

Warszawa, dnia 04.09.2023

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Lekarza wet. Michała Rafała Płóciennika pt. „Ekspresja receptora glikokortykosteroidowego w tkance płucnej, w nerkach i wątrobie świń ze wstrząsem endotoksycznym indukowanym podaniem lipopolisacharydu z *Escherichia coli* O111:B4”.

Wykonanej w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Promotorzy: dr hab. inż. Liliana Kiczak, prof. UPWr
Prof. dr hab. Waldemar Goździk

Podstawą formalną wykonania recenzji był dokument z dn. 04.07.2023 o numerze MDDD0000.4101.16.2023, podpisany przez przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, prof. dr hab. Wojciecha Nizańskiego, zgodnie z którym zostałem powołany na recenzenta rozprawy doktorskiej lek. wet. Michała Płóciennika.

Wprowadzenie, przesłanki

Sepsa oraz wstrząs septyczny stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów ludzi na świecie oraz są to jedne z najczęściej leczonych stanów w oddziałach intensywnej terapii (OIT) w Polsce i na świecie. Mimo postępów w rozpoznawaniu i leczeniu sepsy, wyniki leczenia są dalekie od zadowalających. Poza leczeniem infekcji, kluczową rolę odgrywa wspomaganie funkcji niewydolnych narządów, często kilku jednocześnie. Resuscytacja układu krążenia odgrywa kluczową rolę, jednak poza płynoterapią oraz lekami wazokonstrykcyjnymi brak jest skutecznych leków mogących wspomóc przywrócenie funkcji układu krążenia. Od wielu lat prowadzone są badania nad wykorzystaniem glikokortykosteroidów jako leków wspomagających w leczeniu wstrząsu septycznego. Początkowe próby



wykorzystania tych leków w wysokich dawkach zakończyły się niepowodzeniem. Obecnie dominuje koncepcja rozwoju względnej niedoczynności osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej, która jest przyczynkiem do podaży glikokortykosteroidów w dawkach suplementacyjnych u chorych we wstrząsie septycznym z utrzymującą się niewydolnością krążenia. Niestety, dowody kliniczne przemawiające za korzyściami z takiego leczenia są ograniczone. Podkreślić należy niezwykle złożony mechanizm działania glikokortykosteroidów związany m. in. z istnieniem różnych form receptora dla tych związków. Ostatnie badania oparte o metody transkryptomyczne wykazały, że pewne endotypy chorych ze wstrząsem septycznym mogą odnieść większą szkodę z podaży tych leków niż inni. Wskazuje to na konieczność pogłębienia wiedzy na temat biologicznych podstaw leczenia glikokortykosteroidami.

Doktorant podjął się zbadania bardzo ciekawego zagadnienia związanego z możliwością terapeutycznej modulacji ekspresji receptora glikokortykosteroidowego poprzez podawanie wziewne tlenku azotu (NO). Jako że istnieje hipoteza o oporności na glikokortykosteroidy u chorych we wstrząsie septycznym związana z obniżeniem ekspresji tego receptora, próby modulacji jego ekspresji wydają się szczególnie interesujące. Ostatnia pandemia COVID-19, potwierdziła przydatność kliniczną glikokortykosteroidów w leczeniu wstrząsu septycznego o etiologii wirusowej u ludzi, przez co temat podjęty przez Doktoranta wydaje się szczególnie aktualny.

Forma rozprawy

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lekarza weterynarii Michała Płóciennika ma układ klasyczny i właściwy dla rozprawy doktorskiej, liczy 78 stron, zilustrowana jest 20 rycinami. Dane zostały przedstawione w 10 tabelach. Rozprawę otwiera spis treści. Następnie przedstawiono wyczerpujące wyjaśnienie stosowanych skrótów w języku angielskim i polskim. Kolejne rozdziały, to streszczenia (polskie i angielskie), Wstęp, Cele pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Spis Rycin i Tabel i Bibliografia. We Wstępie, na 14



stronach opisano szczegółowe dane dotyczące wstrząsu septycznego w zakresie: definicji, epidemiologii, etiopatogenezy oraz zarysu leczenia ze szczegółowym omówieniem glikokortykosteroidów, receptora glikokortykosteroidowego oraz NO. W ostatnich podrozdziałach omówione zostały zwierzęce modele sepsy w tym wykorzystanie świń. Cel pracy został przedstawiony w 5 zadaniach wyłaniających się z przesłanek. Opis materiałów i metod obejmuje bardzo dokładny opis modelu zwierzęcego wstrząsu endotoksycznego, zaś metody analityczne opisano bardzo starannie przedstawiając także wykaz odczynników i producentów. Wyjaśniono dobór metod statystycznych. Wyniki, na 23 stronach, prezentują obserwacje kliniczne i pomiary fizjologiczne zwierząt, wyniki analizy porównawczej leczenia standardowe – leczenie badane (hydrokortyzon + NO) dla ekspresji receptora glikokortykosteroidowego oraz regulowanych przez niego genów w nerkach, płucach oraz wątrobie. Wyniki przedstawiono w tabelach i na wykresach słupkowych, czytelnie oznaczając kolorami poszczególne grupy badane i zaznaczając różnice istotne statystycznie. Dodatkowo przykłady detekcji każdego z badanych białek zostały zilustrowane fotografiami (membran oraz preparatów immunohistochemicznych). W Dyskusji Doktorant odniósł się do poszczególnych wyników, a w jej drugiej części podsumował całość badania. Wnioski ujęte w 3 punktach odpowiadają na zadane cele pracy. Spis piśmiennictwa obejmuje 105 pozycji wymienionych w kolejności cytowania w tekście pracy.

Opis szczegółowy metodyki i wyników Rozprawy Doktorskiej

Przedmiotem badania przeprowadzonego przez lek. wet. Michała Płóciennika była ocena wpływu kombinowanej terapii hydrokortyzonem i wziewnym NO na poziom ekspresji receptora glikokortykosteroidowego (GCR), jego aktywacji oraz zmian histopatologicznych w nerkach, płucach oraz wątrobie świń poddanych eksperymentalnej endotoksemii i intensywnej terapii. Przesłanki do takiego układu eksperymentalnego stanowiły literaturowe dane dotyczące zwiększenia ekspresji GCR pod wpływem NO. Badanie przeprowadzono na 23



osobnikach rasy biała polska zwisłoucha. Grupę badaną stanowiło 12 osobników, a grupę kontrolną (leczenie standardowe) 11 osobników. Zastosowano bardzo zaawansowany model zwierzęcy, w którym świnie poddano w znieczuleniu ogólnym pełnej instrumentacji, a następnie prowadzono wlew dożylny lipopolisacharydu (LPS), jednocześnie prowadząc resuscytację rozwijającego się wstrząsu zgodnie z wytycznymi klinicznymi. Monitorowano, m.in. rzut serca, rytm serca, ciśnienia w tętnicy płucnej, ośrodkowe ciśnienie żyłne, temperaturę, diurezę, równowagę kwasowo-zasadową. Zwierzęta w grupie badanej otrzymywały trzy dawki hydrokortyzonu (25 mg, i.v.) oraz wziewny NO (30 ppm) od 3 h po indukcji wstrząsu. Po 10 h wlew LPS zatrzymano, prowadzono leczenie oraz obserwacje przez kolejne 10 godzin, po czym zwierzęta zostały humanitarnie uśmiercone. Aktywację GCR badano za pomocą techniki *Western blotting* we frakcjach komórkowych: cytoplazmatycznej oraz jądrowej. Dokonano także analizy immunohistochemicznej ekspresji i lokalizacji GCR, wykorzystując zarówno półilościową ocenę mikroskopową, jak i zautomatyzowaną analizę informatyczną obrazu. Zastosowano łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym, z użyciem starterów specyficznych dla wybranych genów, których ekspresję modulują glikokortykosteroidy (IL-1 β , IL-6, TNF, TGF- β).

Wszystkie zwierzęta poddane badaniu przeżyły zaplanowany czas badania. Monitorowane parametry jednoznacznie świadczą o tym, że zwierzęta w obu grupach wprowadzono we wstrząs endotoksyczny, który może być dobrym modelem wstrząsu septycznego. W grupie badanej obserwowano redukcję średniego ciśnienia w tętnicy płucnej, co wskazuje na pozytywny efekt NO oraz hydrokortyzonu. We wszystkich badanych narządach obserwowano typowe zmiany histopatologiczne dla resuscytowanego wstrząsu septycznego. Korzystny efekt terapii kombinowanej obserwowano jedynie w płucach, co sugeruje korzystne lokalne działanie NO. Analiza homogenatu tkankowego wykazała w obu grupach podobny poziom ekspresji GCR we wszystkich badanych narządach, niezależnie od zastosowanego leczenia. Jedynym wyjątkiem była wyższa



ekspresja białka o masie 85 kDa w nerkach zwierząt w grupie kontrolnej, w porównaniu do grupy badanej. Także poziom ekspresji GCR we frakcji cytoplazmatycznej i jądrowej był podobny w obu badanych grupach. Wyniki te zostały potwierdzone w analizie immunohistochemicznej. Także poziom ekspresji mRNA dla badanych cytokin we wszystkich analizowanych narządach nie uległ modulacji przez badane leczenie. Należy zwrócić jednak uwagę na znaczną zmienność osobniczą wyników, która może być przyczyną braku istotnych różnic w niektórych badanych parametrach. Jest to nieuniknione w badaniach na modelach zwierzęcych, zwłaszcza wykorzystując duże zwierzęta, niebędące w hodowli wsobnej ani nie przebywające w warunkach SPF (*specific-pathogen free*).

Analiza uzyskanych wyników prowadzi do wniosków sformułowanych przez Doktoranta, które zostały przedstawione w rozprawie.

Ocena Rozprawy Doktorskiej, uwagi

Przedłożoną rozprawę doktorską lek. wet. Michała Płóciennika oceniam bardzo wysoko pod względem merytorycznym. Praca napisana jest bardzo dobrze, układ jest spójny, logicznie ułożony. Wyniki są przedstawione klarownie, przy tak znacznej ich liczbie łatwe do prześledzenia i zrozumienia. Oprawa graficzna, ilustracje są staranne i podkreślają osiągnięte wyniki.

Doktorant zwięźle i dokładnie wprowadził czytelnika w obszar badawczy w rozdziale „Wstęp”. Metody zostały opisane z należą starannością. Doktorant wykorzystał umiejętnie metody statystyczne do analizy danych i osiągnięcia zakładanych celów. Wyniki zostały zaprezentowane w sposób klarowny. W rozdziale „Dyskusja” Doktorant w sposób dojrzały omówił uzyskane wyniki precyzyjnie odnosząc się do pozycji literaturowych. Wnioski zostały wyciągnięte poprawnie i ostrożnie. Jest to szczególnie warte podkreślenia w kontekście uzyskania negatywnych wyników, które nie potwierdziły wpływu kombinowanej terapii na ekspresję i aktywację GCR. Pragnę podkreślić, że na



podstawie przedłożonej dysertacji nie mam wątpliwości co do umiejętności Doktoranta krytycznej analizy, interpretacji własnych wyników i dyskusowania ich z istniejącą literaturą tematu.


Uważam, że rozprawa doktorska lek. wet. Michała Płóciennika, stanowi istotny wkład do istniejącej wiedzy na temat ekspresji i aktywacji GCR w modelu wstrząsu septycznego. Nie mam istotnych zastrzeżeń merytorycznych do przedłożonej rozprawy. Z obowiązku recenzenta pozwolę sobie jednak przedstawić poniższe uwagi i pytania:

- Chociaż Doktorant jasno sprecyzowała cele pracy, nie przedstawił jednak hipotezy badawczej, która mogłaby stanowić podstawę przeprowadzenia badań.
- Brak jest informacji dotyczącej płci badanych zwierząt i dystrybucji w poszczególnych grupach. Brak jest również informacji dotyczącej pomiarów oporów w krążeniu systemowym i płucnym, o których Doktorant wspomina w rozdziale 7.1.
- Wśród analizowanych transkryptów genów kontrolowanych przez GCR Doktorant badał ekspresję genów dla wybranych cytokin, których regulacja nie jest swoista dla glikokortykosteroidów. Interesujące byłoby oznaczenie ekspresji bardziej specyficznie regulowanych białek, np. GILZ.
- W niektórych fragmentach tekstu, zwłaszcza Wstępu, Doktorant nie uniknął użycia kolokwialnych i nieprecyzyjnych informacji, zwłaszcza dotyczących klinicznych aspektów wstrząsu septycznego (np. „...sepsa może przejść we wstrząs septyczny...”, „W klasycznym zakażeniu...”, „Obecnie wykorzystywanie glikokortykosteroidów jako leczenia wspomagającego w leczeniu sepsy nie wzbudza kontrowersji.” – Jest wręcz odwrotnie) oraz drobnych błędów edytorskich.
- „Badaniem potwierdzającym sepsę jest stwierdzenie obecności bakterii (w przypadku sepsy o podłożu bakteryjnym) w posiewie krwi.” – stwierdzenie to jest szczególnie mylące, ponieważ wg aktualnych definicji



i wytycznych dodatnie posiewy krwi nie są potrzebne do rozpoznania sepsy. Dodatkowo posiewy krwi uzyskuje się jedynie u ok 30% chorych z sepsą i nie należy od nich uzależniać rozpoznania sepsy ani wdrożenia leczenia. Uzyskanie dodatnich posiewów krwi dostarcza oczywiście cennych wskazówek ułatwiających dobranie właściwej antybiotykoterapii.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska **lekarza weterynarii Michała Płóciennika** pt. „Ekspresja receptora glikokortykosteroidowego w tkance płucnej, w nerkach i wątrobie świń ze wstrząsem endotoksycznym indukowanym podaniem lipopolisacharydu z *Escherichia coli* O111:B4.” **spełnia warunki** określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Wniosuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o przyjęcie rozprawy doktorskiej lek. wet. Michała Płóciennika i dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Zakładu Immunologii Translacyjnej
i Eksperymentalnej Intensywnej Terapii

dr hab. n. med. Tomasz Skirecki, prof. CMKP

