

Gdański Uniwersytet Medyczny  
Wydział Lekarski

**Justyna Marta Wierzbicka**

*Modulacja ekspresji elementów skórnego analogu  
osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. HPA)  
w procesie różnicowania keratynocytów  
– wpływ witaminy D*

---

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Promotor:**  
**Prof. dr hab. Michał A. Żmijewski**

Pracę wykonano w Katedrze i Zakładzie Histologii  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

**Gdańsk 2017**

# STRESZCZENIE

## 1. WPROWADZENIE

Skóra nie tylko stanowi warstwę ochronną organizmu zapewniającą utrzymanie wewnętrznej homeostazy, ale również pełni istotną rolę w przekazywaniu bodźców oraz termoregulacji. Aby efektywnie pełnić różnorodne funkcje, komórki skóry produkują szereg neuropeptydów, hormonów oraz innych aktywnych cząstek [1]. Wykazano na przykład ekspresję elementów osi przysadkowo-podwzgórzowo-nadnerczowej (ang. hypothalamic–pituitary–adrenal axis, HPA) [2] w komórkach skóry, która umożliwia miejscową odpowiedź na czynniki stresogenne takie jak promieniowanie UV, czynniki chemiczne czy biologiczne [2-4]. Ale przede wszystkim naskórek jest naturalnym źródłem witaminy D<sub>3</sub> [5].

Szlak produkcji neuropeptydów w skórze zachodzi zgodnie z algorytmem występującym w klasycznej osi HPA (omówione w [2, 16, 17]). Czynnikiem uwalniającym kortykotropinę (kortykoliberyna, CRF) jest jednym z kluczowych elementów osi HPA odpowiedzialnej za odpowiedź na stres [18]. Aktywacja receptorów CRF uruchamia kaskadę sygnalizacyjną prowadzącą do syntezy szeregu hormonów peptydowych będących efektem proteolizy proopiomelanokortyny (POMC): adrenokortykotropiny (ACTH), melanotropiny ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -MSH), lipotropiny ( $\beta$  i  $\gamma$ -LPH), beta-endorfiny ( $\beta$ -END) [19]. ACTH, poprzez selektywne oddziaływanie z receptorem dla melanokortyn (MC2R), pobudza wydzielanie glikokortykosteroidów, w tym kortyzolu w ludzkiej skórze [20]. Kortyzol, wiążąc się z receptorem dla glikokortykosteroidów (*NR3C1*), przeciwdziała czynnikom stresogennym, takim jak odpowiedź zapalna, dodatkowo hamując dalszą sekrecję CRF oraz ACTH na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego [16, 21].

Co ciekawe, na modelu hodowli keratynocytów *in vitro* wykazano szereg działań plejotropowych dla CRF, charakterystycznych również dla witaminy D<sub>3</sub>. Podobnie do witaminy D<sub>3</sub>, produkcja CRF jest indukowana przez UV. Dodatkowo CRF efektywnie hamuje proliferację komórek [22] oraz stymuluje różnicowanie keratynocytów [23]. Wykazano także, że neuropeptydy mogą stymulować ekspresję cząsteczek adhezyjnych [22], jak również indukować produkcję cytokin [24].

## 2. CELE PRACY

Cel 1: Prześledzenie dynamiki zmian w poziomie ekspresji elementów osi HPA wraz z różnicowaniem się komórek naskórka.

Cel 2: Zbadanie wpływu witaminy D oraz jej analogów o niewielkim wpływie na wapń (20(OH)D<sub>3</sub>, 21(OH)pD) na ekspresję elementów osi HPA w hodowli keratynocytów *in vitro*.

## 3. WYNIKI

Na rozprawę doktorską składają się cztery prace, w tym dwa artykuły poglądowe, stanowiące wprowadzenie do tematyki roli witaminy D w skórze. Pozostałe dwie publikacje to prace oryginalne, w których zaprezentowano badania nad wpływem procesu różnicowania się keratynocytów oraz witaminy D na elementy osi HPA w skórze.

W pracy oryginalnej pt. „**Differentiation of Keratinocytes Modulates Skin HPA Analog**”, opublikowanej w *Journal of Cellular Physiology* w 2017 roku, wykazano zmianę w ekspresji elementów osi sHPA podczas różnicowania się keratynocytów.

W badaniach wykazałam podwyższoną ekspresję genu *CRF* w średnio zróżnicowanych keratynocytach, podobne wyniki uzyskałam dla genu *UCN1* kodującego urokortynę 1. Dodatkowo barwienia immunofluorescencyjne wykazały podwyższony poziom immunoreaktywności dla receptora CRFR1 w zróżnicowanych keratynocytach. Ekspresja genu *POMC* wzrastała wraz ze stopniem różnicowania keratynocytów, natomiast poziom jego receptora (*MC2R*) wyraźnie wzrastał w pierwszych dniach hodowli, a następnie sukcesywnie spadał. Natomiast poziom receptora dla glikokortykosteroidów (*NR3C1*) nie ulegał większym wahaniom. Wyniki te zostały potwierdzone immunohistochemicznie na skrawkach zdrowej skóry.

W drugiej pracy oryginalnej pt. „**Bioactive forms of vitamin D selectively stimulate the skin analog of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in human epidermal keratinocytes**” opublikowanej w *Molecular and Cellular Endocrinology* w 2016 roku, opisano wpływ witaminy D<sub>3</sub> oraz jej analogów na wzrost i różnicowania, ale również na zdolność do modulacji ekspresji elementów sHPA w keratynocytach.

W pierwszym etapie pracy zbadalam ogólny efekt 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> oraz jego analogów na hodowlę pierwotnych keratynocytów. Wszystkie sekosteroidy (analogi witaminy D) znacząco hamowały proliferację komórek w sposób zależny od dawki. Jednakże 20(OH)D<sub>3</sub> wykazywało wyższą skuteczność w porównaniu do 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 21(OH)pD, zmniejszając liczbę komórek o 60-70% w porównaniu z 20%, dla pozostałych związków. Została również sprawdzona ekspresja genów markerowych dla procesu różnicowania się keratynocytów. Stwierdzono podwyższoną ekspresję genów markerowych wczesnego zróżnicowania (cytokeratyna 14, cytokeratyna 1) we wszystkich traktowanych próbach. Natomiast, tylko 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 20(OH)D<sub>3</sub> znacząco zwiększyły poziom mRNA dla involukryny (*INV*, markera późnego zróżnicowania). Dodatkowo zbadalam zmiany w ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm witaminy D<sub>3</sub>. Do najważniejszych obserwacji należało obniżenie ekspresji VDR przez 21(OH)pD, przy jednoczesnym braku indukcji *CYP24A1*, kodującego 24-hydroksylazę biorącą udział w katabolizmie witaminy D. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 20(OH)D<sub>3</sub> nie wykazywały wpływu na ekspresję VDR, natomiast efektywnie indukowały ekspresję *CYP24A1*. Względny poziom mRNA pozostałych enzymów metabolizujących witaminę D (*CYP3A4*, *CYP2R1*) uległ umiarkowanej stymulacji przez testowane związki. Co ciekawe, wyłącznie 21(OH)pD znacząco zwiększył ekspresję genu 1 $\alpha$ -hydroksylazy, *CYP27B1*. Powyższe dane sugerują, że 21(OH)pD może aktywować alternatywny szlak, niezależny od receptora dla witaminy D (VDR).

Powszechnie wiadomo, że wapń oraz witamina D należą do silnych induktorów procesu różnicowania się keratynocytów. Dlatego też w kolejnym etapie pracy zbadalam wpływ powyższych induktorów na ekspresję elementów osi HPA (*CRF*, *UNC1-3*, *POMC*, *MC1R*, *MC2R* oraz *NR3C1*) w pierwotnych keratynocytach. Wykazałam, że traktowanie pierwotnych keratynocytów 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> w połączeniu z wapniem (Ca<sup>+2</sup>) efektywnie indukuje ekspresję, przynajmniej na poziomie mRNA, wszystkich elementów osi HPA. Efekt samego wapnia na ekspresję elementów HPA był znacząco słabszy, niż efekt 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Najwyższa indukcja ekspresji była obserwowana po 24h w próbach traktowanych kombinacją 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> oraz Ca<sup>+2</sup>. To sugeruje, że witaminy D<sub>3</sub> może działać na elementy naskórkowe HPA zarówno poprzez ścieżki zależne jak i niezależne od wapnia.

W ostatnim etapie pracy porównałam zdolność stymulacji ekspresji elementów osi sHPA przez 20(OH)D<sub>3</sub> i 21(OH)pD, do 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Oba testowane analogii stymulowały ekspresję *CRF* w porównywalnym stopniu do 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Co ciekawe, najwyższy poziom ekspresji *CRF* i *UCN* obserwowałam w przypadku 21(OH)pD. Geny *POMC*, *MC1R* i *MC2R* były indukowane przez 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 20(OH)D<sub>3</sub> oraz 21(OH)pD, z porównywalnymi efektami. Co ciekawe, mRNA *MC3R* było niewykrywalne w hodowli kontrolnej pierwotnych keratynocytów, natomiast jego ekspresja była skutecznie indukowana przez wszystkie testowane sekosteroidy. Wykazałam również, że tylko 21(OH)pD umiarkowanie obniżało ekspresję *NR3C1*.

Dodatkowo zbadalam czy stopień zróżnicowania keratynocytów, monitorowany poziomem ekspresji *INV*, wpływa na stymulację ekspresji *ACTH* i *MC2R* przez witaminę D<sub>3</sub> oraz jej analogii. Stosując cytometrię przepływową przetestowałam dwie populacje keratynocytów, *INV* pozytywne (*INV*<sup>+</sup>, zróżnicowane) i *INV* ujemne (*INV*<sup>-</sup>, niezróżnicowane). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> zwiększyło produkcję *ACTH* i *MC2R* tylko w komórkach *INV*<sup>+</sup>, natomiast 20(OH)D<sub>3</sub> (umiarkowanie) i 21(OH)pD (silnie) stymulowało produkcję *MC2R* w keratynocytach *INV*<sup>-</sup>. Ponadto w przeciwieństwie do 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nie stwierdzono istotnego wpływu 21(OH)pD na produkcję *ACTH* w obu populacjach keratynocytów.

#### 4. PODSUMOWANIE

Istnieje wyraźna, choć nie do końca poznana, zależność między witaminą D<sub>3</sub>, a osią sHPA. Wydaje się, iż zaobserwowane zmiany w ekspresji *CRF* i *CRFR1* w chorobach skóry mogą podkreślać istotność funkcji *CRF* w hamowaniu proliferacji komórek oraz indukowaniu różnicowania. **W moich badaniach po raz pierwszy wykazałam dynamiczne zmiany w ekspresji elementów sHPA w trakcie różnicowaniu keratynocytów, oraz indukcję ekspresji elementów osi sHPA przez witaminę D i jej analogi.** Ma to istotne znaczenie w przypadku ochrony komórek skóry przed szkodliwym wpływem promieniowania słonecznego (UVB), które jak wykazano stymuluje również ekspresję skórniego analogu osi HPA. Otrzymane dane w ramach prezentowanych prac podnoszą intrygujące pytania: Czy stymulacja elementów osi HPA przez UVB jest przynajmniej częściowo zależna od lokalnie produkowanej witaminy D<sub>3</sub> oraz jej analogów? A może to właśnie witamina D<sub>3</sub> jest głównym czynnikiem stymulującym ekspresję sHPA w skórze?

Tym bardziej wydaje się uzasadnione prowadzenie dalszych badań nad poznaniem mechanizmów tych interakcji. Wyniki moich badań stanowią podstawę do wyjaśnienia patogenezy szeregu chorób skóry, w których obserwuje się zarówno obniżony poziom witaminy D<sub>3</sub> jak i deregulacje osi HPA, takich jak łuszczyca, czy atopowe zapalenie skóry. Ponadto, uzyskane wyniki wskazują nowe cele terapeutyczne w oparciu o witaminę D<sub>3</sub> oraz jej pochodne o nieznacznym wpływie na gospodarkę wapniową. Zaproponowany przeze mnie nowy mechanizm interakcji między witaminą D<sub>3</sub>, a sHPA potwierdza zasadność suplementowania witaminy D<sub>3</sub> w terapii chorób skóry, w celu zmniejszenia częstości ich występowania oraz łagodzenia objawów i skutków, a co za tym idzie również poprawy jakości życia pacjentów dermatologicznych.