

# **Autoreferat w języku polskim i angielskim**

### 1. Imię i Nazwisko

Magdalena Aleksandra Markowska

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne

**1997** – uzyskanie stopnia **magistra** na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego na podstawie rozprawy zatytułowanej „**Wpływ melatoniny na proliferację *in vitro* komórek limfoidalnych kurcząt**”; pracę wykonałam pod opieką dr hab. Krystyny Skwarło-Sońta, prof. UW, w Zakładzie Fizjologii Zwierząt Kręgowych

**2003** - uzyskanie stopnia **doktora** na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego na podstawie rozprawy zatytułowanej „**Przebieżnictwo sygnału melatoninowego w limfocytach samców *Gallus domesticus* L.**”; promotorem pracy była dr hab. Krystyny Skwarło-Sońta, prof. UW.

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

**15.02.1998 - 30.09.1998** – asystent naukowo-dydaktyczny w Zakładzie Fizjologii Zwierząt Kręgowych Wydziału Biologii UW

**1999-2003** - studia doktoranckie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego i wykonanie pracy doktorskiej w Zakładzie Fizjologii Zwierząt Kręgowych Instytutu Zoologii UW, zakończone uzyskaniem stopnia doktora

**2003 – 2015** - zatrudnienie na stanowisku adiunkta na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

**2015 – do dziś** - zatrudnienie na stanowisku asystenta na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

### 4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U.2017 r. poz. 1789):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

**Wybrane aspekty roli melatoniny i jej receptorów błonowych w utrzymaniu homeostazy organizmu zwierzęcego – model *Gallus gallus domesticus* i *Daphnia magna***

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy),

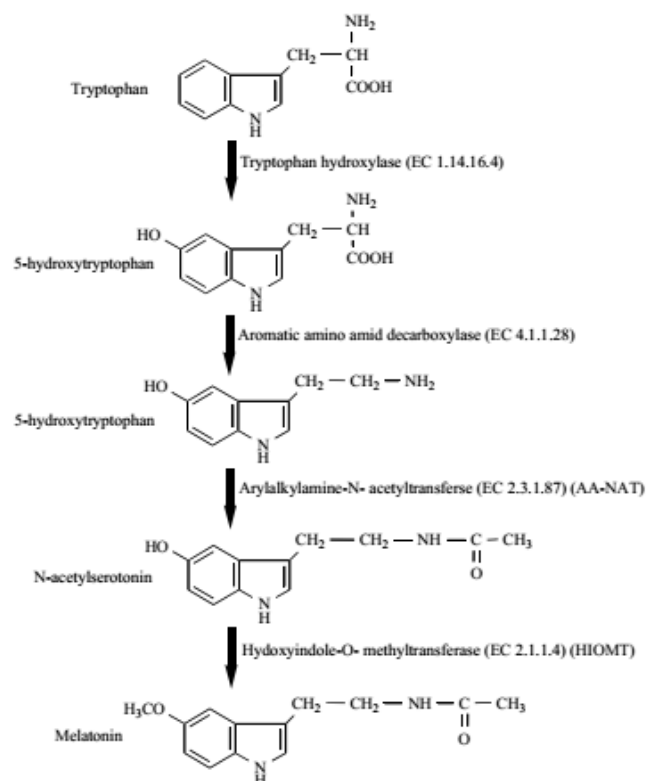
1. Dubocovich, M., & **Markowska, M.** Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. 2005 ENDOCRINE, 27, 101–110.
2. Wronka, M., Maleszewska, M., Stepińska, U., & **Markowska, M.** Diurnal differences in melatonin effect on intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in chicken spleen leukocytes *in vitro*. 2008 JOURNAL OF PINEAL RESEARCH, 44, 134–140.
3. **Markowska, M.**, Bentkowski, P., Kloc, M., & Pijanowska, J. Presence of melatonin in *Daphnia magna*. 2009 JOURNAL OF PINEAL RESEARCH, 46, 242–244.
4. Bentkowski, P., **Markowska, M.**, & Pijanowska, J. Role of melatonin in the control of depth distribution of *Daphnia magna*. 2010 HYDROBIOLOGIA, 643, 43–50.
5. **Markowska, M.**, Majewski, P., & Skwarło-Sońta, K. Avian biological clock – Immune system relationship. 2017 DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY, 66, 130–138.

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

### **Wprowadzenie do osiągnięcia**

Melatonina (5-metoksy-N-acetylotryptamina) to indoloamina, która powstaje w kilkietapowej reakcji przekształcania tryptofanu (Rys. 1). Na uwagę zasługuje fakt, że cząsteczka ta ma identyczną budowę u wszystkich organizmów, u których stwierdzono jej występowanie. Na początku XXI wieku wiadomo było, że melatonina występuje u zwierząt reprezentujących wszystkie gromady kręgowców oraz u niektórych, przebadanych gatunków bezkręgowców, roślin wyższych, pierwotniaków, grzybów i bakterii. Tak powszechne występowanie melatoniny sugeruje jej wczesne pojawienie się w historii życia na Ziemi. Zróżnicowaniu ulegały natomiast funkcje, jakie melatonina pełni u różnych gatunków, począwszy od ochrony przed wolnymi rodnikami a na roli hormonu skończywszy (Hardeland i Poeggeler, 2003, Pandi-PeruMal i wsp., 2006, Bentkowski i Markowska 2007). Do roku 2005 wykazano jej wpływ na procesy zachodzące na różnych poziomach organizacji organizmu zwierzęcego: w komórce dzięki swoim właściwościom chemicznym działa jako zmiatacz wolnych rodników, w narządach i na poziomie układów narządów rozpoznano zaangażowanie tej indoloaminy między innymi w regulację rozmnażania i dojrzewania

płciowego, regulację masy ciała i metabolizmu energetycznego, regulację krążenia, modyfikację reakcji stresowej oraz immunomodulację. Największą jednak uwagę zwraca rola melatoniny w synchronizacji endogenego zegara biologicznego z warunkami świetlnymi, których doświadcza zwierzę (Krause i wsp., 1999, Malpoux i wsp., 2001, Tan i wsp., 2002, Kennaway i Wright, 2002, Guerrero i Reiter, 2002, Barrenetxe i wsp., 2004, Claustrat i wsp., 2005). Działanie melatoniny jest różnorodne i gatunkowo specyficzne nie dziwi zatem, że doniesienia dotyczące jej wpływu na dany proces fizjologiczny mogą być z pozoru przeciwstawne (np. Nelson i Drazen, 2000, Skwarło-Sońta i wsp., 2007).



Rys. 2 Szlak biosyntezy melatoniny (Piesiewicz i wsp., 2010)

U kręgowców melatonina jest syntezowana w szyszynce, narządzie zdolnym **do odbierania** jednej z najważniejszych informacji środowiskowych czyli zmieniającego się cyklicznie natężenia światła **i przekształcania** tej informacji w zrozumiałą dla organizmu sygnał chemiczny. Szyszynka znajduje się u sklepienia 3 komory mózgu, a informacja o świetle dociera do niej dwiema drogami: pośrednio drogą nerwową z siatkówki oka (ssaki) i/lub bezpośrednio dzięki fotowrażliwym pinealocytom (ptaki, gady, płazy, ryby). Z tego też powodu u niższych kręgowców szyszynka nazywana jest trzecim okiem. Droga pośrednia

u ssaków przebiega następująco: informacja świetlna przekazywana jest z siatkówki przez siatkówkowo-podwzgórzowe włókna nerwowe do podwzgórzowych jąder nadskrzyżowania (SCN), w których zlokalizowany jest centralny zegar biologiczny a stąd, drogami zstępującymi, do pośredniobocznych szarych słupów piersiowego odcinka rdzenia kręgowego. Następnie odśrodkowymi neuronami współczulnymi, unerwiającymi zwój szyjny górny, za pośrednictwem zazwojowych włókien współczulnych sygnał dociera do szyszynki.

Wydzielana nocą z tych włókien noradrenalina stymuluje syntezę melatoniny. U ssaków synteza melatoniny pozostaje pod ścisłą kontrolą SCN, których aktywność jest synchronizowana z otaczającymi warunkami świetlnymi. Z drugiej strony melatonina zwrotnie kontroluje aktywność neuronów w SCN. U wszystkich kręgowców szczyt syntezy melatoniny przypada na fazę ciemną doby, a światło jest czynnikiem hamującym jej produkcję. Wysokie stężenie melatoniny we krwi w ciemności wydaje się być uniwersalnym nośnikiem informacji o wzajemnych relacjach długości dnia i nocy i pełni funkcję zegara i kalendarza dla wszystkich komórek organizmu (Korf i wsp., 1998). Melatonina synchronizuje z warunkami świetlnymi endogenne rytmy organizmu, do których należy m.in. sen/czuwanie, aktywność lokomotoryczna, rozród, synteza i uwalnianie hormonów, temperatura ciała, funkcjonowanie układu pokarmowego, krwionośnego, nerwowego i odpornościowego. Synchronizacja ta odbywa się pośrednio poprzez oddziaływanie na centralny zegar w SCN lub bezpośrednio działając na zegary peryferyczne występujące w tkankach (np. Claustrat i Leston , 2015).

U bezkręgowców brak jest centralnego miejsca syntezy melatoniny a miejsca w których powstaje są rozproszone, wykryto ją w mózgu, w oku, w przewodzie pokarmowym i rozrodczym (Bentkowski i Markowska, 2007). Co ciekawe synteza melatoniny u kręgowców także może zachodzić miejscowo, np. w siatkówce oka (Zawilska i wsp., 2006), przewodzie pokarmowym (Bubenik 2008) i leukocytach (Conti i wsp., 2000).

W działaniu melatoniny pośredniczą receptory błonowe związane z białkami G, receptory jądrowe a także niektóre białka cytozolowe (opisane przeze mnie w Majewski i wsp. 2012). Dotychczas sklonowano trzy podklasy receptorów błonowych o wysokim powinowactwie, które nazwano Mel1a, Mel1b i Mel1c (Kokkola i Laitinen, 1998). Pierwsze dwa receptory wykryto u wszystkich badanych gromad kręgowców, natomiast receptora Mel1c, który występuje u *Xenopus* (Ebisawa i wsp., 1994) i ptaków (Reppert i wsp. 1995,

Obłap i Olszańska, 2001, Skwarło-Sońta i wsp., 2003,) nie wykryto u ssaków. Obecnie, według terminologii IUPHAR, receptory Mel1a nazywane są MT1 – (Dubocovich i wsp. 2000), natomiast dla receptora Mel1b zarezerwowany jest termin MT2 (Dubocovich i wsp., 1998).

Podczas mojej ponad 20-letniej pracy naukowej skupiłam się na badaniu funkcji, jaką pełni melatonina u wybranych zwierząt ze szczególnym uwzględnieniem regulacji odporności.

Inspiracją były prace prof. Krystyny Skwarło-Sońta, która wprowadziła tę tematykę do Zakładu Fizjologii Zwierząt Kręgowych UW i na ów czas podsumowała w pracy z 1996 roku (Skwarło-Sońta, 1996). Skupiłam się na mechanizmie działania melatoniny na poziomie komórkowym, a także na regulacji jej syntezy w szyszynce podczas aktywacji układu

odpornościowego (do czego wykorzystałam stworzony przeze mnie układ *in vitro*).

Zaciekawiło mnie także, czy melatonina występuje i jaką rolę pełni u modelowego zwierzęcia w ekologii organizmów wodnych – *Daphnia sp.*

W niniejszym osiągnięciu przedstawiam prace, które przedstawiają wyniki i wysunięte na ich podstawie wnioski potwierdzające różnorodność działania melatoniny i rozszerzające wiedzę na ten temat. Wnioski zawarte w tych pracach pozwalają na przedstawienie melatoniny jako cząsteczki biorącej udział w mechanizmach utrzymywania i przywracania homeostazy. Prace wchodzące w skład osiągnięcia przedstawiam w kolejności chronologicznej.

## Opis prac wchodzących w skład osiągnięcia

### I. UDZIAŁ RECEPTORÓW BŁONOWYCH MELATONINY W JEJ ZRÓŻNICOWANYM DZIAŁANIU

Temat ten jest przedstawiony w dwóch pracach, z których jedna jest przeglądem literatury a druga oryginalną pracą doświadczalną. Opisuje je oddzielnie, a wspólne wnioski umieszczam w podsumowaniu osiągnięcia.

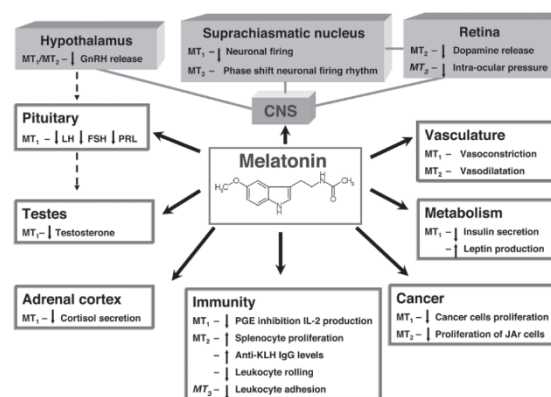
- Dubocovich, M., & **Markowska, M.** Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. 2005 ENDOCRINE, 27, 101–110.

**Wprowadzenie:** W swojej pracy doktorskiej zajmowałam się udziałem receptorów błonowych i postreceptorowym mechanizmem działania melatoniny w układzie odpornościowym ptaków na przykładzie organizmu modelowego jakim jest kura domowa -

*Gallus gallus domesticus* L. (Markowska i wsp., 2004). W badaniach *in vitro* wykazałam dualizm działania melatoniny zależny od pobudzenia splenocytów: melatonina stymuluje proliferację spontaniczną, natomiast hamuje namnażanie się komórek pobudzonych mitogenem (Markowska i wsp., 2002). Odmienne działanie melatoniny na splenocyty kurczą zachodzi za pośrednictwem dwóch różnych podklas jej receptorów błonowych: Mel1c i MT2 (Markowska i wsp., 2004). Badania nad receptorami melatoniny kontynuowałam we współpracy z prof. Margaritą Dubocovich w Department of Molecular Pharmacology and Biological Chemistry, Northwestern University w Chicago dzięki stypendium dla młodych naukowców, które przyznała mi Fundacja Nauki Polskiej.

**Opis pracy:** Jednym z wyników mojej współpracy z profesorem Dubocovich była praca przeglądowa opisująca funkcje melatoniny u ssaków, w których pośredniczą jej receptory błonowe. W szczególności istotne było przedstawienie, który z receptorów błonowych, MT1 czy MT2, odpowiada za daną funkcję fizjologiczną, a także jakie ścieżki wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału są aktywowane. Przez dłuższy czas miejsca działania melatoniny były przedstawiane wyłącznie w postaci miejsc wiążących jej znakowaną jodem [<sup>125</sup>I] cząsteczkę, będącą ligandem o wysokim powinowactwie i specyficzności, co obrazowało ich rozmieszczenie, ale nie rozróżniało podklas receptora. Krokami milowymi w badaniu receptorów melatoniny było ich sklonowanie (Reppert i wsp., 1996), stworzenie transgenicznych myszy z delecją receptorów MT1 lub MT2, a także zsyntezowanie antagonistów poszczególnych klas receptorów (Dubocovich i wsp., 2003). To umożliwiło na szczegółowe zbadanie receptorów uwzględniając ich funkcje w działaniu melatoniny. **Nowością w naszej wspólnej pracy** było zestawienie danych literaturowych wskazujących, że receptory MT1 i MT2 występują w obwodowych tkankach organizmu, dotychczasowe bowiem prace przeglądowe skupiały się głównie na występowaniu tych receptorów w układzie nerwowym. Wyjątek stanowiły badania układu odpornościowego (Guerrero i Reiter, 2002). Szersze niż dotychczas sądzono występowanie **funkcjonalnych** błonowych receptorów melatoniny zdecydowanie wskazywało na jej udział nie tylko w regulacji endogennego zegara, rytmów dobowych oraz regulacji rozrodu, ale także w bezpośredniej regulacji metabolizmu poprzez wpływ na wydzielanie leptyny i insuliny, w regulacji krążenia poprzez wpływ na mięśnie gładkie naczyń krwionośnych, oraz w regulacji osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej. Niebagatelny jest też udział melatoniny w

regulacji układu odpornościowego i procesu nowotworzenia. Dane literaturowe zostały podsumowane w postaci ryciny (Rys. 2). Receptory MT1 i MT2 związane są z różnymi białkami G, a ścieżki sygnałowe zaangażowane w przekazanie sygnału obejmują cyklazę adenylanową, fosfolipazę C, fosfolipazę A2, kanały potasowe a także cyklazę guanylową i kanały wapniowe. Ważne było również wskazanie, że działanie melatoniny może być odmienne lub nawet przeciwstawne w danej tkance zależnie od podklasy receptora tam występującego. Potwierdzało to obserwacje poczynione przeze mnie w układzie odpornościowym ptaków.



Rys. 2. Udział receptorów błonowych melatoniny w jej funkcjach pełnionych w ośrodkowym układzie nerwowym i w tkankach obwodowych (Dubocovich i Markowska, 2005).

**Wnioski:** W pracy wskazałyśmy różnorodność miejsc występowania funkcjonalnych receptorów melatoniny i jej wpływ na wiele procesów fizjologicznych. W podsumowaniu tej pracy pokreśliłyśmy ze współautorką, że zmienne działanie melatoniny jest związane: z dobowymi zmianami powinowactwa receptora do melatoniny, liczbą receptorów ekspresowanych w danej tkance i/lub podklasą receptora ekspresowanego w błonie komórkowej.

- Wronka, M., Maleszewska, M., Stepińska, U., & **Markowska, M.** Diurnal differences in melatonin effect on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in chicken spleen leukocytes in vitro. 2008 JOURNAL OF PINEAL RESEARCH, 44, 134–140.

**Wprowadzenie:** Począwszy od końca XX wieku wyniki badań wskazywały na regulację ekspresji błonowych receptorów melatoniny w układzie nerwowym. Zgodnie z zasadą „down-regulation” liczba i powinowactwo receptorów zmieniały się pod wpływem samej melatoniny. Sugerowało to, że w zależności od pory doby, w której bada się działanie



melatoniny jej wpływ może być różny (Witt-Enderby i wsp., 2003, Masana i wsp., 2003). Uzyskane w naszym zespole wyniki wskazywały, że u kury domowej przebieg procesów odpornościowych zarówno *in vivo* jak *in vitro* zależy od pory doby kiedy są badane oraz fotoperiodu w jakim trzymane są zwierzęta. Wskazywało to na udział endogennej melatoniny, nieznanym był jednak mechanizm takiej regulacji, która mogła się odbywać na poziomie receptorowym (Skwarło-Sońta i wsp. 2003, Majewski i wsp. 2005a, Skwarło-Sońta i wsp., 2007). Podówczas doniesień dotyczących regulacji receptorów melatoniny w układzie odpornościowym było bardzo mało (Barjavel i wsp., 1998). Nieliczne dane w piśmiennictwie i uzyskane przez nas wcześniej wyniki zrodziły pytanie, czy w układzie odpornościowym kury domowej zachodzą dobowe różnice w ekspresji i funkcji receptorów melatoniny. Odpowiedzi na to pytanie szukałam podczas realizacji grantu Komitetu Badań Naukowych: „Regulacja występowania receptorów melatoninowych w układzie odpornościowym kury domowej (*Gallus gallus domesticus*), przepiórki japońskiej (*Coturnix coturnix japonica*) i chomika syberyjskiego (*Phodopus sungorus sungorus*)”, 2004 – 2007, którego byłam kierownikiem.

**Celem pracy było:**

- sprawdzenie ekspresji błonowych receptorów melatoninowych w narządach odpornościowych kurcząt w ciągu dnia i w nocy
- oznaczenie zmian wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia ( $[Ca^{2+}]_i$ ) zachodzących pod wpływem melatoniny w ciągu dnia i w nocy

**Opis pracy:** Metodą półilościowej RT-PCR wraz z współautorami zbadaliśmy ekspresję receptorów Mel1a, Mel1b i Mel1c w śledzionie, grasicy i bursie Fabrycjusza izolowanych z kurcząt w połowie dnia i połowie nocy oraz w splenocytach hodowanych *in vitro* przez 30 godzin. Zastosowane warunki izolacji narządów odpornościowych miały odzwierciedlać układ doświadczalny w eksperymentach badających procesy odpornościowe *in vivo* i *in vitro*. W całych narządach nie zaobserwowaliśmy różnic w poziomie mRNA żadnego z receptorów natomiast wyraźne różnice dobowe zaobserwowaliśmy w izolowanych splenocytach. Poziom mRNA wszystkich receptorów melatoninowych był wyższy w hodowanych *in vitro* splenocytach izolowanych z kurcząt w nocy niż w splenocytach izolowanych w dzień. Następnie sprawdziliśmy, czy melatonina modyfikuje wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia odmiennie za dnia i w nocy. Wybór tego wewnątrzkomórkowego przekaźnika

wynikał z dwóch faktów: po pierwsze wyniki wskazywały, że splenocyty izolowane w nocy odpowiadają słabiej na stymulację mitogenem i ich proliferacja jest niższa niż splenocytów izolowanych w dzień (Majewski i wsp., 2005a), a po drugie jony wapnia są głównym wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem biorącym udział w proliferacji limfocytów. Ponadto przystępując do pracy wiedzieliśmy, że działaniu melatoniny *in vitro* na splenocyty kurcząt towarzyszą zmiany stężenia trifosforanu inozytolu w cytozolu, a ten przekaźnik stymuluje uwolnienie jonów wapnia z retikulum cytoplazmatycznego (Markowska i wsp., 2004). Śledzony pobieraliśmy od kurcząt w środku dnia i w środku nocy, a  $[Ca^{2+}]_i$  mierzyliśmy metodą fluorymetryczną. Zaobserwowaliśmy wzrost  $[Ca^{2+}]_i$  pod wpływem działania melatoniny i jodomelatoniny – agonistów receptorów melatoninowych – a efekt ten był większy w splenocytach izolowanych w dzień niż w nocy. W nocy istotny wzrost  $[Ca^{2+}]_i$  nastąpił tylko po zadziałaniu jodomelatoniny, która ma większe powinowactwo do receptorów melatoninowych niż melatonina. Może to świadczyć o desensytyzacji receptorów melatoninowych pod wpływem 6. godzinnej ekspozycji na ciemność, a tym samym o obecności przez 6 godzin endogennej melatoniny w krwioobiegu. Preinkubacja z nieselektywnym antagonistą receptorów melatoninowych - luzindolem nie odwracała wpływu melatoniny i tylko częściowo wpływ jodomelatoniny, co utrudnia jednoznaczne wskazanie, czy i które receptory pośredniczą w jej działaniu. Sądzić można, że melatonina działała przez receptor Mel1c (nie zbadano czy luzindol jest także antagonistą receptorów Mel1c), zaś jodomelatonina przez receptor MT1/MT2. Obserwowany wzrost  $[Ca^{2+}]_i$  pod wpływem melatoniny jest częściowo zniesiony w buforze nie zawierającym jonów wapnia, co sugeruje że pod wpływem melatoniny jony te napływają z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Natomiast wpływ jodomelatoniny w środowisku nie zawierającym jonów wapnia pozostaje widoczny co sugeruje, że część jonów pochodzi z retikulum endoplazmatycznego.

**Wnioski:** Dobowe różnice w ekspresji receptorów melatoniny w splenocytach hodowanych *in vitro* wskazują, że w splenocytach może istnieć endogenny rytm ekspresji receptorów melatoninowych, który ujawnia się po usunięciu kontroli ze strony zegara centralnego. Wyniki wskazują też, że w interpretacji wyników działania melatoniny *in vitro* trzeba szczególnie uwzględnić warunki hodowli. Wpływ melatoniny na  $[Ca^{2+}]_i$ , jest różny w dzień i nocy, co odpowiadać może za dobowe różnice w działaniu melatoniny obserwowane w układzie odpornościowym kurcząt (Skwarło-Sońta i wsp., 2007).

## II. WYSTĘPOWANIE I POTENCJALNA FUNKCJA MELATONINY U *Daphnia magna*

Temat ten jest przedstawiony w dwóch pracach doświadczalnych, które tu opatrzyłam wspólnym wprowadzeniem.

- **Markowska, M.**, Bentkowski, P., Kloc, M., & Pijanowska, J. Presence of melatonin in *Daphnia magna*. 2009 JOURNAL OF PINEAL RESEARCH, 46, 242–244.
- Bentkowski, P., **Markowska, M.**, & Pijanowska, J. Role of melatonin in the control of depth distribution of *Daphnia magna*. 2010 HYDROBIOLOGIA, 643, 43–50.

**Wprowadzenie:** Po powrocie ze stażu podoktorskiego równoległe z badaniami nad mechanizmem działania melatoniny w układzie odpornościowym kury domowej rozpoczęłam współpracę z zespołem prof. Joanny Pijanowskiej z Zakładu Hydrobiologii, Wydziału Biologii, w ramach której dotychczas uczestniczyłam jako wykonawca i konsultant w 4 grantach badawczych. Głównym tematem badań jest szeroko pojęta ekofizjologia wioślarek planktonowych na modelu *Daphnia*.

Jednym z charakterystycznych zachowań *Daphnia* służącym unikaniu drapieżców w postaci ryb planktonożernych są dobowe migracje pionowe. W ciągu dnia *Daphnia* migrują w niższe partie toni wodnej unikając górnej, jasnej warstwy epilimnionu, gdzie żerują posługujące się wzrokiem ryby. Wraz ze zmierzchem, gdy ustaje żer ryb, *Daphnia* przemieszczają się do góry, gdzie znajduje się fitoplankton, którym się żywią. Jest to przykład aktywności lokomotorycznej indukowanej sygnałami chemicznymi (kairomonami) pochodzącymi od drapieżnika w warunkach zmian natężenia światła (Dawidowicz i Loose, 1992, Brewer i wsp., 1999). Znaczenie ekologiczne takiego zachowania jest dobrze poznane natomiast podłoże fizjologiczne nie. Wpływ melatoniny na rytm aktywności lokomotorycznej kręgowców jest dobrze udokumentowany, lecz liczba gatunków zwierząt bezkręgowych przebadanych pod tym kątem wciąż nie jest zbyt duża, a w momencie podjęcia przeze mnie tych badań nieliczna (Bentkowski i Markowska, 2007).

**Cele prac:** W świetle wymienionych przesłanek postanowiłam zbadać, czy melatonina występuje u *Daphnia* i czy wpływa na jej dobowe migracje pionowe.

**Opis prac:**

W pracy Markowska i wsp., 2009 badaliśmy obecność melatoniny metodą ELISA i immunohistochemicznie w osobnikach *Daphnia magna* hodowanych w fotoperiodzie L:D = 16:8. Stężenia melatoniny zostały zmierzone w ciągu doby, co dwie godziny w fazie jasnej i co godzinę w fazie ciemnej, każdorazowo u 60 osobników. Wykazaliśmy, że melatonina występuje u *D. magna*, a szczyt jej syntezy przypada na fazę jasną doby, a zatem odwrotnie niż u kręgowców. Nie jest to jednak sytuacja odosobniona wśród bezkręgowców (Bentkowski i Markowska, 2007). Brak melatoniny w komórkach zielenic *Scenedesmus obliquus*, którymi żywione były *D. magna* potwierdził jej endogenne pochodzenie w rozwieltkach. Według mojej wiedzy **jest to pierwsze doniesienie** o występowaniu melatoniny u *D. magna*. Przy użyciu poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko melatoninie wykryliśmy jej obecność w całym organizmie *D. magna* z największym stężeniem w oku, włóknach nerwowych, zwoju nadprzełykowego i zwoju wzrokowym, a także w odnóżach. Występowanie melatoniny w odnóżach było zaskoczeniem, ale mogło wskazywać na jej udział w regulacji aktywności lokomotorycznej. Dlatego w kolejnej pracy postanowiliśmy sprawdzić, czy wzorzec dobowych migracji pionowych *D. magna* jest modyfikowany w obecności egzogennej melatoniny w wodzie.

W pracy Bentkowski i wsp., 2010, dobowe migracje pionowe zbadaliśmy u samic i samców *Daphnia magna* umieszczonych w szklanych rurkach, w których woda stratyfikowana była termicznie, a warunki świetlne odpowiadały fotoperiodowi L:D = 16:8. Woda w rurkach doświadczalnych zawierała kairomon ryby i/lub jedno z trzech stężeń melatoniny ( $10^{-9}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-5}$ M). Wraz ze współautorami wykazaliśmy, że melatonina odwraca indukowaną kairomonem migrację *D. magna* ku dołowi rurki podczas fazy jasnej. Sama melatonina nie wpływała na migracje pionowe. Jest wysoce prawdopodobne, że egzogenna melatonina działa jako czynnik przeciwdziałający stresowi, wywołanemu przez kairomon (Pijanowska i Kloc, 2004) i w ten sposób wpływa na behavior *D. magna*.

**Wnioski:** Melatonina występuje u *D. magna*, a szczyt jej syntezy przypada na fazę jasną doby. Taki wzór rytmu syntezy melatoniny spotykany jest u bezkręgowców i przypisywana jest mu pierwotna funkcja melatoniny czyli przeciwdziałanie stresowi oksydacyjnemu wywołanego promieniami UV (Hardeland i Poeggeler, 2003). Melatonina nie indukuje

dobowych migracji pionowych *D. magna*, ale modyfikuje wzorzec migracji wywołanych kairomonem ryby.

### III. OŚ UKŁAD ODPORNOŚCIOWY – SZYSZYNKĄ PTAKÓW: MECHANIZM REGULACJI WYDZIELANIA MELATONINY PRZEZ MEDIATORY UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO W BADANIACH *IN VITRO*

- **Markowska, M.**, Majewski, P., & Skwarło-Sońta, K. Avian biological clock – Immune system relationship. 2017 DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY, 66, 130–138

**Wprowadzenie:** Szyszynka ptaków, wraz z odpowiednikami jąder nadskrzyżowaniowych podwzgórza (SCN), głównego oscylatora u ssaków, i siatkówką oka jest miejscem lokalizacji endogennego zegara biologicznego, generującego okołodobowe rytmy wielu procesów fizjologicznych. Podobnie jak u ssaków, szyszynka ptaków jest pod kontrolą SCN, ale w odróżnieniu od ssaków jest jednocześnie samodzielnym oscylatorem i w hodowlach *in vitro* zachowuje cykliczną aktywność objawiającą się rytmicznym wydzielaniem melatoniny w warunkach stałej ciemności. Łatwa w hodowli szyszynka ptaków jest zatem idealnym modelem do badania *in vitro* wzajemnych powiązań między zegarem biologicznym/melatoniną a pozostałymi układami organizmu (Karaganis i wsp., 2008). W nielicznych badaniach prowadzonych od końca XX wieku wskazywano, że poziom melatoniny w osoczu ssaków może ulegać modyfikacji po podaniu cytokin, a także podczas rozwijających się procesów chorobowych (Bartsch i wsp., 1994, Zylinska i wsp., 1995, przegląd m.in. w Markus i wsp., 2007). W roku 2000 (Markowska i wsp., 2000) opublikowałam wraz ze współautorami pracę, w której **po raz pierwszy** jednoznacznie wykazaliśmy, że aktywacja układu odpornościowego kurcząt przez immunizację erytrocytami owcy (SRBC) zmienia aktywność AA-NAT, enzymu, który wyznacza rytmiczny przebieg syntezy melatoniny. Praca ta nie wchodzi w skład osiągnięcia, gdyż została opublikowana przed osiągnięciem stopnia doktora, ale dała podwaliny do badań prowadzonych przez kolejne lata w naszym zespole. Kolejnym dowodem na przepływ informacji z aktywnego układu odpornościowego do szyszynki kurcząt było wskazanie, że rozwijająca się reakcja zapalna otrzewnej obniża nocny szczyt aktywności AA-NAT (Majewski i wsp., 2005a). Opracowany przez dr. Majewskiego model reakcji zapalnej otrzewnej *in vivo*, posłużył do przebadania na jakim poziomie aktywacja układu odpornościowego obniża syntezę

melatoniny. Wyniki badań wskazały, że „zapalenie” hamuje AA-NAT, zarówno na poziomie transkrypcji genu, aktywności enzymu i poziomu białka (Piesiewicz i wsp., 2012). Czynniki pośredniczące w przekazywaniu informacji z układu odpornościowego do elementów zegara biologicznego, w tym szyszynki, były słabo poznane. Nieliczne badania *in vitro* przeprowadzone na szyszynkach szczura wykazały, że aktywność biosyntetyczna szyszynki hamowana jest przez TNF $\alpha$ , który obniża transkrypcję genu AA-NAT i syntezę melatoniny (Fernandes i wsp., 2006, Pontes i wsp., 2007), a także przez IL1 $\beta$  oraz TGF $\beta$ , które obniżają zawartość serotoniny w pinealocytach (Tsai i wsp. 2001). Wyjaśnieniem mechanizmu regulacji aktywności biosyntetycznej szyszynki kurcząt zajęłam się w latach 2010 – 2013 podczas realizacji grantu „Regulacja aktywności biosyntetycznej szyszynki kury domowej *Gallus domesticus L.* przez mediatory eksperymentalnego zapalenia otrzewnej - badania *in vitro*”, którego byłam kierownikiem. W ostatniej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia przedstawiam i podsumowuję wyniki badań uzyskane w trakcie realizacji tego projektu, a także proponuję wraz ze współautorami mechanizmy oddziaływania układu odpornościowego na syntezę melatoniny i zegar biologiczny umiejscowiony w szyszynce kurcząt. Koncepcja tych oddziaływań została przedstawiona w 2015 roku (Markowska i wsp., 2015), a częściowe wyniki na konferencjach w latach 2011 - 2013. Niniejsza praca została opublikowana w 2017 r., gdyż do pełnego obrazu wzajemnych oddziaływań szyszynka-układ odpornościowy kurcząt niezbędne były wyniki uzyskane podczas realizacji grantu „Neuroimmunologiczna regulacja syntezy melatoniny w szyszynce kury domowej” (2013 – 2016), którego byłam wykonawcą.

**Opis pracy:** Praca składa się z dwóch części opisujących: wpływ melatoniny na układ odpornościowy kurcząt oraz mechanizm obniżania syntezy melatoniny przez mediatory układu odpornościowego. Część pierwsza jest podsumowaniem prac wcześniej opublikowanych. Część druga opisuje także nowe wyniki, które przedstawiają mechanizm hamowania syntezy melatoniny, dlatego tę część omówię szczegółowo. Do badań *in vitro* wykorzystaliśmy hodowle organotypowe szyszynki z moją własną modyfikacją, która polegała na kohodowli szyszynki z leukocytami. Wykazaliśmy, że w takim modelu szyszynki trzymane w hodowli w stałej ciemności wykazują rytm syntezy melatoniny, który objawia się dobowymi zmianami ekspresji *Aanat*, za którymi podąża zmiana aktywności AANAT<sup>1</sup>, a w

---

<sup>1</sup> skróty NAT, AA-NAT i AANAT używane są wymiennie w naszych publikacjach i dotyczą tego samego enzymu

końcu wydzielenie melatoniny do podłoża. W pierwszym etapie badań postanowiliśmy zbadać czy rozwijająca się *in vivo* reakcja zapalna otrzewnej wpływa na ekspresję *Aanat*, aktywność AANAT i poziom melatoniny w szyszynkach hodowanych *in vitro*. Otrzymane wyniki wskazują, że rozwijająca się reakcja zapalna *in vivo* wpływa także na aktywność szyszynki obserwowaną *in vitro*. Podobnie jak w doświadczeniach *in vivo*, reakcja zapalna powoduje obniżenie aktywności AANAT co sugeruje, że mediatory zapalenia wywołują trwałą zmianę w tym występującym już na terenie cytoplazmy enzymie, najprawdopodobniej na poziomie jego ufosforylowania do formy aktywnej. Natomiast ekspresja genu *Aanat* ulega **zwiększeniu**, co może być wynikiem uwolnienia się spod hamującego działania mediatorów nie występujących w warunkach *in vitro*. Brak różnic obserwowany na poziomie syntezy melatoniny może być spowodowany zwiększoną aktywnością HIOMT i ekspresją *Asmt* (ostatniego enzymu na szlaku biosyntezy melatoniny i genu go kodującego), który zaobserwowano podczas rozwoju zapalenia w doświadczeniach *in vivo* (Piesiewicz i wsp., 2012).

Następnie przystąpiliśmy do identyfikacji cytokin, które mogą odpowiadać za hamujący wpływ reakcji zapalnej. Kiedy rozpoczynaliśmy nasze eksperymenty *in vitro* molekularne metody do badania układu odpornościowego ptaków były bardzo słabo rozwinięte. Genom *Gallus gallus domesticus* był wprawdzie od kilku lat zsekwencjonowany i rozpoczęły się intensywne badania ekspresji cytokin w różnych stanach pobudzenia układu odpornościowego, ale cytokiny jako takie nie były dostępne komercyjnie. Homologia pomiędzy cytokinami ptaków a tymi pochodzącymi od innych gatunków kręgowców sięga najwyżej 35%, co uniemożliwia stosowanie cytokin np. ssaków w badaniach układu odpornościowego ptaków. Dlatego też dla zbadania wpływu mediatorów układu odpornościowego na szyszynkę ptaków zaplanowałam zastosowanie własnej metody pośredniej. Jako źródło cytokin użyłam leukocyty pochodzące od zwierząt z wywołaną reakcją zapalną, o których wstępnie wiadomo było, że ekspresyjnie produkują cytokiny prozapalne (Szczur, 2010). Pierwszy wybór padł na leukocyty otrzewnowe (PTL), które przedostają się do jamy otrzewnej po wywołaniu reakcji zapalnej. Hodowaliśmy szyszynki z różną liczbą PTL w pożywce i po 24 godzinach została zmierzona aktywność AANAT. W obecności PTL, aktywność AANAT wzrosła proporcjonalnie do ich liczby w hodowli. W kolejnych eksperymentach zaobserwowaliśmy także wzrost ekspresji genu *Aanat* oraz obniżenie ilości melatoniny w podłożu w obecności PTL. Jako drugie źródło cytokin wykorzystaliśmy

leukocyty obwodowe krwi (PBL) izolowane od zwierząt z zapaleniem otrzewnej. W ich obecności zaobserwowałam spadek ekspresji mRNA *Aanat*, aktywności AANAT i zawartości melatoniny w medium.

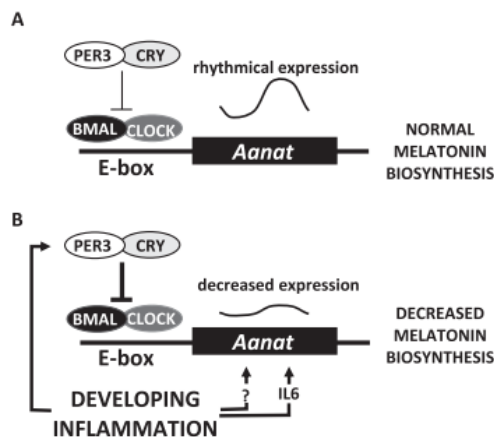
Pomiar ekspresji cytokin w leukocytach wskazuje na potencjalną przyczynę różnic. Zarówno w PTL i PBL wykazano jedynie ekspresję trzech cytokin prozapalnych: IL 1beta, IL6 i IL18. Poziom ekspresji tych cytokin jest różny w badanych populacjach leukocytów, ekspresja IL18 jest wyższa w PTL niż w PBL zaś IL6 odwrotnie.

Na podstawie tych wyników zaproponowałam następujący mechanizm hamowania syntezy melatoniny podczas rozwijającego się zapalenia: 1) wywołane zapalenie otrzewnej indukuje syntezę IL 6 w leukocytach obwodowych krwi, 2) cytokina ta przenika przez barierę krew-mózg, dociera do szyszynki i hamuje syntezę melatoniny, 3) równolegle, IL 18 syntetyzowana w leukocytach otrzewnowych działa lokalnie w miejscu zapalenia. Dalsze badania w ramach grantu „Neuroimmunologiczna regulacja syntezy melatoniny w szyszynce kury domowej” wykazały ekspresję receptorów dla IL 6 i IL 18 w szyszynkach kurcząt, co potwierdza wyniki otrzymane *in vitro* i uwiarygadnia postulowany mechanizm hamowania aktywności biosyntetycznej szyszynki podczas reakcji zapalnej otrzewnej (Adamska i wsp., 2019 manuskrypt przygotowywany do wysłania).

Dodatkowo w pracy opisane zostały wyniki uzyskane przez Turkowską i wsp., w 2013 i w 2015 roku, które wskazują na wpływ IL6 i IL18 na ekspresję genów zegara *Per3* i *Bmal1* w szyszynce kurcząt. Geny te są regulatorami ekspresji *Aanat*, dlatego możliwe jest, że IL 6 działa pośrednio na syntezę melatoniny poprzez regulację ekspresji genów zegara.

**Wnioski:** Na podstawie 20 lat badań całego zespołu, w tym moich badań *in vitro*, zaproponowaliśmy następujący schemat oddziaływania reakcji zapalnej na szyszynkę kurcząt przedstawiony na Rys. 3. Białka BMAL i CLOCK (pozytywne elementy pętli zegara biologicznego) stymulują transkrypcję genu *Aanat*, co powoduje rytmiczną syntezę melatoniny w nocy (A). Podczas rozwoju reakcji zapalnej interleukiny syntetyzowane na obwodzie docierają do szyszynki, zwiększają ekspresję *PER3*, co z kolei hamuje wiązanie heterodimeru BMAL/CLOCK do sekwencji E-box w promotorze genu *Aanat* i rytm syntezy melatoniny zostaje zniesiony. Równolegle interleukina 6 może bezpośrednio zmniejszać ekspresję i/lub aktywność *Aanat*, co wywołuje obniżenie syntezy melatoniny (B).





Rys. 3 Proponowany mechanizm hamowania syntezy melatoniny w szyszynce podczas rozwoju zapalenia otrzewnej u kurcząt.

### Podsumowanie osiągnięcia i perspektywy dalszych badań

Różnorodność funkcji melatoniny przedstawiam w swoim osiągnięciu na przykładzie jej działania w układzie odpornościowym *Gallus gallus domesticus* i na przykładzie modyfikacji behawioru *Daphnia magna*. Analizując dane literaturowe i wyniki własne zauważam, że różnorodność ta zależy przede wszystkim od dwóch czynników: pory doby i stanu fizjologicznego organizmu a ja zajęłam się zbadaniem możliwego podłoża tej różnorodności.

Najpierw swoją uwagę skupiłam na funkcjonowaniu błonowych receptorów melatoniny. Zarówno analiza literatury jak i własne wyniki wskazują, że **receptory te ulegają dobowym zmianom ekspresji i funkcjonowania, a co za tym idzie działanie melatoniny jest zmienne w ciągu doby**. Zaobserwowano to w różnych tkankach ssaków laboratoryjnych, a ja wykazałam to w układzie odpornościowym kury domowej. Jest to w mojej ocenie ważna informacja choćby ze względu na fakt, że w ostatnich dwóch dekadach rozpowszechniła się idea stosowania melatoniny jako suplementu diety. W ogólnie dostępnych źródłach melatoninie przypisuje się np. funkcje zapobiegające starzeniu (dzięki właściwościom antyoksydacyjnym) oraz łagodzące objawy menopauzy (poprzez regulację snu). W badaniach przedklinicznych podkreśla się rolę melatoniny oraz nowych agonistów/antagonistów receptorów melatoniny w leczeniu zaburzeń snu i rytmów dobowych (np. jet lag), zaburzeń metabolicznych i endokrynologicznych, a także w powstrzymaniu wzrostu komórek nowotworowych (Peschke i wsp., 2015, Hill i wsp., 2015, Ng i wsp., 2017, Cardinali i Harderland, 2017, Xie i wsp., 2017, Reiter i wsp., 2017). Badania wskazują także na udział melatoniny w chorobach neurodegeneracyjnych (Sarлак i wsp., 2013, Wongprayoon i Govitrapong, 2017).

Prace Dubocovich i Markowska (2005) i Wronka i wsp. (2008) choć przeprowadzone na przedstawicielach różnych gromad kręgowców wskazują i **podkreślają rolę dogłębnego zbadania występowania i funkcjonowania receptorów melatoniny**. Obecny stan wiedzy o receptorach MT1 i MT2 weryfikuje to przypuszczenie. Dużą rolę w funkcjonowaniu receptorów przypisuje się tworzeniu się dimerów receptorów MT1 i MT2 u ssaków (Oishi i wsp., 2018). Poznanie budowy tych receptorów umożliwiło rozpoznanie miejsc, w których są one funkcjonalnie modyfikowane i znacząco zwiększyło liczbę zsyntetyzowanych agonistów i antagonistów receptorów. Wykazano także, że mutacje w tych receptorach znajdują się u osób z zaburzeniami metabolicznymi, w tym u osób z cukrzycą typu 2 (Jockers i wsp., 2016, Karamitri i Jockers, 2019). To na pewno ważna ścieżka badań.

Następnym elementem mojego osiągnięcia było sprawdzenie, jaką funkcję pełni melatonina u wioślarek *Daphnia magna*. Wioślarki zajmują centralne miejsce w pelagicznych łańcuchach troficznych, zapewniają ważne źródło energii dla drapieżników i są głównym ogniwem między fitoplanktonem a wyższymi poziomami troficznymi. Jednym ze znanych zachowań wioślarek są dobowe migracje pionowe, które służą unikaniu presji drapieżców. Melatonina syntetyzowana rytmicznie i regulująca aktywność lokomotoryczną u bezkręgowców i kręgowców wydawała się idealnym kandydatem do wyjaśnienia fizjologicznego podłoża dobowych migracji pionowych. Badania rozpoczęłam od sprawdzenia, czy u *D. magna* występuje melatonina, co opisuję w pracy Markowska i wsp. (2009). Wykazałam wraz ze współautorami, że melatonina jest syntezowana u *D. magna*, a najwyższe jej stężenie występuje w dzień. **Było to pierwsze doniesienie w literaturze fachowej o syntezie melatoniny u *D. magna***. W kolejnych badaniach (Bentkowski i wsp., 2010) wykazaliśmy, że melatonina sama nie indukuje dobowych migracji pionowych, ale w obecności kairomonu ryb odwraca kierunek migracji *D. magna*. Wraz ze współautorami wysunęliśmy hipotezę, że takie **działanie melatoniny może świadczyć o jej działaniu przeciwdziałającym negatywnym skutkom stresu jaki wiąże się z przebywaniem w środowisku, w którym jest drapieżnik**. Taki wynik dobitnie wskazuje, że **działanie melatoniny zależy od stanu fizjologicznego organizmu**. Do czasu ukazania się pracy 4 nie wykazano innej funkcji melatoniny u *Daphnia*. Przed naszą pracą opublikowano tylko jedną pracę toksykologiczną, w której sprawdzano wpływ egzogennych hormonów kręgowców na determinację płci, rozrodczość, rozwój, przeżywalność i produkcję efiipiów u *Daphnia* i nie wykazano w niej wpływu melatoniny na

żaden z badanych wskaźników (Kashian i Dodson, 2004). W 2014 r. Schwarzenberger i wsp., wykazali, że melatonina znacząco osłabiała reakcję *D. pulex* na stres wywołany przez kairomon larw bezkręgowców *Chaoborus* (badano zmiany morfologiczne) oraz przegęszczenie (badano historię życia – life history). Potwierdza to nasze wcześniejsze przypuszczenie z 2010 roku, że funkcją melatoniny u *Daphnia* jest przeciwdziałanie stresowi. Ponadto w 2011 r. Tilden i wsp. zidentyfikowali geny zegara u *Daphnia pulex*, a w 2016 r. Bernatowicz i wsp., oraz Rund i wsp. wykazali rytm dobowy ekspresji tych genów w tkankach *D.pulex*. Ostatnio Hawker i wsp. 2017 wykazali związek między dobowymi migracjami pionowymi a ekspresją genów zegara u widłonogów morskich. Niewykluczone zatem, że melatonina może modyfikować rytmy biologiczne, w tym dobowe migracje pionowe *Daphnia*, poprzez regulację ekspresji tych genów. Zjawisko takie zaobserwowano u kręgowców. Otwiera to nowe perspektywy badań.

Szyszynkowa melatonina wpływa na wiele procesów fizjologicznych, ale sama szyszynka też jest odbiorcą informacji o stanie organizmu. Od dawna wiadomo, że rozwijający się proces chorobowy wpływa na funkcjonowanie układu nerwowego - „*Mens sana in corpore sano*” powiadali już starożytni Rzymianie. Jednym z objawów są zaburzenia rytmów biologicznych, które związane mogą być z zaburzeniami syntezy melatoniny. U ssaków i ptaków rozwijający się stan zapalny obniża poziom melatoniny w osoczu i hamuje aktywność biosyntetyczną szyszynki (Markowska i wsp., 2000, Piesiewicz i wsp., 2012, Markus i wsp., 2018). Wraz ze współautorami sprawdziłam zatem, jaki jest potencjalny mechanizm tego procesu. W stworzonym przez siebie układzie *in vitro* **wykazałam, że za hamowanie aktywności i ekspresji AA-NAT odpowiada z dużym prawdopodobieństwem IL 6** powstająca w leukocytach obwodowych krwi podczas rozwoju reakcji zapalnej otrzewnej, co opisałam w pracy Markowska i wsp. (2017). Tym samym dodałam kolejny dowód na to, że wzajemne powiązania między układem odpornościowym a szyszynką u kurcząt są elementem mechanizmu utrzymującego homeostazę organizmu. Melatonina jest czynnikiem przeciwzapalnym (Carrillo-Vico i wsp., 2013; Majewski i wsp., 2005b) i hamuje rozwój stanu zapalnego, co z kolei powoduje, że mediatory reakcji zapalnej hamują jej syntezę. Uzyskane wyniki stały się inspiracją do kolejnych badań. Skupiliśmy się na sprawdzeniu w szyszynce ekspresji receptorów cytokin jak i samych cytokin, a także receptorów TLR odpowiadających za bezpośrednią percepcję czynników patogennych. Badany jest także udział czynnika

transkrypcyjnego NF kappa B na ścieżce hamowania syntezy melatoniny przez mediatory reakcji zapalnej. Wyniki są w trakcie publikacji.

Podsumowując, funkcję homeostatyczną melatonina może pełnić na różnych poziomach. Od poziomu komórkowego, gdzie przeciwdziała stresowi oksydacyjnemu lub innym mechanizmom indukowanym przez czynniki stresowe aż po poziom organizmu, w którym pełni rolę synchronizatora zegara biologicznego i procesów fizjologicznych (w tym odpornościowych) z panującymi warunkami świetlnymi. W jej działaniu pośredniczą receptory błonowe MT1, MT2 i Mel1c, których funkcjonowanie różni się w ciągu doby, co determinuje działanie melatoniny. W 2013 r Carillo-Vico i wsp. zaproponowali termin „bufor immunologiczny”, próbując zdefiniować plejotropowy, zróżnicowany i złożony wpływ melatoniny na układ odpornościowy. Ja dodałabym, że rozpowszechniona w świecie zwierząt melatonina pełni rolę „stróża” homeostazy. Odzwierciedleniem tego jest ewolucja jej funkcji, od działania doraźnego, lokalnego przeciwdziałania skutkom zaburzeń homeostazy (np. stres komórkowy, wyciszenie rozwiniętej reakcji odpornościowej) gdy niejednokrotnie jest syntezowana w miejscu działania, aż po działanie ogólnoustrojowe, synchronizujące, jako melatonina syntetyzowana w specjalnym narządzie, szyszynce, będącą składnikiem zegara biologicznego, który ma nadrzędną pozycję w hierarchii mechanizmów utrzymujących homeostazę.

W 1996 roku, kiedy przystępowałam do pracy naukowej, po wpisaniu słowa „melatonina” w wyszukiwarce baz bibliograficznych pojawiało się ok. 500 prac rocznie, dziś liczba ta uległa podwojeniu i wynosi ok. 1200. Melatonina pojawia się w każdym chyba kontekście - od bakterii przez rośliny po zdrowie człowieka. Jednym z ciekawszych odkryć ostatnich lat jest fakt, że melatonina jest syntezowana w mitochondriach neuronów, a organella te posiadają w swojej błonie receptory MT1 poprzez które melatonina hamuje w nich wydzielanie cytochromu c pod wpływem stresu (Suofu i wsp., 2017). Pokazuje to, że melatonina może mieć działanie homeostatyczne nawet wewnątrz organellum a Autorzy nazwali to działanie „automitocrine” *per analogiam* do „autocrine”. Widać zatem, że wyniki kolejnych badań nie tylko generują nowe pytania, ale też otwierają nowe obszary poszukiwań. Sądzę, że przyszłość badań nad melatoniną jest zapewniona!

**Piśmiennictwo:**

1. Barjavel, M., J., Mamdouh, Z., Raghbate, N., & Bakouche, O. (1998). Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, 160(3), 1191-1197.
2. Barrenetxe, J., Delagrang, P., & Martínez, J., A. (2004). Physiological and metabolic functions of melatonin. *JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY*, 60(1), 61-72.
3. Bartsch, C., Bartsch, H., Flüchter, S., H., Mecke, D., & Lippert, T., H. (1994). Diminished pineal function coincides with disturbed circadian endocrine rhythmicity in untreated primary cancer patients. Consequence of premature aging or of tumor growth? *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES*, 719, 502-525.
4. Bentkowski, P., & Markowska, M. (2007). Ewolucja fizjologicznych funkcji melatoniny u bezkręgowców. *KOSMOS*, 56(3-4), 383-391.
5. Bernatowicz, P., P., Kotwica-Rolińska, J., Joachimiak, E., Sikora, A., Polańska, M., A., Pijanowska, J., & Bębas, P. (2016). Temporal Expression of the Clock Genes in the Water Flea *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera). *JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY PART A ECOLOGICAL GENETICS AND PHYSIOLOGY*, 325(4), 233-254.
6. Brewer, M., C., Dawidowicz, P., & Loose, C., J. (1999). Interactive effects of fish kairomone and light on *Daphnia* escape behaviour. *JOURNAL OF PLANKTON RESEARCH*, 21, 1317-1335.
7. Bubenik, G., A. (2008). Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. *JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY*, 59 Suppl 2, 33-51.
8. Cardinali, D., P., & Hardeland, R. (2017). Inflammaging, Metabolic Syndrome and Melatonin: A Call for Treatment Studies. *NEUROENDOCRINOLOGY*, 104(4), 382-397.
9. Carrillo-Vico, A., Lardone, P., J., Alvarez-Sánchez, N., Rodríguez-Rodríguez, A., & Guerrero, J., M. (2013). Melatonin: buffering the immune system. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, 14(4), 8638-8683.
10. Claustrat, B., & Leston, J. (2015). Melatonin: Physiological effects in humans. *NEUROCHIRURGIE*, 61(2-3), 77-84.
11. Claustrat, B., Brun, J., & Chazot, G. (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *SLEEP MEDICINE REVIEWS*, 9(1), 11-24.
12. Conti, A., Conconi, S., Hertens, E., Skwarło-Soñta, K., Markowska, M., & Maestroni, G. (2000). Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *JOURNAL OF PINEAL RESEARCH*, 28, 193-202.
13. Dawidowicz, P., & Loose, C., J. (1992). Metabolic costs during predator-induced diel vertical migration in *Daphnia* - *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY*, 37, 665-669.
14. Dubocovich, M., L., Cardinali, D., P., Delagrang, P., Krause, D., N., Sudgen, D., Strosberg, A., D., & Yocca, F., D. (2000). The IUPHAR compendium of receptor characterisation and classification, II-edition. IUPHAR MEDIA, London, 187-193.
15. Dubocovich, M., L., Cardinali, D., P., Guardiola-Lemaitre, B., Hagan, R., M., Krause, D., N., Sudgen, D., Vanhoutte, P., M., & Yocca, F., D. (1998). The IUPHAR compendium of receptor characterisation and classification. IUPHAR MEDIA, London, 187-193
16. Dubocovich, M., L., Rivera-Bermudez, M., A., Gerdin, M., J., & Masana, M., I. (2003). Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *FRONTIERS IN BIOSCIENCE*, 1, 8, 1093-1108.
17. Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M., R., & Reppert, S., M. (1994). Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 91(13), 6133-7.
18. Fernandes, P., A., Cecon, E., Markus, R., P., & Ferreira, Z., S. (2006). Effect of TNF-alpha on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing. *JOURNAL OF PINEAL RESEARCH* 41(4), 344-350.
19. Guerrero, J., M., & Reiter, R., J. (2002). Melatonin-immune system relationships. *CURRENT TOPICS IN MEDICINAL CHEMISTRY*, 2(2), 167-79.

20. Hardeland, R., & Poeggeler, B. (2003). Non-vertebrate melatonin. *JOURNAL OF PINEAL RESEARCH*, 34(4), 233-41.
21. Häfker, N., S., Meyer, B., Last, K., S., Pond, D., W., Hüppe, L., & Teschke, M. (2017). Circadian Clock Involvement in Zooplankton Diel Vertical Migration. *CURRENT BIOLOGY*, 27(14), 2194-2201.
22. Hill, S., M., Belancio, V., P., Dauchy, R., T., Xiang, S., Brimer, S., Mao, L., Hauch, A., Lundberg, P., W., Summers, W., Yuan, L., Frasc, T., & Blask, D., E. (2015). Melatonin: an inhibitor of breast cancer. *ENDOCRINE-RELATED CANCER*, 22(3), R183-204.
23. Jockers, R., Delagrang, P., Dubocovich, M., L., Markus, R., P., Renault, N., Tosini, G., Cecon, E., & Zlotos, D., P. (2016). Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY*, 173(18), 2702-25.
24. Karaganis, S., Kumar, V., Beremand, P., Bailey, M., Thomas, T., & Cassone, V. (2008). Circadian genomics of the chick pineal gland in vitro. *BMC GENOMICS*, 9, 206.
25. Karamitri, A., & Jockers, R. (2019). Melatonin in type 2 diabetes mellitus and obesity. *NATURE REVIEWS ENDOCRINOLOGY*, 15(2), 105-125.
26. Kashian, D., R., & Dodson, S., I. (2004). Effects of vertebrate hormones on development and sex determination in *Daphnia magna*. *ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY*, 23(5), 1282-1288.
27. Kennaway, D., J., & Wright, H. (2002). Melatonin and circadian rhythms. *CURRENT TOPICS IN MEDICINAL CHEMISTRY*, 2(2), 199-209.
28. Kokkola, T., & Laitinen, J., T. (1998). Melatonin receptor genes. *ANNALS OF MEDICINE*, 30(1), 88-94.
29. Korf, H., W., Schomerus, C., & Stehle, J., H. (1998). The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *ADVANCES IN ANATOMY, EMBRYOLOGY AND CELL BIOLOGY*, 146, 1-100.
30. Krause, D., N., Geary, G., G., Doolen, S., & Duckles, S., P. (1999). Melatonin and cardiovascular function. *ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY*, 460, 299-310.
31. Majewski, P., Adamska, I., Pawlak, J., Barańska, A., & Skwarło-Sońta, K. (2005a) Seasonality of pineal gland activity and immune functions in chickens. *JOURNAL OF PINEAL RESEARCH*, 39(1), 66-72.
32. Majewski, P., Dziwinski, T., Pawlak, J., Waloch, M., & Skwarło-Sońta K. (2005b). Anti-inflammatory and opioid-mediated effects of melatonin on experimental peritonitis in chickens. *LIFE SCIENCES*, 76(17), 1907-1920.
33. Majewski, P., Markowska, M., Pawlak, J., Piesiewicz, A., Turkowska, E., & Skwarło-Sońta, K. (2012). Pineal gland and melatonin: Impact on the seasonality of immune defence in mammals and birds. *ADVANCES IN NEUROIMMUNE BIOLOGY*, 3(1), 95-108.
34. Malpoux, B, Migaud, M., Tricoire, H., & Chemineau, P. (2001). Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *JOURNAL OF BIOLOGICAL RHYTHMS*, 16(4), 336-47.
35. Markowska, M., Białocka, B., Ciechanowska, M., Koter, Z., Laskowska, H., Karkucińska-Więckowska, A., & Skwarło-Sońta, K. (2000). Effect of immunization on nocturnal NAT activity in chicken pineal gland. *NEUROENDOCRINOLOGY LETTERS*, 21, 367-373.
36. Markowska, M., Majewski, P., Adamska, I., Skwarło-Sońta, K., (2015). Does the local inflammation can be still defined as local?. In: *The 9th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry from Molecules to Macrophysiology*, Krakow, Poland.
37. Markowska, M., Mrozkowiak, A., & Skwarło-Sońta, K. (2002). Influence of melatonin on chicken lymphocytes in vitro: involvement of membrane receptors. *NEUROENDOCRINOLOGY LETTERS*, 23, 67-72.
38. Markowska, M., Mrozkowiak, A., Pawlak, J., & Skwarło-Sońta, K. (2004). Intracellular second messengers involved in melatonin signal transduction in chicken splenocytes in vitro. *JOURNAL OF PINEAL RESEARCH*, 37, 207-212.
39. Markus, R., P., Fernandes, P., A., Kinker, G., S., da Silveira Cruz-Machado, S., & Marçola, M. (2018). Immune-pineal axis - acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes. *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY*, 175(16), 3239-3250.
40. Markus, R., P., Ferreira, Z., S., Fernandes, P., A., & Cecon, E. (2007). The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *NEUROIMMUNOMODULATION*, 14, 126-133.

41. Masana, M., I., Witt-Enderby, P., A., & Dubocovich, M., L. (2003). Melatonin differentially modulates the expression and function of the hMT1 and hMT2 melatonin receptors upon prolonged withdrawal. *BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY*, 65(5), 731-739.
42. Nelson, R., J., & Drazen, D., L. (2000). Melatonin mediates seasonal changes in immune function. *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES*, 917, 404-15.
43. Ng, K., Y., Leong, M., K., Liang, H., & Paxinos, G. (2017). Melatonin receptors: distribution in mammalian brain and their respective putative functions. *BRAIN STRUCTURE AND FUNCTION*, 222(7), 2921-2939
44. Obłap, R., & Olszańska, B. (2001). Expression of melatonin receptor transcripts (mel-1a, mel-1b and mel-1c) in Japanese quail oocytes and eggs. *ZYGOTE*, 9(3), 237-244.
45. Oishi, A., Cecon, E., & Jockers, R. (2018). Melatonin Receptor Signaling: Impact of Receptor Oligomerization on Receptor Function. *INTERNATIONAL REVIEW OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY*, 338, 59-77.
46. Pandi-Perumal, S., R., Srinivasan, V., Maestroni, G., J., Cardinali, D., P., Poeggeler, B., & Hardeland, R. (2006). Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *THE FEBS JOURNAL*, 273(13), 2813-38.
47. Peschke, E., Bähr, I., & Mühlbauer, E. (2015). Experimental and clinical aspects of melatonin and clock genes in diabetes. *JOURNAL OF PINEAL RESEARCH*, 59(1), 1-23.
48. Piesiewicz, A., Kedzierska, U., Adamska, I., Usarek, M., Zeman, M., Skwarło-Sońta, K., & Majewski, P., M. (2012). Pineal arylalkylamine N-acetyltransferase (Aanat) gene expression as a target of inflammatory mediators in the chicken. *GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY*, 179(2), 143-151.
49. Piesiewicz, A., Podobas, E., Kędzierska, U., Joachimiak, E., Markowska, M., Majewski, P., & Skwarło-Sońta, K. (2010). Season-related differences in the biosynthetic activity of the neonatal chicken pineal gland. *OPEN ORNITHOLOGY JOURNAL*, 3, 134-140.
50. Pijanowska, J., & Kloc, M. (2004). Daphnia response to predation threat involves heat-shock proteins and the actin and tubulin cytoskeleton. *GENESIS*, 38(2), 81-86.
51. Pontes, G., N., Cardoso, E., C., Carneiro-Sampaio, M., M., & Markus, R., P. (2007). Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *JOURNAL OF PINEAL RESEARCH*, 43(4), 365-371.
52. Reiter, R., J., Rosales-Corral, S., A., Tan, D., X., Acuna-Castroviejo, D., Qin, L., Yang, S., F., & Xu, K. (2017). Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, 18(4), 843-890.
53. Reppert, S., M., Weaver, D., R., & Godson, C. (1996). Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES*, 17(3), 100-102.
54. Reppert, S., M., Weaver, D., R., Cassone, V., M., Godson, C., & Kolakowski, L., F., Jr. (1995). Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *NEURON*, 15(5), 1003-1015.
55. Rund, S., S., Yoo, B., Alam, C., Green, T., Stephens, M., T., Zeng, E., George, G., F., Sheppard, A., D., Duffield, G., E., Milenković, T., & Pfrender, M., E. (2016). Genome-wide profiling of 24 hr diel rhythmicity in the water flea, *Daphnia pulex*: network analysis reveals rhythmic gene expression and enhances functional gene annotation. *BMC GENOMICS*, 17, 653-673.
56. Sarlak, G., Jenwitheesuk, A., Chetsawang, B., & Govitrapong, P. (2013). Effects of melatonin on nervous system aging: neurogenesis and neurodegeneration. *JOURNAL OF PHARMACOLOGICAL SCIENCES*, 123(1), 9-24.
57. Schwarzenberger, A., Christjani, M., & Wacker, A. (2014). Longevity of *Daphnia* and the attenuation of stress responses by melatonin. *BMC PHYSIOLOGY*, 6, 14:18.
58. Suofu, Y., Li, W., Jean-Alphonse, F.G., Jia, J., Khattar, N.K., Li, J., Baranov, S.V., Leronni, D., Mihalik, A.C., He, Y., Cecon, E., Wehbi, V.L., Kim, J., Heath, B.E., Baranova, O.V., Wang, X., Gable, M.J., Kretz, E.S., Di Benedetto, G., Lezon, T.R., Ferrando, L.M., Larkin, T.M., Sullivan, M., Yablonska, S., Wang, J., Minnigh, M.B., Guillaumet, G., Suzenet, F., Richardson, R.M., Poloyac, S.M., Stolz, D.B., Jockers, R., Witt-Enderby, P.A., Carlisle, D.L., Vilardaga, J.P., & Friedlander, R.M. (2017). Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release. *PROCEEDINGS OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE U S A*. 19;114(38), E7997-E8006.

59. Skwarło-Sońta, K. (1996). Functional connections between the pineal gland and immune system. *ACTA NEUROBIOLOGIAE EXPERIMENTALIS JOURNAL*, 56(1), 341-357.
60. Skwarło-Sońta, K., Majewski, P., Markowska, M., Oblap, R., & Olszanska, B. (2003). Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. *CANADIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY*, 81(4), 342-349.
61. Skwarło-Sońta, K., Majewski, P., Pawlak, J., & Markowska, M. (2007). Photoperiodic vs. non-photoperiodic animals – circadian and seasonal changes in immunity. *Melatonin: From Molecules to Therapy*. NOVA SCIENCE PUBLISHERS, 247-260.
62. Szczur, A., (2010). Zmiany poziomu ekspresji cytokin prozapalnych (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 i TGF- $\beta$ 4) w leukocytach, kury domowej (*Gallus domesticus*) – praca magisterska wykonana w Zakładzie Fizjologii Zwierząt, UW pod opieką dr Magdaleny Markowskiej.
63. Tan, D., X., Reiter, R., J., Manchester, L., C., Yan, M., T., El-Sawi, M., Sainz, R., M., Mayo, J., C., Kohen, R., Allegra, M., & Hardeland, R. (2002). Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *CURRENT TOPICS IN MEDICINAL CHEMISTRY*, 2(2), 181-97.
64. Tilden, A., R., McCoolle, M., D., Harmon, S., M., Baer, K., N., & Christie, A., E. (2011). Genomic identification of a putative circadian system in the cladoceran crustacean *Daphnia pulex*. *COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY PART D: GENOMICS AND PROTEOMICS*, 6(3), 282-309.
65. Tsai, S., Y., O'Brien, T., E., & McNulty, J., A. (2001). Microglia play a role in mediating the effects of cytokines on the structure and function of the rat pineal gland. *CELL AND TISSUE RESEARCH*, 303, 423-431.
66. Turkowska, E., Adamska, I., Niedziolka, S., Majewski, P., Skwarło-Sońta, K., (2015). Seasonality of inflammation in the chicken: clock vs. melatonin control over the pro-inflammatory cytokine gene transcription. *BIOLOGICAL RHYTHM RESEARCH*, 47, 45-58.
67. Turkowska, E., Rai, S., Majewski, P., M., Skwarło-Sońta, K., (2013). Diurnal and seasonal changes in IL-6 and IL-18 gene expression in blood leukocytes of male chickens with experimental peritonitis: the impact of lighting conditions and melatonin. *JOURNAL OF ANIMAL AND FEED SCIENCES*, 22, 79-87.
68. Witt-Enderby, P., A., Bennett, J., Jarzynka, M., J., Firestine, S., & Melan, M., A. (2003). Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *LIFE SCIENCES*, 72(20), 2183-2198.
69. Wongprayoon, P., & Govitrapong, P. (2017). Melatonin as a mitochondrial protector in neurodegenerative diseases. *CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES*, 74(21), 3999-4014.
70. Xie, Z., Chen, F., Li, W., A., Geng, X., Li, C., Meng, X., Feng, Y., Liu, W., & Yu, F. (2017). A review of sleep disorders and melatonin. *NEUROLOGICAL RESEARCH*, 39(6), 559-565.
71. Zawilska, J., B., Lorenc, A., Berezińska, M., Vivien-Roels, B., Pévet, P., & Skene, D., J. (2006). Diurnal and circadian rhythms in melatonin synthesis in the turkey pineal gland and retina. *GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY*, 145(2), 162-168.
72. Zylińska, K., Komorowski, J., Robak, T., Mucha, S., & Stepień, H. (1995). Effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and granulocyte colony stimulating factor on melatonin secretion in rats in vivo and in vitro studies. *JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY*, 56, 187-190.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Prace podzieliłam na grupy tematyczne.

### I. Badania biosyntetycznej aktywności szyszynki

1. Adamska, I., Małz, M., Lewczuk, B., Blügental, N., **Markowska, M.**, Meronka, R., & Majewski, P. (2019). Daily Profiles of Neuropeptides, Catecholamines, and Neurotransmitter Receptors in the Chicken Pineal Gland. *FRONTIERS IN PHYSIOLOGY*, 9, 1–10.



2. Adamska, I., Marhelava, K., Walkiewicz, D., Kędzierska, U., **Markowska, M.**, & Majewski, P. (2016). All Genes Encoding Enzymes Participating in Melatonin Biosynthesis in the Chicken Pineal Gland are Transcribed Rhythmically. *JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY*, 67(4), 521–530.

3. Adamska, I., Lewczuk, B., **Markowska, M.**, & Majewski, P. (2016). Daily profiles of melatonin synthesis-related indoles in the pineal glands of young chickens (*Gallus gallus domesticus* L.). *JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B-BIOLOGY*, 164, 335–343.

4. Piesiewicz, A., Podobas, E., Kędzierska, U., Joachimiak, E., **Markowska, M.**, Majewski, P., & Skwarło-Sońta, K. (2010). Season-related differences in the biosynthetic activity of the neonatal chicken pineal gland. *OPEN ORNITHOLOGY JOURNAL*, 3, 134–140.

Częstą przyczyną uzyskiwania sprzecznych wyników w badaniach rytmu procesów biologicznych jest różna częstotliwość ich pomiarów w ciągu doby. W trzech pracach aktywność biosyntetyczna szyszynki była badana co 2 godziny, co dało możliwość uzyskania bardzo szczegółowych wyników. W badaniach tych wykazaliśmy rytm znakomitej większości badanych procesów (prace 2, 3), które niekiedy były uważane za niecykliczne. Wyniki przedstawione w pracy 1 po raz pierwszy ukazują rytm katecholamin, neuropeptydów i ich receptorów w szyszynce kurcząt. Wyniki przedstawione w 4 pracy wskazują, że sezon, w którym wykluły się kurczęta wpływa na aktywność biosyntetyczną szyszynki niezależnie od tego, że po wykluciu zwierzęta hodowane były w fotoperiodzie L:D = 12:12. Praca ta tematycznie nawiązuje do drugiego badanego tematu, przedstawionego poniżej.

## **II. Badania wpływu sezonu, fotoperiodu i melatoniny na układ odpornościowy ssaków i ptaków**

5. Majewski, P., **Markowska, M.**, Pawlak, J., Piesiewicz, A., Turkowska, E., & Skwarło-Sońta, K. (2012). Pineal gland and melatonin: Impact on the seasonality of immune defence in mammals and birds. *ADVANCES IN NEUROIMMUNE BIOLOGY*, 3(1), 95–108.

6. Pawlak, J., Gołąb, M., **Markowska, M.**, Majewski, P., & Skwarło-Sońta, K. (2009). Photoperiod-related changes in hormonal and immune status of male Siberian hamsters, *Phodopus sungorus*. *COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY A-MOLECULAR & INTEGRATIVE PHYSIOLOGY*, 152(3), 299-303

7. Skwarło-Sońta, K., Majewski, P., Pawlak, J., & **Markowska, M.** (2007). Photoperiodic vs. non-photoperiodic animals – circadian and seasonal changes in immunity. *Melatonin: From Molecules to Therapy*. Londyn: Nova Science Publishers 247 - 260.

8. Pawlak, J., Majewski, P., **Markowska, M.**, & Skwarło-Sońta, K. (2005). Season- and gender-dependent changes in the immune function of Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *NEUROENDOCRINOLOGY LETTERS*, 26, 1–3.

Wieloletnie badania prowadzone przez zespoły badające wpływ melatoniny na układ odpornościowy ssaków i ptaków wskazywały na różnice wyników uzyskiwanych w laboratorium i terenie. Jedną z przyczyn może być zastosowany podczas doświadczeń fotoperiod. W laboratorium zazwyczaj stosuje się fotoperiod 12L:12D,, który w naszej strefie geograficznej występuje tylko dwa razy w roku. Prace z tego cyklu wskazują, że działanie układu odpornościowego zgodne jest z warunkami świetlnymi panującymi w środowisku życia zwierząt, niezależnie od utrzymywanego w laboratorium reżimu świetlnego. Oznacza to, że endogenny zegar biologiczny w układzie rocznym jest nadrzędny w stosunku do doraźnie zastosowanych warunków świetlnych.

### III. Badanie wpływu melatoniny na układ odpornościowy ptaków

9. **Markowska, M.**, Mrozkowiak, A., Pawlak, J., & Skwarło-Sońta, K. (2004). Intracellular second messengers involved in melatonin signal transduction in chicken splenocytes *in vitro*. JOURNAL OF PINEAL RESEARCH, 37, 207–212.

10. **Markowska, M.**, Mrozkowiak, A., & Skwarło-Sońta, K. (2002). Influence of melatonin on chicken lymphocytes *in vitro*: involvement of membrane receptors. NEUROENDOCRINOLOGY LETTERS, 23, 67–72.

11. Skwarło-Sońta, K., Majewski, P., **Markowska, M.**, Jakubowska, A., & Waloch, M. (2002). Bi-modal effect of melatonin on inflammatory reaction in young chicken. Treatise on pineal gland and melatonin. Enfield, NH, USA: Science Publishers, 225-238.

12. **Markowska, M.**, Waloch, M., & Skwarło-Sońta, K. (2001). Melatonin inhibits PHA-stimulated chicken lymphocyte proliferation *in vitro*. JOURNAL OF PINEAL RESEARCH, 30, 220–226.

W pracach tych podsumowane są wyniki otrzymane podczas wykonywaniu pracy magisterskiej i doktorskiej. W badaniach *in vitro* wykazałam dualizm działania melatoniny zależny od pobudzenia splenocytów: melatonina stymuluje proliferację spontaniczną, natomiast hamuje namnażanie się komórek pobudzonych mitogenem. Odmiennie działanie melatoniny na splenocyty kurcząt zachodzi za pośrednictwem dwóch różnych podklas jej receptorów błonowych: Mel1c i MT2. Inne są też wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnałowe inicjowane przez melatoninę podczas pobudzenia i bez mitogenem. Mechanizm stymulującego działania melatoniny związany jest ze wzrostem poziomu  $IP_3$  i  $Ca^{2+}$ , przekaźników niezbędnych do aktywacji limfocytów, oraz obniżaniem wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP. Natomiast w aktywowanych mitogenem splenocytach Mel powoduje wzrost stężenia cAMP oraz obniżanie poziomu  $IP_3$  i  $Ca^{2+}$ . W pracy 11 przedstawione są wyniki wskazujące, że także *in vivo* melatonina wpływa na układ odpornościowy ptaków odmiennie w zależności od stopnia jego aktywacji.

#### IV. Badania wzajemnego oddziaływania szyszynka-układ odpornościowy

13. Skwarło-Sońta, K., Majewski, P., **Markowska, M.**, Obłap, R., & Olszańska, B. (2003). Bi-directional communication between pineal gland and immune system. *CANADIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY*, 81, 342–349.

14. **Markowska, M.**, Białecka, B., Ciechanowska, M., Koter, Z., Laskowska, H., Karkucińska-Więckowska, A., & Skwarło-Sońta, K. (2000). Effect of immunization on nocturnal NAT activity in chicken pineal gland. *NEUROENDOCRINOLOGY LETTERS*, 21, 367–373.

W pracach tych zawarte zostały pierwsze przesłanki o istnieniu komunikacji między układem odpornościowym a aktywnością biosyntetyczną szyszynki ptaków.

#### V. Pozostałe prace

15. Kiernożek, E., Kowalik, A., **Markowska, M.**, Kozłowska, E., & Drela, N. (2014). Day/night changes of thymus-deriving natural regulatory T cell development and function. *JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY*, 274(1-2), 102–110.

Praca przedstawia dobowe różnice w funkcjonowaniu regulatorowych limfocytów T z uwzględnieniem wpływu kortykosteronu na te procesy. Moim zadaniem było oznaczenie kortykosteronu.

16. Pietrzak, B., Bednarska, A., **Markowska, M.**, Rojek, M., Szymańska, E., & Ślusarczyk, M. (2013). Behavioural and physiological mechanisms behind extreme longevity in *Daphnia*. *HYDROBIOLOGIA*, 715(1), 125–134.

Praca przedstawia potencjalne mechanizmy stojące za długowiecznością *Daphnia* w Morskim Oku. Moją rolą było zmierzenie i wykorzystanie wskaźnika RNA/DNA do wytłumaczenia tego zjawiska.

17. Sińska, B., Sotowska-Brochocka, J., Rosołowska-Huszcz, D., **Markowska, M.**, Bożentowicz, M., Skwarło-Sońta, K., & Gromadzka-Ostrowska, J. (2007). Diet supplementation with cholesterol and vitamin E influences rat hormonal and immune status. *JOURNAL OF ANIMAL AND FEED SCIENCES*, 16, 109–120.

Praca przedstawia wpływ diety wysokocholesterolowej na wybrane wskaźniki działania układu hormonalnego i odpornościowego szczurów. Mój udział polegał na uczestniczeniu w doświadczeniach i interpretacji wyników.

18. Majewski, P., **Markowska, M.**, Laskowska, H., Waloch, M., & Skwarło-Sońta, K. (2002). Effect of morphine on thioglycollate-induced peritonitis in chickens. *NEUROENDOCRINOLOGY LETTERS*, 23, 87–93.

Praca przedstawia udział endogennych opioidów na reakcję zapalną otrzewnej. Mój udział polegał na uczestniczeniu w doświadczeniach i interpretacji wyników.

19. Bułtowicz, M., Buraczewska, M., **Markowska, M.**, & Skwarło-Sońta, K. (2001). Immunotoxicity of airborne dust particles in young chickens of both sexes. ACTA BIOLOGICA CRACOVIENSIA SERIES ZOOLOGIA, 43, 77–87.

Praca przedstawia wpływ zanieczyszczenia środowiska na układ odpornościowy kurcząt. Mój udział polegał na uczestniczeniu w doświadczeniach i interpretacji wyników.

20. Conti, A., Conconi, S., Hertens, E., Skwarło-Sońta, K., **Markowska, M.**, & Maestroni, G. (2000). Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. JOURNAL OF PINEAL RESEARCH, 28, 193–202.

Wyniki tej pracy wskazują na syntezę melatoniny w komórkach odpornościowych ssaków. Mój udział polegał na oznaczeniu aktywności AA-NAT w komórkach odpornościowych.

Warszawa 25.04.2019

Magdalena Markowska