity and beta cell destroying autoimmune reactions in type 1 diabetes, are important contributors of the metabolic disturbance (44). Clinical data indicate that in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases different diets with longer fasting periods and caloric restriction attenuate the severity of symptoms (45–48). However, it is completely unknown whether food intake restricted to a well tolerable period of the day without caloric restriction and changes in the nutrient composition can affect the progression of these diseases.

As time restricted feeding (TRF) was shown to affect metabolic functions as well as the circadian system (22), and both of them control the immune system, we aimed to examine the effect of TRF on inflammatory responsiveness. We found that in mice subjected to TRF, symptoms of autoinflammatory arthritis were attenuated as compared to mice with *ad libitum* food availability. TRF strengthened rhythmic physiology and reduced inflammatory properties of the visceral adipose tissue. Moreover, after time restricted food intake, daily fluctuation in the peripheral neutrophil and monocyte counts was enhanced. Increased levels of circulatory leukocytes in the TRF group compared to the *ad libitum* (AL) group coincided with reduced margination of the neutrophils to the vessel wall and lower expression of adhesion molecules on the cell surface. Our

results indicate that TRF has significant impact on inflammatory responsiveness and suggest that synchronization of food intake with the environmental and activity rhythm can function as a novel therapeutic support in the treatment of autoimmune or inflammatory diseases.

Materials and methods

Animals and diets

Male C57BL/6 mice were bred and housed in a conventional animal facility under 12 hour light/12 hour dark schedule. *Zeitgeber* time (ZT) 0 indicates the onset of light, whereas ZT12 indicates the onset of darkness. Before the experiments mice were kept on an *ad libitum* normal chow diet and had unlimited access to water. At 60–80 days of age animals were assigned to different feeding regimens for 4 weeks in 2 groups: *ad libitum* fed (AL) and time restricted fed (TRF) groups (Figure 1A). TRF mice had food access in a 10 hour window in their active phase between ZT12 and ZT22 controlled by an automated FeedTime[®] system (TSE Systems). Both groups were fed normal chow, had unlimited access to water and were kept on a grid to avoid snacking and coprophagy. Animals' weights and food intake were measured weekly. Experiments and tests were carried out after 4 weeks. All animal experiments were approved by the Animal Experimentation Review Board of the Semmelweis University and the Government Office for Pest County (Hungary) (Ethical approval: PE/EA/1967-2/2017).

K/BxN serum-transfer arthritis

Autoimmune arthritis was induced by a single intraperitoneal injection of 250 μ l K/BxN arthritic serum. The feeding-regime was continued during the arthritis development. Serum was obtained as described previously (49). Arthritis severity was assessed daily by two investigators separately at ZT5 for 6 days by clinical scoring of the paws on a 1–10 scale including half points (49) and by measuring the ankle thickness with a spring-loaded caliper (Kroepflin). Ankle thickness values measured by the two investigators were averaged. Sum of scores of 4 limbs and mean of ankle thickness of the hind limbs were normalized to values obtained on the day of the injection (day 0). The investigators were blinded for the origin and treatment of the mice.

Six days after arthritis induction, mice were sacrificed and hind limbs were cut, minced and incubated in a digesting solution (1 ml/sample: 200 mM HEPES (pH 7.4), 200 μ g/ml Liberase (Roche) and 1 μ g/ml DNase I in HBSS) for 1 hour at 37°C 1400 rpm. To generate single cell suspensions, samples were passed through a 40 μ m filter and absolute cell counts were determined using CountBright[™] (Invitrogen) (CytoFLEX,

Beckman Coulter). Cells then were labeled with anti-Ly6G-FITC and anti-CD11b-APC. Neutrophils were identified according to their Ly6G expression and their FSC and SSC properties. For analysis of flow cytometric measurements (CytoFLEX, Beckman Coulter) the Kaluza Analysis Software (version 2.1, Beckman Coulter) was applied.

Intraperitoneal glucose tolerance test

Mice were fasted for 16 hours before the intraperitoneal injection of glucose (1 mg/g body weight, at ZT14). Blood glucose levels were measured with a Dcont Trend glucose meter immediately before, and 1 and 2 hours after glucose administration.

Gene-expression analysis

Visceral adipose tissue was isolated, immediately frozen in liquid nitrogen and then grinded. Adipocytes and total bone marrow isolates were immediately lysed using the TriPure[®] Isolation Reagent (Roche). Samples were stored at -80°C until RNA preparation. Total RNA was extracted according to the manufacturer's protocol. Following DNase treatment, cDNA was synthesized using the QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Relative expression levels of *per2*, *reverb α* , *cxcl12*, *tnf α* , *il1 β* , *il18*, *nlrp3*, *leptin* and *adipsin* were measured in a Light Cycler[®] 480 system (Roche) using TaqMan hydrolysis probes (see Supplementary Table 1). *Rplp0* was used as a reference. The second derivative maximum method was applied for data analysis using LightCycler[®] Relative Quantification Software (version 1.5.0.39, Roche).

Analysis of leukocyte subsets and migratory factors expressed on leukocytes

Before and after the 4 weeks conditioning, blood was collected by tail snip and absolute leukocyte number was determined. Blood collections at night (at ZT13, 17 and 21) were carried out under red light. Leukocytes (CD45+ cells) were further analyzed by flow cytometric measurements (CytoFLEX, Beckman Coulter) and different subsets were quantified. For neutrophil staining Ly6G, for identification of T- and B lymphocytes antibodies against CD3 and CD19 were applied. Monocyte staining was performed with antibodies against Ly6C, CD11b and CD115 and the population was further divided into Ly6C^{high} and Ly6C^{low} subsets as inflammatory and non-inflammatory monocytes. For data analysis the Kaluza Analysis Software (version 2.1, Beckman Coulter) was used.

Cell surface expression of migratory factors of neutrophils (Ly6G⁺) and monocytes (CD11b⁺, Ly6G⁻, SSC^{low}) were determined using antibodies listed in [Supplementary Table 2](#). For gating strategies see [Supplementary Figures 1, 2](#).

Leptin treatment of leukocytes

After tail snip of non-conditioned *ad libitum* fed animals, 40 μ l blood samples were collected at ZT1 and incubated in serum free RPMI 1640 medium (supplemented with 50 units/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin) for 30 min at 37°C, with 5% CO₂ followed by a treatment with either 15 ng/ml leptin (Sigma-Aldrich) or vehicle for 4 hours. The applied leptin concentration (15 ng/ml) was the sum of the maximal concentration measured in the AL serum at ZT1 (10 ng/ml) and the difference between the TRF and the AL groups (5 ng/ml) at this time point. Following the treatment, expression of adhesion molecules was analyzed as described in the previous section.

Quantification of marginated and tissue leukocytes in the lungs

Mice were anesthetized by inhalation of isoflurane and anti-CD45-PECy7 (9 μ g/200 μ l) antibody was administered by retro-orbital injection. After 5 minutes, mice were sacrificed and after a left ventricular heart puncture the lung vasculature was perfused *via* the right ventricle with 15 ml PBS and lungs were removed. To count and label pulmonary leukocytes, small lung pieces were minced in 15 μ g/30 μ l anti-CD45.2-FITC, then were incubated in a digesting solution (1 ml/sample: 1% BSA, 1 mg DNase I and 0.1 mg trypsin inhibitor in PBS) for 10 minutes at 37°C. After that, collagenase XI (0.1 mg) was added and samples were incubated for an additional 20 minutes. To generate single cell suspensions, samples were passed through a 40 μ m filter and the absolute leukocyte counts were determined (CytoFLEX, Beckman Coulter). Cells were then labeled with live/dead-APC and anti-Ly6G-PE. Marginated (i.e. adhered to the vessel wall) (CD45-PECy7⁺, CD45.2-FITC⁺) and tissue (interstitial and alveolar) leukocytes (CD45-PECy7⁻, CD45.2-FITC⁺) were distinguished ([Supplementary Figure 3](#); [Figure 7A](#)). Macrophages were identified according to their high autofluorescence. For analysis of flow cytometric measurements (CytoFLEX, Beckman Coulter) the Kaluza Analysis Software (version 2.1, Beckman Coulter) was applied. For gating strategies see [Supplementary Figure 3](#).

Quantification of CXCL12, leptin and corticosterone

After flushing femur bone marrow with 1 ml cold PBS, cells were spun down for 3 min at 500 g at 4°C. Supernatants were

collected and stored at -80°C. CXCL12 levels were determined in the total bone marrow extracellular fluid using ELISA reagents (R&D Systems). Data were normalized to the total protein concentration measured in the supernatants using DC Protein Assay (Bio-Rad).

For serum preparation mice were anesthetized by inhalation of isoflurane and 1 ml blood was collected from the retro-orbital plexus. Samples were incubated at room temperature for 1 hour and centrifuged at 4°C and 1500 g for 10 minutes. Serum was collected and stored at -80°C. CXCL12, leptin and corticosterone levels were determined using ELISA reagents (R&D Systems).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statistica software version 13.5 (StatSoft). Statistical significance threshold was set at $p < 0.05$. Measurements were taken from distinct samples. Comparisons between two groups were carried out by two sample t-tests. For the analysis of parameters measured in the course of the day, one-way ANOVA and cosinor analysis were used to observe time effect. Group differences were tested by two-way ANOVA. For the analysis of IPGTT and arthritis development repeated measures ANOVA was performed, followed by Fisher's LSD *post-hoc* test. Cosinor analysis was run in Matlab R2021a (MathWorks).

Results

Time restricted feeding attenuates symptoms of autoinflammatory arthritis and affects time-of-the-day-specific alterations in systemic immune activity

Mice kept under 12 hour light/12 hour dark schedule and fed normal chow were conditioned to TRF by limiting the food intake to the first 10 hours of the dark (active) phase ([Figure 1A](#)). Adrenal gland weight is considered an indicator of the endocrine and nervous system responses to daily or periodic stressors (50). However, gland weights in the AL and TRF groups were similar ([Supplementary Figure 4A](#)). As an additional marker of stress, we determined serum corticosterone levels but no significant difference between the TRF and AL samples could be obtained at either ZT1 or ZT13 ([Supplementary Figure 4B](#)). These data suggest that TRF did not induce serious stress in the animals. To examine the effects of TRF on the general metabolic state, body weight, food intake and blood glucose levels were followed. There was no significant difference in the animals' body weight between the two groups either at the start or at the end of the feeding regimens ([Supplementary Figure 4C](#)), thus, similarly to previous findings (22), this short period of TRF did not significantly change body weight. TRF and AL mice

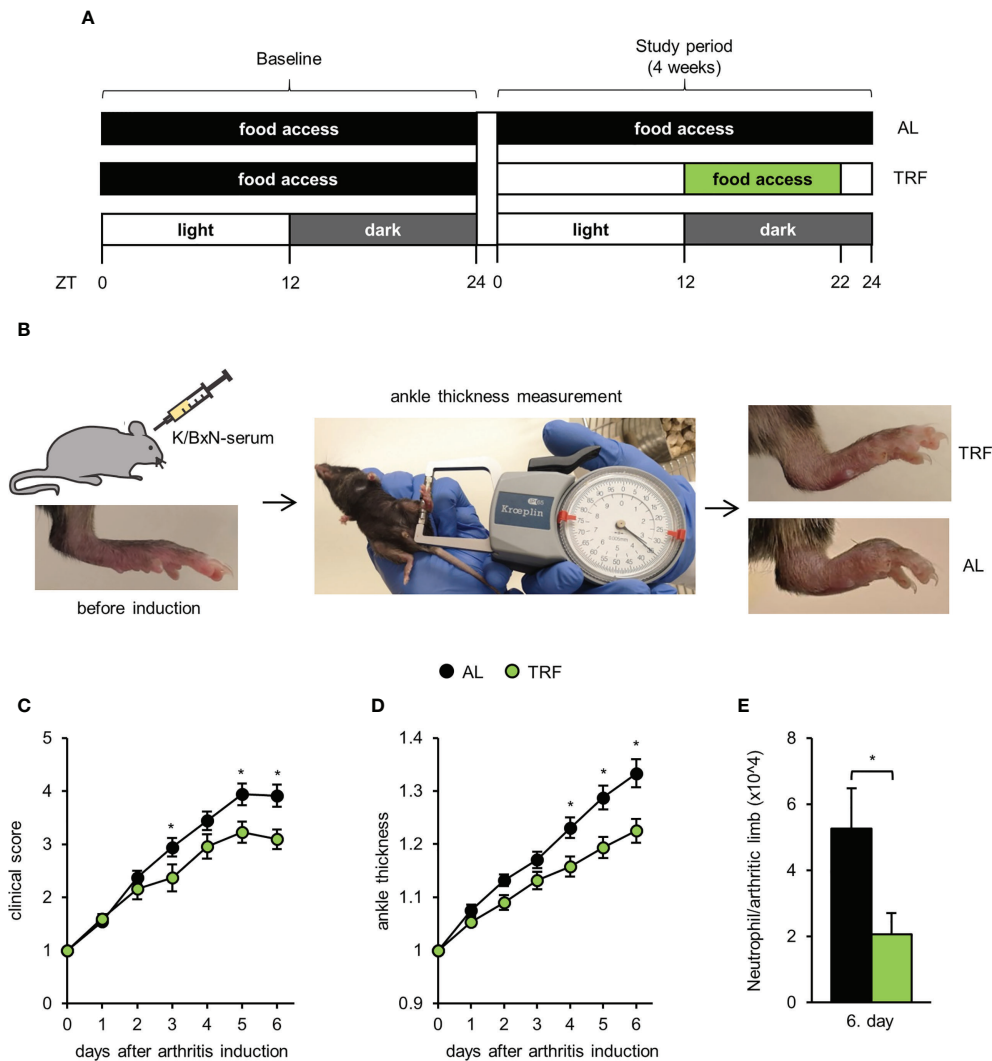


FIGURE 1

Time restricted feeding attenuates symptoms of autoinflammatory arthritis. (A) Schematic outline of the feeding regimens. (B) Short outline of the experimental setup and representative images of hind limbs of TRF and AL animals on the 6th day after arthritis induction. For further details, see Materials and Methods. Mice were injected with K/BxN arthritic serum i.p. on day 0. Arthritis development was followed by clinical scoring of the limbs (C) and ankle-thickness measurement (D). Data were normalized to values obtained on day 0 (mean \pm SEM, $n = 25$ (AL) and $n = 23$ (TRF), repeated measures ANOVA, clinical score: group effect $p = 0.053$, group*day effect $p = 0.0001$, ankle-thickness: group effect $p = 0.0056$, group*day effect $p = 0.0003$, *post-hoc* Fisher test, * $p < 0.05$) (E) Neutrophil counts in the arthritic hind limbs of mice (mean \pm SEM, $n = 7$ (AL), $n = 7$ (TRF) mice, two-sample t-test, * $p < 0.05$).

consumed similar amount of chow (Supplementary Figure 4D), indicating that there was no caloric restriction in the TRF group. We also followed the food intake of the AL fed animals separately during the light and dark phases of the day. Similarly to previous data (22), food intake was not limited to the dark phase, the animals consumed 24% of the chow during the light phase (Supplementary Figure 4E). At the end of the 4-week feeding regimen glucose tolerance was assessed. Blood glucose levels in the two experimental groups did not differ and were in the normal range at all tested time points (Supplementary Figure 4F). In summary, the applied feeding

program did not lead to changes in the basic metabolic parameters of the animals.

To investigate whether the applied TRF protocol can affect the development of an autoinflammatory disease, after 4 weeks of conditioning to TRF, K/BxN serum-transfer arthritis was induced. This method is considered an ideal model to study the effector mechanisms involved in the acute progression of human rheumatoid arthritis (for review see (51)). Body weight was controlled, as it can affect joint inflammation, but no significant difference between the two groups was found (Supplementary Figure 5). Arthritis severity was assessed

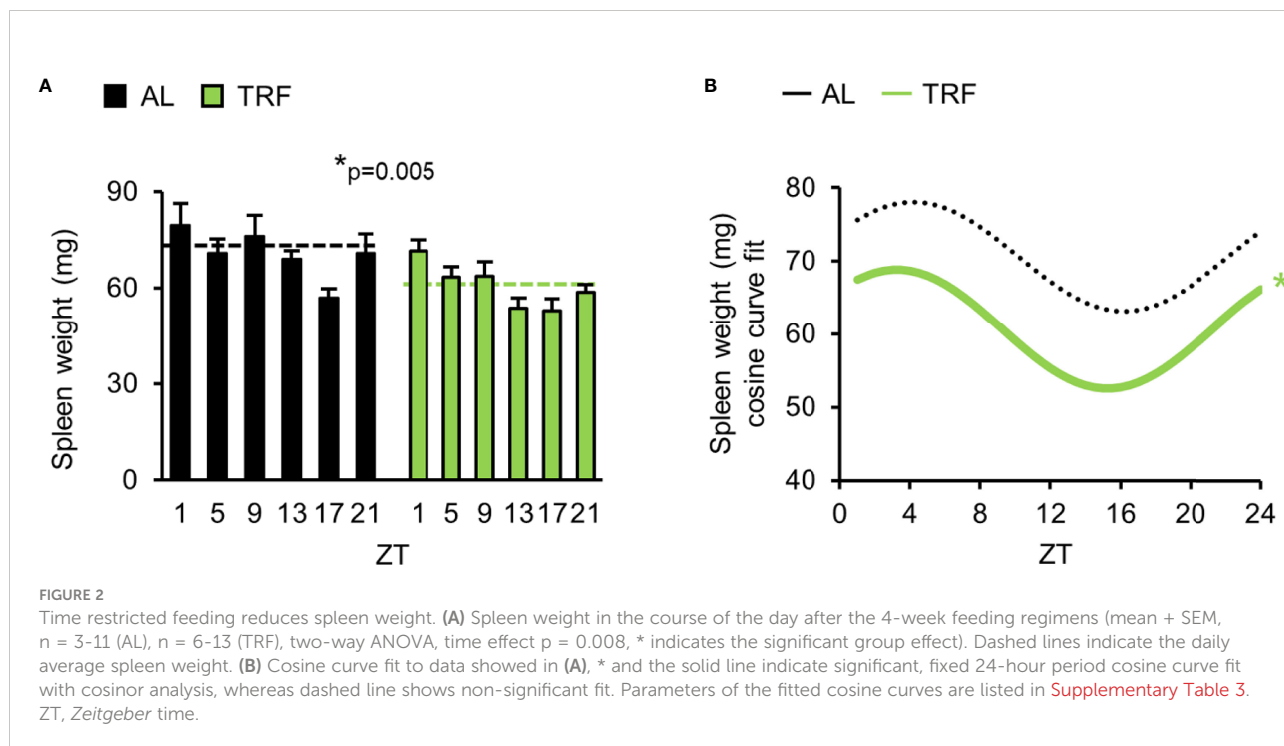
daily by clinical scoring of the paws and ankle thickness measurements (Figure 1B). From day 4 after arthritis induction, both indicators significantly differed in the two groups of mice (Figures 1C, D). On day 6, when inflammation severity was the most intense, in TRF animals the arthritis induced changes of clinical score and paw size displayed only 77% and 70%, respectively, compared to AL fed mice. We also investigated the cellular composition of the arthritic limbs on day 6 and found significantly reduced neutrophil count in the TRF animals (Figure 1E). As in this model of rheumatoid arthritis, neutrophils are the main effector cells, the lower neutrophil infiltration might significantly contribute to the attenuation of inflammation in the TRF group. These data suggest that TRF might be an effective tool in dampening the symptoms of rheumatoid arthritis.

As irregular food intake and the emerging metabolic disturbance often correlate with systemic inflammation, we hypothesized that a low-grade systemic inflammation may be triggered by AL feeding, leading to the development of a more severe form of arthritis. To search for differences between TRF and AL mice in the steady-state conditions of the immune system (corresponding to the state before arthritis induction), we measured spleen weight, which is considered an indicator of low-grade systemic inflammation (52, 53). TRF reduced the average spleen weight (Figure 2A), and resulted in significant rhythmicity of daily weight changes (Figure 2B; Supplementary Table 3), indicating that timely controlled food intake

strengthens rhythmic physiology of the spleen and lowers systemic inflammatory state.

TRF strengthens rhythmic functions and reduces inflammatory state of the visceral adipose tissue

Visceral adipose tissue is considered as a central hub integrating metabolic changes and inflammatory responses, best represented by increased production of proinflammatory cytokines in obesity and other metabolic disturbances (46, 54). Based on our above observations, we hypothesized that TRF alters both the rhythmic function and the adipokine production in the adipose tissue, which might influence systemic immune responses. Rhythmic operation of the visceral adipose tissue was investigated by following time-dependent changes in the expression of the core oscillator gene *per2*, one of the key components of the secondary feedback loop *reverbα*, and the fat-derived hormone *leptin* (55). Under TRF condition amplitude of the time-dependent changes of both *per2* and *leptin* were increased, whilst rhythmic expression of *reverbα* was phase shifted (Figures 3A-D; Supplementary Table 4), showing that TRF affected the entrainment of visceral adipose tissue. In addition, average *leptin* expression was ca. 30% lower in the TRF than in the AL group, suggesting that TRF has profound effects on the homeostasis of adipose tissue. Similarly to the gene expression levels – TRF reduced the average



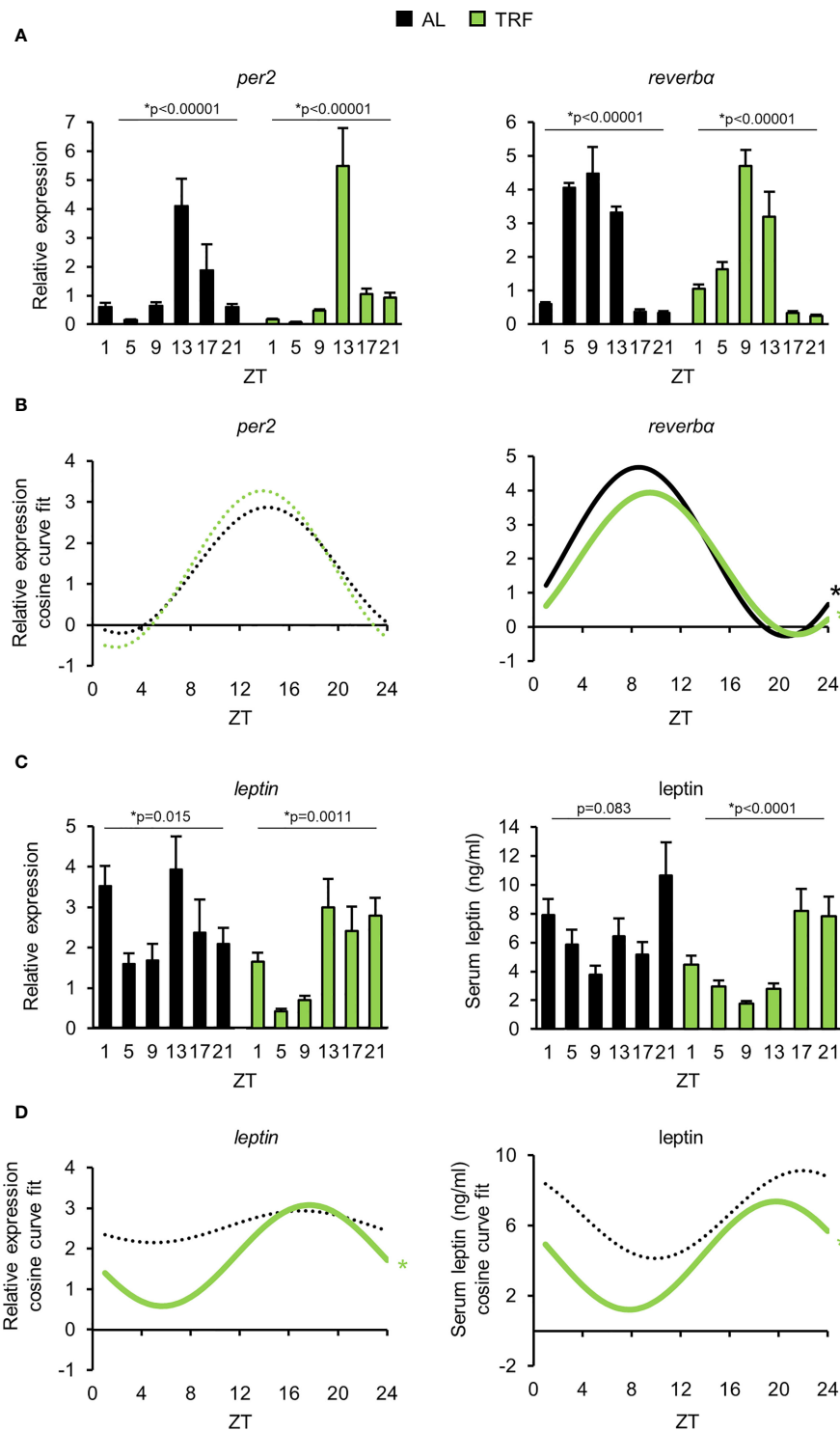


FIGURE 3

Time restricted feeding entrains the peripheral clock of visceral adipose tissue. (A) Relative mRNA expression of *per2* and *reverba* in the course of the day in visceral adipose tissue (mean + SEM, n = 3-9 (AL), n = 6-11 (TRF)), one-way ANOVA, * indicates significant time effect. (B) Cosine curve fit to relative expression data showed in (A). (C) Relative mRNA expression of *leptin* (mean + SEM, n = 3-9 (AL), n = 6-11 (TRF)) and serum leptin levels in the course of the day (mean + SEM, n = 3-7 (AL), n = 3-8 (TRF)), one-way ANOVA, * indicates significant time effect. (D) Cosine curve fit to data showed in (C). In mRNA expression measurements *Rplp0* was used as reference gene. In (B, D) * and solid lines indicate significant, fixed 24-hour period cosine curve fit with cosinor analysis, whereas dashed lines show non-significant fit. Parameters of the fitted cosine curves are listed in [Supplementary Table 4](#). ZT, Zeitgeber time.

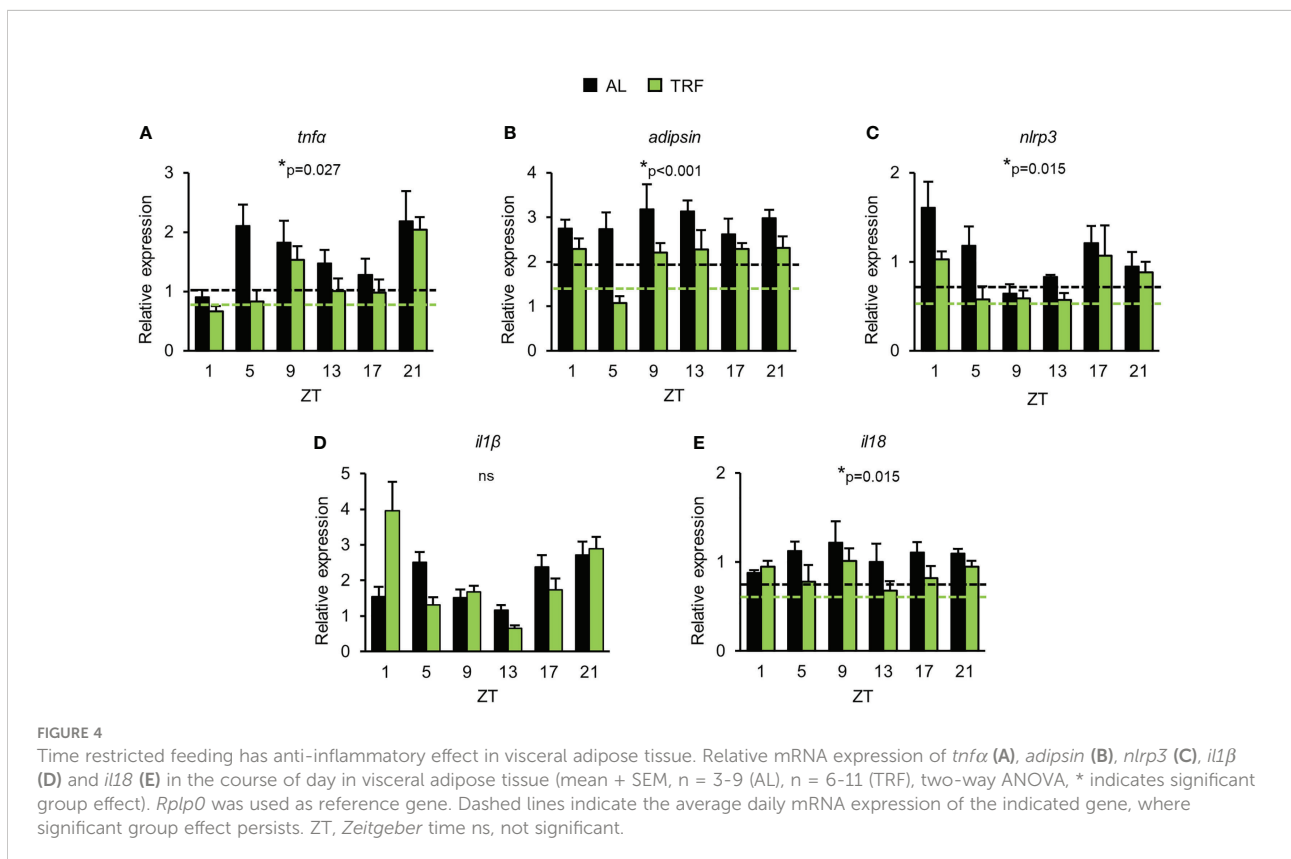
concentration and induced rhythmic changes of serum leptin as well (Figures 3C, D; Supplementary Table 4). This finding further supports the entraining effect of TRF on the metabolic rhythm of the adipose tissue.

As TRF alters the clock function of the adipose tissue and the circadian clock can directly control the activity of NF κ B (9), we followed the daily expression pattern of the NF κ B-dependent proinflammatory cytokine *tnf α* . Although *tnf α* expression did not display circadian rhythm, significant reduction in *tnf α* levels was observed in the TRF group compared to AL fed animals (Figure 4A). Adipsin (complement factor D) promotes lipid accumulation and differentiation of adipocytes and also activates the alternative pathway of the complement cascade, leading to the elevation of anaphylatoxin C3a production (56). As shown in Figure 4B, *adipsin* expression was lower in the TRF group than in the AL group. Literature data shows that the amount of the inflammasome regulator NLRP3 reflects the activity of NF κ B and is sensitive to metabolic changes, like the concentration of LDL, cholesterol, fatty acids or ROS (56). Following stimulation, NLRP3 recruits caspase-1 to the inflammasome complex, which in turn cleaves and thereby activates the inflammatory cytokines IL1 β and IL18. Although the expression of *il1 β* did not differ between the groups, both *nlrp3* and *il18* levels were decreased in TRF mice compared to AL fed animals (Figures 4C-E). In summary, our data indicate that despite the relatively short

period of conditioning, TRF has a significant impact on the rhythm of metabolism and reduces inflammatory potential of the visceral adipose tissue.

TRF affects time-dependent variations of circulatory leukocytes' count

Leukocyte count in peripheral blood is controlled by the circadian clock. Number of the circulating cells depends on both leukocyte margination to the vessel wall and migration into the tissues and releasing from and homing back of the cells to the bone marrow, *i.e.* processes that are influenced by the circadian clock (27, 29, 57, 58). In line with this, we examined time-dependent changes of leukocyte counts in the peripheral blood and found larger difference between the minimal and maximal values in the TRF animals compared to the AL ones (Figure 5A; Supplementary Table 5; Supplementary Figure 6). Additionally, analysis of leukocyte subpopulations indicated that TRF had entraining effect on the rhythm of the cell numbers, with the most intense amplitude increase in monocyte and neutrophil counts (56% and 93% elevation, respectively) (Figures 5B-F; Supplementary Table 5). Further examination of the monocyte population revealed that the increased alteration of the Ly6C^{high} inflammatory monocyte counts was the main reason for the



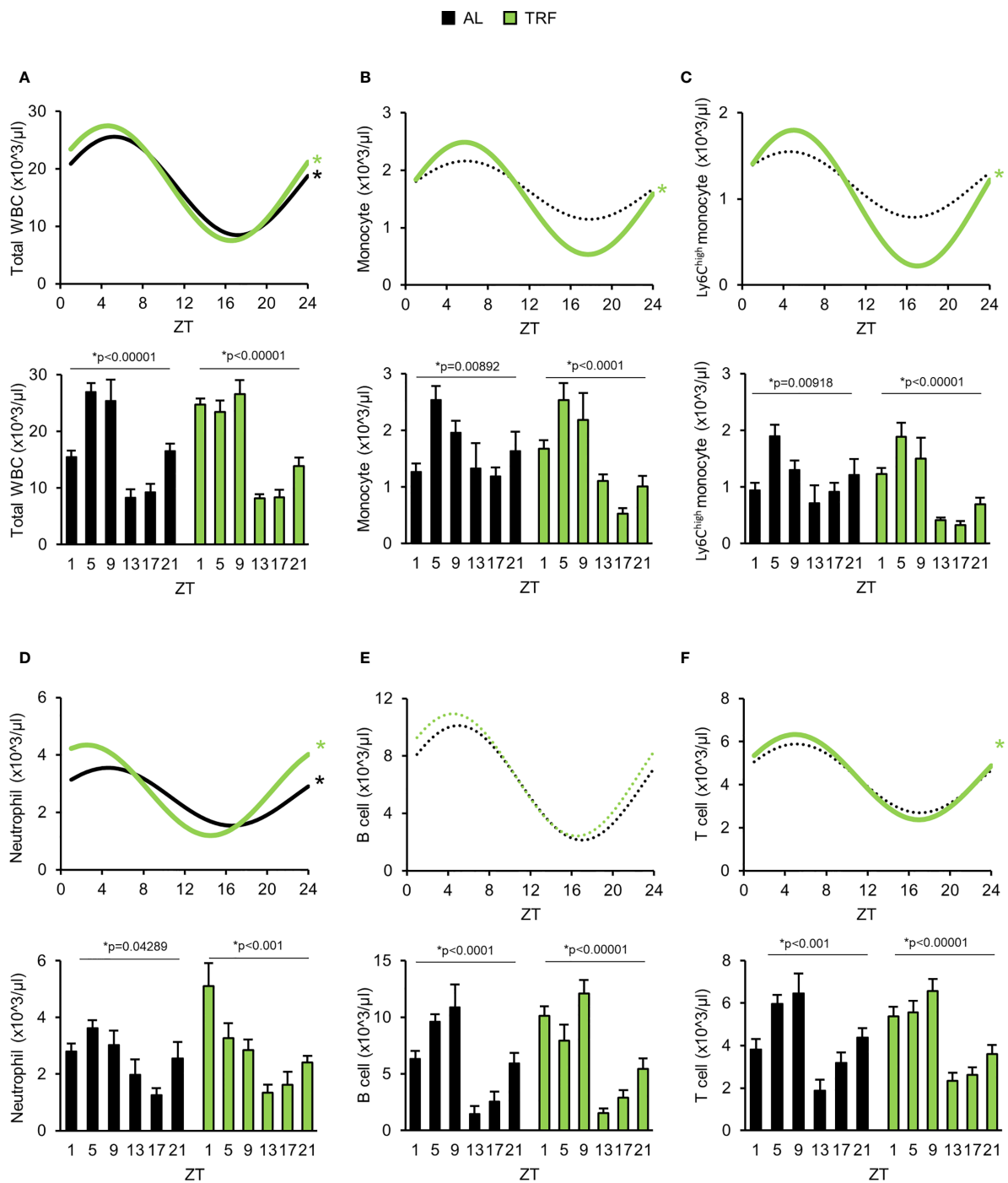


FIGURE 5

Time restricted feeding supports oscillation of the peripheral leukocyte counts. (A–F) Lower panels show peripheral leukocyte counts in the course of the day. Upper panels indicate cosine curve fit to data showed in lower panels. Total WBC (A), monocyte (B), Ly6C^{high} monocyte (C), neutrophil (D), B-lymphocyte (E) and T-lymphocyte (F) counts. Data information: In lower panels (A–F) data are presented as mean + SEM (n = 3–9 (AL) and n = 6–11 (TRF), one-way ANOVA, * indicates significant time effect). In upper panels * and solid lines indicate significant, fixed 24-hour period cosine curve fit with cosinor analysis, whereas dashed lines show non-significant fit. Parameters of the fitted cosine curves are listed in [Supplementary Table 5](#). ZT, Zeitgeber time.

pronounced rhythm in the total monocyte counts (Figure 5C; Supplementary Table 5). In summary, our results raise the possibility that TRF has an impact on leukocyte trafficking between circulation and different tissues.

TRF modulates the expression of adhesion molecules and cytokine receptors of peripheral neutrophils and monocytes and decreases the tissue leukocyte pool of the lung

Bone marrow functions – including coordination of homing and release of hematopoietic stem cells and neutrophils – is rhythmic (57, 59), thus an altered bone marrow activity could account for the pronounced leukocyte rhythm seen in the TRF group. Operation of the circadian clock in the bone marrow was investigated by following the expression *per2* and *reverb α* during a 24-hour period. Similarly to our observation in the visceral adipose tissue, in TRF mice the amplitude of *per2* RNA changes was increased, whereas rhythmic expression of *reverb α* was phase delayed (Supplementary Figures 7A, B; Supplementary Table 6), showing that TRF enhances circadian clock function of the bone marrow.

CXCL12 produced in the bone marrow is a main regulator of the time-of-day-dependent homing and release of neutrophils. Both its secretion and the expression of its receptor, CXCR4 are rhythmic (57). As recently reported, leptin can influence the production of CXCL12 *via* activation of LepR+ stromal cells of the bone marrow (60). As leptin showed rhythmic changes in the TRF animals, we investigated the expression of CXCL12 in the course of the day. Although clear daily variations were observed in the expression of CXCL12, no significant difference was found at either the RNA or the protein levels between the TRF and AL groups (Supplementary Figures 7C, D; Supplementary Table 7). In addition, at ZT1 and ZT13 serum levels of CXCL12 were also similar (Supplementary Figure 7E).

Low-grade inflammation or the activation of the NLRP3 inflammasome pathway in the bone marrow are also known to regulate the trafficking of cells with hematopoietic origin (61). Therefore, time-dependent expression of *tnf α* , *nlrp3*, *il1 β* , *il18* RNA was investigated. In case of all RNA levels, significant time effect (two-way ANOVA, $p < 0.05$) and daily variations were observed (Supplementary Figure 7F; Supplementary Table 7), however, with no differences between the TRF and AL groups (Supplementary Figure 7F). In summary, our data suggest that the altered rhythm of blood neutrophil count is unlikely originated from differences in the expression of bone marrow derived factors.

Migration of white blood cells to tissues shows circadian rhythm which is dependent on the daily oscillation of leukocyte activating cytokines and time-dependent changes in endothelial functions (58). Modified expression of adhesion molecules and

cytokine receptors on both neutrophils and monocytes and altered migration ability of the cells could account for rhythm changes in the leukocyte counts and could also mark the inflammatory potential of the cells. Therefore, the cell surface levels of molecules involved in selectin signaling (CD62L, CD162), integrins (CD11a, CD11b, CD29, CD49d), and cytokine receptors (CXCR2, CXCR4, TNFR1) of neutrophils and monocytes were compared between the TRF and the AL groups at the beginning of the inactive phase (ZT1) and at the beginning of the active phase (ZT13) (Figure 6; Supplementary Figures 8, 9). In neutrophils of the TRF group significantly lower surface levels of CD62L, CD49d and TNFR1 were detected at both time points compared to the cells of the AL group. In addition, CXCR4 showed reduced expression in TRF neutrophils, but the difference reached the significance level only at ZT1 (Figure 6A; Supplementary Figures 8A, 9A). In monocytes, significant reduction in the cell surface expression of CD29, CD49d and CXCR4 was measured at ZT1 (Figure 6B; Supplementary Figures 8B, 9B).

According to literature data, leptin activates various immune functions, including the adhesion and migration ability of leukocytes [for review see (62)]. To test whether elevated leptin levels in the AL group could contribute to the increased expression of cell surface structures in neutrophils and monocytes, we treated blood samples with leptin and analyzed the expression of adhesion molecules that were affected by TRF in the previous experiment. Leptin applied in a concentration comparable to maximal serum levels in the AL samples induced the expression of CD49d on both neutrophils and monocytes and the expression of CXCR4 on monocytes (Supplementary Figure 10). These results suggest, that leptin could mediate, at least partially, the effect of adipose tissue on leukocyte responsiveness in a feeding-dependent manner.

The obtained differences between the AL and TRF groups in the expression of adhesion molecules and cytokine receptors raise the possibility that TRF impacts both the margination (adherence to the vessel wall) and tissue accumulation of the cells. We used a method that allows distinguishing between marginated and tissue leukocytes in the lung, and compared the leukocyte pools between the AL and the TRF groups at ZT1 and ZT13 (Figure 7A). As shown in Figure 7B, the total leukocyte count in the lung halved at ZT1 in the TRF fed animals, suggesting a remarkable effect of TRF on leukocyte recruitment. In the TRF animals the marginated leukocyte pool was significantly reduced at ZT1, along with a markedly decreased neutrophil count compared to the AL fed mice (Figure 7C). Also, in case of tissue leukocytes lower counts were detected in the TRF group at ZT1, which could be linked to the reduced macrophage population (Figure 7D).

Based on the differences in the spleen weight we compared the abundance of spleen neutrophils in the samples of AL and TRF animals (Supplementary Figure 11). The higher neutrophil ratio obtained in the AL samples at ZT13 might also reflect an

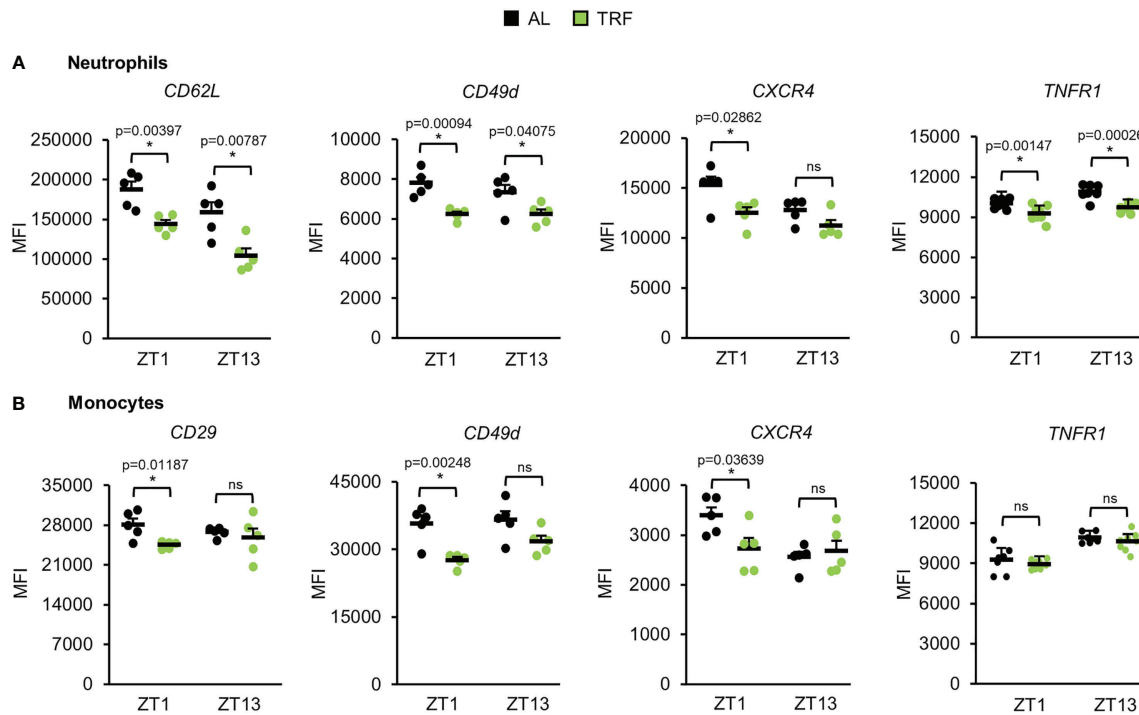


FIGURE 6

Time restricted feeding modulates the expression of adhesion molecules and cytokine receptors of peripheral neutrophils and monocytes. Selectin (CD62L), integrin (CD29, CD49d) and cytokine receptor (CXCR4, TNFR1) expression of neutrophils (A) and monocytes (B) at ZT1 and ZT13 (mean + SEM, $n = 5$ (AL), $n = 5$ (TRF), two-sample t-test, * $p < 0.05$). ZT, Zeitgeber time. Histograms of fluorescence intensities are shown in [Supplementary Figure 9](#) ns, not significant.

enhanced migration ability of the AL cells compared to the TRF ones.

In summary, the lower expression of adhesion molecules and chemokine receptors in leukocytes of the TRF group correlates with a decreased tissue leukocyte pool and increased number of circulating neutrophils, which could imply a lower inflammatory potential of tissues.

Discussion

Temporal restriction of food intake to the active phase of behaviour was reported to enhance metabolic fitness in both animal and human studies, and was found to be beneficial in the prevention and treatment of obesity and associated metabolic diseases (63). In mice, detailed analysis of metabolic parameters, liver functions in particular, revealed that TRF strengthens the oscillation of the peripheral tissue clock and thereby the rhythmic expression of metabolic regulators which might lead to a better and thus more efficient timely control of metabolism (22). Although it is well documented that metabolism and immune functions interact, the mechanistic connections between the two systems are only partially understood. It is

especially unexplored whether metabolic rhythm and its modifications can influence immune cells and complex immune responses. In this study we show that even a 4-week period with temporal regulation of feeding significantly affects immune functions at both the systemic and cellular level. Compared to animals with *ad libitum* food availability, in mice subjected to TRF in the active phase, a less severe form of autoimmune arthritis was developed and substantial differences in both the circulating and the tissue pool of leukocytes were detected. Time-of-the-day-dependent changes in neutrophil abundance in the blood are dependent on rhythmic alterations of cell trafficking to and from the bone marrow. During the inactive (light) phase homing of aged neutrophils back to the bone marrow becomes dominant and leads to a decrease of peripheral cell count, whereas later in the active phase egress of young cells from the bone marrow results in elevation of the peripheral neutrophil number (57). TRF increased the amplitude of time-dependent changes of clock genes in the bone marrow, and the enhanced rhythmic function of bone marrow cells might be reflected by a higher amplitude of leukocyte homing and egress. Although expression of bone marrow derived factors was similar in TRF and AL mice, the reduced expression of CXCR4 in TRF neutrophils compared to

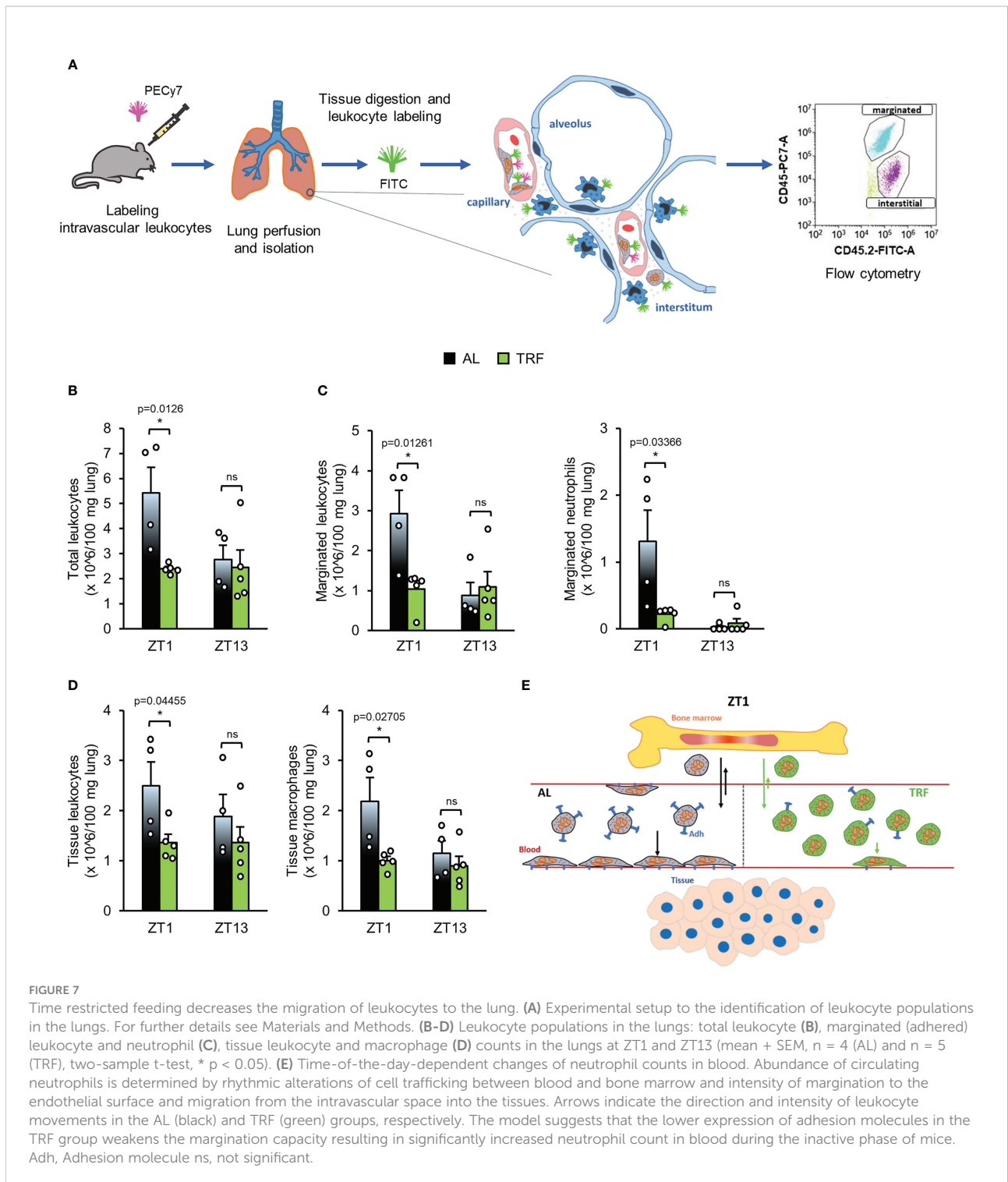


FIGURE 7

Time restricted feeding decreases the migration of leukocytes to the lung. (A) Experimental setup to the identification of leukocyte populations in the lungs. For further details see Materials and Methods. (B–D) Leukocyte populations in the lungs: total leukocyte (B), margined (adhered) leukocyte and neutrophil (C), tissue leukocyte and macrophage (D) counts in the lungs at ZT1 and ZT13 (mean + SEM, n = 4 (AL) and n = 5 (TRF), two-sample t-test, * p < 0.05). (E) Time-of-the-day-dependent changes of neutrophil counts in blood. Abundance of circulating neutrophils is determined by rhythmic alterations of cell trafficking between blood and bone marrow and intensity of margination to the endothelial surface and migration from the intravascular space into the tissues. Arrows indicate the direction and intensity of leukocyte movements in the AL (black) and TRF (green) groups, respectively. The model suggests that the lower expression of adhesion molecules in the TRF group weakens the margination capacity resulting in significantly increased neutrophil count in blood during the inactive phase of mice. Adh, Adhesion molecule ns, not significant.

AL cells could result in higher neutrophil count in the circulation at ZT1. The decreased expression of adhesion molecules might lower the level of margined and tissue resident leukocytes as well and thus contribute to the elevation of neutrophil count in

the blood and the lower accumulation of the cells in the arthritic limb of the TRF animals at the beginning of the light (inactive) phase (Figure 7E). However, margination and migration of leukocytes is also dependent on the expression of endothelial

structures interacting with leukocyte receptors. Importantly, endothelial ICAM-1 and VCAM-1 levels display daily oscillation which results in enhanced tissue accumulation of leukocytes during the active (dark) phase (58). Whether TRF affects expression of these endothelial structures, needs further investigations.

Neutrophil infiltration follows a tight circadian pattern (64), which contributes to a balanced immune homeostasis of the tissue but might influence pathological reactions as well. During infections, augmented neutrophilia and disturbed rhythmicity of the cell trafficking could lead to excessive pulmonary damage (65). Thus, our results raise the possibility that TRF could have protective effect and may prevent overactivation of the immune cells. In addition, the increased macrophage population detected in the lung tissue may also contribute to an elevation of the inflammatory potential in the AL group. Enhanced tissue accumulation of both monocytes and neutrophils is often associated with a more severe prognosis of diseases with excessive tissue damage, such as autoimmune arthritis, acute pancreatitis or the SARS-CoV2 infection of the lung (66). It is important to note, that the right timing of immune activation is crucial not only in the prevention of tissue damage and autoinflammatory processes, but also in the effective elimination of pathogens. In line with this, a recent study showed that night-restricted feeding can enhance cytokine production in response to bacterial endotoxin treatment (67).

Although basic metabolic indicators did not differ between TRF and AL mice, rhythm and function of visceral adipocytes were substantially affected by temporal variations of food intake. Amplitude of the time-dependent changes in the expression of both leptin and core clock components was increased by TRF and the average leptin level throughout the day was markedly reduced in both the adipose tissue and the serum. In addition, TRF attenuated inflammatory activity of adipose tissue, as reflected by the reduction of the expression of the proinflammatory cytokines *tnf α* and *il18*, *adipsin* and the inflammasome constituent *nlrp3*. We propose that visceral adipose tissue can act both as a sensitive indicator of metabolism and as a mediator between TRF-induced metabolic changes and immune system responsiveness. Adipsin was recently reported to play pivotal role in the development of K/BxN serum-induced arthritis (68). Complement activation, particularly the alternative complement pathway is central in the pathology of the effector phase of rheumatoid arthritis (51) and adipsin is an important contributor of this pathway by activating the C3 convertase. Complement activation may promote neutrophil infiltration into the joint where activated neutrophils further trigger the complement pathway, leading to an amplification of the inflammatory process (68). Leptin was also considered to play critical role in the pathology of human rheumatoid arthritis (69). As a potent modulator of multiple levels of immune responses, it

might affect both innate and adaptive immune processes. It was described as an effective stimulator of almost all types of immune cells, including neutrophils and monocytes which both showed altered time-dependent abundance under TRF conditions. In addition, our results indicate that leptin increases the expression of adhesion molecules on both cell types. Leptin is also considered a survival signal of neutrophils, as it delays apoptosis of mature neutrophils (70). Furthermore, exogenous leptin induces neutrophil migration through TNF α and CXCL1 dependent mechanisms (71). Leptin is a sensitive indicator of the nutrition state and short-term treatment of starved animals with physiological amounts of leptin was found to increase spleen weight (72). The detected changes in the leptin expression and serum leptin levels in response to TRF could be responsible for the reduced spleen mass under our experimental conditions as well. Overall, higher leptin levels produced by the adipose tissue of AL fed mice as compared to the TRF group may contribute to the enhanced migration capacity and reactivity of neutrophils in our experiments. In addition, leptin can also be produced by bone marrow adipocytes and if reaching high local concentration, it stimulates myeloid differentiation which can promote leukocytosis often found in obesity (73). Other indicators of the inflammatory state - such as activation of NLRP3 and elevation of pro-inflammatory cytokine levels in the adipose tissue and higher expression of the cytokine receptor TNFR1 in neutrophils - might also contribute to the enhanced inflammatory potential observed in AL fed mice (74). In addition, NLRP3 was found to be a stimulating factor of tissue infiltration of myeloid cells (69, 75).

Finally, it is important to note, that in this study we used a moderate form of TRF with only 14 hours fasting phase and for a relatively short period (4 weeks). This feeding regimen corresponds to the feeding habit of the animals in nature and it did not cause serious stress. Therefore, this feeding schedule can serve as a good experimental model for a balanced and attainable eating pattern which might contribute to the prevention and therapy of human inflammatory processes and metabolic diseases.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/[Supplementary Materials](#). Further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by Animal Experimentation Review Board of the Semmelweis University

and the Government Office for Pest County (Hungary) (Ethical approval: PE/EA/1967-2/2017).

Author contributions

KE and KK designed and supervised the project. KE and ÁS designed the experiments. KE, ÁS, ZB, BK, ÁK performed the experiments and analyzed the data. KE, ÁS and KK interpreted the results and wrote the manuscript. AM gave technical and financial support to the revised version of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by the National Research, Development and Innovation Office – NKFIH (K115953 and K132393), the Ministry of Innovation and Technology of Hungary (National Research, Development and Innovation Fund, financed under the projects TKP2021-EGA-25 and TKP2021-EGA-24), inhouse grants of the Semmelweis University (STIA-2017 to KK and STIA-2018 to KE) and by the ÚNKP-20-4-II-SE-23 New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology from the source of the National Research, Development and Innovation Fund to KE. KE is a Merit Scholar of the Semmelweis University.

References

- Yerushalmi S, Green RM. Evidence for the adaptive significance of circadian rhythms. *Ecol Lett* (2009) 12(9):970–81. doi: 10.1111/j.1461-0248.2009.01343.x
- Golombek DA, Rosenstein RE. Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev* (2010) 90(3):1063–102. doi: 10.1152/physrev.00009.2009
- Xie Y, Tang Q, Chen G, Xie M, Yu S, Zhao J, et al. New insights into the circadian rhythm and its related diseases. *Front Physiol* (2019) 10:682. doi: 10.3389/fphys.2019.00682
- Ella K, Mocsai A, Kaldi K. Circadian regulation of neutrophils: Control by a cell-autonomous clock or systemic factors? *Eur J Clin Invest* (2018) 48 Suppl 2: e12965. doi: 10.1111/eci.12965
- Honma S. The mammalian circadian system: a hierarchical multi-oscillator structure for generating circadian rhythm. *J Physiol Sci* (2018) 68(3):207–19. doi: 10.1007/s12576-018-0597-5
- Manoogian ENC, Panda S. Circadian rhythms, time-restricted feeding, and healthy aging. *Ageing Res Rev* (2017) 39:59–67. doi: 10.1016/j.arr.2016.12.006
- Mure LS, Le HD, Benegiamo G, Chang MW, Rios L, Jillani N, et al. Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. *Science* (2018) 359(6381):eaa0318. doi: 10.1126/science.aa0318
- Baron KG, Reid KJ. Circadian misalignment and health. *Int Rev Psychiatry* (2014) 26(2):139–54. doi: 10.3109/09540261.2014.911149
- Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P, O'Neill LA. Circadian clock proteins and immunity. *Immunity* (2014) 40(2):178–86. doi: 10.1016/j.immuni.2014.02.002
- Koopman ADM, Rauh SP, van 't Riet E, Groeneveld L, van der Heijden AA, Elders PJ, et al. The association between social jetlag, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus in the general population: The new hoorn study. *J Biol Rhythms* (2017) 32(4):359–68. doi: 10.1177/074873041713572

Acknowledgments

We thank Rita Krisztina Nagy and Zalán Lumniczky for the excellent technical assistance. We are especially grateful to Bence Erdős for technical support.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.924541/full#supplementary-material>

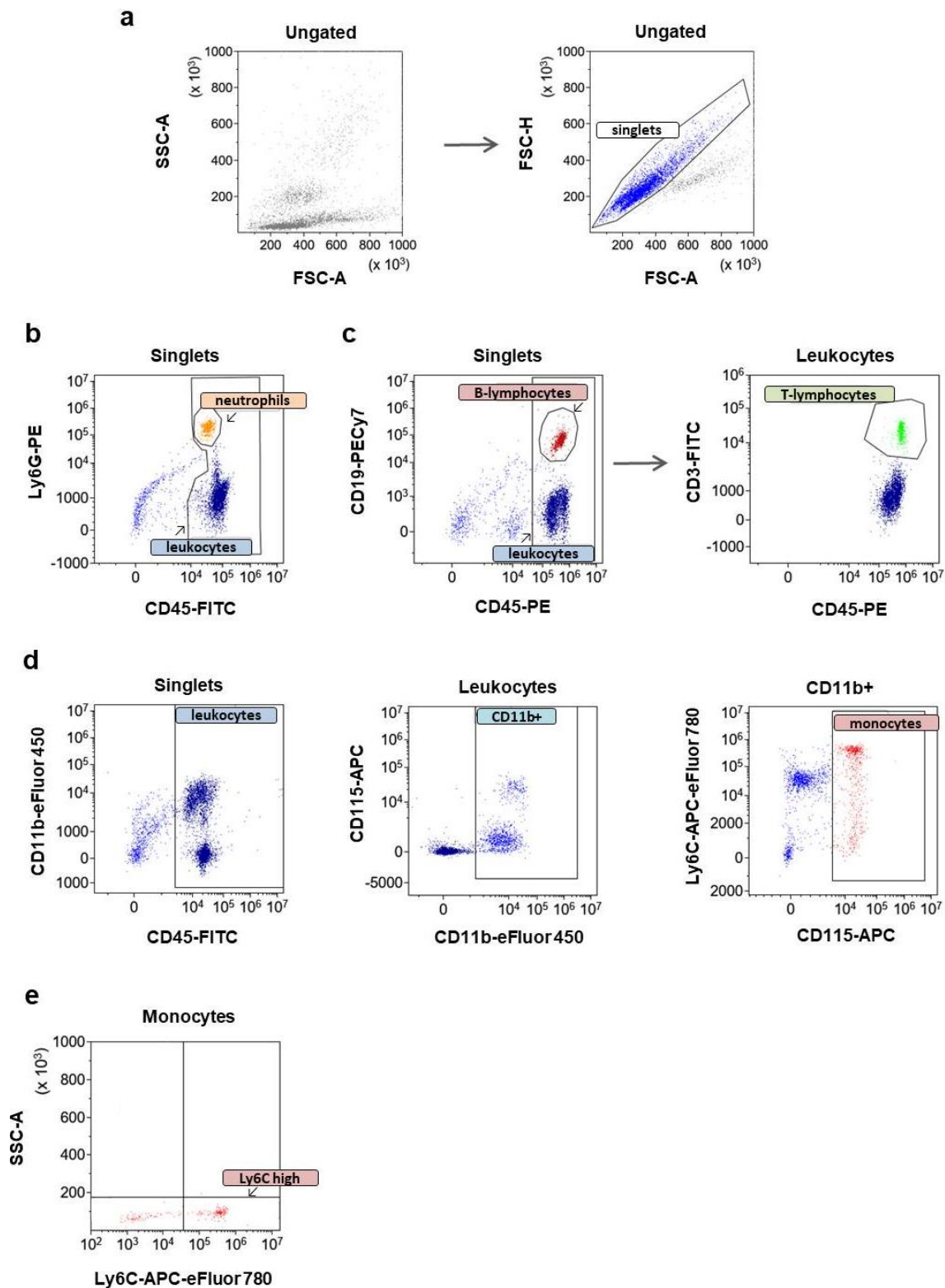
- Parsons MJ, Moffitt TE, Gregory AM, Goldman-Mellor S, Nolan PM, Poulton R, et al. Social jetlag, obesity and metabolic disorder: Investigation in a cohort study. *Int J Obes (Lond)* (2015) 39(5):842–8. doi: 10.1038/ijo.2014.201
- Roenneberg T, Allebrandt KV, Mellow M, Vetter C. Social jetlag and obesity. *Curr Biol* (2012) 22(10):939–43. doi: 10.1016/j.cub.2012.03.038
- Rutters F, Lemmens SG, Adam TC, Bremmer MA, Elders PJ, Nijpels G, et al. Is social jetlag associated with an adverse endocrine, behavioral, and cardiovascular risk profile? *J Biol Rhythms* (2014) 29(5):377–83. doi: 10.1177/0748730414550199
- Wong PM, Hasler BP, Kamarck TW, Muldoon MF, Manuck SB. Social jetlag, chronotype, and cardiometabolic risk. *J Clin Endocrinol Metab* (2015) 100(12):4612–20. doi: 10.1210/jc.2015-2923
- Rivera AS, Akanbi M, O'Dwyer LC, McHugh M. Shift work and long work hours and their association with chronic health conditions: A systematic review of systematic reviews with meta-analyses. *PLoS One* (2020) 15(4):e0231037. doi: 10.1371/journal.pone.0231037
- Wittmann M, Dinich J, Mellow M, Roenneberg T. Social jetlag: misalignment of biological and social time. *Chronobiol Int* (2006) 23(1-2):497–509. doi: 10.1080/07420520500545979
- Marcheva B, Ramsey KM, Peek CB, Affinati A, Maury E, Bass J. Circadian clocks and metabolism. *Handb Exp Pharmacol* (2013) 217:127–55. doi: 10.1007/978-3-642-25950-6_6
- Panda S. Circadian physiology of metabolism. *Science* (2016) 354(6315):1008–15. doi: 10.1126/science.aah4967
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* (2000) 14(23):2950–61. doi: 10.1101/gad.183500

20. Pickel L, Sung HK. Feeding rhythms and the circadian regulation of metabolism. *Front Nutr* (2020) 7:39. doi: 10.3389/fnut.2020.00039
21. Ruddick-Collins LC, Morgan PJ, Johnstone AM. Mealtime: A circadian disruptor and determinant of energy balance? *J Neuroendocrinol* (2020) 32(7): e12886. doi: 10.1111/jne.12886
22. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab* (2012) 15(6):848–60. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.019
23. Haus EL, Smolensky MH. Shift work and cancer risk: Potential mechanistic roles of circadian disruption, light at night, and sleep deprivation. *Sleep Med Rev* (2013) 17(4):273–84. doi: 10.1016/j.smrv.2012.08.003
24. Puttonen S, Harma M, Hublin C. Shift work and cardiovascular disease - pathways from circadian stress to morbidity. *Scand J Work Environ Health* (2010) 36(2):96–108. doi: 10.5271/sjweh.2894
25. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Ma S. Obesity and metabolic syndrome: Association with chronodisruption, sleep deprivation, and melatonin suppression. *Ann Med* (2012) 44(6):564–77. doi: 10.3109/07853890.2011.586365
26. Scheiermann C, Kunisaki Y, Frenette PS. Circadian control of the immune system. *Nat Rev Immunol* (2013) 13(3):190–8. doi: 10.1038/nri3386
27. Druz D, de Juan A, Scheiermann C. Circadian rhythms in leukocyte trafficking. *Semin Immunopathol* (2014) 36(2):149–62. doi: 10.1007/s00281-013-0414-4
28. Ella K, Csepanyi-Komi R, Kaldi K. Circadian regulation of human peripheral neutrophils. *Brain Behav Immun* (2016) 57:209–21. doi: 10.1016/j.bbi.2016.04.016
29. Pick R, He W, Chen CS, Scheiermann C. Time-of-Day-Dependent trafficking and function of leukocyte subsets. *Trends Immunol* (2019) 40(6):524–37. doi: 10.1016/j.it.2019.03.010
30. Scheiermann C, Gibbs J, Ince L, Loudon A. Clocking in to immunity. *Nat Rev Immunol* (2018) 18(7):423–37. doi: 10.1038/s41577-018-0008-4
31. Borrmann H, McKeating JA, Zhuang X. The circadian clock and viral infections. *J Biol Rhythms* (2021) 36(1):9–22. doi: 10.1177/0748730420967768
32. Diallo AB, Coiffard B, Leone M, Mezouar S, Mege JL. For whom the clock ticks: Clinical chronobiology for infectious diseases. *Front Immunol* (2020) 11:1457. doi: 10.3389/fimmu.2020.01457
33. Edgar RS, Stangherlin A, Nagy AD, Nicoll MP, Efstathiou S, O'Neill JS, et al. Cell autonomous regulation of herpes and influenza virus infection by the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2016) 113(36):10085–90. doi: 10.1073/pnas.1601895113
34. Durrington HJ, Farrow SN, Loudon AS, Ray DW. The circadian clock and asthma. *Thorax* (2014) 69(1):90–2. doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-203482
35. Gibbs JE, Ray DW. The role of the circadian clock in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* (2013) 15(1):205. doi: 10.1186/ar4146
36. Hand LE, Hopwood TW, Dickson SH, Walker AL, Loudon AS, Ray DW, et al. The circadian clock regulates inflammatory arthritis. *FASEB J* (2016) 30(11):3759–70. doi: 10.1096/fj.201600353R
37. Krakowiak K, Durrington HJ. The role of the body clock in asthma and COPD: Implication for treatment. *Pulm Ther* (2018) 4(1):29–43. doi: 10.1007/s41030-018-0058-6
38. Nakao A, Nakamura Y, Shibata S. The circadian clock functions as a potent regulator of allergic reaction. *Allergy* (2015) 70(5):467–73. doi: 10.1111/all.12596
39. Reinberg A, Gervais P, Levi F, Smolensky M, Del Cerro L, Ugolini C. Circadian and circannual rhythms of allergic rhinitis: an epidemiologic study involving chronobiologic methods. *J Allergy Clin Immunol* (1988) 81(1):51–62. doi: 10.1016/0091-6749(88)90220-5
40. De Rosa V, Galgani M, Santopaolo M, Colamatteo A, Laccetti R, Matarese G. Nutritional control of immunity: Balancing the metabolic requirements with an appropriate immune function. *Semin Immunol* (2015) 27(5):300–9. doi: 10.1016/j.smim.2015.10.001
41. Ganesan K, Chawla A. Metabolic regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* (2014) 32:609–34. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120236
42. Ferrante AW Jr. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med* (2007) 262(4):408–14. doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01852.x
43. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* (2006) 444(7121):860–7. doi: 10.1038/nature05485
44. Roep BO, Thomaidou S, van Tienhoven R, Zaldumbide A. Type 1 diabetes mellitus as a disease of the beta-cell (do not blame the immune system?). *Nat Rev Endocrinol* (2021) 17(3):150–61. doi: 10.1038/s41574-020-00443-4
45. Calder PC, Albers R, Antoine JM, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, et al. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr* (2009) 101 Suppl 1:S1–45. doi: 10.1017/S0007114509377867
46. Calle MC, Andersen CJ. Assessment of dietary patterns represents a potential, yet variable, measure of inflammatory status: A review and update. *Dis Markers* (2019) 2019:3102870. doi: 10.1155/2019/3102870
47. Khanna S, Jaiswal KS, Gupta B. Managing rheumatoid arthritis with dietary interventions. *Front Nutr* (2017) 4:52. doi: 10.3389/fnut.2017.00052
48. Mattson MP, Allison DB, Fontana L, Harvie M, Longo VD, Malaisse WJ, et al. Meal frequency and timing in health and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111(47):16647–53. doi: 10.1073/pnas.1413965111
49. Jakus Z, Simon E, Frommhold D, Sperandio M, Mocsai A. Critical role of phospholipase Cgamma2 in integrin and fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. *J Exp Med* (2009) 206(3):577–93. doi: 10.1084/jem.20081859
50. Everds NE, Snyder PW, Bailey KL, Bolon B, Creasy DM, Foley GL, et al. Interpreting stress responses during routine toxicity studies: a review of the biology, impact, and assessment. *Toxicol Pathol* (2013) 41(4):560–614. doi: 10.1177/0192623312466452
51. Christensen AD, Haase C, Cook AD, Hamilton JA. K/BxN serum-transfer arthritis as a model for human inflammatory arthritis. *Front Immunol* (2016) 7:213. doi: 10.3389/fimmu.2016.00213
52. Bronte V, Pittet MJ. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity* (2013) 39(5):806–18. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.010
53. Buchan L, St Aubin CR, Fisher AL, Hellings A, Castro M, Al-Nakkash L, et al. High-fat, high-sugar diet induces splenomegaly that is ameliorated with exercise and genistein treatment. *BMC Res Notes* (2018) 11(1):752. doi: 10.1186/s13104-018-3862-z
54. Andersen CJ, Murphy KE, Fernandez ML. Impact of obesity and metabolic syndrome on immunity. *Adv Nutr* (2016) 7(1):66–75. doi: 10.3945/an.115.010207
55. Kettner NM, Mayo SA, Hua J, Lee C, Moore DD, Fu L. Circadian dysfunction induces leptin resistance in mice. *Cell Metab* (2015) 22(3):448–59. doi: 10.1016/j.cmet.2015.06.005
56. Taylor EB. The complex role of adipokines in obesity, inflammation, and autoimmunity. *Clin Sci (Lond)* (2021) 135(6):731–52. doi: 10.1042/CS20200895
57. Casanova-Acebes M, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chevre R, AG N, et al. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* (2013) 153(5):1025–35. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.040
58. He W, Holtkamp S, Hergenhan SM, Kraus K, de Juan A, Weber J, et al. Circadian expression of migratory factors establishes lineage-specific signatures that guide the homing of leukocyte subsets to tissues. *Immunity* (2018) 49(6):1175–90 e7. doi: 10.1016/j.immuni.2018.10.007
59. Stenzinger M, Karpova D, Unterrainer C, Harenkamp S, Wiercinska E, Hoerster K, et al. Hematopoietic-extrinsic cues dictate circadian redistribution of mature and immature hematopoietic cells in blood and spleen. *Cells* (2019) 8(9):1033. doi: 10.3390/cells8091033
60. Frodermann V, Rohde D, Courties G, Severe N, Schloss MJ, Amatullah H, et al. Exercise reduces inflammatory cell production and cardiovascular inflammation via instruction of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med* (2019) 25(11):1761–71. doi: 10.1038/s41591-019-0633-x
61. Ratajczak MZ, Bujko K, Cymer M, Thapa A, Adamiak M, Ratajczak J, et al. The Nlrp3 inflammasome as a "rising star" in studies of normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia* (2020) 34(6):1512–23. doi: 10.1038/s41375-020-0827-8
62. Fernandez-Riejos P, Najib S, Santos-Alvarez J, Martin-Romero C, Perez-Perez A, Gonzalez-Yanes C, et al. Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators Inflamm* (2010) 2010:568343. doi: 10.1155/2010/568343
63. Longo VD, Mattson MP. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab* (2014) 19(2):181–92. doi: 10.1016/j.cmet.2013.12.008
64. Casanova-Acebes M, Nicolas-Avila JA, Li JL, Garcia-Silva S, Balachander A, Rubio-Ponce A, et al. Neutrophils instruct homeostatic and pathological states in naive tissues. *J Exp Med* (2018) 215(11):2778–95. doi: 10.1084/jem.20181468
65. Gibbs J, Ince L, Matthews L, Mei J, Bell T, Yang N, et al. An epithelial circadian clock controls pulmonary inflammation and glucocorticoid action. *Nat Med* (2014) 20(8):919–26. doi: 10.1038/nm.3599
66. Gallo CG, Fiorino S, Posabella G, Antonacci D, Tropeano A, Pausini E, et al. COVID-19, what could sepsis, severe acute pancreatitis, gender differences, and aging teach us? *Cytokine* (2021) 148:155628. doi: 10.1016/j.cyto.2021.155628
67. Cisse YM, Borniger JC, Lemanski E, Walker WH2nd, Nelson RJ. Time-restricted feeding alters the innate immune response to bacterial endotoxin. *J Immunol* (2018) 200(2):681–7. doi: 10.4049/jimmunol.1701136
68. Li Y, Zou W, Brestoff JR, Rohatgi N, Wu X, Atkinson JP, et al. Fat-produced adipin regulates inflammatory arthritis. *Cell Rep* (2019) 27(10):2809–16 e3. doi: 10.1016/j.celrep.2019.05.032
69. Tian G, Liang JN, Wang ZY, Zhou D. Emerging role of leptin in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* (2014) 177(3):557–70. doi: 10.1111/cei.12372

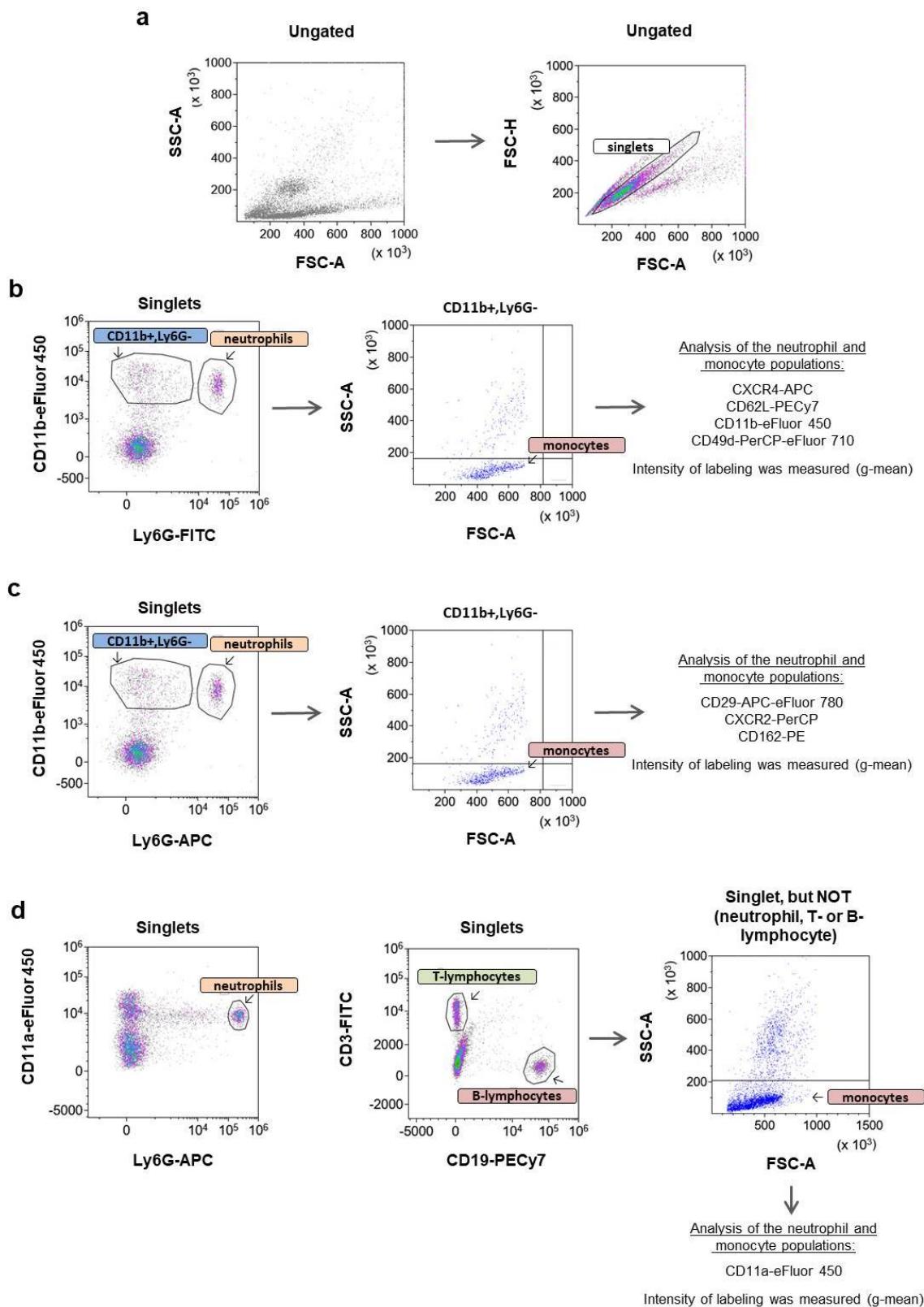
70. Bruno A, Conus S, Schmid I, Simon HU. Apoptotic pathways are inhibited by leptin receptor activation in neutrophils. *J Immunol* (2005) 174(12):8090–6. doi: 10.4049/jimmunol.174.12.8090
71. Souza-Almeida G, D'Avila H, Almeida PE, Luna-Gomes T, Liechocki S, Walzog B, et al. Leptin mediates *In vivo* neutrophil migration: Involvement of tumor necrosis factor-alpha and CXCL1. *Front Immunol* (2018) 9:111. doi: 10.3389/fimmu.2018.00111
72. Mito N, Yoshino H, Hosoda T, Sato K. Analysis of the effect of leptin on immune function *in vivo* using diet-induced obese mice. *J Endocrinol* (2004) 180(1):167–73. doi: 10.1677/joe.0.1800167
73. Laharrague P, Oppert JM, Brousset P, Charlet JP, Campfield A, Fontanilles AM, et al. High concentration of leptin stimulates myeloid differentiation from human bone marrow CD34+ progenitors: potential involvement in leukocytosis of obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* (2000) 24(9):1212–6. doi: 10.1038/sj.ijo.0801377
74. Pietras EM. Inflammation: A key regulator of hematopoietic stem cell fate in health and disease. *Blood* (2017) 130(15):1693–8. doi: 10.1182/blood-2017-06-780882
75. Li X, Zhang Y, Xia M, Gulbins E, Boini KM, Li PL. Activation of Nlrp3 inflammasomes enhances macrophage lipid-deposition and migration: Implication of a novel role of inflammasome in atherogenesis. *PLoS One* (2014) 9(1):e87552. doi: 10.1371/journal.pone.0087552

Supplementary Material

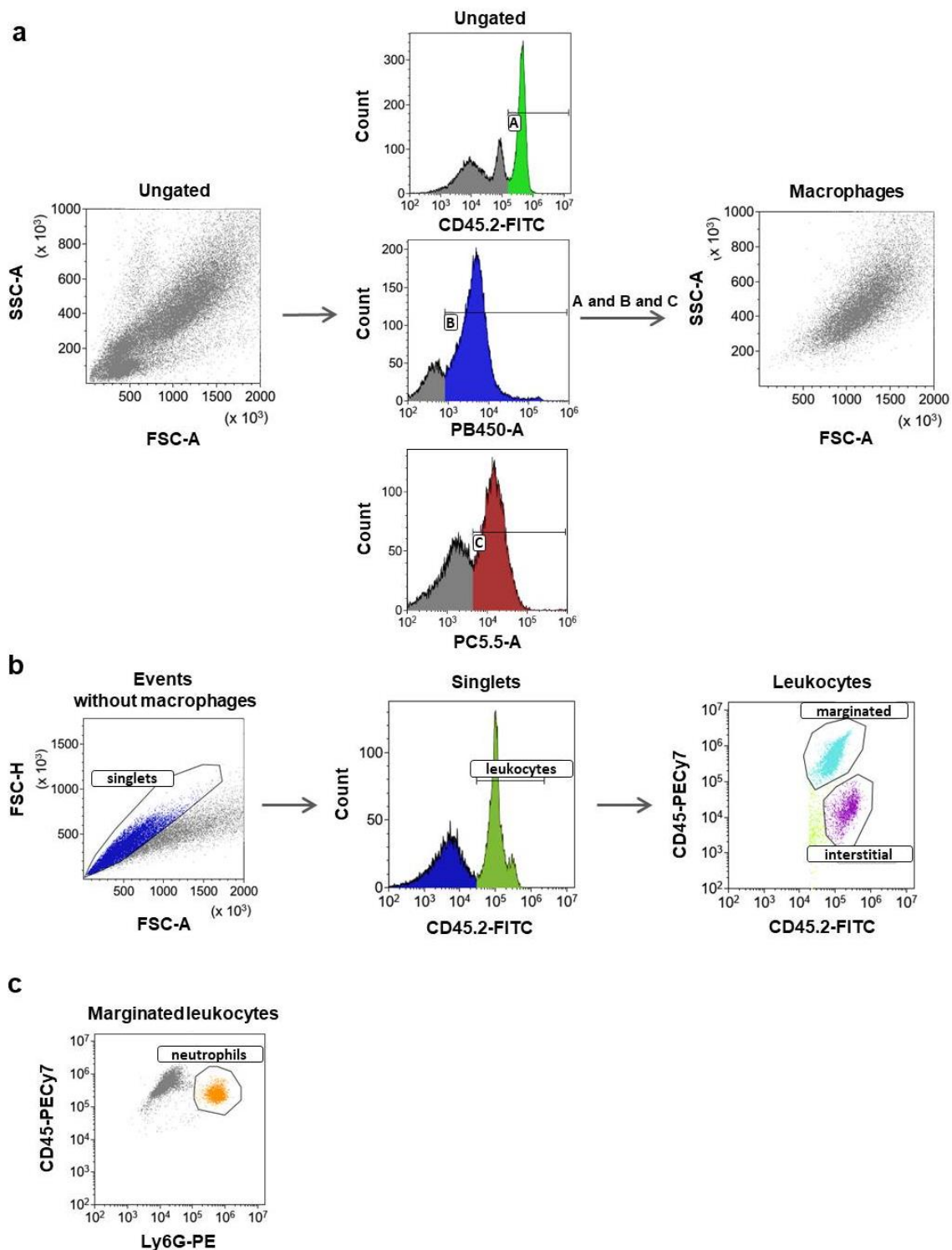
- Supplementary Figure 1.** Flow cytometric analysis of leukocyte populations in blood.
- Supplementary Figure 2.** Flow cytometric analysis of migratory factors expressed on neutrophils and monocytes.
- Supplementary Figure 3.** Flow cytometric analysis of the marginated and tissue leukocyte populations of the lung.
- Supplementary Figure 4.** Adrenal mass, serum corticosterone levels, body weight, food intake and glucose tolerance of the experimental groups.
- Supplementary Figure 5.** Body weight of the animals did not differ in arthritis experiments.
- Supplementary Figure 6.** Peripheral leukocyte counts did not differ before conditioning the animals to different feeding regimens.
- Supplementary Figure 7.** Time restricted feeding entrains the peripheral clock but does not modify the rhythm of CXCL12 and the inflammatory state of the bone marrow.
- Supplementary Figure 8.** Expression of migratory factors of neutrophils and monocytes.
- Supplementary Figure 9.** Histograms of fluorescence intensities presented in Figure 6.
- Supplementary Figure 10.** Expression of migratory factors of neutrophils and monocytes after leptin treatment.
- Supplementary Figure 11.** Effect of TRF on the abundance of neutrophils among spleen leukocytes.
- Supplementary Table 1.** Primer and probe sequences for gene expression analysis.
- Supplementary Table 2.** Antibodies and staining reagents.
- Supplementary Table 3.** Parameters of the fitted cosine curves shown in Figure 2B.
- Supplementary Table 4.** Parameters of the fitted cosine curves shown in Figure 3B and D.
- Supplementary Table 5.** Parameters of the fitted cosine curves shown in Figure 5.
- Supplementary Table 6.** Parameters of the fitted cosine curves shown in Supplementary Figure 7B.
- Supplementary Table 7.** Parameters of the cosine curves fitted to the data shown in Supplementary Figure 7C, D, F.



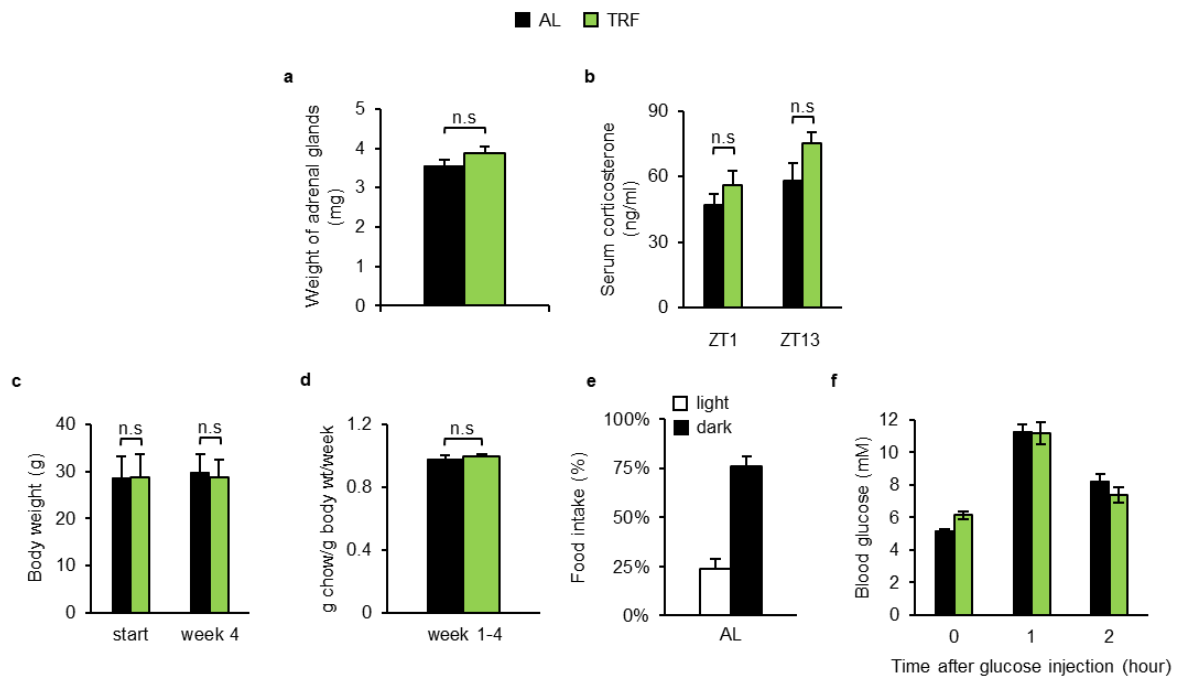
Supplementary Figure 1. Flow cytometric analysis of leukocyte populations in blood. Before analysis of specific labelings, singlets were gated in all cases (A). Identification of neutrophils (B), B- and T-lymphocytes (C), monocytes (D) and Ly6C^{high} inflammatory monocytes (E).



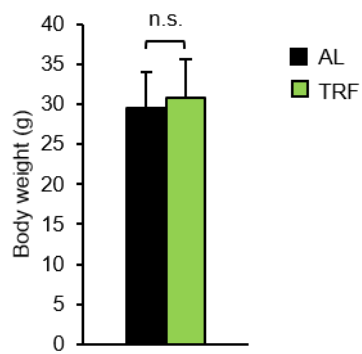
Supplementary Figure 2. Flow cytometric analysis of migratory factors expressed on neutrophils and monocytes. Before analysis of specific labelings, singlets were gated in all cases (A). Identification of neutrophils (Ly6G⁺) and monocytes (CD11b⁺, Ly6G⁻, SSC^{low} or Ly6G⁻, CD3⁻, CD19⁻, SSC^{low}) (B, C, D). Intensity of labeling signals was determined using g-mean values.



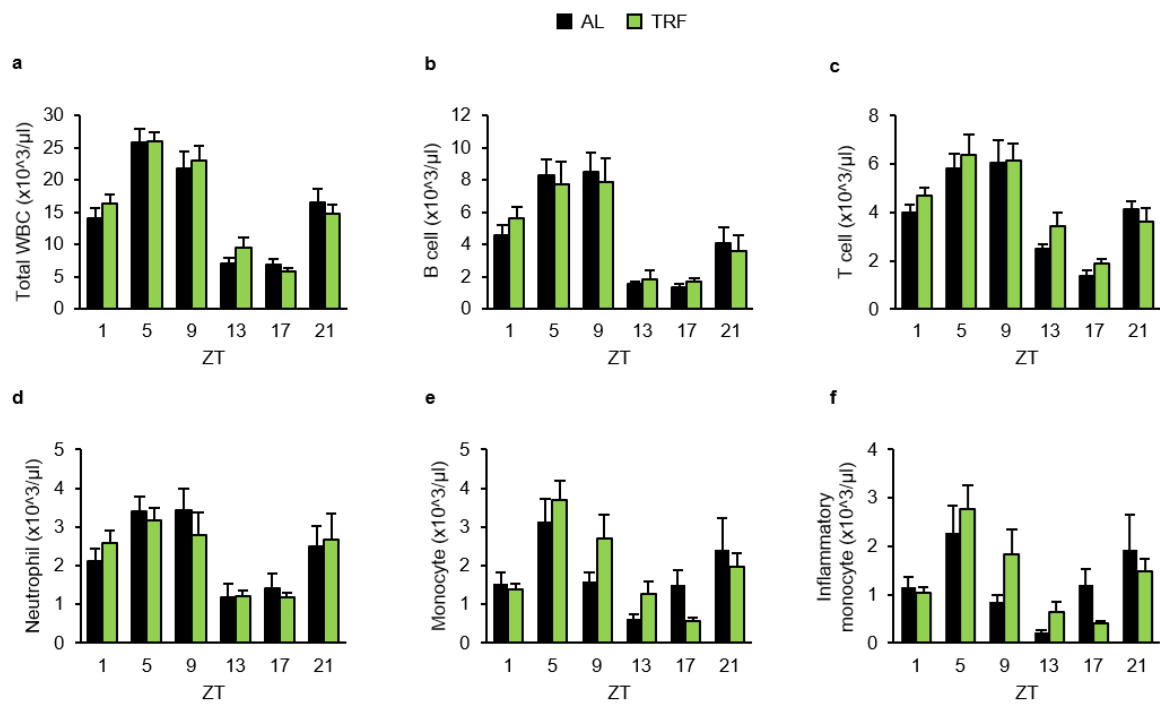
Supplementary Figure 3. Flow cytometric analysis of the marginated and tissue leukocyte populations of the lung. (A) Identification of tissue macrophages according to CD45-FITC positivity and their high autofluorescence measured in PB450 and PC5.5 channels. (B) Identification of the marginated (CD45-PECy7⁺, CD45.2-FITC⁺) and tissue leukocytes (CD45-PECy7⁻, CD45.2-FITC⁺) of the lung. (C) Identification of marginated neutrophils (Ly6G-PE⁺) of the lung.



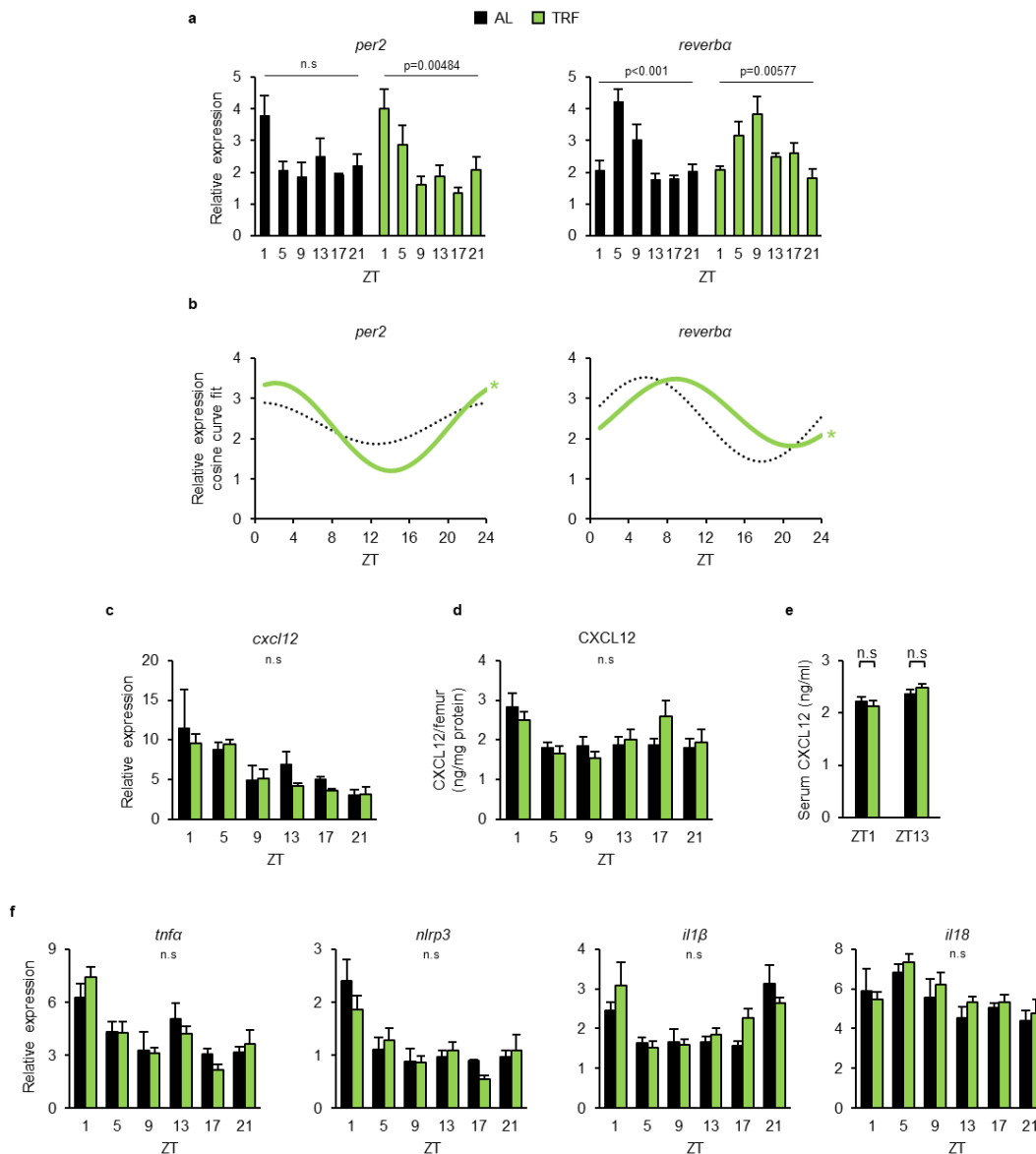
Supplementary Figure 4. Adrenal mass, serum corticosterone levels, body weight, food intake and glucose tolerance of the experimental groups. (A) Adrenal mass after 4-week time restricted feeding (mean + SD n=15 (AL), n=13 (TRF), two-sample t-test, n.s. p=0.154). (B) Serum corticosterone levels after 4-week time restricted feeding (mean + SEM n=11 (AL), n=11 (TRF), two-sample t-test, n.s. p=0.287 and p=0.091 for ZT1 and ZT13 respectively). (C) Body weight of the animals at the start and after 4 weeks of the feeding regimens (mean + SD, n=75 (AL), n=82 (TRF), two-sample t-test, n.s. p=0.871 and p=0.137 for start and week 4 respectively). (D) Average of the weekly food intake normalized to g body weight (mean + SEM, n=24 (AL), n=28 (TRF), two-sample t-test, n.s. p=0.571). (E) Food intake of the ad libitum fed animals in the light and dark phases of the day (mean + SD n=5 cages) (F) IPGTT measured in AL and TRF mice after 16 hours fasting. Average blood glucose levels after IPGTT in AL and TRF mice (mean ± SEM, n=7 (AL), n=9 (TRF), repeated measures ANOVA, time effect p<0.001, group effect p=0.986). ZT=Zeitgeber time, n.s.=not significant



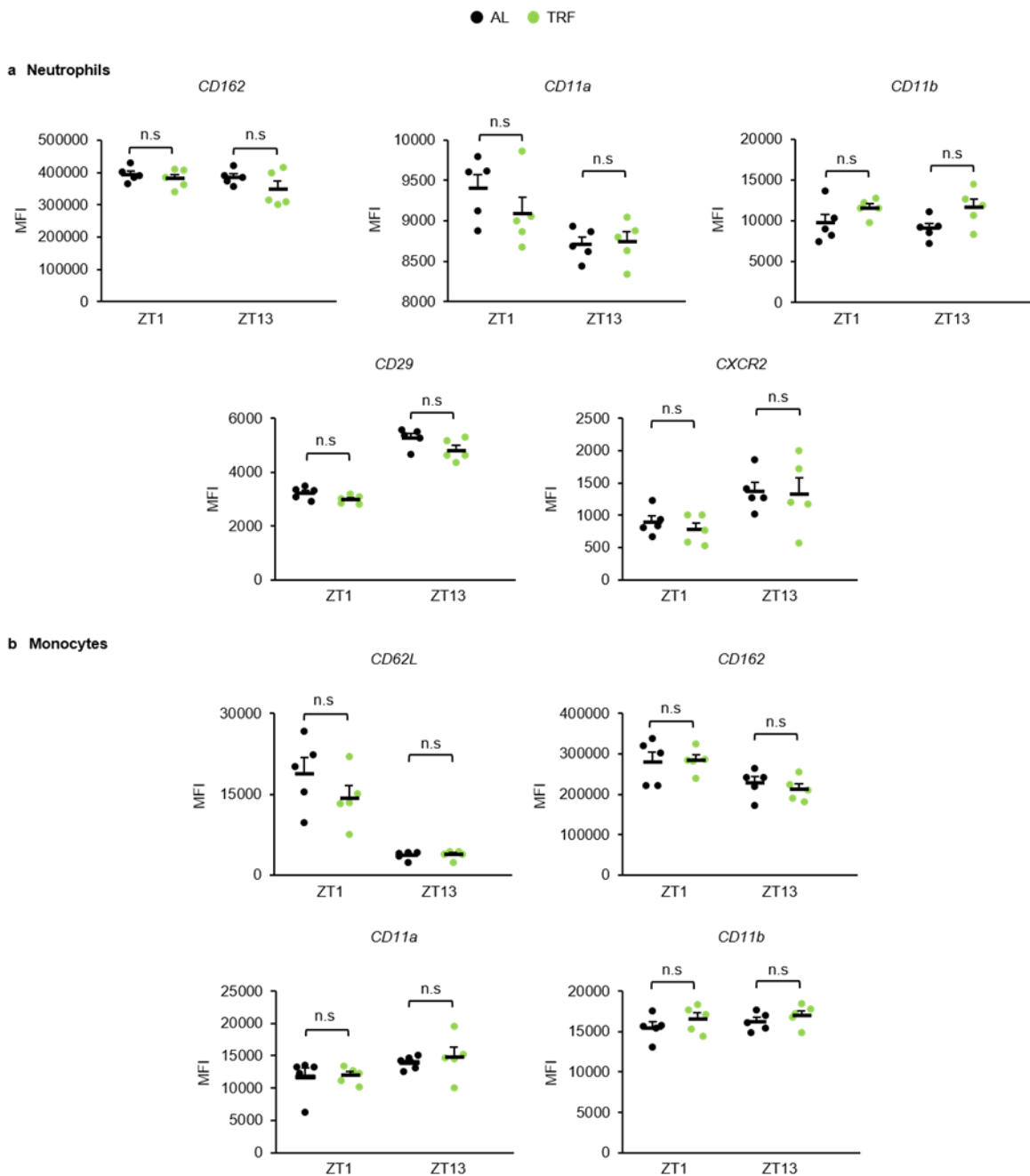
Supplementary Figure 5. Body weight of the animals did not differ in arthritis experiments. Body weight of the animals at the induction of K/BxN serum transfer arthritis (mean + SD, n=25 (AL), n=23 (TRF), two-sample t-test, n.s. p=0.348). n.s.=not significant



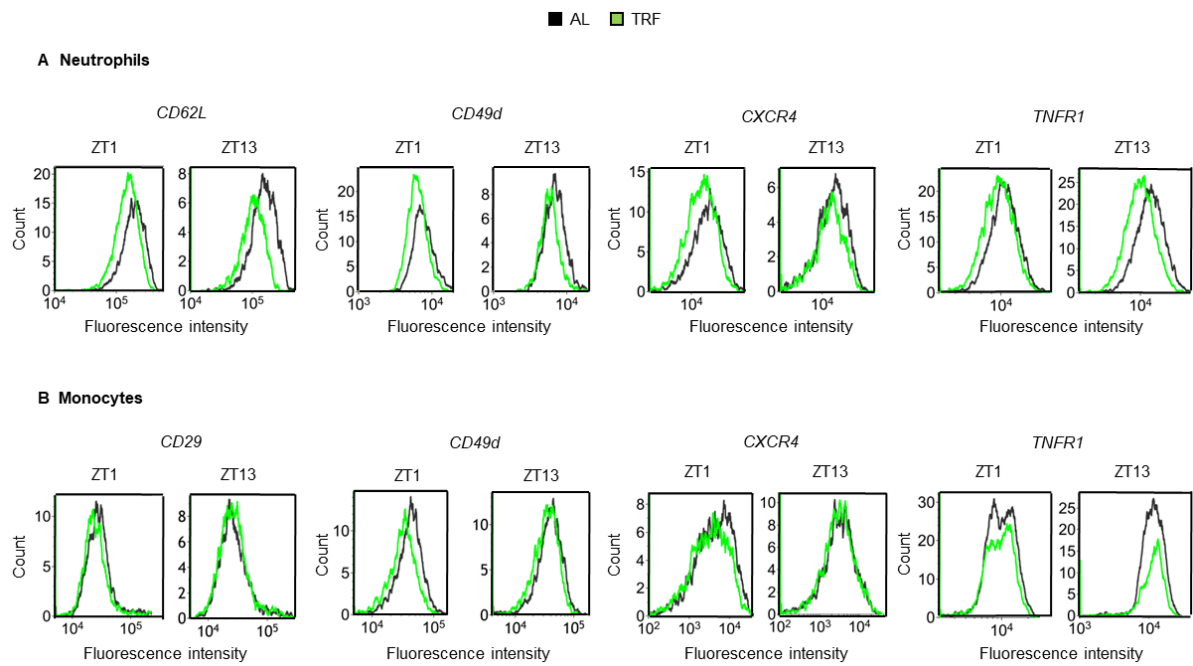
Supplementary Figure 6. Peripheral leukocyte counts did not differ before conditioning the animals to different feeding regimens. Total WBC (A), B-lymphocyte (B), T-lymphocyte (C), neutrophil (D), monocyte (E) and Ly6C^{high} inflammatory monocyte (F) counts on the starting day of the 4-week feeding regimens (mean ± SEM, n=3-9 (AL), n=6-11 (TRF), two-way ANOVA, n.s.). ZT=Zeitgeber time, n.s=not significant



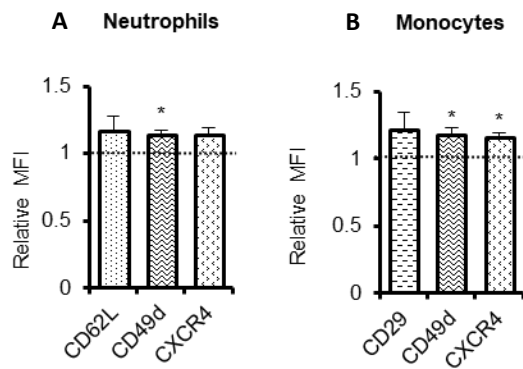
Supplementary Figure 7. Time restricted feeding entrains the peripheral clock but does not modify the rhythm of CXCL12 and the inflammatory state of the bone marrow. (A) Relative mRNA expression of *per2* and *reverba* in the course of the day (mean + SEM, n=3-8 (AL), n=6-9 (TRF), one-way ANOVA, * indicates significant time effect). *Rplp0* was used as a reference. (B) Cosine curve fit to relative expression data showed in (A), * and solid lines indicate significant, fixed 24-hour period cosine curve fit with cosinor analysis, whereas dashed lines show non-significant fit. Parameters of the fitted cosine curves are listed in Supplementary Table 6. (C) Relative mRNA expression of *cxcl12* (mean + SEM, n=3-8 (AL), n=6-9 (TRF), two-way ANOVA, time effect p=0.005, group effect n.s.). *Rplp0* was used as a reference. (D) Protein expression of CXCL12 in the bone marrow (mean ± SEM, n=5-10 (AL), n=7-11 (TRF), two-way ANOVA, time effect p=0.007, group effect n.s.). (E) Serum concentrations of CXCL12 (mean + SEM, n=4-8 (AL), n=3-11 (TRF), two-sample t-test, n.s.). (F) Relative mRNA expression of *tnfa*, *nlrp3*, *il1b* and *il18* in the course of day in bone marrow (mean + SEM, n=3-8 (AL) and n=6-9 (TRF), two-way ANOVA, group effect n.s.). *Rplp0* was used as a reference. ZT=Zeitgeber time, n.s.=not significant



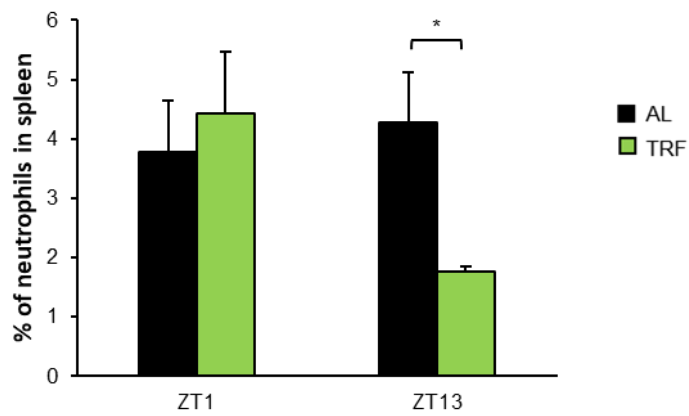
Supplementary Figure 8. Expression of migratory factors of neutrophils and monocytes. Selectin (CD62L), selectin ligand (CD162), integrin (CD11a, CD11b, CD29) and chemokine receptor (CXCR2) expression of neutrophils (A) and monocytes (B) at ZT1 and ZT13 (mean + SEM, n=5 (AL), n=5 (TRF), two-sample t-test, *p<0.05). ZT=Zeitgeber time, n.s.=not significant



Supplementary Figure 9. Histograms of fluorescence intensities presented in Figure 6. Selectin (CD62L), integrin (CD29, CD49d) and cytokine receptor (CXCR4, TNFR1) expression of neutrophils (A) and monocytes (B) at ZT1 and ZT13. ZT=Zeitgeber time



Supplementary Figure 10. Expression of migratory factors of neutrophils and monocytes after leptin treatment. Selectin (CD62L), integrin (CD29, CD49d) and chemokine receptor (CXCR4) expression of neutrophils (**A**) and monocytes (**B**) after leptin treatment compared to vehicle (mean + SEM, n=5, one-sample t-test, *p<0.05).



Supplementary Figure 11. Effect of TRF on the abundance of neutrophils among spleen leukocytes. Percentage of neutrophils among spleen leukocytes at ZT1 and ZT13 (mean + SEM, $n=3-6$ (AL) and $n=5-8$ (TRF), two-sample t-test, $*p<0.05$). ZT=*Zeitgeber* time

Supplementary Table 1.

Primer and probe sequences for gene expression analysis.

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

Supplementary Table 2.

Antibodies and staining reagents.

Antibody	Clone	Conjugate	Catalog #
CD45	30-F11	FITC	11-0451
CD45	30-F11	PE	12-0451
CD45	30-F11	PECy7	25-0451
CD45.2	104	FITC	11-0454
Ly-6G	1A8-Ly6g	PE	12-9668
Ly-6G	1A8-Ly6g	APC	17-9668
CD62L	MEL-14	PECy7	25-0621
CD115	AFS98	APC	17-1152
CD11b	M1/70	eFluor 450	48-0112
CD11b	M1/70	APC	561690
Ly-6C	HK1.4	APC-eFluor 780	47-5932
CD3	17A2	FITC	11-0032
CD19	eBio1D3 (1D3)	PECy7	25-0193
CD162	4RA10	PE	12-1621
CD11a	M17/4	eFluor 450	48-0111
CD49d	R1-2	PerCP-eFluor 710	46-0492
CD29	HMb1-1	APC-eFluor 780	47-0291
CXCR4	L276F12	APC	BZ-146507
CXCR2	IL-8RB	PerCP	FAB2164C
CD120a (TNFR1)	55R-286	PE	BZ-113003
Live/Dead Fixable Far Red			L34974

CXCR4 and CXCR2 antibodies were produced by Biolegend and R&D Systems, respectively, all other antibodies were manufactured by eBioscience. The LIVE/DEAD™ Fixable Far Red Dead Cell Stain Kit was manufactured by Life Technologies.

Supplementary Table 3.

Parameters of the fitted cosine curves shown in Figure 2B.

	spleen weight	
	AL	TRF
Mesor	70.64	60.67
Amplitude	7.45	8.18
Acrophase (ZT)	4.18	3.24
Cosinor fit, p-value	0.114	0.015

Supplementary Table 4.

Parameters of the fitted cosine curves shown in Figure 3B and D.

	<i>per2</i>		<i>reverbA</i>		<i>leptin</i>		serum leptin	
	AL	TRF	AL	TRF	AL	TRF	AL	TRF
Mesor	13.35	13.63	22.05	18.61	25.40	18.28	6627.71	4291.4
Amplitude	15.40	19.06	24.68	20.72	3.96	12.53	2495.47	3073.92
Acrophase (ZT)	14.23	13.84	8.57	9.45	16.97	17.66	21.96	19.79
Cosinor fit, p-value	0.071	0.165	0.000	0.011	0.771	0.018	0.072	0.003

Supplementary Table 5.

Parameters of the fitted cosine curves shown in Figure 5.

	Total WBC		B cell		T cell	
	AL	TRF	AL	TRF	AL	TRF
Mesor	17.00	17.54	6.13	6.67	4.29	4.35
Amplitude	8.59	9.99	3.99	4.26	1.60	1.99
Acrophase (ZT)	5.22	4.57	5.02	4.49	5.09	4.97
Cosinor fit, p-value	0.042	0.009	0.053	0.078	0.160	0.022
Increase in amplitude (%)		16		7		24

	Neutrophil		Monocyte		Ly6C ^{high} Monocyte	
	AL	TRF	AL	TRF	AL	TRF
Mesor	2.54	2.77	1.65	1.51	1.17	1.01
Amplitude	1.01	1.58	0.51	0.98	0.38	0.79
Acrophase (ZT)	4.60	2.50	5.84	5.70	4.59	4.98
Cosinor fit, p-value	0.004	0.016	0.120	0.000	0.17	0.001
Increase in amplitude (%)		56		93		101

Supplementary Table 6.

Parameters of the fitted cosine curves shown in Supplementary Figure 7B.

	<i>per2</i>		<i>reverta</i>	
	AL	TRF	AL	TRF
Mesor	2.38	2.29	2.48	2.65
Amplitude	0.51	1.09	1.05	0.83
Acrophase (ZT)	0.62	2.09	5.74	8.84
Cosinor fit, p-value	0.408	0.037	0.050	0.024

Supplementary Table 7.

Parameters of the cosine curves fitted on data shown in Supplementary Figure 7C, D, F.

	<i>cxcl12</i>		CXCL12		<i>tnfα</i>	
	AL	TRF	AL	TRF	AL	TRF
Mesor	6.75	5.85	2.02	2.04	4.18	4.13
Amplitude	2.45	3.32	0.30	0.39	0.71	1.59
Acrophase (ZT)	3.71	3.85	0.91	19.74	3.31	2.1
Cosinor fit, p-value	0.289	0.023	0.370	0.186	0.607	0.206
	<i>nlrp3</i>		<i>il1β</i>		<i>il18</i>	
	AL	TRF	AL	TRF	AL	TRF
Mesor	1.20	1.12	2.02	2.16	5.38	5.75
Amplitude	0.53	0.44	0.65	0.70	1.02	1.01
Acrophase (ZT)	1.26	2.29	22.46	21.77	4.81	6.45
Cosinor fit, p-value	0.197	0.098	0.081	0.030	0.033	0.035