**UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU**



Kamil Krzysztof Grubczak

**Badania doświadczalne nad zastosowaniem witaminy D3 jako czynnika modulującego fenotyp i funkcję monocytów z ekspresją CD16**

PRACA DOKTORSKA

Opiekun i Promotor pracy

**dr hab. Marcin Moniuszko**

# Streszczenie.

W przebiegu astmy dochodzi do znacznego zaburzenia stosunków ilościowych pomiędzy trzema różnymi subpopulacjami monocytów. Poprzednie badania wykazały, że glikokortykosteroidy (GKS) charakteryzują się zdolnością do wybiórczego obniżenia liczby subpopulacji monocytów o znaczącej aktywności prozapalnej, czyli monocytów pośrednich i nieklasycznych.

 Celem niniejszej pracy było zbadanie immunomodulujących właściwości innego związku o działaniu immunosupresyjnym - aktywnej formy witaminy D (witaminy D3), względem monocytów. Ocenie poddano również efekty łącznego zastosowania witaminy D3 i GKS na fenotyp i funkcję różnych subpopulacji monocytów.

 Badanie opierało się na hodowlach *in vitro* komórek jednojądrzastych krwi obwodowej osób zdrowych i pacjentów z astmą w obecności witaminy D3 i/lub GKS, a następnie cytometrycznej ocenie wpływu tych związków na zmiany ilościowe i czynnościowe w obrębie subpopulacji monocytów. Dodatkowe eksperymenty z inhibitorami szlaków apoptotycznych, agonistą receptora glikokortykosteroidowego i swoistymi czynnikami stymulującymi monocyty posłużyły do oceny mechanizmu działania badanych związków oraz ich wpływu na wydzielanie cytokin pro- i anty-zapalnych.

 Wyniki badań wykazały, że zastosowanie samej witaminy D3 lub jej kombinacji z GKS znacząco redukuje odsetek monocytów "pro-zapalnych" oraz ogólną produkcję TNF-α przez te komórki. Ponadto wykazano zdolność witaminy D3 do indukcji apoptozy monocytów nieklasycznych oraz wywierania części swoich efektów z wykorzystaniem receptora dla GKS Połączenie aktywnej formy witaminy D z GKS umożliwiło zredukowanie dawki GKS przy zachowaniu porównywalnych efektów działania względem badanych monocytów.

 Uzyskane wyniki pozwoliły na identyfikację nowych immunomodulujących właściwości witaminy D3 wobec obdarzonych prozapalnym potencjałem subpopulacji monocytów będących głównym źródłem wydzielania TNF-α. Ponadto, uzyskane wyniki sugerują możliwość potencjalnego zastosowania aktywnej formy witaminy D jako czynnika wspomagającego efekty przeciwzapalne GKS lub nawet umożliwiającego redukcję dawki GKS.

# Abstract.

 Asthma is characterized by significant alterations in quantitative distribution of three phenotypically and functionally different subpopulations of monocytes Previous studies demonstrated that glucocorticoids (GC) were capable of selective reduction of numbers of proinflammatory monocytes known as intermediate and non-classical monocytes.

 The aim of the current study was to investigate the monocyte-related immunomodulatory properties of  another immunosuppressive drug, namely active form of vitamin D (vit. D3). Moreover, the effects of combined vit. D3 and GC treatment on the phenotype and function of different monocyte subsets were studied.

 The study was based on the *in vitro* cultures of peripheral blood mononuclear cells of healthy subjects or asthmatic patients in presence of vitamin D3 and/or GC, and, subsequently, flow cytometric evaluation of the effects of these compounds on quantitative and functional changes within different monocyte subsets. Additional experiments with apoptotic pathways inhibitors, glucocorticosteroid receptor agonist and specific monocyte-stimulating agents were used to assess the mechanism of action of the studied compounds and their effects on the secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines.

 It was demonstrated that vit. D3 alone or in combination with GC significantly reduced the frequency of "pro-inflammatory" monocyte subsets as well as total production of TNF-α by these cells. Furthermore, vit. D3 was shown to induce apoptosis of non-classical monocytes and to exert some of its effects with the use of GC receptor. Moreover, combination of active form of vitamin D and GC enabled significant reduction of GC dose while maintaining comparable anti-inflammatory monocyte-related effects.

 Current data allowed for identification of novel immunomodulatory properties of vitamin D3 directed at proinflammatory monocytes constituting the main source of TNF-α. In addition, these data suggest a potential capacity for the use of active form of vitamin D as a potential factor enhancing anti-inflammatory effects of GC or even allowing the reduction of GC dose.