



JUSTYNA KUŚMIERCZYK

**Charakterystyka układu odpornościowego myszy z ablacją
receptora glukokortykoidowego w komórkach
noradrenergicznych: badania w kierunku zaburzeń
indukowanych stresem oraz dysfunkcji naczyń**

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Biochemii Mózgu IF PAN
i Katedrze Farmakologii UJ CM

Promotorzy

Prof. dr hab. *Irena Nalepa*

Prof. dr hab. *Rafał Olszanecki*

Recenzenci: prof. Marta Kubera, dr hab. Piotr Ceranowicz

Streszczenie

Zwierzęta transgeniczne są obecnie coraz szerzej stosowane w laboratoriach, jako modele doświadczalne. Zastosowanie systemu warunkowych *knock-outów* genowych, takich jak system Cre/LoxP, umożliwia selektywne usunięcie genów z wybranej populacji komórek. Pozwala to na zmniejszenie ryzyka wystąpienia zmian powodujących letalność oraz upraszcza interpretacje obserwowanych efektów mutacji.

Zwierzęta GR^{DBHCre} , będące modelem badawczym zastosowanym w pracy doktorskiej, otrzymano krzyżując myszy z ekspresją rekombinazy Cre pod kontrolą promotora beta-hydroksylazy dopaminy, enzymu przekształcającego dopaminę do noradrenaliny, ze zwierzętami posiadającymi sekwencję LoxP w genie dla receptora glikokortykoidów (GR). Manipulacja ta spowodowała usunięcie GR z komórek syntezujących noradrenalinę i adrenalinę. Mając na uwadze opisaną wcześniej charakterystykę behawioralną myszy GR^{DBHCre} oraz atrofię rdzenia nadnerczy i deficyty adrenaliny, w niniejszej pracy doktorskiej postawiono hipotezę roboczą, że u myszy GR^{DBHCre} może dochodzić do zaburzeń w układzie odpornościowym o charakterze prozapalnym, które mogłyby się przejawiać opisanymi wcześniej zmianami behawioralnymi. Te wszystkie przesłanki stanowiły podstawę niniejszej pracy.

Celem niniejszej pracy była ocena aktywności wybranych parametrów układu odpornościowego myszy pozbawionych GR w układzie adrenergicznym oraz wpływu mutacji na efekty stresu i układ krążenia. Zbadano stan układu odpornościowego w warunkach podstawowych, po chronicznym stresie unieruchomienia i po stresie zapalnym wywołanym dootrzewnowym podaniem LPS-u. Ocenie podlegały takie parametry jak właściwości makrofagów, splenocytów i tymocytów w stanie podstawowym i po zadziałaniu stresorów. Ponadto oznaczono poziomy kortykosteronu i amin katecholowych w osoczu w warunkach podstawowych i po stresie. Na koniec zbadano funkcję naczyń i podstawowe parametry układu krążenia takie jak ciśnienie, tętno, odpowiedź aort na bodźce skurczowo-rozkurczowe oraz wolnych rodników w naczyniach. Eksperymenty przeprowadzono na zwierzętach obu płci, ponieważ zarówno w funkcjonowaniu układu immunologicznego jak i sercowo-naczyniowego występują różnice międzypłciowe.

Rozważając wyłącznie różnice genotypowe nie zaobserwowano różnic pomiędzy myszami *wt* i $GR^{-/-}$ w aktywności makrofagów. Subtelna prozapalna tendencja u samic uwidacznia się jedynie w warunkach stymulacji prozapalnej. Noradrenalina wywierała niewielki, modulujący wpływ na funkcję makrofagów. Ponadto, badając zarówno zdolność

splenocytów do proliferacji jak i produkcji cytokin nie zaobserwowano różnic w funkcjonowaniu śledziony – największego obwodowego narządu układu odpornościowego, u myszy GR^{DBHCre} w porównaniu do myszy *wt*.

Zmiany w dynamice odpowiedzi na bodźce stresowe zaobserwowano w grasicy. Stymulacja tymocytów kortykosteronem nie hamowała aktywności proliferacyjnej u myszy GR^{DBHCre} po 2h, natomiast po 24h odpowiedź była na poziomie wartości obserwowanych u myszy *wt*. W pozostałych badanych parametrach nie znaleziono różnic zależnych od genotypu.

Zwierzęta GR^{DBHCre} odpowiadają zarówno na stres immunologiczny jak i psychologiczny podobnie do zwierząt *wt*, o czym świadczy splenomegalia, atrofia grasicy oraz poziom kortykosteronu i zmiany w aktywności komórek układu odpornościowego. Natomiast w odróżnieniu od myszy *wt*, u których w odpowiedzi na ostry stres wzrasta poziom adrenaliny, w osoczu u myszy GR^{DBHCre} rośnie poziom dopaminy.

Ponadto w pracy potwierdzono występowanie różnic międzypłciowych, zarówno w aktywności układu odpornościowego (np. zwiększona liczba komórek w jamie otrzewnowej samic oraz ich większa reaktywność) jak i sercowo-naczyniowego (np. mocniejszy skurcz naczyń samców w odpowiedzi na stymulację fenylefryną). Co więcej zaobserwowano, że mechanizmy kompensujące u samic GR^{DBHCre} nieoczekiwanie poprawiają funkcjonowanie aorty. Być może jest to związane ze zmienionymi poziomami adrenaliny i kortykosteronu w osoczu.

Podsumowując, myszy GR^{DBHCre} nie są dobrym modelem do badania interakcji pomiędzy osią podwzgórze – przysadka – nadnercza a układem współczulnym pod względem regulacji układu odpornościowego w odpowiedzi stresowej. Bardziej szczegółowe badania układu odpornościowego mogą stworzyć szansę na identyfikację mechanizmów, które kompensują efekty mutacji. Zastosowanie stresorów innego rodzaju, blokada obwodowego układu dopaminowego lub zbadanie odpowiedzi makrofagów otrzewnowych na stymulację dopaminą mogłyby udzielić dodatkowych odpowiedzi. Natomiast na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy, można zaproponować myszy GR^{DBHCre} jako użyteczny model do badań interakcji dopaminy z obwodowym układem adrenergicznym.