# **STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ:**

**Badania wpływu adrenaliny i melatoniny na przebieg reakcji odpornościowej karpia**

Magdalena Kępka

Rozprawa doktorska

wykonana pod opieką

dr hab. Magdaleny Chadzińskiej

w Zakładzie Immunologii Ewolucyjnej

Instytutu Zoologii

# **STRESZCZENIE**

Wzajemne oddziaływania pomiędzy układem neuro-endokrynnym i odpornościowym wynikają z wrażliwości komórek organizmu na te same mediatory – neuroprzekaźniki, hormony, cytokiny oraz z obecności wiążących je receptorów. Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu ligandów receptorów związanych z białkami G (adrenaliny i melatoniny) na żywotność i aktywność leukocytów karpia w warunkach *in vitro* i *in vivo* podczas wywołanego zymosanem zapalenia jamy otrzewnej.

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie w pierwszej kolejności dotyczyły poznania mechanizmów pobudzenia i regulacji apoptozy leukocytów karpia podczas immunostymulacji *in vitro* i *in vivo*. Szczególnie skupiono się na roli reaktywnych form tlenu (ROS) w tym procesie (rozdział II.1). Stwierdzono, że stymulacja komórek *in vitro* zymosanem i estrem forbolu (PMA) pobudza produkcję ROS, prowadzi do utraty potencjału mitochondrialnego i do apoptozy. Jednak tylko wywołana zymosanem apoptoza zależna była od aktywacji oksydazy NADPH. Natomiast w przypadku obydwu stymulantów zahamowanie apoptozy obserwowano po inkubacji komórek z inhibitorem kinaz białkowych. Również w warunkach *in vivo*, obserwowano, że wysiękowe neutrofile i monocyty/makrofagi podlegają apoptozie, a proces ten jest prawdopodobnie niezależny od oksydazy NADPH.

W niniejszej pracy (rozdział II.2) wykazano także, że adrenalina podana wraz z wywołującym zapalenie zymosanem, nie wpływa na liczbę leukocytów w ognisku zapalenia, ale zmienia ich skład komórkowy. Wywołany adrenaliną spadek liczby wysiękowych monocytów/makrofagów najprawdopodobniej wynikał zarówno z osłabienia ich migracji (co tłumaczyć można było obniżeniem ekspresji genu dla chemokiny CXCa/CXCL8\_L1 i jej receptorów CXCR1 i CXCR2), jak również ze zwiększenia poziomu ich apoptozy.

W rozdziale II.3 przedstawiono wyniki na temat wpływu melatoniny na przebieg reakcji odpornościowej karpia. Stwierdzono, że narządy limfatyczne i leukocyty nerki głowowej karpia wykazują ekspresję melatoninowego receptora MT1. Sugeruje to możliwość bezpośredniego oddziaływania melatoniny na leukocyty karpia. Nie stwierdzono jednak by stymulacja leukocytów *in vitro* i *in vivo* wpływała na ekspresję MT1.

Zaobserwowano, że melatonina modulowała aktywność fagocytów karpia *in vitro*, promując ich przeżycie poprzez hamowanie procesu późnej apopotozy, stymulując ekspresję cytokin prozapalnych TNF-α i IL-12p35 oraz hamując migrację komórek w kierunku chemokin CXC i ekspresję genów chemokiny CXCa/CXCL8\_L1 i receptora chemokinowego CXCR3. Melatonina odgrywała również istotną funkcję w przebiegu odczynu zapalnego, obniżając liczbę neutrofili i limfocytów wysiękowych, najprawdopodobniej poprzez związane z obniżeniem ekspresji genu chemokiny CXCa/CXCL8\_L1, zahamowanie ich chemotaksji, (rozdział II.3).

Wyniki niniejszej pracy wskazują więc, że adrenalina i melatonina wpływają na procesy migracji i apoptozy leukocytów karpia zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. O ile w przypadku migracji/napływu leukocytów i ekspresji genów dla chemokin i ich receptorów oba ligandy działają hamująco, co skutkuje zmniejszeniem liczby odpowiednio monocytów/makrofagów i neutrofili w ognisku zapalenia, o tyle efekt działania obydwu hormonów na proces apoptozy leukocytów jest odmienny. Melatonina obniża, a adrenalina zwiększa proces apoptozy leukocytów karpia.

# **ABSTRACT**

The interactions between neuro-endocrine and immune systems result from the cells sensitivity to the same mediators - neurotransmitters, hormones, cytokines and from the presence of their receptors in/on the cells. The aim of this study was to investigate the effect of adrenaline and melatonin (ligands of G-protein coupled receptors) on the survival and activity of carp leukocytes both *in vitro* and *in vivo* during the zymosan-induced peritonitis.

The studies presented in this thesis in the first place focused on the effects of leukocyte stimulation on the initiation and regulation of apoptosis, with special attention directed toward role of reactive oxygen species (ROS) in this process (Chapter II.1). It was found that *in vitro* treatment of cells with zymosan and phorbol ester (PMA) stimulates the production of ROS, leads to loss of mitochondrial membrane potential and to apoptosis. However, only zymosan-induced apoptosis was NADPH oxidase-dependent, while in the case of both stimulants neutrophil apoptosis was inhibited by protein kinases inhibitor. It was observed moreover, that *in vivo* inflammatory neutrophils and monocytes/macrophages undergo apoptosis, that most probably is NADPH oxidase-independent process.

Chapter II.2 presents study concerning the effects of adrenaline on the inflammatory response. It was found that adrenaline injected together with inflammation inducer – zymosan, did not affect the number of inflammatory leukocytes, but it changed the cells composition in the focus of inflammation. Observed upon adrenaline-treatment decreased number of inflammatory monocytes/macrophages was probably due to the inhibition of cell migration (which could be explained by the decrease in chemokine and chemokine receptors gene expression - CXCL8\_L1, CXCR1 and CXCR2), as well as by the increase of apoptosis.

In the Chapter II.3 the role of melatonin in the modulation of carp immune response *in vitro* and *in vivo* was analyzed. The presence of melatonin receptor MT1 in/on carp lymphoid organs and head kidney leukocytes suggested the possibility of direct influence of melatonin on carp immune response. Moreover, *in vitro* and *in vivo* immunstimulation did not change MT1 gene expression in carp leukocytes.

Melatonin modulated activity of carp phagocytes by promoting their survival (through downregulation of late apoptosis), by stimulation of the expression of pro-inflammatory cytokines (TNF-α and IL-12p35) and by inhibition of cell migration towards to CXC chemokines, downregulation of chemokine CXCa/CXCL8\_L1 and chemokine receptor CXCR3 gene expression. Melatonin also reduced the number of inflammatory neutrophils and lymphocytes *in vivo*, most likely by inhibition of chemotaxis, associated with decreased chemokine CXCa/CXCL8\_L1 gene expression (Chapter II.3).

Our results therefore indicate that adrenaline and melatonin affects in carp leukocyte migration and apoptosis both *in vitro* and *in vivo*. Both ligands inhibit the migration/influx of leukocytes and downregulate gene expression of chemokines. Furthermore, adrenaline and melatonine reduce the number of monocytes/macrophages and neutrophils in the focus of inflammation, respectively, whereas their influence on cell apoptosis is opposite. Melatonin inhibits, while adrenaline increases apoptosis of carp leukocytes.