

mgr inż. Kinga Gawlińska

Zakład Farmakologii Uzależnień

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotor: **prof. dr hab. Edmund Przegaliński**

Promotor pomocniczy: **dr hab. Michał Korostyński**

Tytuł pracy doktorskiej:

***Wpływ zmodyfikowanej diety matki na fenotyp potomstwa:
korelacje behawioralne i molekularne***

***Influence of modified maternal diet on the phenotype of offspring:
behavioral and molecular correlations***

STRESZCZENIE

Narastające na przestrzeni ostatnich dekad globalne obciążenie medyczne, społeczne i ekonomiczne wywołane zaburzeniami psychicznymi i neurorozwojowymi skłania do intensywnego poszukiwania patomechanizmów rozwoju mózgu, celów molekularnych dla projektowania nowych leków, a także wczesnych markerów biologicznych lub metod prewencji. Coraz częściej wśród potencjalnych przyczyn rozwoju chorób na kolejnych etapach życia (od dzieciństwa do starości) rozpatruje się niekorzystne warunki rozwoju w okresie ciąży i laktacji, w tym brak zbilansowanej diety matki.

Głównym celem niniejszej pracy była ocena wpływu trzech zmodyfikowanych rodzajów diet matki: *i*) wysokotłuszczowej, *ii*) wysokowęglowodanowej (bogatej w sacharozę oraz *iii*) mieszanej (o zwiększonej zawartości tłuszczu i węglowodanów) spożywanych w okresie ciąży i laktacji na predyspozycję rozwoju zaburzeń behawioralnych (ocena zachowań podobnych do depresji, prołękowych, pamięci oraz zaburzeń interakcji socjalnych i zachowań repetytywnych) oraz zmian molekularnych w mózgu u szczurzego potomstwa obu płci na przestrzeni ich życia.

Wśród najważniejszych obserwacji wykazano, że zarówno młode, jak i dorosłe potomstwo obu płci, eksponowane na matczyną dietę wysokotłuszczową wykazywało zachowania podobne do depresji, w tym anhedonię, a także zaburzenia prawidłowego funkcjonowania pamięci krótkotrwałej tylko u samic. Dokonane obserwacje behawioralne wskazały również na silny związek między ekspozycją na matczyną dietę bogatą w tłuszcz w okresie rozwoju wewnątrzmacicznego i wczesnego postnatalnego, a zwiększoną predyspozycją wystąpienia fenotypu podobnego do autyzmu u młodego potomstwa płci męskiej, manifestującego się zaburzeniami interakcji socjalnych oraz nasileniem zachowań repetytywnych.

Poszukując molekularnego podłoża obserwowanych zmian behawioralnych uwagę skoncentrowano na korze przedczołowej, korze czołowej i hipokampie – regionach mózgu odgrywających istotną rolę w patogenezie depresji i spektrum zaburzeń autystycznych. Analizy danych z sekwencjonowania nowej generacji wskazały, że wśród badanych diet, matczyzna dieta wysokotłuszczowa powodowała najszersze spektrum zmian w poziomach abundancji mRNA w korze czołowej młodego potomstwa. Zaburzała ona między innymi ekspresję genów kodujących składniki synaps dopaminergicznych i glutaminianergicznych oraz białka uczestniczące w sygnalizacji Wnt i aksonogenezie. Zaobserwowano również istotne zmiany w ekspresji korowych markerów neuronów pobudzających i hamujących. W przeciwieństwie do istotnych zmian na poziomie regulacji ekspresji genów, modyfikacje w zakresie receptorów 5-HT_{2A} i 5-HT_{2C}, cytokin prozapalnych, BDNF i iryzyny wydają się nie odgrywać istotnej roli w rozwoju zachowań podobnych do depresji u potomstwa powiązanych z matczyną dietą bogatą w tłuszcz. Jednocześnie wysokotłuszczowe środowisko wczesnego rozwoju skutkowało wzrostem ekspresji wielu genów związanych z patogenezą spektrum zaburzeń autystycznych w regionach korowych młodego potomstwa płci męskiej, prowadząc do wzrostu poziomu białek ANKRD11, EIF4E, SETD1B, SHANK1 i TAOK2. Czynniki zewnętrzne zmieniające środowisko rozwoju wewnątrzmacicznego i wczesnego dzieciństwa mogą znacząco wpływać na fenotyp potomstwa w późniejszym życiu poprzez modyfikację jego epigenomu. Matczyzna dieta wysokotłuszczowa zależnie od badanego regionu mózgu, wieku i płci potomstwa zwiększała lub zmniejszała poziom globalnej metylacji DNA, wpływając również na poziom metylotransferazy DNA 3B (enzymu odpowiedzialnego za metylację DNA). W korze przedczołowej potomstwa eksponowanego na matczyną dietę bogatą w tłuszcz obserwowano również wzrost ekspresji, krótkich niekodujących RNA (miR-17, miR-20a,

miR-423 i miR-494), które mogą uczestniczyć w regulacji poziomów analizowanych białek (SHANK1 i TAOK2).

Dieta matki w okresie ciąży i laktacji jest ważnym elementem odpowiadającym za prawidłowy rozwój potomstwa. Wśród badanych diet, matczyna dieta bogata w tłuszcz jest czynnikiem o najszerszym spektrum konsekwencji dla prawidłowego rozwoju mózgu potomstwa. Wysokotłuszczowe środowisko rozwoju wewnątrzmacicznego i wczesnego dzieciństwa zwiększa predyspozycję rozwoju zaburzeń behawioralnych, w tym zachowań prodepresyjnych i charakterystycznych dla spektrum zaburzeń autystycznych. Brak zbilansowanej diety matki skutkuje również licznymi zmianami na poziomie transkrypcji, translacji oraz mechanizmów epigenetycznych, które mogą przyczyniać się do obserwowanych zmian zachowania. Warto podkreślić różnorodność obserwowanych zmian molekularnych w zależności od badanego regionu mózgu, wieku i płci potomstwa, świadczących o złożoności zachodzących procesów w trakcie i po ekspozycji na zmodyfikowany pokarm matki. Ze względu na istotne różnice w otrzymanych wynikach pomiędzy samicami i samcami, słuszne jest prowadzenie badań z wykorzystaniem zwierząt obu płci. Dokładne poznanie znaczenia środowiskowego programowania płodu przez pokarm matki może przyczynić się do prewencji chorób psychicznych i neurorozwojowych w przyszłości.

ABSTRACT

The global medical, social, and economic burden caused by mental and neurodevelopmental disorders, which has been increasing over the past decades, has prompted an intensive search for pathomechanisms of brain development, molecular targets for the design of new drugs, as well as early biological markers or methods of prevention. Overall, unfavorable development conditions during pregnancy and lactation are being considered more frequently among the potential causes of the development of diseases at subsequent stages of life (from childhood to old age), including the lack of a balanced diet of the mother.

The main aim of this study was to assess the impact of three modified maternal diets: *i*) high-fat, *ii*) high-carbohydrate (rich in sucrose), and *iii*) mixed (enriched in fat and carbohydrates) consumed during pregnancy and lactation for the predisposition to develop behavioral disorders (evaluation of depressive- and anxiety-like behaviors, memory disturbances and disorders of social interactions and repetitive behaviors) and molecular changes in the brain of rat offspring of both sexes throughout their lives.

Among the most important observations, it was shown that both adolescent and adult offspring of both sexes exposed to the maternal high-fat diet showed depressive-like behaviors, including anhedonia, as well as disturbances in the proper functioning of short-term memory in females. The behavioral observations also showed a strong relationship between exposure to a maternal diet rich in fat during intrauterine and early postnatal development, and an increased predisposition to develop an autistic-like phenotype in young male offspring, manifested by social interaction disorders and the intensification of repetitive behaviors.

Searching for the molecular basis of the observed behavioral changes, attention was focused on the prefrontal cortex, the frontal cortex, and the hippocampus – brain regions that play an important role in the pathogenesis of depression and the autism spectrum disorder. Analyses of next generation sequencing data indicated that, among diets studied, the maternal high-fat diet caused the broadest spectrum of changes in mRNA abundance levels in the frontal cortex of adolescent offspring. It disturbed, *inter alia*, the expression of genes encoding components of dopaminergic and glutamatergic synapses as well as proteins involved in Wnt signaling and axonogenesis. Significant changes in the expression of cortical markers of excitatory and inhibitory neurons were also observed. Contrary to significant changes

in the regulation of gene expression, modifications in the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors, proinflammatory cytokines, BDNF, and irisin do not seem to play a significant role in the development of depressive-like behavior in offspring exposed to a maternal diet rich in fat. At the same time, the high-fat environment of early development resulted in an increase in the expression of many genes related to the pathogenesis of the autism spectrum disorder in the cortical regions of young male offspring, leading to an increase in the protein levels of ANKRD11, EIF4E, SETD1B, SHANK1, and TAOK2. External factors altering the environment of intrauterine development and early childhood can have a profound effect on the phenotype of the offspring later in life by modifying their epigenome. The maternal high-fat diet, depending on the brain region examined, age, and sex of the offspring, increased or decreased the level of global DNA methylation, also influencing the level of DNA methyltransferase 3B (the enzyme responsible for DNA methylation). Within the prefrontal cortex of offspring exposed to maternal high-fat diet, an increase in expression of short non-coding RNAs (miR-17, miR-20a, miR-423, and miR-494), which may participate in the regulation of the levels of the analyzed proteins (SHANK1 i TAOK2), was also observed.

The maternal diet during pregnancy and lactation is an important factor responsible for the proper development of the offspring. Among the studied diets, a maternal diet rich in fat is the factor with the broadest spectrum of negative consequences for the proper development of the offspring's brain. A high-fat environment of intrauterine development and early childhood increases the predisposition for the development of behavioral disorders, including depressive-like behaviors and those characteristic of the autism spectrum disorder. The lack of a balanced maternal diet also results in numerous changes in the level of transcription, translation, and epigenetic mechanisms that may contribute to the observed behavioral changes. It is worth emphasizing the diversity of the observed molecular changes depending on the studied region of the brain, age, and sex of the offspring, which proves the complexity of the processes taking place during and after exposure to the maternal modified diet. Due to the significant differences in the obtained results between females and males, it is appropriate to conduct research with the use of animals of both sexes. Understanding the importance of environmental programming of the fetus through maternal diet may contribute to the prevention of mental and neurodevelopmental diseases in the future.