

Natasha Scialpi¹, Moris Sanguinetti¹, Marilidia Piglionica¹, Luigi De Maria², Piero Lovreglio²,
Luigi Vimercati², Carlo Sabbà¹, Leonardo Soleo², Antonio Moschetta¹

Sindrome metabolica e lavoro

¹ Dipartimento Interdisciplinare di Medicina, Clinica Medica "C. Frugoni", Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Italia

² Dipartimento Interdisciplinare di Medicina, Sezione di Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Italia

RIASSUNTO. I ritmi circadiani sono variazioni cicliche endogene regolate da un pacemaker sito nel nucleo soprachiasmatico (SCN) dell'ipotalamo, che consentono fluttuazioni quotidiane delle attività biochimiche, fisiologiche e comportamentali. Grazie a studi condotti sui roditori, tuttavia, si è visto che il meccanismo molecolare che controlla l'attività circadiana è espresso non solo nel SNC, ma anche in quasi tutti i tessuti periferici. Diversi ormoni presentano oscillazioni su base circadiana, e mostrano un rilascio regolato da stimoli ambientali quali l'alimentazione e i cicli luce-buio. In un recente studio si è visto come abitudini dietetiche diverse determinino una variabile espressione genica nei tessuti periferici che è possibile studiare tramite le variazioni dell'espressione genica nelle cellule mononucleate del sangue (PBM). Scopo del nostro studio è quello di indagare le variazioni di espressione genica nei PBMCs di operatori sanitari classificati in base al tipo di turnazione lavorativa ed esposizione professionale a radiazioni ionizzanti al fine di individuare nuovi markers circolanti associati ad alterazioni metaboliche dovute a condizioni lavorative che determinano variazioni nel ritmo circadiano. Sono stati raccolti i dati anamnestici ed antropometrici di oltre 100 operatori sanitari reclutati con criterio random. Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad un prelievo ematico per la determinazione degli indici biochimico-sierici e per l'isolamento dei PBMCs. I dati preliminari suggeriscono una possibile associazione tra lavoro a turni e notturno e/o radioesposizione e la presenza di steatosi epatica. Ulteriori dati saranno ricavati dalle successive analisi di espressione genica.

Parole chiave: ritmi circadiani, sindrome metabolica, espressione genica, lavoro.

ABSTRACT. METABOLIC SYNDROME AND WORK. *Circadian rhythms are endogenous fluctuations modulated by a pacemaker entity located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the ventral hypothalamus that allows daily fluctuations in biochemical, physiological, and behavioral activities. The molecular machinery that controls the circadian activity is expressed not only in the SCN, but also in several peripheral tissues. Several hormones were shown to have daily oscillations, and the so-called nutrient-sensitive hormones, namely insulin, leptin, ghrelin and adiponectin also oscillate on a circadian basis, and their release is, at least partially, regulated by environmental stimuli, such as feeding time and light-dark cycles. In a recent study designed to test the impact of different dietary habits on the human clock, it was found that a change in the dietary habits can alter the gene expression peripherally, as measured by gene expression in circulating monocytes (PBMCs). Therefore, we decided to investigate the gene expression variation in PBMCs of health care workers, in order to identify*

I ritmi circadiani sono fluttuazioni endogene regolate da un *pacemaker* sincronizzato da segnali ambientali, che consentono quindi, fluttuazioni quotidiane delle attività biochimiche, fisiologiche e comportamentali.

La ritmicità biologica è presente in tutti i tipi di cellule e organismi. A seconda del periodo di oscillazione, i ritmi circadiani sono classificati come ultradiani (meno di 24 ore, per esempio, i flussi ionici nelle membrane), infradiani (più di 24 ore, ad esempio eventi di marea e annuali) e circadiani (circa 24 ore) (1). In particolare, il "*timing system*" nei mammiferi è costituito da una serie di oscillatori periferici coordinati, che agiscono sotto il controllo di un pacemaker principale situato nell'ipotalamo ventrale e noto come nucleo soprachiasmatico (SCN) (2).

Il "core" dell'orologio molecolare è costituito da un insieme di geni specializzati, noti come "*clock genes*", raggruppati in tre diversi "*feedback loops*" (Figura 1): 1) il ciclo a feedback positivo composto dal *clock gene* costitutivo e dal gene *baml1* (*Brain and muscle ARNT-like 1*), i cui prodotti di traduzione formano un dimero nel nucleo della cellula che riconosce le regioni di promotori specializzati, note come "*E-box*", e di altri *clock genes* come *per1* (*period circadian protein homolog 1*), *per2* (*period circadian protein homolog 2*), *cry1* (*Cryptochrome Circadian Regulator 1*), *cry2* (*Cryptochrome Circadian Regulator 2*), *rev-erbα* (*NR1D1, nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1*) e *roraα* (*RAR-related orphan receptors alpha*), facilitando la loro trascrizione (la maggior parte dei geni sotto regolazione circadiana contiene promotori con E-box); 2) il ciclo a feedback negativo formato da *per1* / *per2* e *cry1* / *cry2*, le cui proteine corrispondenti formano un eterodimero in seguito a fosforilazione ad opera della *casein chinasi 1 epsilon / delta* (*CK1ε / δ*). L'eterodimero entra nel nucleo per inibire la propria trascrizione, così come la trascrizione degli altri *clock genes*; 3) il ciclo di feedback accessorio di proteine codificate da *rev-erbα* e *roraα*, che entrano nel nucleo dove agiscono sugli elementi di risposta retinoica (*RRE*), sia come inibitore trascrizionale (*REV-ERBα*) che come attivatore (*RORα*) della trascrizione di *BMAL1* (3).

Il meccanismo molecolare che controlla l'attività circadiana è espresso non solo nel SCN, ma anche in quasi tutti i tessuti periferici, come dimostrato in alcuni esperimenti condotti su roditori. Tali ritmi periferici dipendono tuttavia dall'attività del pacemaker centrale poiché, in

new circulating biomarkers of metabolic alterations caused by specific work conditions. During our health surveillance we enrolled more than 100 workers and categorizing them for night-shift and radio-exposure conditions. Anamnestic and anthropometric data, serum biochemical indices and whole blood for PBMSCs isolation were collected. The preliminary data suggest a feasible relationship of night shift condition and/or radio-exposure with hepatic steatosis. Therefore, further investigations will be performed by gene expression profiling.

Key words: circadian rhythms, metabolic syndrome, gene expression, work.

vitro, si attenuano fino a bloccarsi dopo 2-7 cicli nel fegato, nei polmoni e nei muscoli scheletrici, in assenza del contributo del SCN (5).

Studi successivi hanno descritto come i tessuti periferici isolati siano in grado di sostenere autonomamente una periodicità circadiana per oltre 20 cicli. Infatti, gli organi periferici mostrano differenze tessuto-specifiche nel ritmo e nella fase circadiana e, le lesioni del SCN, non resettano la ritmicità circadiana, ma desincronizzano solo i tessuti periferici. Pertanto, gli organi periferici esprimono almeno un oscillatore circadiano parzialmente autonomo (6). Tale comportamento circadiano è stato osservato anche in vitro in diversi tipi di cellule (7) e in espianti di tessuto da quasi

tutti gli organi (8). È interessante notare che il cervello stesso possiede la propria oscillazione circadiana nell'espressione di diversi geni che sembra essere indipendente dall'attività del SCN (9).

È stato dimostrato che diversi ormoni presentano oscillazioni giornaliere e, tra questi, i principali sono la melatonina, il cortisolo, gli steroidi gonadici, la prolattina, l'ormone tiroideo e l'ormone della crescita (GH). I cosiddetti ormoni sensibili ai nutrienti, cioè insulina, leptina, grelina e adiponectina oscillano anche su base circadiana e, il loro rilascio, è almeno in parte regolato da stimoli ambientali, come alimentazione e cicli luce-buio (10).

La comprensione dell'influenza dell'orologio circadiano sulla regolazione del metabolismo è notevolmente migliorata, ma il numero di geni controllati dall'orologio molecolare è ampio.

Un ruolo centrale è stato attribuito a *SIRT1*, un membro della famiglia delle deacetilasi *SIRT* (11). *SIRT1* modula l'espressione ritmica di numerosi geni controllati dai ritmi circadiani (12). La mancata espressione o l'inibizione farmacologica di *SIRT1* desincronizza il ciclo circadiano: quindi *SIRT1* potrebbe svolgere un ruolo centrale nel controllo dell'orologio circadiano, percependo le alterazioni dei metaboliti a livello cellulare (13).

L'*AMPK* è un complesso multiproteico che svolge un ruolo centrale nella regolazione del metabolismo come sti-

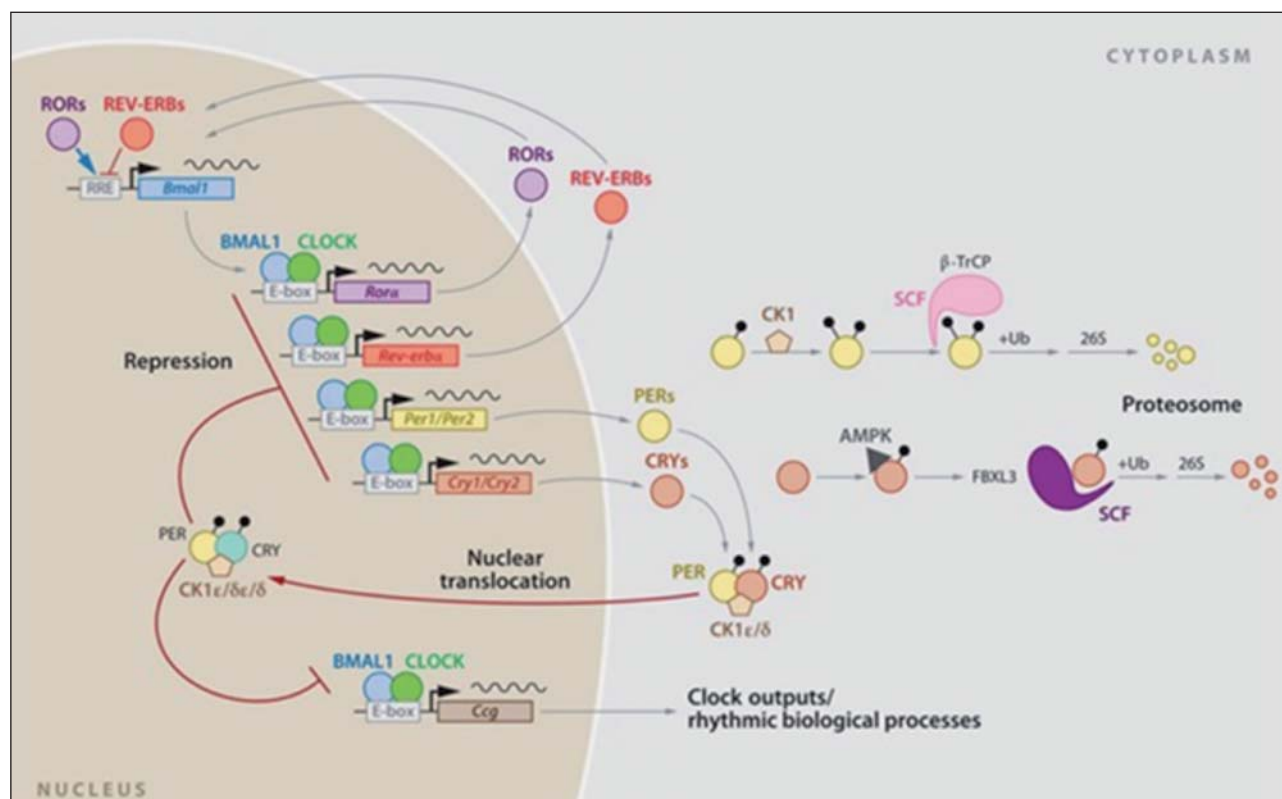


Figura 1. Meccanismo molecolare dell'orologio circadiano nei mammiferi. Differenti feedback loops inducono sia la trascrizione che l'inibizione dei clock genes. Il ciclo di feedback positivo è regolato da CLOCK e BMAL1, mentre il ciclo di feedback negativo è regolato da PER1 / PER2 e CRY1 / CRY2. La regolazione delle proteine dell'orologio circadiano è data da meccanismi post-traduzionali come la fosforilazione da parte della chinasi caseina chinasi 1 ϵ / δ (CK1 ϵ / δ), della proteina chinasi attivata da adenosina monofosfato (AMPK) e da SCF (scatola Skp1-Cullin-F proteina), da complessi di ubiquitinazione E3 che coinvolgono β -TrCP e FBXL3. Ub (ubiquitinazione), 26S (complesso del proteasoma 26S), RRE (elemento di risposta retinoico), ROR (recettori orfani retinoici), Ccg (geni controllati dall'orologio). Tratto da (4).

molatore delle pathways cataboliche e inibitore di quelle anaboliche. Una delle sue subunità regolatorie, *ampk β 2*, è espressa con ritmicità circadiana, il che si traduce in una traslocazione periodica nel nucleo, dove fosforila direttamente *CRY1* in associazione con la chinasi *LKB*. Questa fosforilazione determina la degradazione del proteasoma *CRY1* (14) (10).

BMAL1 e *CLOCK* sono molto importanti per la regolazione dell'omeostasi del glucosio e dei trigliceridi. La gluconeogenesi, per esempio, è inibita dalla delezione di *Bmal1* e ridotta nei mutanti *Clock*. Inoltre, una dieta ad alto contenuto di grassi è in grado di ampliare le oscillazioni circadiane nella sensibilità all'insulina e nella tolleranza al glucosio (15). L'orologio circadiano, inoltre, controlla anche la gluconeogenesi epatica, che durante il digiuno è avviata dalla fosforilazione *cAMP*-mediata, della proteina di legame degli elementi di risposta all'*cAMP* (*CREB*). L'attività di *CREB* è regolata durante il digiuno da *Cry1* e *Cry2*. L'espressione di *Cry1* è elevata durante la transizione notturna, quando a digiuno, riduce l'espressione del gene della gluconeogenesi, inibendo l'aumento mediato dal glucagone nelle concentrazioni di *cAMP* intracellulare e la fosforilazione mediata dalla protein-chinasi di *CREB*. Poiché la over espressione epatica di *Cry1* riduce la concentrazione di glucosio nel sangue e migliora

la sensibilità all'insulina nei topi insulino-resistenti, gli *enhancers* dell'attività molecolare dei criptocromi potrebbero essere considerati come agenti terapeutici utili per il diabete di tipo 2 (16).

L'associazione tra orologio circadiano e metabolismo è stata ulteriormente confermata da studi che hanno dimostrato che il fattore di trascrizione maggiormente controllato dal punto di vista metabolico *REV-ERB α* è fondamentale per la sincronizzazione dell'orologio circadiano (17). Gli agonisti sintetici di *REV-ERB α* sono stati infatti proposti come regolatori positivi per le malattie metaboliche. Nei topi trattati con gli agonisti sintetici di *REV-ERB*, l'espressione circadiana dei geni metabolici nel fegato, nei muscoli scheletrici e nel tessuto adiposo è stata modificata, portando ad un aumento del dispendio energetico. Infatti, topi obesi trattati con agonisti di *REV-ERB* hanno mostrato una diminuzione della massa grassa e una migliore iperglicemia e dislipidemia (18).

Una varietà di studi ha indagato su come specifici componenti della dieta possono modulare l'attività dell'orologio circadiano. Le diete variano sostanzialmente nel tipo e nella quantità di macro e micronutrienti che possono essere usati come *zeitgebers* per l'orologio (Figura 2) (19).

In uno studio progettato per testare l'impatto di una dieta a basso contenuto di carboidrati / alto contenuto di

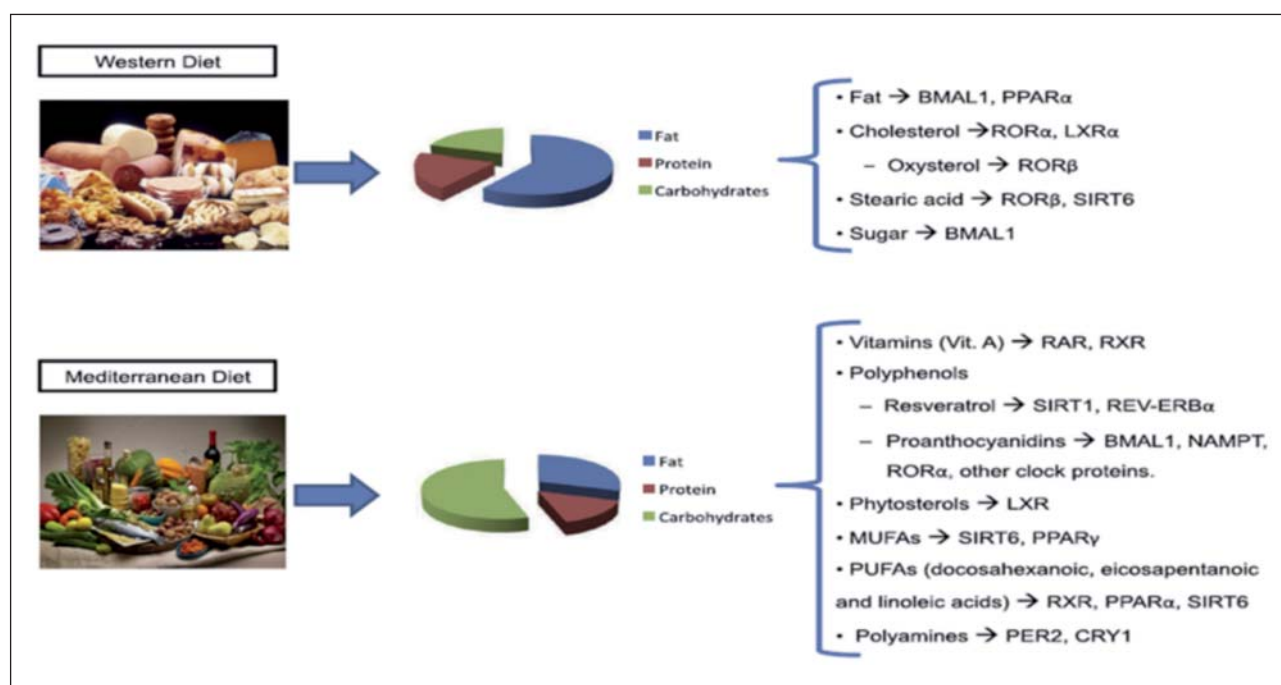


Figura 2. La composizione della dieta produce diversi *zeitgeber* per l'orologio. Prodotti alimentari tipici della cosiddetta "dieta occidentale", generalmente costituita da cibi ad alto contenuto di grassi saturi combinati con un alto contenuto di zucchero e, prodotti alimentari tipici della cosiddetta "dieta mediterranea", che è costituita da una percentuale più elevata di verdure e alimenti principalmente ricchi di grassi mono e polinsaturi. Ognuna di queste diete produce macromolecole e metaboliti noti per funzionare come *zeitgebers* per l'orologio circadiano in vari tipi di tessuti e cellule. Mentre i lipidi e il colesterolo sono noti per modulare PPAR γ , ROR α , LXR e ROR β , i grassi (in particolare quelli che influenzano la sensibilità all'insulina nel tempo) e l'alta glicemia probabilmente modulano l'attività di BMAL1 in modo dipendente da GSK3 β . È stato osservato che l'acido stearico modula la proteina SIRT6 (che si lega direttamente a CLOCK: BMAL1). Diverse diete, portano ad un aumento dei "clock *zeitgebers*" tra cui vitamina A (nota per attivare RAR e RXR), polifenoli come il resveratolo (attivatore di SIRT1) e proantocianidine (regolatori o modulatori di Bmal1, Nampt e molti altri geni di clock). Ulteriori ligandi o modulatori delle proteine correlate all'orologio circadiano o ai recettori nucleari della ritmicità includono poliammine (regolatori del PER2: complesso CRY1), MUFA e PUFA (modulatori di SIRT6, PPAR γ , RXR e PPAR α) e fitosteroli (modulatori di LXR) (19).

grassi, rispetto ad una dieta con basso contenuto di grassi / alto contenuto di carboidrati, sull'orologio circadiano umano, si è constatato che il passaggio da una dieta a basso contenuto di carboidrati / alto contenuto di grassi, ad una dieta ricca di grassi / basso contenuto di carboidrati causa un ritardo di fase nei livelli di cortisolo salivare (indicativo di un periodo centrale più lungo) e, un'alterata espressione genica a livello periferico, come misurato attraverso l'espressione genica nei monociti circolanti (20).

In effetti, alcuni studi hanno dimostrato che i componenti funzionali dell'orologio possono essere misurati anche a livello delle cellule mononucleate del sangue (PBMC) e, quindi, possono svolgere un ruolo definito nel controllo fisiologico del sistema immunitario circadiano. In questo studio è stato dimostrato che vi è una significativa fluttuazione dei livelli di mRNA di *hPer* attraverso la fase circadiana nei PBMC umani (21). È stato dimostrato anche che l'espressione di *hPer2* nei PBMC è significativamente diversa al mattino e alla sera, che l'oscillazione circadiana che osserviamo non è spiegata dall'alterazione dell'esposizione alla luce, all'assunzione di cibo o allo stress, ma l'oscillazione dei geni clock nei PBMC è presente anche in assenza di episodi di sonno / oscurità, un'osservazione che supporta la sua natura endogena (22).

Pertanto, abbiamo deciso di indagare le variazioni di espressione genica a livello dei PBMCs di operatori sanitari al fine di individuare nuovi markers circolanti associati ad alterazioni metaboliche dovute a condizioni lavorative di variazioni del ritmo circadiano.

Nel corso della sorveglianza sanitaria espletata nel periodo aprile 2016 - novembre 2017, sono stati reclutati con criterio random oltre 100 operatori sanitari tra infermieri e dirigenti medici, tenendo in considerazione le condizioni di turnista e radioesposto. Sono stati raccolti dati anamnestici, antropometrici, indici biochimici-sierici e sangue intero per l'isolamento dei PBMCs. I dati preliminari suggeriscono che possa esistere una relazione tra le condizioni di turnista e/o radioesposizione con la presenza di steatosi epatica. Ulteriori dati saranno ricavati dalle successive analisi di espressione genica.

Bibliografia

- 1) Dunlap JC, Loros, DeCoursey PJ. Chronobiology: Biological Timekeeping. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, USA. 2009.
- 2) Arellanes-Licea E, Caldelas I, De Ita-Pérez, et al. The circadian timing system: a recent addition in the physiological mechanisms underlying pathological and aging processes. *M Aging Dis* 2014 Jan 9;5(6):406-18. doi: 10.14336/AD.2014.0500406. eCollection 2014 Dec. Review. PMID: 25489492
- 3) Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002; 418: 935-941.
- 4) Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS. Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu Rev Neurosci* 2012; 35:445-462.
- 5) Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, et al. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 5339-5346.
- 6) Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 1998; 93: 929-937.
- 7) Brown SA, Fleury-Olela F, Nagoshi E, et al. The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. *PLoS Biol* 2005; 3: e338. (Yagita K, Tamanini F, van Der Horst GT, Okamura H. Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science* 2001; 292: 278-281.
- 8) Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 1998, 93, 929-937. Granados-Fuentes D, Saxena MT, Prolo LM, Aton SJ, Herzog ED. Olfactory bulb neurons express functional, entrainable circadian rhythms. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 898-906.
- 9) Granados-Fuentes D, Prolo L.M, Abraham U, et al. The suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain, circadian rhythmicity in the olfactory bulb. *J Neurosci* 2004; 24: 615-619. Granados-Fuentes D, Tseng A, Herzog ED. A circadian clock in the olfactory bulb controls olfactory responsivity. *J Neurosci* 2006; 26: 12219-12225.
- 10) Gnocchi D, Bruscalupi G. Circadian Rhythms and Hormonal Homeostasis: Pathophysiological Implications. *Biology (Basel)* 2017 Feb 4; 6(1): pii: E10. doi: 10.3390/biology6010010. Review. PMID:28165421
- 11) Chalkiadaki A, Guarente L, Sirtuins. Mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8: 287-296.
- 12) Belden WJ, Dunlap JC. SIRT1 is a circadian deacetylase for core clock components. *Cell* 2008; 134: 212-214.
- 13) Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, et al. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* 2008; 134: 329-340.
- 14) Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, et al. AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science* 2009; 326: 437-440.
- 15) Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, et al. Two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol* 2004; 2: e377.
- 16) Zhang E.E, Liu Y, Dentin R, et al. Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nat Med* 2010, 16, 1152-1156.
- 17) Yin L, Wu N, Curtin JC, et al. Rev-erbalpha, a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. *Science* 2007; 318: 1786-1789.
- 18) Solt LA, Wang Y, Banerjee, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature* 2012; 485: 62-68.
- 19) Ribas-Latre A, Eckel-Mahan K. Interdependence of nutrient metabolism and the circadian clock system: Importance for metabolic health. *Mol Metab* 2016 Jan 14; 5(3): 133-152.
- 20) Pivovarova O, Jürchott K, Rudovich N, et al. Changes of Dietary Fat and Carbohydrate Content Alter Central and Peripheral Clock in Humans. *J Clin Endocrinol Metab J Clin Endocrinol Metab* 2015 Jun; 100(6): 2291-302.
- 21) Boivin DB, James FO, Wu A, et al. Circadian clock genes oscillate in human peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 2003 Dec 1; 102(12): 4143-5. Epub 2003 Jul 31.
- 22) Takata M, Burioka N, Ohdo S, et al. Daily expression of mRNAs for the mammalian Clock genes *Per2* and *clock* in mouse suprachiasmatic nuclei and liver and human peripheral blood mononuclear cells. *Jpn J Pharmacol* 2002 Nov; 90(3): 263-9.

Corrispondenza: Luigi Vimercati, Dipartimento Interdisciplinare di Medicina, Sezione di Medicina del Lavoro 'B. Ramazzini', Università di Bari Aldo Moro, Policlinico, Piazza Giulio Cesare 11, 70124 Bari, Italy, Tel. ++390805478216, E-mail: luigi.vimercati@uniba.it