

University of Groningen

Chronic social stress and the circadian system

Ota, Simone Marie

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2019

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Ota, S. M. (2019). *Chronic social stress and the circadian system: Effects on the central clock and peripheral liver oscillator*. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

Alle organismes op aarde zijn geëvolueerd in een omgeving die gekenmerkt wordt door duidelijke 24-uurs ritmes in licht-donker, temperatuur en voedselbeschikbaarheid, veroorzaakt door de draaiing van onze planeet om haar as. Als aanpassing op deze cyclische omgeving vertonen vrijwel alle soorten, inclusief de mens, dag-nacht ritmes in gedrag en fysiologie, bijvoorbeeld in slaap-waak gedrag, lichaamstemperatuur en hormoonafgifte. Deze ritmes in gedrag en fysiologie worden intern gestuurd door een systeem van biologische klokken of oscillatoren. Dit circadiane systeem (circa = ongeveer, dies = een dag) bevat een centrale klok of pacemaker die gelokaliseerd is in de suprachiasmatische nucleus (SCN) van de hypothalamus. Deze pacemaker is gelegen bovenop de kruising van de oogzenuwen en ontvangt directe licht-input vanuit de ogen, zodat het zijn eigen ritme kan synchroniseren met de 24-uurs dag-nacht ritme van de omgeving. De SCN coördineert en synchroniseert vervolgens de klokken van andere weefsels en organen zodat alle ritmes in ons lichaam op elkaar en op de omgeving zijn afgestemd en op die manier bijdragen aan een optimaal functioneren.

Als het circadiane systeem verstoord raakt en de interne 24-uurs-ritmes niet in de pas lopen met elkaar of met de omgeving, zoals vaak het geval is bij werken in nachtdiensten of bij een jetlag, dan kan dat ernstige gevolgen hebben voor het functioneren en welzijn. Op lange termijn kan een verstoring van het circadiane systeem zelfs bijdragen aan een verhoogde gevoeligheid voor allerlei ziektes en aandoeningen.

In deze context van een relatie tussen circadiane organisatie en gezondheid is het een belangrijke vraag of het circadiane systeem gevoelig is voor verstoringen veroorzaakt door stress. Omstandigheden met oncontroleerbare en chronische stress worden vaak gezien als een belangrijke oorzaak van verminderd functioneren en ziekte, en veel ziektebeelden zijn geassocieerd met verstoringen in de normale dag-nacht ritmes in gedrag en fysiologie (verstoorde slaap, verstoorde hormoonritmes). Op basis van deze gegevens zou men kunnen veronderstellen dat een verstoord circadiane organisatie een rol speelt bij het ontstaan van stress-gerelateerde aandoeningen zoals cardiovasculaire aandoeningen en psychiatrische ziektebeelden.

In het echte leven is het moeilijk om oorzakelijke verbanden vast te stellen tussen stress, verstoord circadiane ritmiek en verminderde gezondheid. Om deze reden is er in het onderzoek beschreven in dit proefschrift gebruik gemaakt van een model voor chronische sociale stress in muizen om de volgende vragen te beantwoorden: 1. Heeft oncontroleerbare chronische stress invloed op de centrale circadiane pacemaker in de SCN en de gedragsritmes die gecoördineerd worden door deze klok? 2. Heeft oncontroleerbare chronische stress invloed op perifere klokken elders in het lichaam en kan het de coördinatie tussen de centrale klok in de SCN en die perifere klokken verstoren?

In hoofdstuk 2 van dit proefschrift wordt een breed overzicht gegeven van de

beschikbare wetenschappelijke literatuur en momentane inzichten over effecten van stress op het circadiane systeem. Eerdere studies van onder andere onze eigen onderzoeksgroep suggereerden dat de centrale circadiane pacemaker in de SCN niet heel gevoelig lijkt te zijn voor acute stress. Echter, de literatuur leek minder consistent over de mogelijke effecten van chronische stress. Hoewel diverse studies ook na chronische stress geen veranderingen lieten zien in circadiane organisatie waren er ook enkele studies die suggereerden dat er mogelijk kleine, accumulerende effecten zijn die geleidelijk aan leiden tot een verschuiving van ritmes die gestuurd worden door de SCN. Het is bij die studies echter niet duidelijk of er daadwerkelijk sprake was van faseverschuivingen van de SCN-ritmes of dat de intern gegenereerde ritmes gemaskeerd waren door verstoringen elders in het lichaam. Daarnaast waren er enkele studies die hebben laten zien dat bepaalde hormonen die vaak geassocieerd worden met stress, met name glucocorticoïden afgegeven door de bijnieren, kunnen leiden tot verschuivingen in het ritme van perifere klokken zoals die in de lever. Deze bevindingen tezamen waren de motivatie voor het uitvoeren van een serie nieuwe experimenten in muizen waarin werd gekeken naar de invloed van chronische sociale stress op de centrale klok in de SCN en de perifere klok in de lever.

In hoofdstuk 3 onderzochten wij allereerst of chronische sociale stress van invloed is op het circadiane ritme in locomotoractiviteit waarvan bekend is dat het wordt aangestuurd door de pacemaker in de SCN. Volwassen mannelijke muizen werden gedurende het gehele experiment gehouden in constant rood licht, wat voor muizen in feite constant donker is omdat ze het rode licht nauwelijks kunnen waarnemen. Doordat de muizen onder deze constante omstandigheden waren gehuisvest, vertoonden ze een zogenaamd vrijlopend activiteitsritme met een endogene, door de klok in de SCN gegenereerde periode die iets korter was dan 24 uur. Op deze manier kon goed onderzocht worden of de fase en periode van de centrale klok beïnvloed worden door stress. De helft van de muizen blootgesteld aan chronische sociale stress door ze gedurende 10 opeenvolgende dagen kortdurend te huisvesten in het territorium van een dominante en agressieve soortgenoot, het zogenaamde 'social defeat stress' model. Verschillende groepen muizen werden blootgesteld aan sociale stress tijdens de circadiane activiteitsfase of tijdens de circadiane rustfase. Vervolgens werd de periode en fase van het activiteitsritme voor, tijdens en na de 10 dagen sociale stress in deze muizen vergeleken met de ritmes van controle dieren die niet aan stress werden blootgesteld. De resultaten lieten zien dat sociale stress weliswaar leidde tot een sterke reductie in de hoeveelheid activiteit, maar niet leidde tot significante veranderingen in de periode en fase van het ritme ten opzichte van de controle muizen. In overeenstemming met de meeste eerdere studies suggereert deze bevinding dat de centrale klok in de SCN niet wordt verstoord door chronische stress.

In hoofdstuk 4 werd nogmaals bevestigd dat de herhaalde sociale stress gedurende 10 dagen geen invloed had op de periode en fase van het ritme in locomotoractiviteit. Vervolgens werd er direct na de periode van sociale stress materiaal van hersenen en lever

verzameld om in vitro te kijken naar het circadiane ritme van het eiwit PERIOD2 (PER2) dat deel uitmaakt van het moleculaire klokmechanisme. Om in de verschillende weefsels het ritme in het PER2-eiwit te kunnen meten werd gebruik gemaakt van transgene PERIOD2::LUCIFERASE knock-in muizen waarin de expressie van dit klokeiwit gekoppeld is aan de expressie van het enzym luciferase. Dit enzym breekt luciferin af dat aanwezig is in het medium waarin de weefselmonsters worden gehouden en hierbij komt licht vrij dat vervolgens gemeten kan worden. Op deze manier wordt het circadiane ritme in expressie van het klokeiwit tot uiting gebracht in een meetbaar ritme in lichtproductie. Met deze methode kon direct in vitro vastgesteld worden wat het effect was van voorafgaande stress op de centrale klok in de SCN en op de perifere klok in de lever. De in vitro metingen lieten zien dat het circadiane PER2 ritme in de SCN niet beïnvloed werd door de stress, in overeenstemming met de bevinding dat de activiteits-output van de SCN niet was verschoven. Het in vitro PER2 ritme in het leverweefsel daarentegen was duidelijk verschoven in de muizen die voorafgaand gedurende 10 dagen aan sociale stress waren blootgesteld. Het PER2-ritme in de lever van deze muizen was duidelijk vertraagd ten opzichte van het PER2-leverritme in de controle muizen. Deze bevindingen ondersteunen duidelijk het idee dat de centrale klok in de SCN weliswaar goed beschermd is tegen stress maar dat sommige perifere klokken wel beïnvloed kunnen worden door stressvolle gebeurtenissen.

In hoofdstuk 5 werd onderzoek gedaan naar het mogelijke mechanisme waarlangs stress de leverklok zou kunnen verschuiven. De hypothese was dat het bijnierhormoon corticosteron een rol zou kunnen spelen. Dit hormoon wordt in sterke mate afgegeven tijdens sociale stress. Er werden opnieuw transgene PERIOD2::LUCIFERASE knock-in muizen gebruikt voor het genereren van in vitro culturen van SCN en leverweefsel. Een deel van deze culturen werd vervolgens blootgesteld aan verschillende doseringen van corticosteron. Zoals verwacht werd de periode en fase van het PER2-ritme in de SCN-culturen niet beïnvloed door directe toediening van corticosteron. Het PER2-ritme in het leverweefsel daarentegen werd duidelijk vertraagd door de toevoeging van corticosteron, in overeenstemming met de effecten van sociale stress in het vorige hoofdstuk. Tevens sluiten deze resultaten aan bij het gegeven dat receptoren voor het glucocorticoïd hormoon voorkomen in vrijwel alle weefsels in het lichaam, maar niet in de volgroeide SCN. De resultaten van dit experiment ondersteunen het idee dat het bijnierhormoon corticosteron betrokken zou kunnen zijn bij de effecten van chronisch sociale stress op perifere klokken.

De studie in hoofdstuk 6 was gebaseerd op het idee dat een interne desynchronisatie van circadiane klokken in verschillende weefsels gevolgen zou kunnen hebben voor de lichamelijke en mentale gezondheid. In deze studie werden verschillende gedragstesten uitgevoerd in muizen blootgesteld aan het sociale stress protocol en controle muizen. Deze gedragstesten waren met name gericht op het vaststellen van angst en depressie-achtig gedrag. In tegenstelling tot de verwachting werden er geen effecten van chronische sociale stress op gedrag gevonden, ondanks dat eerdere studies al duidelijke veranderingen hebben

gerapporteerd in dit type gedragingen na zowel acute als chronische sociale stress. Een mogelijke verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat de dieren in onze studie ouder waren dan in de meeste rapportages. Jongere dieren zouden gevoeliger kunnen zijn voor de gevolgen van sociale stress. Dit neemt niet weg dat de duidelijk effecten van chronische sociale stress op de hoeveelheid locomotoractiviteit in de thuishok en de effecten op de leverklok gemeten in eerdere hoofdstukken blijkbaar niet direct geassocieerd zijn met parallele veranderingen in angst en depressie-achtig gedrag.

In het laatste hoofdstuk van dit proefschrift worden alle voorgaande resultaten geïntegreerd en bediscussieerd in relatie tot ander gepubliceerd werk. Het door ons toegepaste protocol van chronische sociale stress leidde tot een duidelijke onderdrukking van locomotoractiviteit. In dat opzicht lijkt het een uiterst bruikbaar model voor onze doelstelling. De bevinding dat de periode en fase van de centrale klok in SCN niet beïnvloed wordt door deze vorm van stress is in overeenstemming met de meeste andere publicaties over de effecten van acute en chronische stress. Eén recente studie rapporteerde een verschuiving van de circadiane activiteitspiek na chronische sociale stress, maar aangezien deze studie werd uitgevoerd met muizen die waren gesynchroniseerd aan een normale 24-uurs licht-donker cyclus is het onduidelijk of er daadwerkelijk sprake was van een faseverschuiving van de endogene centrale klok. Onze bevinding dat zowel chronische sociale stress in vivo alsook chronische blootstelling aan corticosteron in vitro kan leiden tot een verschuiving van de perifere leverklok, gemeten aan de fase van het PER2-ritme in vitro stress, is eveneens in overeenstemming met diverse andere recente publicaties. Zo is er laten zien dat ook in vivo injecties met corticosteron of vergelijkbare synthetische glucocorticoïden kan leiden tot een verschuiving in het ritme van klokeiwitten in de lever en andere weefsels. Onze resultaten met toevoeging van corticosteron aan het in vitro medium suggereren dat deze effecten het gevolg kunnen zijn van directe inwerking van corticosteron op deze perifere weefsels in plaats van een indirect effect. Om de causale rol van corticosteron bij de door ons gevonden verschuiving van de leverklok na stress daadwerkelijk vast te stellen zullen toekomstige experimenten gericht zijn op het blokkeren van corticosteron afgifte tijdens de sociale stress periode. Daarnaast stellen wij voor om ook studies te verrichten naar de effecten van sociale stress op ritmes in klokeiwitten in verschillende hersengebieden buiten de SCN, met name hersengebieden die betrokken zijn bij de regulatie van cognitieve functies en emoties zoals de hippocampus en de prefrontale cortex. Dergelijke studies kunnen inzicht geven in de mogelijke rol van stress-geïnduceerde interne circadiane desynchronisatie en de gevoeligheid voor het ontwikkelen van psychiatrische aandoeningen zoals depressie.