

### Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Turniak-Kusy z tytułu

*Wpływ testosteronu na odpowiedź astrocytów*

*w modelach demielinizacji ośrodkowego układu nerwowego*

Opracowana na zlecenie Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

W ostatnich latach, zarówno w badaniach *in vitro*, jak i w badaniach *in vivo* wykazano, że androgeny mogą pełnić znaczącą rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej, w przebiegu zapalenia o podłożu autoimmunologicznym w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) oraz mają wpływ na stan zapalny, demielinizację i neurodegenerację. Ponadto udowodniono, że androgeny działają protekcyjnie na neurony i komórki gleju oraz wpływają na zdolność remielinizacji w różnych modelach uszkodzenia OUN.

Stwardnienie rozsiane (SR) jest chorobą zapalno-degeneracyjną OUN, w której zachorowalność jest związana z płcią, ponieważ choroba 2-3 krotnie częściej występuje u kobiet. Ta różnica najwyraźniej jest widoczna w przedziale wieku między 20 a 36 rokiem życia, co sugeruje udział hormonów płciowych w patogenezie choroby. Aktualnie mimo systematycznego wprowadzania nowych leków, SR jest nadal chorobą nieuleczalną, która w różnym tempie, ale nieuchronnie prowadzi do kalectwa. Ponadto, żaden z aktualnie stosowanych leków nie ma potencjału remielinizacyjnego. Dlatego stale prowadzone są badania doświadczalne oceniające różne mechanizmy przeciwdziałające neurozapaleniu i neurodegeneracji oraz stymulujące neuroregenerację. Poznanie mechanizmów i wzajemnych zależności między reakcjami tkanek OUN, a funkcjonowaniem układu odpornościowego i wpływem hormonów, jest główną drogą do wyznaczenia nowych kierunków terapii. Jednym z takich potencjalnych kierunków jest stosowanie różnej kombinacji hormonów płciowych, a szczególnie androgenów. Pilotażowe badania kliniczne wykazały dobrą tolerancję leczenia zarówno testosteronem, jak i selektywnymi modulatorami receptora androgenowego oraz ich wpływ na poprawę funkcji poznawczych, mniejsze zmęczenie oraz spowolnienie procesu atrofii mózgu. Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Turniak-Kusy

zatytułowana „Wpływ testosteronu na odpowiedź astrocytów w modelach demielinizacji ośrodkowego układu nerwowego” jest przykładem kontynuacji i rozszerzania takich badań, w szczególności oceniających mechanizmy działania testosteronu na astrocyty.

Pod względem formalnym praca składa się z 123 stron podzielonych na rozdziały: Wstęp, który zawiera podstawowe informacje o SR oraz o roli androgenów, astrocytów i wybranych cytokin w chorobach demielinizacyjnych. Ponadto Doktorantka opisuje w nim zwierzęce modele chorób demielinizacyjnych o podłożu zapalnym. Następnie przedstawia: Cele pracy, Założenia metodologiczne badań, Prezentację wyników badań – analiza i interpretacja, Dyskusja, Podsumowanie i Wnioski, Streszczenie, Bibliografie oraz Spis Rycin i Tabel. Proporcje między poszczególnymi rozdziałami pracy są właściwe. Piśmiennictwo jest bardzo obszerne, zawiera 310 pozycji ułożonych zgodnie z kolejnością cytowania i uwzględnia najnowsze dane z literatury polskiej i anglojęzycznej. Teoretyczne podstawy pracy opisano bardzo dokładnie. Doktorantka opisuje najnowsze dane dotyczące roli androgenów w chorobach demielinizacyjnych, a następnie szczegółowo przedstawia rolę astrocytów w funkcjonowaniu OUN. To bardzo ważny podrozdział ponieważ astrocyty pełnią kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy w OUN, a ich wielokierunkowa i skomplikowana odpowiedź na szkodliwe czynniki nie jest do końca poznana. Obecnie, astrocyty są aktywnie badanym celem potencjalnych terapii neuroprotektoryjnych i neuroregeneracyjnych.

Celem rozprawy doktorskiej była ocena w warunkach *in vitro* wpływu testosteronu na wydzielanie wybranych cytokin i chemokin przez astrocyty z określeniem udziału receptora androgenowego. Ponadto w przebiegu eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego (EAE ang. *experimental autoimmune encephalomyelitis*) u myszy C57Bl6 analizowano wpływ endogennego testosteronu na obraz kliniczny oraz wpływ egzogenego testosteronu na przebieg kliniczny EAE oraz na astrogliozę i ubytek mieliny.

Dla realizacji celu pracy Doktorantka wykonała szereg badań eksperymentalnych. Pierwsze cele pracy realizowała w oparciu o linię komórkową astrocytów DI TNC1 pochodzącą z pierwotnej hodowli astrocytów typu 1, które następnie były hodowane w odpowiednim medium, transferowane na płytki i inkubowane z LPC, testosteronem i flutamidem w różnych kombinacjach. Po zakończeniu eksperymentu Doktorantka oceniała żywotność komórek za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego, badała poziom ekspresji wybranych genów za pomocą ilościowej analizy real-time RT-PCR, a stężenie TNF $\alpha$ , CXCL1, IL-6 oraz IL8 w supernatancie z nad hodowli testem ELISA. Drugim rodzajem badań eksperymentalnych były badania samców myszy szczepu C57/Bl6, u których w trakcie eksperymentu wykonano orchidektomię, następnie za pomocą antygenu

mielinowego MOG 35-55 indukowano EAE i wprowadzono implant podskórny w celu podania testosteronu. Myszy badano najpierw przyżyciowo – oceniano nasilenie objawów neurologicznych, zdolności motoryczne za pomocą urządzenia Rotarod. Następnie po uśmierceniu w 16 tygodniu, preparaty tkanek OUN barwiono immunohistochemicznie i obserwowano za pomocą mikroskopu konfokalnego. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Stosowane metody badawcze są opisane bardzo szczegółowo i tak ustalona metodyka wskazuje, że Doktorantka posiada dużą wiedzę dotyczącą metod używanych w eksperymentach badawczych przeprowadzanych zarówno *In vitro* jak i w modelu zwierzęcym EAE. Doktorantka potrafi prawidłowo dobrać narzędzia badawcze umożliwiające ocenę wyników eksperymentu.

Uzyskane wyniki są przedstawione przez Doktorantkę w sposób wyczerpujący z uwzględnieniem wyników analizy statystycznej. Zwraca uwagę staranne przedstawienie wszystkich otrzymanych wyników liczbowych i ich omówienie. Doktorantka wykazała, że testosteron redukuje indukowany przez bodziec prozapalny wzrost wydzielania CXCL1, a obserwowany efekt jest zależny od dawki i osiągany za pośrednictwem receptora androgenowego. Zaobserwowała również, że testosteron nasila wydzielanie IL-6 przez astrocyty w sposób zależny od dawki. Ponadto wykazała, że endogenny testosteron działa protekcyjnie w modelu przewlekłego eksperymentalnego EAE, a zastosowany egzogennie w formie terapii łagodzi przebieg schorzenia – zmniejsza nasilenie objawów, wiąże się z poprawą funkcjonalną, zmniejsza utratę mielinę i łagodzi astroglizję. Wykazała również podobieństwo działania testosteronu i antagonisty receptora androgenowego – flutamidu, co otwiera możliwość eksploracji nowych opcji terapeutycznych z użyciem tego związku.

W oparciu o uzyskane wyniki Doktorantka sformułowała wnioski, które wynikają z otrzymanych wyników i są ich podsumowaniem.

1. Testosteron pobudza wydzielanie IL-6 przez astrocyty *in vitro*, zarówno w warunkach fizjologicznych jak i prozapalnych
2. Testosteron redukuje nasilenie wydzielania CXCL1 w warunkach prozapalnych *in vitro*
3. Astrocyty linii komórkowej DI TNC1 nie wydzielają TNF $\alpha$  ani IL-8 w badanych warunkach eksperymentalnych. Testosteron nie ma wpływu na wydzielanie tych białek
4. Receptor androgenowy pośredniczy w efektach testosteronu *in vitro*
5. Flutamid wykazuje działanie analogiczne do testosteronu w zakresie wpływu na wydzielanie IL-6 oraz CXCL1


6. Ekspozycja na endogeny testosteron działa protekcyjnie w modelu przewlekłego eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego – opóźnia pojawienie się pierwszych objawów, łagodzi przebieg schorzenia, a także redukuje utratę mieliny i łagodzi astrogliozę
7. Ekspozycja na egzogeny testosteron zastosowany w formie terapii (po wystąpieniu pierwszych objawów klinicznych w modelu przewlekłego eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego łagodzi przebieg schorzenia – zmniejsza nasilenie objawów, wiąże się z poprawą funkcjonalną, zmniejsza utratę mieliny i łagodzi astrogliozę.

Mgr Małgorzata Turniak-Kusy wykazała, korzystny wpływ testosteronu na przebieg eksperymentalnego autoimmunizacyjnego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego, a także na proces astrogliozy i redukcję utraty mieliny. Jej badania wskazują, że testosteron ma potencjał nie tylko protekcyjny, ale również leczniczy w zakresie łagodzenia przebiegu EAE, ponieważ zastosowanie testosteronu po wystąpieniu objawów wiąże się ze znacząco łagodniejszym przebiegiem schorzenia nie tylko w porównaniu do grupy zwierząt kastrowanych, ale również do myszy eksponowanych na endogeny testosteron już w momencie immunizacji. Temat pracy doktorskiej został zrealizowany, a przedstawiona do recenzji dysertacja jest wykonana bardzo starannie. Doktorantka wykazała się bardzo dużą wiedzą teoretyczną w badanej przez nią dyscyplinie naukowej. Chciałabym podkreślić, szeroki zakres prowadzonych eksperymentów i ich duże skomplikowanie metodologiczne, co pozwoliło na ocenę problemu badawczego zarówno *In vitro* jak i *In vivo* w modelu zwierzęcym. Stanowi to oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Nie mam żadnych poważnych zastrzeżeń do pracy i oceniam ją bardzo dobrze.

Rozprawa doktorska zatytułowana " *Wpływ testosteronu na odpowiedź astrocytów w modelach demielinizacji ośrodkowego układu nerwowego*" spełnia warunki określone w art. 13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017roku, poz. 1789). Wnoszę o dopuszczenie mgr Małgorzaty Turniak-Kusy do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Rzeszów 23.09.2023

Prof. dr hab. med. Halina Bartosik-Psujek



2023 -10- 0 5