

Prof. dr hab. Łukasz Adaszek
Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej
lek. wet. Michała Płóciennika

„Ekspresja receptora glikokortykosteroidowego w tkance płucnej, w nerkach i wątrobie świń ze wstrząsem endotoksycznym indukowanym podaniem lipopolisacharydu z *Escherichia coli* O111:B4”

Układ redakcyjny ocenianej dysertacji odpowiada wymogom stawianym pracom naukowym. Liczy ona 78 stron wydruku komputerowego, w tym spis treści, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel prac, materiał i metody, wyniki, dyskusję z wnioskami końcowymi, bibliografię, spis rycin, spis tabel i bibliografię. Dokumentacja jest bardzo bogata i obejmuje 10 tabel i 20 rycin umiejętnie włączonych w tekst pracy.

Praca dotyczy istotnego problemu klinicznego jakim jest sepsa. Stan ten definiowany jest jako zagrażająca życiu niewydolność narządów wewnętrznych związana z nieprawidłową odpowiedzią gospodarza na zakażenie. Występuje on zarówno u pacjentów ludzkich, jak i weterynaryjnych, a związany jest z dłuższym czasem życia zwierząt i ludzi, i starzeniem się społeczeństwa, wzrastającą liczbą przypadków chorób immunologicznych przebiegających z immunosupresją oraz narastającą antybiotykoodpornością bakterii. Pomimo stosowania nowoczesnej intensywnej terapii śmiertelność wewnątrzszpitalna u pacjentów z sepsą wynosi 30 a 45%.

W pracy lek. wet. Michał Płóciennik przedstawił wpływ terapii skojarzonej tlenkiem azotu i hydrokortyzonem na liczbę i lokalizację receptora glikokortykosteroidowego w płucach, nerkach i wątrobie świń. Oporność na glikokortykosteroidy, czyli nieodpowiednia odpowiedź receptora glikokortykosteroidowego (GCR), często jest obserwowana w przebiegu sepsy i prawdopodobnie przyczynia się do braku oczekiwanej poprawy po zastosowaniu glikokortykosteroidów w terapii. Doktorant ilość GR analizował za pomocą techniki Western blot. Lokalizację GCR w płucach, wątrobie i nerkach oceniał korzystając z barwienia immunohistochemicznego. Wyniki badań w grupie zwierząt badanych – u których

wywołano wstrząs septyczny, a następnie poddawano leczeniu odnosił do grupy kontrolnej, w której zwierzęta nie poddawano terapii. Niewielka ilość podobnych badań opisanych w piśmiennictwie krajowym i zagranicznym była przyczyną podjęcia przez lek. wet. Michała Płóciennika tematu badawczego zaprezentowanego w tytule pracy doktorskiej. Decyzję o prowadzeniu obserwacji w tym obszarze podjął On ze świadomością trudności związanych z koniecznością przeprowadzenia dość złożonych badań na modelu świńskim obejmujących wykorzystanie wielu technik badawczych, takich jak: Western blot, barwienie immunohistochemiczne tkanek, czy badanie ekspresji genów prozapalnych metodą real-time PCR (IL-1 β , TNF- α , IL-6, TGF- β), zakładając, że uzyskane wyniki badań pozwolą na opracowanie skuteczniejszej terapii pacjentów z sepsą.

Ponieważ jak podaje Doktorant w skali globalnej na sepsę zapada rokrocznie 49 milionów osób, z czego około 11 milionów umiera, podjęcie przez Niego badań dotyczących zagadnień zaprezentowanych w tytule pracy należy uznać za trafne i w pełni uzasadnione zarówno w aspekcie poznawczym, jak i praktycznym.

Pracę rozpoczyna, poprzedzony streszczeniem, piętnastostronicowy wstęp, w którym Doktorant przedstawił aktualną definicję sepsy, dokładną patogenezę tego stanu, rolę lipopolisacharydów bakteryjnych w jego rozwoju, zasady i metody jego leczenia. We wstępie przedstawiono także opis dotychczasowych prób wykorzystania modeli zwierzęcych w badaniach nad wstrząsem septycznym. Wydaje się, że ta część pracy powinna być nieco inaczej ułożona. Rozdział 4.5 - Tlenek azotu - znaczenie biologiczne i zastosowanie medyczne i 4.6 – Glikokortykosteroidy, dotyczą terapii sepsy, w związku z czym w moim przekonaniu powinny być podrozdziałami rozdziału 4.4 - Zarys leczenia sepsy.

Wstęp wskazuje na bardzo dobrą znajomość przez Doktoranta badanej tematyki i piśmiennictwa. Jest on tak napisany, że uzasadnia celowość prowadzenia badań podjętych przez lek. wet. Michała Płóciennika i pozwala na sformułowanie ich ostatecznego celu, który logicznie wypływa z przedstawionego we wstępie opisu.

Doktorant postawił sobie do realizacji pięć celów badawczych tj.: przygotowanie świńskiego modelu wstrząsu endotoksycznego i zastosowanie skojarzonej terapii małymi dawkami kortyzonu i wziewnie podawanego tlenu azotu; zbadanie ekspresji receptora glikokortykosteroidowego na poziomie białka techniką Western blot w narządach wewnętrznych; ocenę aktywacji receptora glikokortykosteroidowego - przeprowadzenie subfrakcjonowania komórkowego w celu uzyskania frakcji białek cytoplazmatycznych i frakcji białek jądrowych związanych z chromatyną (płuca, wątroba, nerki) i pomiar białka metodą Western blot; ocenę aktywacji receptora glikokortykosteroidowego – analiza nasilenia

reakcji jądrowej i cytoplazmatycznej w preparatach immunohistochemicznych; ocenę aktywacji receptora glikokortykosteroidowego – pomiar ekspresji genów. W moim przekonaniu cele 3-5 mogłyby być połączone w jeden - np. ocena aktywacji receptora glikokortykosteroidowego metodami proteomicznymi, immunohistochemicznymi oraz molekularnymi.

W Rozdziale „Materiał i Metody”, liczącym 11 stron Autor opisał użyte w pracy materiały oraz metodyki badawcze. Przedstawił charakterystykę grupy badawczej, szczegółowo opisał procedurę doświadczenia klinicznego (wywołanie sepsy, znieczulanie, eutanazja zwierząt, pobieranie materiału do dalszych analiz), jak i badań laboratoryjnych (Western blot, badanie immunohistochemiczne, real-time PCR). Rozdział ten kończy przedstawienie opisu statystycznej analizy wyników. Metodyka badań została dobrana poprawnie, a sam opis poszczególnych analiz jest niezwykle dokładny, pozwalający czytelnikowi pracy na łatwe powtórzenie przeprowadzonych eksperymentów. Doktorant w odpowiednich tabelach szczegółowo przedstawił także charakterystykę wykorzystanej aparatury, programów komputerowych i odczynników. Takie zestawienia choć nie są standardem w pracach doktorskich, to w moim przekonaniu potwierdzają wiarygodność badań oraz są cenną pomocą dla osób chcących przeprowadzić podobne analizy.

Wyniki badań przedstawiono na 24 stronach, pracy, w które umiejętnie wkomponowano ryciny i tabele prezentujące uzyskane przez Doktoranta rezultaty. Na rycinach 3,9,15 nie oznaczono skali (jak np. na rycinie 7), a w ich opisie nie podano jaką metodą barwiono preparaty histopatologiczne.

Doktorant wykazał, że podawanie tlenu azotu z kortyzolem świniom z wywołanym eksperymentalnie wstrząsem septycznym nie wpływa, w porównaniu z grupą kontrolną, na różnice w obrazie histopatologicznym wątroby, płuc i nerek, zwiększenie ilości i nasiloną aktywność receptora glikokortykosteroidowego w tych narządach, oraz nasiloną ekspresję wybranych genów, kontrolowanych przez ten receptor - kluczowych cytokin zapalnych: IL-1 β , IL-6, TNF- α oraz TGF- β .

Lek. wet. Michał Płóciennik zaprezentował uzyskane wyniki Western blott, badań immunohistochemicznych oraz PCR w czasie rzeczywistym oddzielnie dla każdego badanego narządu (nerki, płuca, wątroba). Nie jest to błędem, aczkolwiek prowadzi do kopiowania znacznej części tekstu i zwiększenia objętości pracy. Można było temu zapobiec, gdyby wyniki analiz uzyskanych z wszystkich narządów umieścić we wspólnych podrozdziałach np.: „Ocena histologiczna preparatów narządów wewnętrznych”, „Analiza ekspresji GR w homogenatach białkowych „, itd.. Ponadto w wynikach Doktorant niepotrzebnie powtarza w

wielu miejscach metodykę badań, która została już przedstawiona w rozdziale „Materiały i metody”.

W liczącym 6 stron rozdziale „Dyskusja” (nie umieszczono go w spisie treści) Doktorant podkreślił, unikalność prowadzonych badań. Wyniki badań własnych umiejętnie skonfrontował z analogicznymi danymi zamieszczonymi w dostępnym piśmiennictwie .

Lek. wet. Michał Płóciennik dowiódł nie tylko dobrej znajomości badanej problematyki, ale również umiejętności weryfikacji wyników badań własnych w kontekście wyników uzyskanych przez innych autorów. Sprawnie wskazał, co może być przyczyną rozbieżności pomiędzy rezultatami badań własnych, a uzyskanymi przez innych naukowców (dawka LPS, czas trwania eksperymentu). Dyskutując wyniki badań własnych wyciągnął wnioski, iż zastosowanie terapii kombinowanej, polegającej na jednoczesnym podawaniu tlenu azotu w formie wziewnej i hydrokortyzonu w formie wlewów nie wpływa na ilość i lokalizację receptora glikokortykosteroidowego w świńskim modelu wstrząsu septycznego indukowanego endotoksyną. W badanym modelu u zwierząt poddanych kombinowanej terapii (niska dożylna dawka hydrokortyzonu i wziewny tlenek azotu) najprawdopodobniej nie rozwinęła się oporność na glikokortykosteroidy.

Praca zakończona jest trzema wnioskami, które logicznie wynikają z kontekstu doktoratu i podsumowują całokształt przeprowadzonych badań.

Wykaz piśmiennictwa jest bogaty (liczy 105 pozycji), co świadczy o zdolności doboru właściwych materiałów źródłowych do analizy wyników i dyskusji w ramach tematyki będącej przedmiotem badań.

Reasumując stwierdzam, że przedstawione w pracy zagadnienia stanowią ważne uzupełnienie dotychczasowej wiedzy dotyczącej patogenezы i leczenia wstrząsu septycznego.


Praca zawiera elementy nowatorskie, została wykonana metodycznie poprawnie, a wyniki badań mają duże znaczenie poznawcze zarówno dla medycyny weterynaryjnej, jak i medycyny człowieka.

Nieznaczne uwagi krytyczne przedstawione w treści recenzji pracy mają w większości charakter porządkowy i nie wpływają na pozytywną ocenę rozprawy. Doktorant włożył wiele pracy w wykonanie dość trudnych badań, wywiązując się w pełni z zadań określonych w celach badawczych.

W konkluzji stwierdzam, że praca doktorska pt.: **”Ekspresja receptora glikokortykosteroidowego w tkance płucnej, w nerkach i wątrobie świń ze wstrząsem endotoksycznym indukowanym podaniem lipopolisacharydu z Escherichia coli O111:B4”** odpowiada warunkom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo

o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742.), dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. wet. Michała Płóciennika do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora oraz wnioskuję o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej stosowaną nagrodą.

Lublin, 15 lipca 2023


Prof. dr hab. Łukasz Adaszek,