

**mgr Katarzyna Curzytek**

Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej

Instytut Farmakologii im. J. Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotor: **prof. dr hab. Marta Kubera**

**Badanie wpływu leków przeciwdepresyjnych na przebieg reakcji nadwrażliwości kontaktowej w modelach zwierzęcych i z zastosowaniem linii komórkowych HaCaT i JAWSII**

**STRESZCZENIE**

Nieustanna industrializacja, wzrost zanieczyszczenia środowiska i powszechne stosowanie różnorodnych substancji chemicznych w otoczeniu człowieka, przyczyniają się do wywoływania u ludzi nadwrażliwości typu późnego (DTH, ang. Delayed Hypersensitivity). DTH jest reakcją układu odpornościowego typu komórkowego na antygeny. Najczęściej występującym typem DTH u ludzi, jest alergiczne kontaktowe zapalenie skóry (ACD, ang. Allergic Contact Dermatitis), które rozwija się w miejscu ekspozycji na niskocząsteczkowe związki, zwane haptenami. ACD występuje u 15 – 20% populacji, a zmiany skórne tego typu stanowią około 30% chorób zawodowych. Do wnikliwego poznania przebiegu i mechanizmu ACD przyczyniło się wykorzystanie reakcji nadwrażliwości kontaktowej (CHS, ang. Contact Hypersensitivity) – zwierzęcego modelu ACD.

Choroba afektywna jedno- lub dwubiegunowa (potocznie zwana depresją) jest jednym z najbardziej powszechnych zaburzeń psychicznych i cały czas notuje się wzrost zachorowań. Według WHO, ponad 264 milionów ludzi w różnym wieku cierpi z powodu depresji. Wysoka częstość występowania w populacji ludzkiej, zarówno zachorowań na ACD, jak i na depresję, powoduje wysokie prawdopodobieństwo współwystępowania tych chorób. To współwystępowanie wynika nie tylko z czystego prawdopodobieństwa, ale także ze wspólnego, prozapalnego podłoża obu jednostek chorobowych. Związek psychiatrii z dermatologią jest dość silny, a ponadto obukierunkowy. Ocenia się, że objawy z kręgu zaburzeń lękowych i depresyjnych dotyczą nawet 30 – 60 % pacjentów dermatologicznych, co przyczyniło się do powstania nowej dziedziny w medycynie, psychodermatologii, jak również stosowania leków przeciwdepresyjnych (LPD) u tych pacjentów.

Pomimo intensywnych badań, molekularny mechanizm działania leków przeciwdepresyjnych nie jest do końca poznany, zwłaszcza w odniesieniu do komórek układu odpornościowego.

Celem badań przeprowadzonych w niniejszej rozprawie było sprawdzenie czy leki przeciwdepresyjne o zróżnicowanym mechanizmie działania (fluoksetyna, dezypramina, imipramina) będą efektywnie hamowały reakcję nadwrażliwości kontaktowej, zarówno w modelach *in vivo*, jak i *in vitro*.

Reakcję CHS w badaniach *in vivo* przeprowadzono z udziałem dwóch szczepów myszy (CBA i Balb/c) o zróżnicowanym haplocybie (odpowiednio H-2<sup>k</sup> i H-2<sup>d</sup>) immunizowanych różnymi haptenami (odpowiednio 2,4,6-trinitro-1-chlorobenzenem (TNCB; chlorkiem pikrylu, PCL) oraz 2,4-dinitrofluorobenzenem (DNFB)) co w konsekwencji stanowiło o różnicach w profilu efektorowych limfocytów T. Mianowicie, u myszy CBA reakcja CHS na aplikację PCL przebiega głównie przy współdziałaniu limfocytów Th1 CD4<sup>+</sup>, a u myszy Balb/c w odpowiedzi na DNFB w fazie efektorowej reakcji dominują limfocyty Tc1 CD8<sup>+</sup>. Ponadto w kolejnym etapie badań wykorzystaliśmy szczep myszy B10.PL (haplotyp H-2<sup>u</sup>) i myszy knock-out wywodzące się z niego, pozbawione poszczególnych populacji limfocytów: TCRδ<sup>-/-</sup> (myszy nieposiadające limfocytów T z receptorem TCRγδ), CD1d<sup>-/-</sup> (myszy nieposiadające limfocytów NKT zależnych od CD1d) oraz B2m<sup>-/-</sup> (myszy nieposiadające populacji limfocytów T CD8<sup>+</sup>). U wszystkich zwierząt reakcję CHS indukowano poprzez aplikację haptenu na ogoloną skórę brzucha, a miejscem ponownej aplikacji haptenu w celu wywołania reakcji CHS (4 dni później) i pomiaru natężenia tej reakcji (24 godziny później), była małżowina uszna. Fluoksetynę i dezypraminę podawano dootrzewnowo zwierzętom przez 14 dni (w dawce 10 mg/kg m.c.), podania LPD rozpoczynano 9 dni przed indukcją reakcji CHS.

W modelu *in vivo* reakcji CHS dowiedziono, że fluoksetyna i dezypramina hamują z bardzo wysoką, około 50% skutecznością, reakcję nadwrażliwości kontaktowej na hapteny u myszy, niezależnie od tego, jaki rodzaj limfocytów efektorowych T (CD4<sup>+</sup> czy CD8<sup>+</sup>) przeważał w fazie elicytacji reakcji. Ponadto badania przeprowadzone z udziałem myszy knock-out wykazały, że inhibicyjne działanie leków przeciwdepresyjnych na przebieg reakcji CHS wiąże się z ich oddziaływaniem na populacje limfocytów T CD8<sup>+</sup> i NKT, pozostając bez wpływu na limfocyty Tγδ. To hamujące działanie fluoksetyny i dezypraminy na przebieg reakcji CHS wiązało się również z ich wpływem na szereg parametrów odpowiedzi immunologicznej. LPD hamowały, podwyższoną CHS, spontaniczną i stymulowaną mitogেনem aktywność proliferacyjną (mierzoną testem inkorporacji [<sup>3</sup>H]-tymidyny) i/lub aktywność metaboliczną (mierzoną testem MTT) komórek izolowanych ze śledzion i węzłów

chłonnych badanych zwierząt. LPD powodowały również obniżenie masy takich narządów limfatycznych jak: węzły chłonne pachowe i pachwinowe, grasica i śledziona, podwyższonej w wyniku aplikacji haptenu. Ponadto, dezypramina i fluoksetyna hamowały wydzielanie (przez stymulowane mitogenem komórki śledziony i/lub węzłów chłonnych) cytokin o potencjale prozapalnym (IL-4, IL-6 oraz IFN- $\gamma$ ) i zwiększały wydzielanie przeciwwzapalnej IL-10.

Zaintrygowana wysoką skutecznością użytych leków przeciwdepresyjnych w hamowaniu reakcji CHS u myszy, w dalszej kolejności przeprowadziłam badania *in vitro*, mające na celu zgłębić molekularne mechanizmy działania tych leków, w hodowlach komórkowych ludzkiej linii keratynocytów HaCaT i mysiej linii prekursorów komórek dendrytycznych JAWSII – komórek, które odgrywają kluczową rolę w indukcji, elicytacji oraz regulacji reakcji CHS. Do aktywacji komórek obu linii użyto takich substancji jak: lipopolisacharad (LPS), mieszanina cytokin prozapalnych TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  oraz DNFB, a wśród leków stosowanych w hodowlach komórkowych, badano: fluoksetynę, dezypraminę oraz imipraminę. Stężenia poszczególnych substancji dobrano na podstawie testów biochemicznych, pozwalających określić żywotność komórek (test MTT, LDH).

Ze względu na to, że reakcja nadwrażliwości kontaktowej przebiega w środowisku zwiększonego stężenia wielu cytokin prozapalnych i chemokin, w pierwszej kolejności, przy użyciu techniki ELISA, oceniłam wpływ leków przeciwdepresyjnych na wydzielanie wielu z nich przez stymulowane keratynocyty i komórki dendrytyczne. Zaobserwowałam, że w odpowiedzi na stymulację (głównie za pomocą LPS i mieszaniny cytokin TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ ) komórki obu linii odpowiadają zwiększoną syntezą takich cytokin jak: IL-1 $\beta$  i IL-6, a komórki JAWSII w odpowiedzi na stymulację LPS syntetyzują znaczne ilości IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-12 oraz czynnika wzrostu M-CSF. Zastosowane leki przeciwdepresyjne w poszczególnych stężeniach miały normalizujący wpływ na badane parametry. Ponadto aktywowane stymulacją komórki wydzielały do medium znaczne ilości chemokin. Komórki linii HaCaT pod wpływem LPS i TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  uwalniały do medium znacząco większe ilości chemokin CCL2 (MCP-1) i CXCL8 (IL-8), z tym że leki przeciwdepresyjne działały normalizująco na wydzielanie tylko tej pierwszej, bez wpływu na wydzielanie IL-8. Dodatkowo pod wpływem działania haptenu (DNFB) na komórki HaCaT obserwowano spadek wydzielania MCP-1, nieregulowany zastosowanymi w hodowli lekami przeciwdepresyjnymi. Natomiast, stosując do badań test mikromacierzy białkowych, w hodowlach mysich niedojrzałych komórek dendrytycznych JAWSII stymulowanych za pomocą LPS obserwowano wzrost syntezy chemokin: XCL1, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL5 (RANTES), CXCL5 (LIX), przy czym użyte:

fluoksetyna, dezypramina i imipramina w poszczególnych oznaczeniach, działały normalizująco na wydzielanie: XCL1, CCL2 i CXCL5.

Interesujących wyników dostarczyły badania nad wpływem leków przeciwdepresyjnych na ekspresję cząsteczek adhezyjnych takich jak ICAM-1 i E-kadheryna w stymulowanych komórkach keratynocytów HaCaT. Pod wpływem stymulacji komórek HaCaT obserwowano zarówno wzrost ekspresji genu *Icam-1* (mierzony za pomocą techniki Real Time PCR), jak i wzrost poziomu białka ICAM-1 (mierzony testem ELISA, w lizatach komórkowych), przy czym normalizujące działanie leków przeciwdepresyjnych obserwowano tylko w odniesieniu do pomiarów mRNA *Icam-1*. Spadek ekspresji białka E-kadheryna uzyskano w hodowlach keratynocytów traktowanych LPS, a fluoksetyna w obu użytych stężeniach normalizowała ten spadek. Wszystkie użyte w doświadczeniu czynniki stymulujące wpływały na wzrost ekspresji *Icam-1*, przy czym najsilniejszy wpływ na badany parametr wykazywała mieszanina cytokin TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  (krotność zmiany – ponad 600, w stosunku do komórek z hodowli kontrolnych). Również zastosowane w poszczególnych stężeniach leki przeciwdepresyjne, obniżały ekspresję *Icam-1*. Zaobserwowano wzrost ekspresji białka ICAM-1 po stymulacji LPS i mieszaniną TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ , natomiast użyte leki przeciwdepresyjne nie działały hamująco na ten wzrost. Spadek ekspresji E-kadheryny uzyskano w hodowlach keratynocytów traktowanych LPS, a fluoksetyna w obu użytych stężeniach normalizowała ten spadek. Obserwacje te zostały dodatkowo, jakościowo potwierdzone za pomocą mikroskopii konfokalnej na preparatach sporządzonych z keratynocytów HaCaT. Dodatkowo w preparatach sporządzonych z komórek dendrytycznych JAWSII obserwowano wzrost ekspresji CD18 (składowej LFA-1, liganda dla ICAM-1) spowodowany stymulacją cytokinami TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  i normalizujące działanie użytych leków przeciwdepresyjnych.

W ostatnim etapie badań, stosując technikę Western blot, sprawdzono czy hamujące działanie leków przeciwdepresyjnych na wydzielanie wielu czynników prozapalnych w hodowlach komórkowych, wiązało się z hamowaniem wewnątrzkomórkowych szlaków aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B oraz kinazy p38. Wyniki tych badań nie dały jednoznacznej odpowiedzi na to pytanie. W przypadku białek zaangażowanych w aktywację czynnika jądrowego  $\kappa$ B, obserwowano tendencję do wzrostu aktywacji (ufosforylowania) takich białek jak I $\kappa$ B, podjednostki p65 NF $\kappa$ B czy kinazy NIK po stymulacji komórek obu linii i normalizujące działanie zastosowanych leków przeciwdepresyjnych. Pod wpływem stymulacji komórek HaCaT (LPS lub TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ ) i komórek JAWSII (LPS) dochodzi do aktywacji kinazy p38. Z tym, że pod wpływem działania LPD w keratynocytach HaCaT nie dochodzi do hamowania fosforylacji kinazy p38, a w komórkach dendrytycznych JAWSII,

kinaza p38 jest negatywnie kontrolowana przez wszystkie użyte do badań leki przeciwdepresyjne: fluoksetynę, dezypraminę i imipraminę.

Przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej badania wykazały, że hamujący wpływ leków przeciwdepresyjnych na przebieg uczulenia kontaktowego jest związany nie tylko z wpływem tych leków na różne populacje limfocytów, ale również moduluje odpowiedź stymulowanych keratynocytów i komórek dendrytycznych – komórek tworzących naturalną barierę chroniącą organizm przed szkodliwymi czynnikami środowiska.

## **SUMMARY**

Continuing industrialization, increasing environmental pollution, and common use of various chemical substances in the direct human environment contribute to the development of delayed hypersensitivity (DTH) in people. DTH is a cell-mediated immune response to antigens. Allergic contact dermatitis (ACD) is the most common type of DTH in humans. It develops at the site of exposure to low molecular weight compounds, called haptens. ACD has a prevalence of 15 – 20% in the general population, and skin reactions of this type account for ca. 30 % of occupational diseases. A thorough understanding of the course and mechanism of ACD can largely be attributed to the investigation of contact hypersensitivity (CHS), an animal model of ACD.

Unipolar or bipolar affective disorder (commonly referred to as depression) is one of the most prevalent mental disorders, the incidence of which is constantly on the rise. According to WHO, over 264 million people of different ages suffer from depression.

High incidence of both ACD and depression in the human population makes the co-occurrence of these diseases highly probable, which results from their common pro-inflammatory background. The link between psychiatry and dermatology is quite strong and reciprocal. It has been estimated that symptoms of anxiety and depression spectrum disorders occur even in 30 – 60% of dermatologic patients, which contributed to the development of a new field of medicine, namely psychodermatology, and treatment of these patients with antidepressant drugs (ADs).

Despite intense studies, the molecular mechanism of antidepressant drug action is not fully understood, especially concerning immune cells.

The aim of the studies carried out within the framework of the present thesis was to check whether antidepressant drugs with different mechanisms of action (fluoxetine,

desipramine, imipramine) are able to efficiently inhibit the contact hypersensitivity reaction both in *in vivo* and *in vitro* models.

The studies of CHS reaction *in vivo* were carried out on two mouse strains (CBA and Balb/c) with different haplotypes (H-2<sup>k</sup> and H-2<sup>d</sup>, respectively), immunized with different haptens (2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene, TNCB; picryl chloride, PCL, respectively) and 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) which resulted in different profiles of effector T lymphocytes. In particular, Th1 CD4<sup>+</sup> lymphocytes were mostly responsible for the CHS reaction to PCL application in CBA mice while Tc1 CD8<sup>+</sup> lymphocytes dominated in the effector phase of the response to DNFB in Balbc mice. In addition, at the next stage of research, we used B10.PL mouse strain (haplotype H-2<sup>u</sup>) and derived from this strain, TCR $\delta$ <sup>-/-</sup> knock-out mice (lacking T lymphocytes with TCR $\gamma\delta$  receptor), CD1d<sup>-/-</sup> knock-out mice (lacking CD1d-dependent NKT cells) and B2m<sup>-/-</sup> knock-out mice (lacking T CD8<sup>+</sup> lymphocyte population). In all animals, the CHS reaction was induced by hapten application onto the shaved skin of the abdomen, while CHS expression was triggered by hapten application to the ear (4 days later), and the reaction intensity was measured 24 hours later. Fluoxetine and desipramine were administered intraperitoneally for 14 days (at a dose of 10 mg/kg b.w.), administration of ADs started 9 days before the induction of CHS reaction.

Studies in the *in vivo* model of CHS reaction revealed that fluoxetine and desipramine very efficiently inhibited CHS reaction by 50%, irrespective of which type of effector T lymphocytes (CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>) prevailed in the elicitation phase. Moreover, studies on knock-out mice indicated that the inhibitory action of antidepressant drugs on CHS reaction relied on their impact on T CD8<sup>+</sup> and NKT lymphocytes while T $\gamma\delta$  lymphocytes were not affected. This inhibitory action of fluoxetine and desipramine on CHS reaction was also associated with their effect on an array of parameters of the immune response. ADs suppressed exaggerated CHS, spontaneous and mitogen-stimulated proliferative activity (measured by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation), and/or metabolic activity (measured by the MTT test) of cells isolated from the spleen and lymphoid nodes of the study animals. ADs also reduced the hapten application-induced increase in the weight of such lymphatic organs as axillary and inguinal lymph nodes, thymus, and spleen. Moreover, desipramine and fluoxetine inhibited the release (from mitogen-stimulated spleen and/or lymph node cells) of cytokines with pro-inflammatory potential (IL-4, IL-6, and IFN- $\gamma$ ), and increased anti-inflammatory cytokine IL-10 secretion.

Intrigued by high efficacy of the examined antidepressant drugs in the suppression of CHS reaction in mice, I conducted *in vitro* studies aimed to explore the molecular mechanisms of action of these drugs in cell cultures of human keratinocyte cell line HaCaT and mouse

precursor dendritic cell line JAWSII, which play a key role in induction, elicitation and regulation of the CHS reaction. The cells of both lines were activated by lipopolysaccharide (LPS), a mixture of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  and DNFB while among drugs, fluoxetine, desipramine, and imipramine were tested. The concentrations of these substances were chosen based on biochemical cell viability tests (MTT and LDH test).

Since the contact hypersensitivity reaction develops in the milieu containing elevated concentrations of many pro-inflammatory cytokines and chemokines, the first task was to assess the effect of antidepressant drugs on the release of many of them from the stimulated keratinocytes and dendritic cells, with the use of ELISA. I observed that cells of both lines responded to the stimulation mostly by LPS and TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  cytokine mixture with an elevated synthesis of IL-1 $\beta$  and IL-6, while JAWSII cells in response to LPS stimulation synthesized considerable amounts of IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-12 and growth factor M-CSF. The used antidepressant drugs at different concentrations showed a normalizing effect on the tested parameters. Besides, activated cells released large amounts of chemokines to the medium. HaCaT cells stimulated by LPS and TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  secreted significantly greater amounts of chemokines CCL2 (MCP-1) and CXCL8 (IL-8) to the medium, but antidepressant drugs normalized the release of only the former one with no impact on IL-8. Also, hapten (DNFB) exposure reduced MCP-1 release, which was unaffected by antidepressant drugs added to the culture. On the other hand, protein microarray studies revealed that stimulation of mouse immature dendritic cell cultures JAWSII by LPS increased the CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL5 (RANTES), CXCL5 (LIX) synthesis, while fluoxetine, desipramine, and imipramine at different concentration normalized the XCL1, CCL2, and CXCL5 secretion.

Interesting results were also obtained from studies on the effect of antidepressant drugs on the expression of adhesive molecules: ICAM-1 and E-cadherin in the stimulated keratinocyte cells HaCaT. The stimulation of HaCaT cells induced an increase in *Icam-1* gene expression (measured by Real-Time PCR) and ICAM-1 protein (determined by ELISA in cell lysates) but the normalizing effect of antidepressant drugs was observed only for *Icam-1* mRNA. On the other hand, a decreased expression of E-cadherin was seen in the LPS-treated keratinocyte cultures while fluoxetine at both used concentrations normalized this change. All stimulating factors used in this experiment augmented *Icam-1* expression with the most pronounced effect of the mixture of cytokines TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  (over 600-fold change compared with control cultures). Also, in this case, different concentrations of antidepressant drugs reduced *Icam-1* expression. However, the ICAM-1 protein expression increased after LPS and TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  stimulation but it was not suppressed by the tested antidepressant drugs. On the other hand, E-

cadherin expression dropped in the LPS-treated keratinocytes, and fluoxetine at both concentrations normalized its level. These observations were additionally qualitatively confirmed by confocal microscopic examination of keratinocyte HaCaT preparations. Furthermore, in preparations from dendritic cells JAWSII, cytokine TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  stimulation increased the CD18 expression (LFA-1 subunit, ICAM-1 ligand), and the used antidepressant drugs produced a normalizing effect.

At the last stage of research, Western blot analysis was used to check whether the inhibitory effect of antidepressant drugs on the release of many pro-inflammatory factors in cell cultures was associated with suppression of intracellular activation pathways of the transcription factor NF $\kappa$ B and p38 kinase. The results of these studies did not provide an unequivocal answer to this question. In the case of proteins implicated in nuclear factor  $\kappa$ B activation, there was a tendency towards an enhanced activation (phosphorylation) of such proteins as I $\kappa$ B, NF $\kappa$ B p65 subunit, or NIK kinase after stimulation of both cell lines, which was normalized by the used antidepressant drugs. The stimulation of HaCaT cells (LPS or TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ ) and JAWSII cells (LPS) led to the p38 kinase activation. ADs did not suppress p38 kinase phosphorylation in HaCaT cells but in dendritic cells, JAWSII, p38 kinase was negatively controlled by all used antidepressant drugs: fluoxetine, desipramine, and imipramine.

The studies performed within the framework of this doctoral thesis demonstrated that the inhibitory effect of antidepressant drugs on the course of contact hypersensitivity was associated not only with the impact of these drugs on different lymphocyte populations but also with modulation of the response of stimulated keratinocytes and dendritic cells which form a natural barrier protecting the body against harmful environmental factors.