



UNIwersytet
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU

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

Rozprawa doktorska

lek. wet. Michał Rafał Płóciennik

Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Promotorzy:

dr hab. inż. Liliana Kiczak, prof. UPWr

Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Prof. dr hab. Waldemar Goździk

Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii, Wydział Lekarski,

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wrocław 2023

ProHum - Interdyscyplinarna Szkoła Doktorska- planowanie badań eksperymentalnych, tworzenie
i optymalizacja zwierzęcych modeli doświadczalnych z umiejętnościami transferowania ich do badań
klinicznych w medycynie człowieka

Umowa nr POWR.03.02.00-00-I008/17

Składam ogromne podziękowania wszystkim, dzięki którym niniejsza rozprawa powstała.

Pragnę podziękować profesor Lilianie Kiczak i profesorowi Waldemarowi Goździkowi, za opiekę w trakcie realizacji badań oraz przygotowywania rozprawy doktorskiej. Bez Państwa nieocenionej życzliwości, cierpliwości i zaangażowania niniejsza rozprawa nie mogłaby powstać.

Serdecznie dziękuję profesor Agnieszce Noszczyk- Nowak, profesor Bożenie Obmińskiej-Mrukowicz, profesorowi Marcinowi Nowakowi oraz profesorowi Wojciechowi Niżańskiemu za wsparcie i ogromne pokłady życzliwości dla młodych badaczy. Niejednokrotnie przypadkowa, krótka rozmowa z Państwem dodawała nowej energii i pomysłów.

Dziękuję bardzo profesor Urszuli Paślawskiej oraz doktorowi Robertowi Paślawskiemu, którzy zasiali we mnie chęć do pracy naukowej i wielokrotnie bardzo mi pomogli- zarówno w życiu naukowym jak i prywatnym.

Ogromne podziękowania pragnę złożyć profesorowi Jackowi Bani, który służył nie tylko radą ale i udostępnił kierowane przez siebie laboratorium i jego zasoby, dzięki czemu niniejsza praca mogła powstać.

Pragnę podziękować profesorowi Piotrowi Kuropce za rady, okazaną pomoc oraz udostępnienie zasobów Zakładu.

Serdeczne podziękowania składam profesor Barbarze Adamik za fachowe i konkretne wskazówki, które umożliwiły analizę statystyczną zgromadzonych danych

Bardzo dziękuję doktor Alicji Tomaszek oraz doktor Aleksandrze Piotrowskiej za pomoc w sporządzeniu i ucyfrowieniu preparatów immunohistochemicznych.

Odrębne podziękowania składam lekarz weterynarii Aleksandrze Tabiś, której przenikliwy umysł niejednokrotnie potrafił celnym komentarzem wypchnąć człowieka ze strefy komfortu. Rozmowy z Aleksandrą były niezwykle motywujące.

Bardzo dziękuję lekarzowi weterynarii Kacprowi Nowakowi oraz lekarz weterynarii Karolinie Owsieńskiej- Schmidt za to że jesteście i jakoś przetrwaliśmy.

Dodatkowo pragnę podziękować całemu Zespołowi Zakładu Higieny Surowców Zwierzęcych za wieloletnią gościnność i serdeczność.

Odrębne podziękowania pragnę złożyć członkom Rady Szkoły Doktorskiej, pracownikom Dziekanatu Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, personelowi Działu Nauki oraz Biura Szkoły Doktorskiej. Państwa praca stwarzała możliwie dogodne warunki dla realizacji rozprawy.

Dziękuję Pani Kamili Ziarko za czteroletnią opiekę nad projektem ProHum- w ramach którego powstała niniejsza rozprawa.

Spis treści

1. Wykaz skrótów	5
2. Streszczenie pracy w języku polskim	6
3. Streszczenie pracy w języku angielskim	8
4. Wstęp	10
4.1. Sepsa i wstrząs septyczny	10
4.2. Etiopatogeneza sepsy	10
4.3. Lipopolisacharydy	13
4.4. Zarys leczenia sepsy	15
4.5. Tlenek azotu - znaczenie biologiczne i zastosowanie medyczne	17
4.6. Glikokortykosteroidy	20
4.7. Receptor glikokortykosteroidowy (GCR).....	21
4.8. Świnia jako model w badaniach translacyjnych	23
4.9. Zwierzęce modele sepsy.....	24
5. Cel pracy	25
6. Materiały i metody	26
6.1. Opis modelu zwierzęcego	26
6.6. Odczynniki i zestawy analityczne	34
Tab. 4 Odczynniki wykorzystane podczas realizacji części laboratoryjnej badania	34
6.7. Oprogramowanie i narzędzia bioinformatyczne	36
6.8. Analiza statystyczna	36
6.9. Aparatura.....	36
6.10. Roztwory przygotowywane samodzielnie wykorzystywane w pracy	37
7. Wyniki	38
7.1. Dane kliniczne	38
7.2. Nerki	40
7.2.1. Ocena histologiczna preparatów	40
7.2.2. Analiza ekspresji GR w homogenatach białkowych nerek	42
7.2.3. Analiza immunohistochemiczna preparatów nerek.....	44
7.2.4. Analiza ekspresji mRNA wybranych cytokin w nerkach	46
7.3. Płuca	47
7.3.1. Ocena histologiczna preparatów	47
7.3.2. Analiza ekspresji GR w homogenatach białkowych płuc.....	49
7.3.3. Analiza immunohistochemiczna preparatów płuc	52
7.3.4. Analiza ekspresji mRNA wybranych cytokin w płucach.....	53
7.4. Wątroba	54

7.4.1.	<i>Ocena histologiczna preparatów</i>	54
7.4.2.	<i>Analiza ekspresji GR w homogenatach białkowych wątroby</i>	56
7.4.3.	<i>Analiza immunohistochemiczna preparatów wątroby</i>	58
7.4.4.	<i>Analiza ekspresji mRNA wybranych cytokin w wątrobie</i>	60
9.	Spis rycin	68
10.	Spis tabel	70
11.	Bibliografia	71

1. Wykaz skrótów

Tab. 1 Wykaz skrótów użytych w tekście.

Skrót	Rozwinięcie w j. angielskim	Rozwinięcie w j. polskim
ACTH	<i>adrenocorticotropic hormone</i>	adrenokortykotropina
cGMP	<i>cyclic guanosine monophosphate</i>	cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan
CRH	<i>corticotropin-releasing hormone</i>	kortykoliberyna; hormon uwalniający kortykotropinę
DAMP	<i>damage associated molecular patterns</i>	struktury molekularne związane z uszkodzeniem
DIC	<i>disseminated intravascular coagulation</i>	zespół rozlanego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego
ECMO	<i>extracorporeal membrane oxygenation</i>	ciągłe pozaustrojowe natlenianie krwi
GCR	<i>glucocorticoid receptor</i>	receptor glikokortykosteroidowy
IL-10	<i>interleukin 10</i>	interleukina 10
IL-12	<i>interleukin 12</i>	interleukina 12
IL-18	<i>interleukin 18</i>	interleukina 18
IL-1β	<i>interleukin 1β</i>	interleukina 1 β
LPS	<i>lipopolysaccharide</i>	lipopolisacharyd
NET	<i>neutrophil extracellular traps</i>	neutrofilowe sieci zewnątrzkomórkowe
NF-χB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>	czynnik jądrowy kappa-wzmacniacz łańcucha lekkiego aktywowanych komórek B
NO	<i>nitric oxide</i>	tlenek azotu (II)
NOS	<i>nitric oxide synthase</i>	syntaza tlenku azotu
NR3C1	<i>nuclear receptor subfamily 3 group C member 1</i>	receptor jądrowy glikokortykoidowy
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>	wzorce molekularne związane z patogenami
sGC	<i>soluble guanylyl cyclase</i>	rozpuszczalna cyklaza guanylowa
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>	zespół ogólnoustrojowej reakcji zapalnej
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>	transformujący czynnik wzrostu beta
TLR	<i>toll-like receptors</i>	receptory toll-podobne

2. Streszczenie pracy w języku polskim

Sepsa jest ciężkim stanem chorobowym, spowodowanym nieprawidłową odpowiedzią gospodarza na zakażenie, co prowadzi do rozwoju niewydolności wielonarządowej. Pomimo stosowania nowoczesnej intensywnej terapii śmiertelność wewnątrzszpitalna nadal waha się między 30 a 45%. Liczne badania przedkliniczne wskazują na kluczową rolę wrażliwości na endogenne glikokortykosteroidy w modulowaniu przebiegu sepsy m.in. poprzez ograniczenie nadmiernej reakcji zapalnej. Z tego względu w wielu randomizowanych badaniach klinicznych testowano glikokortykosteroidy jako element terapii wspomagającej w przebiegu sepsy i wstrząsu septycznego. Wyniki tych badań są jednak niejednoznaczne.

Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy może być tzw. oporność na glikokortykosteroidy, czyli nieodpowiednia odpowiedź receptora glikokortykosteroidowego (GCR), często obserwowana w przebiegu sepsy i prawdopodobnie przyczyniająca się do braku oczekiwanej poprawy po zastosowaniu glikokortykosteroidów w terapii sepsy. Z drugiej strony, terapia skojarzona - jednoczesne podawanie dożylnie kortykosteroidu i wziewnego tlenu azotu (iNO) w świńskim modelu wstrząsu endotoksycznego (indukowanego wlewem bakteryjnego lipopolisacharydu, LPS) osłabiła odpowiedź zapalną i pozwoliła na zachowanie normalnego obrazu histologicznego w płucach i innych ważnych organach.

Dlatego w rozprawie wykorzystano świński model wstrząsu endotoksycznego do oceny wpływu w/w terapii skojarzonej na liczbę i lokalizację receptora glikokortykosteroidowego w płucach, nerkach i wątrobie za pomocą dwóch komplementarnych metod – immunohistochemii i Western blot. Dodatkowo sprawdzono aktywność GCR poprzez pomiar ekspresji genów kontrolowanych przez ten receptor.

Wstrząs endotoksyczny indukowano 10-godzinną dożylną infuzją lipopolisacharydu z *E. coli*, a po jej zakończeniu obserwację kliniczną kontynuowano przez kolejnych 10 godzin. W grupie badanej 12 świń otrzymywało tlenek azotu w inhalacji (iNO) w skojarzeniu z dożylną podażą hydrokortyzonu. Terapię iNO (30 ppm) wraz hydrokortyzonem (w trzech dawkach po 25 mg. i.v.) rozpoczynano

w trzeciej godzinie od rozpoczęcia infuzji LPS i kontynuowano do końca eksperymentu. 11 świń stanowiło grupę kontrolną, w grupie tej zastosowano taki sam schemat infuzji dożylniej LPS. W obu grupach resuscytację wstrząsu prowadzono według zaleceń SSC (*Surviving Sepsis Campaign 2016*).

Frację białek cytoplazmatycznych i frakcję białek jądrowych związanych z chromatyną izolowano z płuc, wątroby i nerek, a następnie ilość GR analizowano za pomocą techniki Western blot. Lokalizację GCR w płucach, wątrobie i nerkach oceniano korzystając z barwienia immunohistochemicznego. Ekspresję genów prozapalnych (IL-1 β , TNF- α , IL-6, TGF- β) zmierzono wykorzystując reakcję PCR w czasie rzeczywistym.

Western blot wykazał, że liczba GCR we frakcji białek cytoplazmatycznych i frakcji białek jądrowych związanych z chromatyną w płucach, wątrobie i nerkach pozostaje na podobnym poziomie w grupie kontrolnej i w grupie świń poddanych terapii skojarzonej (iNO i hydrokortyzon). Analiza immunohistochemiczna wykazała, że reakcja jądrowa i cytoplazmatyczna nie różniła się w obu grupach badanych zwierząt. Ekspresja genów prozapalnych, kontrolowanych przez GCR również pozostała u wszystkich zwierząt na podobnym poziomie.

W świńskim modelu wstrząsu endotoksycznego zwierzęta poddane terapii skojarzonej, z jednoczesnym podawaniem iNO i hydrokortyzonu wykazały podobną liczbę, lokalizację i aktywność receptora glikokortykosteroidowego w płucach, wątrobie i nerkach jak zwierzęta z grupy kontrolnej.

3. Streszczenie pracy w języku angielskim

Sepsis is an aggressive and multifactorial disease state resulting from the dysregulated host response to infection, leading to multiple organ failure. Despite modern intensive care the hospital mortality in sepsis still varies between 30–45%. Multiple preclinical studies have proven the central role of endogenous glucocorticoids tolerance against sepsis by counteracting several of the sepsis characteristics i.a. excessive inflammation. Therefore, glucocorticoids (GCs) have been tested as an adjunctive therapy in sepsis and septic shock in different randomized clinical trials. Nonetheless, these studies produced conflicting results.

Glucocorticoid resistance - inadequate response of the glucocorticoid receptor (GCR) is a well-known manifestation in sepsis and may contribute to the failure of GCs to improve sepsis patients. On the other hand, a combination therapy - simultaneous administration of both a NO intravenous corticosteroid and an inhaled nitric oxide (iNO) in a porcine endotoxemia model (infusion of bacterial lipopolysaccharide, LPS) attenuated the inflammatory response and almost preserved or restored normal histology of both lung and systemic organs.

Thus, a long-term porcine endotoxic shock model was used to evaluate the influence of this combination therapy on amount and localization of GR in lung, kidney, and liver, using two complementary methods – immunohistochemistry and Western blotting (after protein subfractionation) as well as GCR activity (expression of genes controlled by GCR).

An endotoxic shock was established in 23 animals by continuous infusion of *E. coli* LPS for 10 hours. Then the animals were observed for 10 hours. 12 pigs received iNO and intravenous hydrocortisone (iNO treatment started 3 hours after the initial LPS infusion and continued until experiment end) as well as standard treatment. 11 pigs were controls (with standard treatment).

Cytoplasmic and nuclear protein fractions were extracted from lungs, liver, and kidney for Western blot analysis of GCR. GCR localization in porcine lungs, liver, and kidneys was analyzed using immunohistochemistry (IHC). Expression of proinflammatory genes (IL-1 β , TNF- α , IL-6, TGF- β) was measured by real-time PCR.

Western blotting demonstrated that amount of GCR in cytoplasmic and nuclear protein fractions in lungs, kidneys and livers remained on similar levels in pigs treated with iNO and hydrocortisone and in controls. The IHC analysis revealed that the cytoplasmic and nuclear staining pattern was comparable in both analyzed groups. Expression of proinflammatory genes, controlled by GCR, remained on similar level in all animals.

In porcine endotoxemic shock model animals treated with the combination of iNO, and hydrocortisone and controls represented similar amounts, localization, and activity of GR in pulmonary, hepatic, and renal tissue

4. Wstęp

4.1. Sepsa i wstrząs septyczny

Sepsa definiowana jest współcześnie jako zagrażająca życiu niewydolność narządów wewnętrznych związana z nieprawidłową odpowiedzią gospodarza na zakażenie¹. Jej istotę stanowi rozwój ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej (SIRS, ang. *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) w odpowiedzi na czynnik infekcyjny. W szczególnie ciężkich przypadkach sepsa może przejść we wstrząs septyczny. Wstrząs septyczny charakteryzuje się utrzymującym się niedociśnieniem (pomimo odpowiedniej resuscytacji płynami) i koniecznością stosowania wazopresorów, takich jak np. norepinefryna, w celu utrzymania odpowiedniego ciśnienia krwi. Postępowanie we wstrząsie septycznym wymaga szybkiej i skutecznej resuscytacji, której celem jest przywrócenie i utrzymanie odpowiedniego przepływu krwi do ważnych organów oraz wczesnego rozpoczęcia odpowiedniej terapii przeciwbakteryjnej w celu opanowania zakażenia².

Szacuje się, że w skali globalnej na sepsę zapada rokrocznie 49 milionów osób, z czego około 11 milionów umiera. Szacunki wskazują, że sepsa odpowiada za blisko 20% wszystkich zgonów w skali całego świata³, zaś śmiertelność wewnątrzszpitalna w przypadku rozwinięcia się wstrząsu septycznego dochodzić może nawet do 60%⁴.

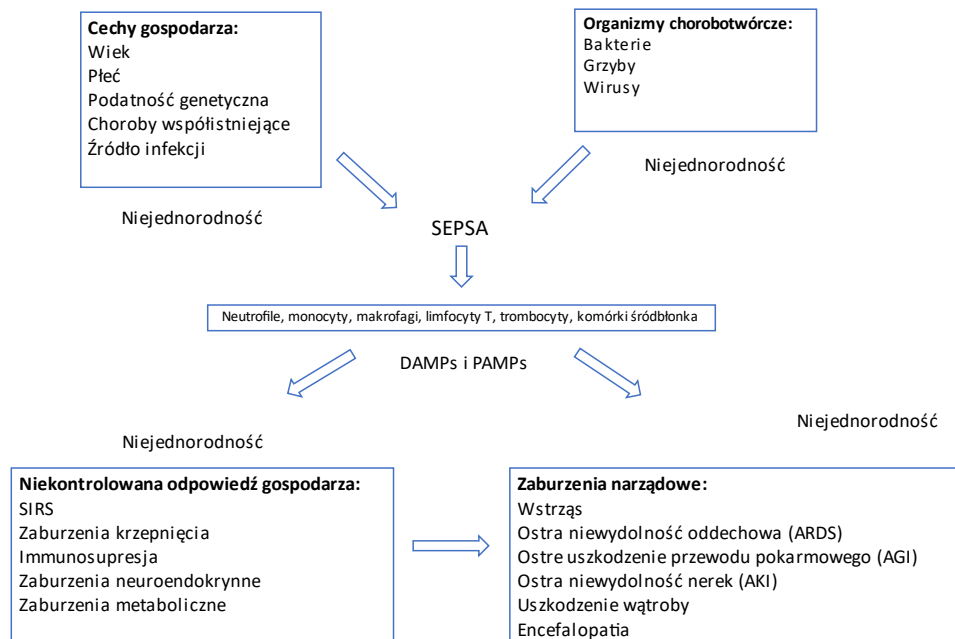
Sepsa, mimo zwiększania dostępności usług medycznych i sukcesywnej poprawy warunków sanitarnych, nadal stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego na świecie³. Związane jest to głównie z takimi czynnikami jak starzenie się społeczeństwa, wzrastająca liczba osób o obniżonym statusie immunologicznym i coraz szersze rozpowszechnienie zjawiska antybiotykoodporności bakterii⁵.

W celu poprawy przeżywalności i ograniczenia długofalowych następstw przebycia sepsy konieczne staje się poszukiwanie doskonalszych metod jej leczenia i wczesnego rozpoznawania.

4.2. Etiopatogeneza sepsy

Dokładna patogeneza sepsy pozostaje nie w pełni wyjaśniona, wiadome jest jednak, że składa się na nią szeroka gama oddziaływań pomiędzy patogenami oraz układem immunologicznym i krzepnięcia pacjenta⁶. Do rozwoju sepsy może dochodzić w przebiegu zakażenia wirusowego, grzybiczego lub pasożytniczego (np. ameboza),

najczęstszą przyczynę sepsy stanowi jednak zakażenie bakteryjne. Pierwotnym źródłem infekcji pozostają najczęściej dolne drogi oddechowe, układ moczowy, jama brzuszna oraz cewniki wewnątrznaczyniowe i wentylacja mechaniczna⁷. W ograniczonym i niepowikłanym zakażeniu proces zapalny ma charakter samoograniczający się.



Ryc.1 Schematyczne ujęcie sepsy obrazujące procesy patofizjologiczne i typy komórek zaangażowane w proces⁸.

U podstaw rozwoju sepsy leżą wielopłaszczyznowe zaburzenia subtelnej równowagi pomiędzy procesami prozapalnymi i przeciwzapalnymi. Na początkowym etapie rozwoju sepsy dochodzi do zakażenia tkanek prowadzącego do wzbudzenia odpowiedzi immunologicznej. W klasycznym zakażeniu np. bakteriami Gram ujemnymi z grupy *E. coli* po pojawieniu się w organizmie wzorców molekularnych związanych z patogenami (PAMPs, ang. *pathogen-associated molecular patterns*) oraz struktur molekularnych związanych z uszkodzeniem (DAMPs, ang. *damage associated molecular patterns*) dochodzi do aktywacji swoistych receptorów typu Toll (TLRs, ang. *Toll-like receptors*) znajdujących się m.in. na powierzchni komórek dendrytycznych, makrofagów, neutrofilii oraz fibroblastów⁹. W efekcie czynnik prozapalny NF-κB przemieszcza się do jądra komórkowego i stymuluje transkrypcję interleukin prozapalnych, takich jak interleukina-1β (IL-1β), interleukina-12 (IL-12), interleukina-18 (IL-18), interferonów oraz czynnika martwicy nowotworów (TNF-α). Białka

kodowane przez te geny pośredniczą w ogólnoustrojowej reakcji zapalnej i rekrutacji komórek odpornościowych do miejsca zakażenia^{10,11} oraz prowadzą do aktywacji kolejnych grup cytokin (m.in. IL-6, IL-8, IFN- γ), układu krzepnięcia krwi, szlaku dopełniacza i osłabienia adaptacyjnego układu odpornościowego, rozumianego m.in. jako: limfopenia (zmniejszona liczba limfocytów w krążącej krwi) oraz utrata przez monocyty zdolności do prezentacji antygenów oraz produkcji cytokin prozapalnych^{12,13}. Uwalnianie cytokin powoduje uogólnioną wazodylatację naczyniową, uszkodzenie śródbłonna naczyniowego i zaburzenia mikrokrążenia, prowadząc do niedociśnienia i zmniejszenia perfuzji tkanek, co przyczynia się do rozwoju niewydolności narządowej¹⁴.

Rozwijający się stres oksydacyjny i uwalniany systemowo tlenek azotu (NO) może prowadzić pośrednio do uszkodzenia śródbłonna, co pociąga za sobą dysfunkcję wielu tkanek i narządów, prowadząc do dalszego nasilenia ogólnoustrojowej reakcji zapalnej¹⁵. W prawidłowo funkcjonującym układzie immunologicznym opisane powyżej reakcje ulegają modulacji m.in. wskutek uwalniania cytokin przeciwzapalnych, takich jak np. IL-10 i aktywacji limfocytów T regulatorowych^{16,17}. Fizjologicznie działania prozapalne są limitowane przez czynniki przeciwzapalne, co prowadzi do samoograniczenia się następstw zakażenia. W sepsie równowaga pomiędzy reakcjami pro- i przeciwzapalnymi zostaje zaburzona, co w rezultacie prowadzi do uszkodzeń narządowych, a wielu wypadkach w dalszej konsekwencji do stanu immunoparezy, rozwoju niewydolności wielonarządowej i śmierci.

Podczas sepsy rozwijający się stan zapalny doprowadza do uszkodzenia śródbłonna wyściełającego ściany naczyń krwionośnych, migracji komórek jednojądrzastych i aktywacji układu krzepnięcia, w wyniku czego dochodzi do zużycia czynników krzepnięcia¹⁸. Według tradycyjnej koncepcji aktywacji układu krzepnięcia wyróżnia się zewnątrzpochodny i wewnątrzpochodny szlak krzepnięcia. Zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia inicjowany jest przez transmembranową glikoproteinę — tromboplastynę tkankową¹⁹. Glikoproteina ta uwalniana jest przez komórki okołonaczyniowe w wyniku uszkodzenia ściany naczynia (np. przerwania jego ciągłości)²⁰. Produkowana jest ona także przez intensywnie migrujące w przebiegu sepsy neutrofile, makrofagi i monocyty, co prowadzi do aktywacji zewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia²¹. Wydaje się, że stan prokoagulacyjny w przebiegu sepsy spowodowany jest nieprawidłowo zwiększoną ekspresją tromboplastyny tkankowej

i gwałtownym spadkiem jej inhibitora, jakim jest inhibitor szlaku czynnika tkankowego (TFPI)²². Stan ten prowadzić może do mikrozakrzepowej niewydolności wielonarządowej.

Dodatkowo w przebiegu sepsy dochodzić może do tzw. immunotrombozy. Jak wspomniano wyżej komórki układu odporności wrodzonej posiadają zdolność aktywowania zewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia w odpowiedzi na wzorce molekularne związane z patogenami (PAMPs) oraz wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (DAMPs). Aktywacja zewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia w ten sposób nazywana jest immunotrombozą i wiąże się z dalszymi następstwami. W jej przebiegu dochodzi do rekrutacji oraz aktywacji neutrofilii, które w konsekwencji tego uwalniają neutrofilowe pułapki zewnątrzkomórkowe (NET, ang. *neutrophil extracellular traps*)²³. Niniejsze pułapki zawierają przede wszystkim histony, DNA, nukleosomy oraz enzymy promujące zakrzepicę²⁴. W ostatnich latach zaobserwowano, że w przebiegu sepsy wyraźnie wzrasta osoczowe stężenie histonów, co może stanowić odzwierciedlenie uwalniania pułapek zewnątrzkomórkowych przez neutrofile²⁵. Histony wzmagają agregację płytek krwi, nasilają obumieranie komórek nabłonka oraz promują migrację neutrofilii²⁶. Immunotromboza ma na celu ograniczenie rozprzestrzenienia się zakażenia lub uszkodzeń, natomiast w niektórych przypadkach dochodzi do dysproporcji pomiędzy krzepnięciem a trombolizą, w wyniku czego rozwija się rozsiane wykrzepianie wewnątrznaczyniowe (DIC, ang. *Disseminated Intravascular Coagulation*)²³. DIC charakteryzuje się zużyciem czynników krzepnięcia i płytek krwi i przyczynia się do rozwoju dysfunkcji narządów we wstrząsie²⁷.

Podsumowując, patogeneza sepsy polega na wielopłaszczyznowym współoddziaływaniu gospodarza i drobnoustrojów, co wywołuje aktywację odpowiedzi immunologicznej gospodarza i rozwój ogólnoustrojowego stanu zapalnego, który może doprowadzić do niewydolności wielonarządowej i śmierci.

4.3. Lipopolisacharydy

Lipopolisacharydy (LPS) stanowią główny składnik błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych i są rozpoznawane przez TLR związane z membranami komórek układu odpornościowego. Są one uwalniane w niewielkich stężeniach ze ściany komórkowej bakterii podczas replikacji lub poprzez wytwarzanie pęcherzyków błony zewnętrznej, zaś w większych stężeniach podczas śmierci lub lizy bakterii²⁸.

TLR są wykształconymi i utrwalonymi w toku ewolucji receptorami zaliczanymi do rodziny receptorów rozpoznających wzorce. U ssaków opisano dotychczas występowanie trzynastu TLR (TLR1-13), w tym u człowieka wykazano obecność dziesięciu z nich (TLR1-10). Poszczególne TLR różnią się między sobą lokalizacją, pochodzeniem (wirusowe lub niewirusowe), koreceptorem, budową formy aktywnej i drogą sygnałową. TLR są związane z błoną komórkową i bezpośrednio odpowiadają za regulację reakcji zapalnych i aktywację wrodzonej lub swoistej odpowiedzi immunologicznej po związaniu rozpoznawanych wzorców PAMP. Pierwszym z poznanych TLR był TLR4, za pośrednictwem którego komórki wrodzonego układu odpornościowego rozpoznają endotoksyny.

Lipopolisacharydy zbudowane są z trzech zasadniczych części: hydrofobowej części lipidowej A, oligosacharydu rdzeniowego i powtarzającego się polisacharydowego łańcucha bocznego O. Część lipidowa A charakteryzuje się największą zmiennością i jest zarazem odpowiedzialna za toksyczność. Stopień toksyczności danego lipopolisacharydu związany jest ze wzorcami acylowania, fosforylowania i obecnością lub brakiem dodatkowych grup²⁹. Rdzeń oligosacharydu jest wysoce konserwatywnym regionem cząsteczki. Skład głównego oligosacharydu może być różny u różnych gatunków bakterii Gram-ujemnych i uważa się, że ma on wpływ na przebieg infekcji wywoływanych przez te bakterie. Łańcuch polisacharydowy O-antygeny stanowi najbardziej zmienną część LPS i jest odpowiedzialny za serotypową specyficzność bakterii Gram-ujemnych. Składa się on z powtarzających się jednostek różnych cukrów, w tym glukozaminy, ramnozy i mannozy i może mieć długość do kilkuset jednostek³⁰. Związanie LPS do TLR powoduje aktywację wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych i uwalnianie cytokin prozapalnych, co prowadzi do aktywacji wrodzonej odpowiedzi immunologicznej.

Uważa się, że LPS odgrywa kluczową rolę w patogenezie wstrząsu septycznego wywołanego przez bakterie Gram-ujemne. Narażenie nawet na niewielką ilość LPS wywołuje silną odpowiedź immunologiczną³¹. Uwalnianie cytokin prozapalnych i innych czynników, takich jak np. histamina może prowadzić do rozszerzenia naczyń, obniżenia napięcia naczyniowego i zmniejszenia rzutu serca, co może przyczynić się do rozwoju wstrząsu septycznego³². Co więcej, ze względu na swoją zdolność do aktywowania płytek krwi (poprzez receptor TLR4), LPS ma silne działanie prozakrzepowe, co znacząco zwiększa ryzyko wystąpienia incydentów

zatorowo-zakrzepowych, a nawet rozwoju rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC). Co ważne oddziaływanie LPS jest istotne nie tylko w sepsie, ale także w rozwoju wielu zapalnych chorób przewlekłych, w tym chorób neurodegeneracyjnych³³.

4.4. Zarys leczenia sepsy

Podstawowym problemem we wczesnym wdrożeniu leczenia sepsy jest brak właściwego rozpoznania. Ma to związek z różnymi definicjami tego zespołu objawów, błędami systemowymi i brakiem jednoznacznych, szybkich, wysoce specyficznych i odpowiednio czułych markerów tego stanu³⁴.

Badaniem potwierdzającym sepsę jest stwierdzenie obecności bakterii (w przypadku sepsy o podłożu bakteryjnym) w posiewie krwi. Jest to jednak badanie czasochłonne, co ogranicza jego przydatność na początkowym etapie procesu diagnostyczno- terapeutycznego. Pierwszym filarem leczenia jest jak najszybsza podaż dożylna środków przeciwdrobnoustrojowych — w ciągu 60 minut od odnotowania podejrzenia wstrząsu septycznego lub sepsy. Opóźnienie w ich podaniu wiąże się ze zwiększoną śmiertelnością³⁵.

Zalecenia stosowania konkretnych chemioterapeutyków i schematy ich podawania ulegają okresowym modyfikacjom i mają związek m.in. z uwarunkowaniami lokalnymi i narastaniem zjawiska antybiotykoodporności. Drugi filar stanowi utrzymanie perfuzji narządowej monitorowane wartościami średniego ciśnienia tętniczego na poziomie ≥ 65 mmHg. Cel ten osiąga się dwutorowo. Pierwszym elementem jest resuscytacja płynowa, głównie z użyciem zbilansowanych roztworów krystaloidów. Nadal jednak dyskutowane są optymalne ilości podawanych płynów i metody monitorowania hemodynamicznego efektów ich podaży. Przeciążenie łożyska naczyniowego we wczesnej fazie resuscytacji na skutek masywnych przetoczeń może okazać się szkodliwe^{36,37}. Dobrze udokumentowany jest niekorzystny wpływ syntetycznych roztworów koloidowych w resuscytacji płynowej pacjentów we wstrząsie septycznym^{38,39}. Drugim elementem utrzymania średniego ciśnienia tętniczego krwi jest ciągły wlew leków wazoaktywnych, gdzie lekiem pierwszego wyboru jest norepinefryna³⁹. W przypadkach opornych na leczenie jako lek drugiego rzutu stosuje się wazopresynę lub jej analogi np. terlipresynę. Gdy nasilenie wstrząsu jest bardzo duże i towarzyszy temu niewydolność serca, dodatkowo

do terapii włączana jest epinefryna⁴⁰. Dodatkowo u pacjentów z sepsą lub wstrząsem septycznym zaleca się stosowanie skutecznej profilaktyki przeciwzakrzepowej, najczęściej z zastosowaniem heparyn drobnocząsteczkowych⁴¹.

W szczególnie ciężkich przypadkach stosowane mogą być różne zaawansowane techniki terapii pozaustrojowych, nazywane ECOS (ang. *Extracorporeal Organ Support*) mające za zadanie podtrzymanie funkcji krytycznie uszkodzonych narządów pacjenta. Do technik tych zalicza się między innymi ciągłe terapie nerkozastępcze CRRT (ang. *Continuous Renal Replacement Therapy*) lub hemodializę, metody pozaustrojowego oczyszczania krwi oraz ECMO (ang. *Extracorporeal Membrane Oxygenation*). Współcześnie jednak, mając na uwadze możliwości tych bardzo zaawansowanych technik podtrzymywania funkcji życiowych, podnosi się coraz częściej również kwestie etyczne tak zwanej uporczywej terapii, odstępując lub nie rozszerzając w niektórych przypadkach bardzo inwazyjnych i kosztownych zabiegów o ograniczonym wpływie na przeżycie pacjentów⁴².

Wciąż poszukuje się możliwości zastosowania różnych wspomagających metod leczenia sepsy i wstrząsu septycznego, w celu ograniczenia lub kontrolowania reakcji zapalnej, a w rezultacie ograniczenia uszkodzeń tkankowych. Obecnie wykorzystywanie glikokortykosteroidów jako leczenia wspomagającego w leczeniu sepsy nie wzbudza kontrowersji. Aktualne wytyczne sugerują ich stosowanie u dorosłych wymagających leczenia wazopresyjnego⁴⁰.

Odpowiedź immunologiczna w sepsie jest procesem niezwykle złożonym i niezwykle trudno jest wychwycić wszystkie wielokierunkowe cechy odpowiedzi gospodarza, obejmujące wzajemne oddziaływanie między komórkami odpornościowymi, kaskadą krzepnięcia krwi, cytokinami, odpowiedzią śródbłonna, mikrobiomem jelitowym, niewydolnością układów i całych narządów, w połączeniu dodatkowo ze zróżnicowaną interwencją farmakologiczną. Wszystko to powoduje, że pojedyncze podejście farmakodynamiczne w leczeniu sepsy kończy się bardzo często niepowodzeniem. Pojawia się w związku z tym coraz więcej koncepcji bazujących na stosowaniu kombinacji interwencji terapeutycznych jako istotnej wartości dodanej w poprawie skuteczności leczenia. Przykładem takiej terapii może być jednoczesne stosowanie inhalacyjnie podawanego tlenu azotu oraz ogólnoustrojowego podawania hydrokortyzonu^{43,44}.

4.5. Tlenek azotu - znaczenie biologiczne i zastosowanie medyczne

Tlenek azotu (NO) jest gazem słabo rozpuszczalnym w wodzie, pozbawionym barwy i woni. Gaz ten naturalnie występuje w atmosferze, w stężeniu od 10 do 500 cząstek na miliard, zaś w silnie zanieczyszczonych obszarach jego stężenie może wynosić nawet 1.7 cząstek na milion cząstek powietrza⁴⁵. Substancja ta stanowi uboczny produkt pracy silników spalinowych i uważana jest za czynnik zanieczyszczający powietrze. Ze względu na niską stabilność tlenek azotu z łatwością ulega utlenieniu do toksycznych tlenków azotu np. NO₂ czy N₂O₄⁴⁵.

Tlenek azotu był pierwszą endogenną, gazową cząsteczką sygnalizacyjną, której działanie biologiczne⁴⁶ zostało odkryte i opisane przez naukowców⁴⁷. Jest to wysoce reaktywna cząsteczka, która odgrywa kluczową rolę w wielu procesach fizjologicznych ssaków⁴⁸. Najważniejszym efektem biologicznym działania tlenku azotu jest rozszerzanie światła naczyń krwionośnych (wazodylatacja).

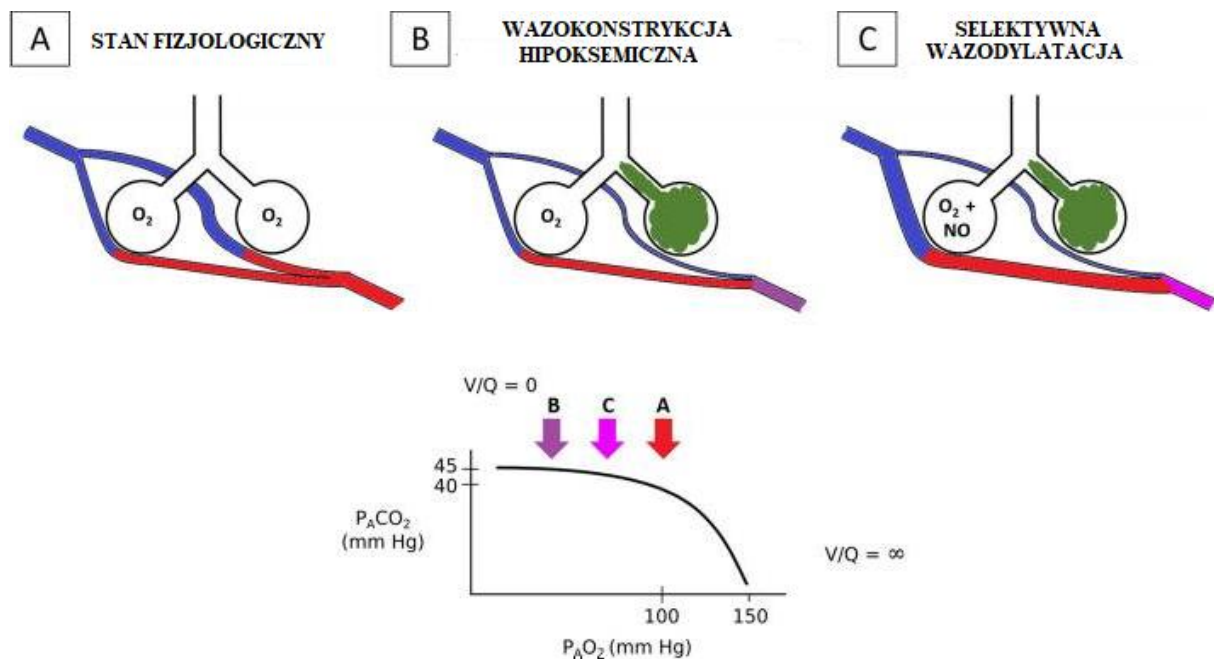
In vivo cząsteczka ta syntetyzowana jest z aminokwasu L-argininy i tlenu przez rodzinę enzymów, znanych jako syntazy tlenku azotu (NOS). Zidentyfikowano trzy izoformy NOS: neuronalna NOS (nNOS lub NOS I), indukowalna NOS (iNOS lub NOS II) i śródbłonkowa NOS (eNOS lub NOS III)⁴⁹. Ta ostatnia jest konstytutywną formą w komórkach śródbłonka, dlatego w warunkach fizjologicznych odpowiada za poziom tlenku azotu w naczyniach krwionośnych.

Po wytworzeniu w śródbłonku NO dyfunduje zarówno do położonych poniżej miocytów, jak i oddziałuje na przepływające blisko obwodu naczynia trombocyty^{50,51}. Po wniknięciu do miocytu podstawowym działaniem tlenku azotu jest pobudzenie rozpuszczalnej cyklazy guanylanowej (sGC, ang. *soluble Guanylyl Cyclase*) do syntetyzowania cGMP aktywującego kinazę białkową G, co powoduje rozkurcz naczyń krwionośnych⁵². NO, dzięki zdolności do dyfuzji przez błony komórkowe, pełni rolę cząsteczki sygnalizacyjnej i przekazuje informacje z komórki, która go wytwarza, do pobliskich komórek docelowych⁵⁰. Dzięki temu jest wszechstronnym i silnym regulatorem wielu funkcji fizjologicznych, w tym przepływu krwi, neurotransmisji i odpowiedzi immunologicznej. NO pełni niezwykle ważną funkcję w komórkach układu odpornościowego ze względu na działanie przeciwdrobnoustrojowe powstającego z niego jonu ONOO⁻ (nadtlenoazotynowego) oraz własności immunomodulujące poprzez liczne szlaki hamowania limfocytów oraz apoptozy⁵³. Właściwości te

tłumaczyć mogą wysoką ekspresję iNOS m.in. w komórkach NK, tucznych, dendrytycznych czy fagocytujących⁵⁴.

W celach terapeutycznych tlenek azotu może być podawany miejscowo, wziewnie lub ogólnoustrojowo za pośrednictwem donorów tlenu azotu takich jak nitrogliceryna lub nitroprusydek sodu^{55,56}. Tlenek azotu jest cząsteczką o ograniczonej stabilności, w związku z czym czas jej działania jest bardzo krótki. W przypadku podania wziewnego działanie NO ogranicza się do krążenia płucnego, zaś w przypadku podania dożylnego dochodzi do uogólnionego działania wazodylatacyjnego⁵⁷.

Dotychczasowe badania wykazały, że NO podawany wziewnie zmniejsza nadciśnienie w krążeniu płucnym, poprawia perfuzję tkanek i natlenienie, a także zmniejsza stres oksydacyjny i produkcję cytokin prozapalnych u pacjentów we wstrząsie endotoksycznym^{43,45,58}.



Ryc. 2 Wziewnie podawany tlenek azotu odwraca hipoksemię i nadciśnienie płucne w przebiegu wazokonstrykcji hipoksemicznej. Prowadzi to do zwiększonego natlenowania krwi⁴⁵.

Tlenek azotu działa jako silny wazodylatator, wywołując rozluźnienie komórek mięśni gładkich w naczyniach krwionośnych, co prowadzi do zwiększenia przepływu krwi i obniżenia ciśnienia⁴⁷. NO ma również silne działanie przeciwzapalne, hamując

produkcję i uwalnianie cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α i interleukina IL-1 β , kluczowych w przebiegu sepsy i wstrząsu septycznego^{59,60}. Ponadto NO posiada właściwości antyoksydacyjne, chroniąc komórki przed stresem oksydacyjnym poprzez wychwytywanie reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) i hamowanie aktywacji wrażliwych na stres oksydacyjny czynników transkrypcyjnych, takich jak czynnik NF- κ B⁵⁹. Uważa się, że tlenek azotu może inaktywować proteazę SARS-CoV-2 poprzez jej S-nitrozylację co czyni go obiecującą substancją w terapii choroby powodowanej przez ten patogen⁵⁸.

Zastosowanie tlenu azotu podlega jednak pewnym ograniczeniom związanym z potencjalną toksycznością tego związku⁶¹. W badaniach *in vitro* odnotowano aberracje chromosomalne w ludzkich komórkach limfoblastoidalnych poddanych działaniu NO⁶². Tworzenie wspomnianego powyżej jonu ONOO⁻, ze względu na jego wysoką reaktywność, może powodować peroksydację lipidów oraz hamować oddychanie na poziomie mitochondrialnym. Podaż tlenu azotu w wysokich dawkach - 100 ppm może prowadzić do uszkodzenia surfaktantu⁶³.

Doniesienia ostatnich lat wskazują, że wziewne stosowanie NO prowadzi do powstawania szeregu aktywnych związków chemicznych, głównie z grupy S-nitrozotoli, oraz nitrozylacji grup sulfhydrylowych różnych białek. Aktywność tlenu azotu może być również uzyskiwana pośrednio poprzez azotyny i azotany, produkty jego metabolizmu. Wszystkie te związki mogą przenosić aktywność biologiczną tlenu azotu do krążenia systemowego i działać jako bardziej stabilne źródło jego magazynowania. Dodatkowo wykazano, że wziewny tlenek azotu selektywnie zwiększa przepływ krwi w tkankach niedokrwionych, jednocześnie nie wykazując działań hemodynamicznych w tkankach perfundowanych prawidłowo. Wydaje się, że leczenie wziewnym tlenkiem azotu, ze względu na prosty sposób podaży oraz natychmiastowe działanie, może być przydatne jako terapia ratunkowa w różnych stanach niedokrwienia, w których istotna jest poprawa przepływu naczyniowego do czasu wystąpienia naturalnej lub interwencyjnej reperfuzji, w tym również w sepsie i wstrząsie septycznym, pomimo nasilonej ogólnoustrojowej wazodylatacji spowodowanej aktywacją indukowalnej NOS⁶⁴⁻⁶⁸.

4.6. Glikokortykosteroidy

Kortykosteroidy są syntetycznymi analogami kortyzolu, naturalnie występującego hormonu, odkrytego w 1946 roku, który moduluje odpowiedź gospodarza na infekcję. Te hydrofobowe cząsteczki będące pochodnymi cholesterolu z łatwością przenikają przez błony komórkowe. Endogenne glikokortykoidy są niezbędne do życia, gdyż regulują wiele procesów fizjologicznych i rozwojowych.

Podobnie jak pozostałe hormony steroidowe są one syntetyzowane z cholesterolu w procesie steroidogenezy (w mitochondriach). U większości ssaków w tym ludzi, świń, chomików i psów, głównym endogennym glikokortykosteroidem jest kortyzol. Z kolei u ptaków, większości gadów, myszy oraz szczurów funkcję tę pełni kortykosteron. Głównym miejscem produkcji, tak kortyzolu jak i kortykosteronu jest kora nadnerczy, może on jednak powstawać także w jelitach, skórze czy grasicy⁶⁹. Wydzielanie kortykosteroidów podlega regulacji poprzez sprzężenie zwrotne za pomocą osi podwzgórze-przysadka-nadnercza – tzw. oś HPA (ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*).

Oś HPA to kompleksowe oddziaływania pomiędzy podwzgórzem, przysadką mózgową oraz nadnerczami, co tworzy główny układ neuroendokryny w organizmie ssaków⁷⁰. W jądrze przyśrodkowym podwzgórze syntetyzowany jest hormon uwalniający kortykotropinę (CRH, ang. *corticotropin-releasing hormone*). Hormon ten oddziałuje na przedni płat przysadki mózgowej, który w odpowiedzi na stymulację wydziela hormon adrenokortykotropowy (ACTH, ang. *Adrenocorticotropic Hormone*). Hormon ten oddziałuje z kolei na korę nadnerczy prowadząc do zwiększenia uwalniania kortykosteroidów⁷¹. Kortykosteroidy poprzez ujemne sprzężenie zwrotne hamują uwalnianie ACTH oraz CRH⁷². Stężenie kortykosteroidów podlega nieustającym zmianom w odpowiedzi na rozmaite czynniki biologiczne, chemiczne i fizyczne – tak w sytuacjach fizjologicznych jak i patologicznych.

Hormony te stanowią podstawę terapii wielu chorób zapalnych i autoimmunologicznych, takich jak astma oskrzelowa, przewlekła choroba płuc, choroba Leśniowskiego-Crohna, kłębuszkowe zapalenie nerek, reumatoidalne zapalenie stawów czy stwardnienie rozsiane^{46,73,74,75}. Wykazano, że kortykosteroidy zmniejszają uwalnianie cytokin prozapalnych i ograniczają odpowiedź gospodarza na infekcję we wstrząsie endotoksycznym^{44,76}.

Wbrew wcześniejszym poglądom, współcześnie uważa się, że glikokortykosteroidy mają zarówno przeciwzapalne jak i prozapalne działanie. Sposób ich działania ma najprawdopodobniej związek z czasem ekspozycji lub charakterem oddziałującego bodźca⁷³. Za wszystkie efekty wywoływane przez endo i egzogenne glikokortykosteroidy opowiadają ich interakcje z receptorem glikokortykosteroidowym (GCR). Jednak dokładne mechanizmy leżące u podstaw skuteczności kortykosteroidów we wstrząsie endotoksycznym nie są w pełni zrozumiałe i potrzebne są dodatkowe badania w celu określenia optymalnego dawkowania i czasu terapii⁷⁶.

Obserwowana w badaniach skuteczność kliniczna podaży egzogennych glikokortykosteroidów ma prawdopodobnie związek z quasi przyczynowym działaniem tych leków w przebiegu względnej niewydolności osi HPA związanej z ciężką chorobą (CIRCI, ang. *Critical illness-related corticosteroid insufficiency*)⁷⁷. Wyniki dotychczasowych badań nie są jednak jednoznaczne i ukazują się także publikacje wskazujące na brak poprawy przeżywalności po zastosowaniu glikokortykosteroidów⁷⁸. Dotychczas opisywano zarówno stosowanie niskich jak i wysokich dawek kortykosteroidów, zarówno z pozytywnym jak niepomyślnym rezultatem⁷⁹⁻⁸¹. Aktualnie, wg najnowszych zaleceń dotyczących leczenia sepsy (wg ogólnoświatowej Surviving Sepsis Campaign, w którą są zaangażowane m.in. Society of Critical Care Medicine (SCCM), European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) można rozważać dożylną podaż kortykosteroidów u pacjentów we wstrząsie endotoksycznym wymagających terapii wazopresyjnej w dawce 200 mg hydrokortyzonu na dobę⁴¹.

4.7. Receptor glikokortykosteroidowy (GCR)

Receptor glikokortykosteroidowy (GCR, ang. *glucocorticoid receptor*) jest polimorficznym białkiem, które wpływa na ekspresję tysięcy genów⁸². Receptor ten zaliczany jest do nadrodziny receptorów jądrowych, liczącej sobie 49 białek, między innymi receptor mineralokortykosteroidowy oraz estrogenowy. Szacuje się, że między 1000 a 2000 genów jest regulowanych za pośrednictwem tego receptora⁸². GCR uczestniczy w regulacji wielu procesów np. odpowiedzi zapalnej, metabolizmu kwasu tłuszczowych oraz glukoneogenezy. Nadmierna lub niedostateczna stymulacja GCR jest przyczyną poważnych schorzeń, takich jak zespół Cushinga i choroba Addisona^{83,84}. Receptor ten podlega silnej ekspresji w wielu tkankach i narządach: mózgu, płucach, mięśniach szkieletowych, nerkach, wątrobie i sercu.

Receptor glikokortykosteroidowy posiada budowę modułową i składa się z:

- regulatorowej domeny N-końcowej (NTD),
- domeny wiążącej DNA,
- regionu zawiasowego,
- domeny wiążącej ligand (LBD).

Do tej pory poznano wiele izoform białkowych receptora glikokortykosteroidowego. Jest to wynikiem istnienia 8 alternatywnych miejsc inicjacji translacji w obrębie egzonu 2 (domena NTD) oraz alternatywnego splicingu⁸⁵. Alternatywny splicing egzonu 9 prowadzi do powstania dwóch różnych wariantów, klasycznego GCR α o długości 777 aminokwasów (94 kDa) oraz GCR β o długości 742 aminokwasów (91 kDa). Sekwencja aminokwasowa obu izoform jest identyczna do pozycji 727, krótsza domena LBD w izoformie GCR β sprawia, że nie jest ona zdolna do wiązania glikokortykosteroidów i z racji tego, że występuje tylko w jądrach komórkowych jest uważana za antagonistę izoformy GCR α ⁸⁶.

GCR α , klasyczny receptor glikokortykosteroidowy, przed związaniem ligandu jest zawieszony w cytoplazmie w wielobiałkowym kompleksie z białkami chaperonowymi oraz immunofilinami. Kompleks ten zapewnia konfigurację optymalną do wiązania ligandu z dużą swoistością⁸⁷. Po związaniu ligandu receptor zmienia konformację, w wyniku czego odłączają się od niego związane z nim białka. Odsłonięciu ulegają fragmenty stanowiące sygnał do translokacji do jądra, co skutkuje szybkim przejściem GCR α ze związanym ligandem do jądra komórkowego poprzez pory jądrowe⁸⁷. Bezpośrednio przed związaniem z DNA, już w jądrze komórkowym, GCR α tworzy homodimery. Część GCR α nie ulega dimeryzacji. Powszechnie uważa się, że homodimeryzacja ma znaczenie dla funkcji GCR α . Zakłada się, że tak monomery jak i dimery GCR α wiążą się z pewnymi sekwencjami DNA i wpływają tym samym na proces transkrypcji^{82,88}. Eksperymentalnie wykazano, że w odpowiedzi na farmaceutyczne dawki glikokortykosteroidów uczestniczą dimery GCR α , a nawet struktury wyższego rzędu⁸⁹. W jądrze komórkowym homodimery receptora rozpoznają i wiążą się z odpowiednimi fragmentami DNA (GRE, ang. *Glucocorticoid-responsive element*). Prowadzi do indukcji docelowych genów. Interakcja pomiędzy GCR α a DNA

jest bardzo dynamiczna, receptor krąży pomiędzy różnymi GRE modyfikując ekspresję wielu różnych genów⁹⁰.

4.8. Świnia jako model w badaniach translacyjnych

Świnie są szeroko wykorzystywane jako zwierzęta modelowe ze względu na ich anatomiczne, fizjologiczne i genetyczne podobieństwo do ludzi w badaniach w obszarach takich jak: kardiologia, onkologia, neurologia i neurochirurgia oraz medycyna transplantacyjna. Charakteryzują się one względnie dużymi rozmiarami ciała, podobnymi do ludzkich, co pozwala na badanie efektów nowych leków i terapii w skali bardziej reprezentatywnej dla ludzi. Anatomia i fizjologia układu sercowo-naczyniowego i oddechowego świń jest podobna do ludzkiej, co czyni świnie odpowiednim modelem do badania wstrząsu septycznego i jego mechanizmów⁹¹.

Kolejną zaletą wykorzystania świń jako modelu do badań translacyjnych jest dostępność narzędzi i modeli genetycznych. Świnie są jednym z niewielu gatunków zwierząt, dla których opracowano zestaw licznych narzędzi genetycznych, takich jak modele transgeniczne, narzędzia do edycji genów i techniki biologii molekularnej. Narzędzia te pozwalają naukowcom badać mechanizmy molekularne oraz rolę wybranych genów w rozwoju i progresji poszczególnych chorób⁹².

Istnieją jednak pewne wady wykorzystania świń jako modelu do badań translacyjnych. Jedną z głównych wad jest koszt związany z utrzymaniem i hodowlą świń, jak również koszt testowanych interwencji i leczenia. Świnie są również podatne na infekcje, co może wpływać na wyniki badań. Praca ze świniami wymaga specjalistycznego szkolenia i sprzętu, co czyni je mniej dostępnymi dla niektórych grup badawczych⁹³.

Pomimo tych wad, świnie pozostają szeroko stosowanym modelem zwierzęcym w badaniach translacyjnych ze względu na ich podobieństwo do ludzi oraz dostępność narzędzi i technik genetycznych. W związku z tym ważne jest, aby podczas projektowania i prowadzenia badań naukowcy dokładnie rozważyli zalety i wady wykorzystania świń jako modelu do badań.

4.9. Zwierzęce modele sepsy

Dotychczas opisano i wielokrotnie wykorzystywano kilka różnych modeli wstrząsu septycznego. Modele oparte o małe zwierzęta laboratoryjne takie jak np. myszy charakteryzują się ograniczoną przydatnością w badaniach nad sepsą ze względu na szereg odmienności fizjologicznych. Myszy w przeciwieństwie do ludzi charakteryzują się naturalną opornością na działanie endotoksyn. Odmiennie niż ludzie, w przebiegu sepsy u myszy częstość oddechów ulega obniżeniu, zwierzęta te rozwijają bradykardię i hipotermię oraz charakteryzują się niską aktywnością osoczną układu dopełniacza, zaś główną frakcją ich krwinek białych stanowią limfocyty (u ludzi neutrofile)⁹⁴. Znacznie wiarygodniejsze są modele oparte o świnie domową.

Wszystkie wykorzystywane powszechnie modele można podzielić na dwie zasadnicze grupy: modele niejałowe lub jałowe. W przypadku modeli niejałowych doprowadza się do zakażenia zwierzęcia modelowego drobnoustrojem lub drobnoustrojami np. poprzez iniekcję dootrzewnową zawiesiny kałowej lub kultury bakteryjnej, perforację jelita ślepego przez nakłucie, enterektomię i nieszczelne zespolenie jelit. Istnieją także modele narządowo-specyficzne, naśladujące np. pneumosepsę (posocznicę pneumokokową) lub urosepsę (posocznicę moczową). Do modeli jałowych zalicza się przede wszystkim iniekcję lub wlew ciągły dostępnego komercyjnie LPS lub TNF- α .

Jednym z najbardziej kompleksowych i sterowalnych modeli jest model opisany przez Frostella w 2014 roku, z późniejszymi modyfikacjami. Model ten został opracowany w celu oceny efektów klinicznych różnego postępowania terapeutycznego w przebiegu wywołanej wlewem LPS niewydolności wielonarządowej. Zwierzęta we wstrząs endotoksyczny wprowadzono poprzez ciągłą infuzję dożylną endotoksyny w dawce 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{godz.}$ przez okres 2 godzin, następnie zaś w dawce 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{godz.}$ przez okres 28 godzin⁹⁵. W późniejszych latach model zmodyfikowano i wdrożono w badaniach dotyczących wpływu wziewnie podawanego tlenu azotu i hydrokortyzonu na przebieg wstrząsu septycznego. W modelu tym dawka i czas trwania wlewu endotoksyny został istotnie skrócony - zwierzęta we wstrząs endotoksyczny wprowadzono poprzez ciągłą infuzję dożylną endotoksyny w dawce 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{godz.}$ przez okres 90 minut, następnie zaś w dawce 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{godz.}$ przez okres 8,5 godziny⁹⁶.

5. Cel pracy

Śmiertelność w przebiegu sepsy u ludzi, pomimo szerokiego stosowania nowoczesnej antybiotykoterapii i nowych technik intensywnej terapii w dalszym ciągu jest wysoka. Skojarzona terapia małymi dawkami kortyzonu i wziewnie podawanego tlenu azotu (NO) w modelu endotoksycznym u świń po aktywacji zapalnej z użyciem lipopolisacharydu wykazuje zahamowanie zapalnej odpowiedzi ogólnoustrojowej. Jako, że w proces odpowiedzi przeciwzapalnej zaangażowany jest szlak sygnałowy receptora glikokortykosteroidowego, ważne jest podjęcie próby oceny, jak zastosowanie wziewnie podawanego tlenu azotu w połączeniu z małymi dawkami hydrokortyzonu wpływa na ekspresję i wewnątrzkomórkową lokalizację receptora glikokortykoidowego w narządach, w których dochodzi do ciężkiej niewydolności w przebiegu sepsy.

Celem przedstawionej rozprawy było:

1. Przygotowanie świńskiego modelu wstrząsu endotoksycznego i zastosowanie skojarzonej terapii małymi dawkami kortyzonu i wziewnie podawanego tlenu azotu.
2. Zbadanie ekspresji receptora glikokortykosteroidowego na poziomie białka techniką Western blot w płucach oraz w takich narządach jak wątroba i nerki.
3. Ocena 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. Nasiloną aktywacją powinna skutkować zwiększonym transportem receptora z cytoplazmy do jądra komórkowego.
4. Ocena aktywacji receptora glikokortykosteroidowego – analiza nasilenia reakcji jądrowej i cytoplazmatycznej w preparatach immunohistochemicznych (płuca, nerki, wątroba).
5. Ocena aktywacji receptora glikokortykosteroidowego – pomiar ekspresji genów (kodujących cytokiny prozapalne), regulowanych przez ten receptor, zarówno w płucach, jak i w nerkach i wątrobie.

6. Materiały i metody

6.1. Opis modelu zwierzęcego

Doświadczenie przeprowadzono w Katedrze Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w ramach projektu „Ocena skuteczności złożonej przedłużonej terapii kortyzonem i wziewnie stosowanym tlenkiem azotu na indukowaną LPS niewydolność narządową u świń”. Na przeprowadzenie niniejszego doświadczenia uzyskano zgodę I Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach we Wrocławiu nr 43/2016. Procedury wykonywane były przez lekarzy specjalistów anestezjologii i intensywnej terapii pod nadzorem lekarza weterynarii. Wobec wszystkich zwierząt w pełni stosowano wytyczne dotyczące opieki i wykorzystania zwierząt laboratoryjnych (Dyrektywa UE 2010/63/UE dotycząca eksperymentów na zwierzętach).

W badaniu uczestniczyło 23 osobników świni domowej rasy polska biała zwisłoucha, o przybliżonej masie ciała 27 kg (wiek - 16 tygodni). Zwierzęta podzielono na dwie grupy: badaną (n = 12) oraz kontrolną (n = 11). Przed rozpoczęciem eksperymentu wszystkie świnię poddano głodówce trwającej 12 godzin, zapewniając jednocześnie nieograniczony dostęp do wody pitnej.

Premedykację zwierząt wykonywano z użyciem domięśniowej podaży mieszaniny tiletamin (2 mg/kg), zolazepamu (2 mg/kg) i medetomidyny (0,08 mg/kg) sporządzonej poprzez rozpuszczenie suchej mieszaniny tiletamin i zolazepamu (Zoletil 100, Virbac, Francja) w dostępnym komercyjnie roztworze medetomidyny (Domitor, Orion Corp., Finlandia). Po uzyskaniu obwodowego dostępu dożylnego do żyły ucha i ewentualnym pogłębieniu znieczulenia przeprowadzono intubację dotchawiczą pod kontrolą wzroku przy użyciu laryngoskopu. Znieczulenie podtrzymywano poprzez ciągły wlew propofolu (3-6 mg/kg/godz. dożylnie; Propofol 1% MCT/LCT Fresenius, Fresenius Kabi Polska, Warszawa, Polska) oraz fentanylu (0,8-1,3 µg/kg/godz. dożylnie; Fentanyl WZF, Polfa Warszawa, Polska). Podczas instrumentacji dawki leków okresowo zwiększano. Zwierzęta wentylowano mechanicznie w trybie IPPV (wentylacja przerywana dodatnim ciśnieniem) z wykorzystaniem respiratora Servo 900C (Siemens-Elima AB, Solna, Szwecja), frakcją tlenu (FiO₂) 0,3 i dodatnim końcowo-wydechowym ciśnieniem (PEEP) w wysokości 5 cm H₂O. Wartości ciśnienia szczytowego, FiO₂ w gazach oddechowych

oraz częstości oddechów dostosowywano indywidualnie w celu osiągnięcia normokapnii i normoksemii.

Instrumentację zwierząt przeprowadzano po pogłębieniu analgezji dożylniej wraz z zastosowaniem znieczulenia nasiękowego. Składało się na nią wprowadzenie żylnego dostępu centralnego przez żyłę szyjną celem podaży leków, w tym wazopresyjnych, płynów infuzyjnych oraz dokonywania pomiarów OCŻ. Przez tą samą żyłę wprowadzano również cewnik Swana-Ganza do pomiarów hemodynamicznych, którego koniec umieszczano w jednej z gałęzi tętnicy płucnej. Dostępu tętniczego dokonywano przez wprowadzenie cewnika naczyniowego przez tętnicę szyjną. Celem pomiarów diurezy godzinowej, wprowadzano do pęcherza cewnik moczowy z dostępu poprzez minilaparotomię. Po wstępnej instrumentacji zwierzęta poddawano 60-minutowej obserwacji celem stabilizacji stanu klinicznego i oceny potencjalnych komplikacji. Po okresie stabilizacji wstrząs endotoksyczny indukowano poprzez trwający 10 godzin wlew dożylny LPS z *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, Gothenburg, Szwecja).

U wszystkich zwierząt roztwór LPS podawany był dwufazowo — przez pierwsze 1,5 godziny podawano go w dawce 2,5 µg/kg/godz., natomiast przez kolejne 8,5 godziny w dawce zredukowanej do 0,5 µg/kg/godz. Po zakończeniu trwającego łącznie 10 godzin infuzji LPS zwierzęta podlegały dalszej obserwacji przez dziesięć godzin. W celu zapewnienia profilaktyki zakażenia chirurgicznego wszystkim zwierzętom przed instrumentacją oraz 8 godzin po niej dwukrotnie podano dożylnie cerufoksym (Zinacef, GlaxoSmithKline, Solna, Szwecja) w dawce 750 mg.

Zwierzętom z grupy badanej od trzeciej godziny trwania wlewu LPS podawano hydrokortyzon (Corhydron 100, Bausch Health) dożylnie oraz wziewnie tlenek azotu (iNO). Hydrokortyzon (25 mg) podawano trzykrotnie: w 3, 8 oraz 16 godzinie trwania eksperymentu. Tlenek azotu (PulmonoxMesser Griesheim 800 ppm NO w 9000 azotu) podawano w stężeniu 30 ppm do linii wdechowej układu respiratora z urządzenia Pulmomix Mini (Messer Griesheim, Gumpoldskirchen, Austria). Podaż tlenu azotu rozpoczynano po 3 godzinach od włączenia wlewu LPS-u i kontynuowano do końca trwania obserwacji. Zwierzęta z grupy kontrolnej podlegały jedynie obserwacji i leczeniu objawowemu wstrząsu

Przez cały okres trwania eksperymentu wszystkie zwierzęta otrzymywały ciągły wlew roztworu NaCl 0,45% z glukozą 2,5% (Glucosum 5% et Natrium chloratum 0,9% 1:1 Fresenius r-r do infuzji (25 mg + 4,5 mg)/ml); Fresenius Kabi, Polska) z prędkością 15 ml/kg m.c./godzinę. W obu grupach resuscytację wstrząsu prowadzono według zaleceń SSC (*Surviving Sepsis Campaign 2016*). Resuscytację płynową prowadzono pod kontrolą wolemii i średniego ciśnienia tętniczego, według ustalonego wcześniej algorytmu. W sytuacji, gdy średnie ciśnienie tętnicze (MAP) spadało poniżej 60 mmHg i przy ciśnieniu zaklinowania tętnicy płucnej 6 mmHg lub mniej, zwierzętom podawano dożylnie bolusy soli fizjologicznej, aż do osiągnięcia wartości ciśnienia zaklinowania tętnicy płucnej co najmniej 8 mmHg. W przypadku utrzymywania się średniego ciśnienia tętniczego poniżej 60 mmHg przy wartości PCWP wyższej lub równej 8 mmHg włączano dożylny wlew norepinefryny (Levonor, Polfa Warszawa, Polska) w dawce od 0,025 µg/kg/min i stopniowo zwiększano do maksymalnie 0,6 µg/kg/min, aż do osiągnięcia wartości średniego ciśnienia tętniczego powyżej 60 mmHg. W przypadku utrzymywania się średniego ciśnienia tętniczego powyżej 60 mmHg dawkę norepinefryny zredukowano do minimalnej, pozwalającej utrzymać MAP w wartościach docelowych.

Temperaturę ciała monitorowano w tętnicy płucnej za pomocą termistora wbudowanego w cewnik donaczyniowy. Zwierzęta utrzymywano w normotermii przy pomocy koców grzewczych lub chłodzenia zewnętrznego. Po 20 godzinach od rozpoczęcia wlewu lipopolisacharydu zwierzęta uśmiercono poprzez iniekcję dożylną pentobarbitalu sodowego (Morbital, Biowet, Puławy, Polska) o stężeniu 133,3 mg/ml w ilości 0,6 ml/ kg m.c.

6.2. Pozyskanie materiału

Próbki narządów wewnętrznych (płuca, wątroba, nerki) przeznaczone do badań biochemicznych pobierano podczas autopsji bezpośrednio po uśmierceniu zwierząt, zamrażano w ciekłym azocie, a następnie przenoszono do zamrażarki niskotemperaturowej (-80°C). Materiał przeznaczony do badań histopatologicznych uzyskiwano poprzez wykrojenie odpowiedniej wielkości fragmentu narządu z uwzględnieniem wszystkich istotnych warstw danego narządu. Tak pobrany materiał utrwalano w zbuforowanym węglanem wapnia roztworze aldehydu mrówkowego o stężeniu 7%. Po utrwaleniu i dehydratacji materiał zatapiano w bloczkach parafinowych.

6.3. Western blotting

Ilość oraz lokalizację receptora glikokortykosteroidowego badano za pomocą metody Western Blot. Do mechanicznej homogenizacji tkanek stosowano urządzenie Tissue Ruptor (Qiagen). W przypadku określania całkowitej ilości GR fragmenty tkanki o masie około 50 mg (nerki, wątroba, płuca) homogenizowano w 200 μ l buforu RIPA (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% deoksycholan sodu, 0.1% siarczan dodecylu sodu, 50 mM Tris-HCl, pH 8) z mieszaniną inhibitorów proteaz (Sigma-Aldrich). Próbkę inkubowano na lodzie przez 30 min i wirowano 15 min przy prędkości $10\,000 \times g$ w temp. 4°C. Następnie ściągano supernatant i mierzono w nim stężenie białka metodą BCA (Pierce), zgodnie z instrukcją producenta. W przypadku badania lokalizacji GR wykonywano subfrakcjonowanie homogenatów tkankowych za pomocą komercyjnego zestawu (Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues, Thermo Fisher) zgodnie z zaleceniami producenta. Po przeprowadzeniu subfrakcjonowania otrzymywano frakcję białek cytoplazmatycznych i frakcję białek jądrowych związanych z chromatyną, w których mierzono ilość białka metodą BCA (Pierce), zgodnie z instrukcją producenta.

Do rozdzielania elektroforetycznego metodą SDS-PAGE wykorzystywano komercyjne żele Criterion TGX 10% (Bio-Rad). Do homogenatów (25 μ g białka dla całkowitych homogenatów, 25 μ g białka dla frakcji białek cytoplazmatycznych, 7,5 μ g dla frakcji białek jądrowych związanych z chromatyną) dodawano odpowiednią ilość redukującego buforu próbkowego (Pierce™ Lane Marker Reducing Sample Buffer), podgrzewano 5 min w 95°C, schładzano na lodzie i наносzono na żel poliakrylamidowy. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy stałym napięciu wynoszącym 90V przez 2 godziny i 15 minut. Następnie przeprowadzono tzw. transfer suchy przy użyciu programu TURBO dla białek o mieszanej masie (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System) na membranę PVDF (Trans-Blot Turbo RTA Midi 0.2 μ m PVDF Transfer Kit). Po dokonaniu transferu membrany PVDF barwiono w roztworze Ponceau S lub odpowiednika (Pierce™ Reversible Protein Stain Kit for PVDF Membranes) i fotografowano w urządzeniu Chemidoc. W dalszej kolejności membrany przepłukiwano w roztworze Pierce Western Blot Signal Enhancer zgodnie z instrukcją producenta. Membrany poddawano blokowaniu przez 60 minut w komercyjnym buforze blokującym StartingBlock™ T20 (PBS) Blocking Buffer (Thermo Fisher).

Membrany inkubowano z przeciwciałem I rzędowym anti-GCR (ab183127) w buforze do blokowania komercyjnego przez noc (15-16 godzin) (1:2000), w temperaturze 4°C. Następnie membrany przepłukiwano 3 razy po 8 min w roztworze TPBS (PBS zawierający 0,5% Triton X-100, v/v). W kolejnym kroku membrany inkubowano z przeciwciałem II-rzędowym (antykrólik 1:40000) w buforze do blokowania komercyjnym przez 1 h w temp. pokojowej. Membrany ponownie 3 razy przepłukiwano w roztworze TPBS, każdorazowo po 8 minut. Do chemiluminescencyjnej detekcji sygnału stosowano substrat SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce). Uzyskane obrazy archiwizowano cyfrowo przy pomocy oprogramowania Quantity One (BioRad).

Przed użyciem kolejnych przeciwciał (w celu normalizacji, antyGAPDH dla pełnych homogenatów i białek z frakcji cytoplazmatycznej, antyhiston dla białek z frakcji jądrowej) membrany odblokowywano za pomocą Restore Plus Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta. Potem membrany poddawano blokowaniu przez 30 minut w komercyjnym buforze blokującym StartingBlock™ T20 (PBS) Blocking Buffer (Thermo Scientific). W celu normalizacji pH membrany ponownie przepłukiwano 2-3 x w PBS 1x Triton 0,5%. W dalszej kolejności membrany, na których analizowano białka z frakcji jądrowej inkubowano z przeciwciałem antyhiston H3 (ab12079, przez noc, w 4°C 1:1000 w komercyjnym buforze do blokowania), z kolei membrany, na których analizowano białka z pełnych homogenatów i z frakcji białek cytoplazmatycznych (CEB) inkubowano z przeciwciałem antyGAPDH (przez noc, w 4°C, 1:1000 w komercyjnym buforze do blokowania). Po odmyciu niezwiązanych przeciwciał pierwszorzędowych (jw.) membrany z frakcją jądrową (NEBC) inkubowano z przeciwciałem II rzędowym antykoza przez 60 minut w temp. pokojowej (1:30000 w komercyjnym buforze do blokowania, zaś membrany z białkami cytoplazmatycznymi (CEB) inkubowano z przeciwciałem II-rzędowym antymysz przez 60 minut w temp. pokojowej (1:20000, w komercyjnym buforze do blokowania). Membrany przepłukiwano (jw.) i do chemiluminescencyjnej detekcji sygnału stosowano substrat SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce). Uzyskane obrazy archiwizowano cyfrowo przy pomocy oprogramowania Quantity One (BioRad).

Intensywność prążków oceniano za pomocą oprogramowania Image Lab. Zarchiwizowane w formie cyfrowej skany dokumentujące chemiluminescencję,

zarówno dla prążków odpowiadających GCR (dwa najwyższe prążki o masie około 100 kDa i 80 kDa) jak i obrazujące GAPDH (dla frakcji cytoplazmatycznej) oraz histon H3 (dla frakcji jądrowej) poddawane były analizie densytometrycznej z wykorzystaniem oprogramowania Image Lab. Na każdym skanie ręcznie wyznaczano poszczególne ścieżki i opisywano je.

Na dalszym etapie ręcznie oznaczano oraz precyzyjnie określano granice poszczególnych prążków poddawanych analizie. Oprogramowanie na podstawie pola powierzchni danego prążka odpowiadającego receptorowi glikokortykosteroidowemu oraz natężenia zaciemnienia obrazu obliczało bezwzględną wartość liczbową odzwierciedlającą nasilenie reakcji. W toku analizy bezwzględne wartości uzyskane przez program odnoszono do przypadku o najbardziej przeciętnym natężeniu reakcji na danej membranie. W wyniku tych działań uzyskano względne wartości, które mogły być porównywane pomiędzy blotami. Działania te powtórzono po strippingu i inkubowaniu membran z przeciwciałami przeciw białkom markerowym — odpowiednio GAPDH lub histonowi H3.

Mając na celu znormalizowanie uzyskanych wyników na zawartość białka uzyskane wartości względne dla receptora glikokortykosteroidowego odnoszono do wartości względnych uzyskanych dla białka markerowego. Uzyskane w ten sposób względne wyniki znormalizowane na GAPDH lub histon H3 poddawano dalszej analizie statystycznej.

6.4. Immunohistochemia

Fragmenty tkanek po utrwaleniu w 7% roztworze buforowanego formaldehydu zatapiało w bloczkach parafinowych i ścinano na skrawki o grubości 3 μm . Skrawki nanoszono na szkiełka podstawowe Superfrost Plus (Menzel Glaser, Niemcy). Barwienie zostało wykonane na urządzeniu LEICA BOND-MAX (Leica Biosystems) wg poniższego protokołu. W pierwszej kolejności tkanki zostały odparafinowane (Bond Dewax Solution, Leica Biosystems) i poddane wstępnej obróbce roztworem Bond Epitope Retrieval Solution 2 (Leica Biosystems) przez 20 minut. Aktywność endogennej peroksydazy została zablokowana przy użyciu roztworu wodnego inhibitora peroksydazy dostarczonego przez producenta zestawu. W celu określenia obecności badanego antygenu na szkiełka nanoszono roztwór przeciwciała anti-GCR (Abcam, ab183127) o stężeniu 1:500 w Bond Primary antibody Diluent (Leica

Biosystems) i pozostawiano na okres 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie próbki inkubowano z roztworem Post Primary and Polymer używając BOND Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems). Jako substrat do barwnej reakcji zastosowano 3,3'-diaminobenzzydinę (DAB Chromogen), którą наносzono na szkiełka. Wszystkie preparaty poddano barwieniu kontrastowemu hematoksyliną. W procedurze uwzględniono kontrolę negatywną z pominięciem etapu nanoszenia przeciwciała pierwszorzędowego. Po przygotowaniu szkiełek zamykano je pod szkiełkiem nakrywkowym przy użyciu balsamu kanadyjskiego.

Tak sporządzone preparaty immunohistochemiczne poddawano badaniu mikroskopowemu. W celu przeprowadzenia kompleksowej analizy odrębnej ocenie poddawano jądro komórki oraz jej część cytoplazmatyczną. Intensywność reakcji w jądrach komórkowych określano jako odsetek pozytywnie zabarwionych jąder komórkowych, przy czym przyjęto, że:

5% = brak reakcji (-)

6- 25% = reakcja słaba (+)

26-50% = reakcja umiarkowana (++)

50% i powyżej = reakcja silna (++++)

Stopień ekspresji receptora glikokortykosteroidowego w błonach komórkowych lub w cytoplazmie oceniano na podstawie skali półilościowej IRS wg Remmele⁹⁷.

Tab. 2 Kryteria oceny mikroskopowej preparatów immunohistochemicznych.

Liczba komórek reagujących pozytywnie	Intensywność koloru reakcji
0 pkt – brak	0 pkt. – brak
1 pkt – do 10%	1 pkt – mało intensywny
2 pkt – od 11 do 50%	2 pkt – średnio intensywny
3 pkt – od 51 do 80%	3 pkt – intensywny
4 pkt – od 81% do 100%	

Liczba punktów, którą uzyskiwał dany preparat stanowiła iloczyn liczby punktów z prawej i lewej kolumny (Tab. 2). Zakresom liczby punktów przyporządkowywano następujące opisy intensywności reakcji w preparacie:

0 punktów – brak reakcji

1 do 2 punktów (+) – reakcja słaba

3 do 4 punktów (++) – reakcja umiarkowana

6 do 12 punktów (+++) – reakcja silna

Mając na celu przeprowadzenie możliwie rzetelnej i kompleksowej analizy uzyskane preparaty immunohistochemiczne poddano cyfrowemu skanowaniu. Uzyskane skany preparatów analizowano przy pomocy oprogramowania ImageJ. Oprogramowanie przy pomocy odpowiedniego algorytmu kwalifikuje poszczególne obszary preparatu jako wykazujące silnie pozytywną, pozytywną, słabo pozytywną lub negatywną reakcję immunohistochemiczną. Wynik procedury stanowi odsetek pola powierzchni preparatu zakwalifikowany do określonej grupy. Odrębnie oceniano nasilenie reakcji cytoplazmatycznej oraz natężenie reakcji jądrowej⁹⁸.

6.5. Real- Time PCR

Fragmenty tkanek o masie około 40-60 mg (każdy fragment ważono) homogenizowano w buforze RLT z β -merkaptoetanołem (300 μ l) za pomocą końcówek jednorazowego użytku do ręcznego homogenizatora tkanek TissueRuptor (Qiagen). Całkowite RNA izolowano na kolumnkach RNeasy (Qiagen). Na matrycy tego RNA przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji, uzyskując tzw. cDNA (SuperScript III First-Strand Synthesis System, Invitrogen), zgodnie z zaleceniami producenta, z wykorzystaniem startera oligo(dT) 20.

Względny poziom ekspresji transkryptu dla genów kodujących IL-1 β , IL-6, TNF- α oraz TGF- β określano poprzez ilościową reakcję PCR w czasie rzeczywistym. Badania przeprowadzono na aparacie CFX Optical System (Bio-Rad) przy użyciu zestawu odczynników SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad). Sekwencje zastosowanych starterów pokazano w poniższej tabeli. Warunki reakcji: wstępna denaturacja w 95°C przez 30 s, 35 cykli - 95°C przez 10 s, 62°C przez 15s. Wszystkie pomiary wykonano w trzech powtórzeniach.

Tabela 3. Startery zastosowane w ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Gen	Sekwencja 5'- 3'
GAPDH	TCACTGCCACCCAGAAGA TACCAGGAAATGAGCTTGAC
TNF-α	TCTTCTCCTTCCTCCTGGTC ACGATGATCTGAGTCCTTGG
IL-1β	GAAGAAGAGCCCATCATCCTTG TTGTTGTTGCTATCATCTCCTTGC
IL-6	AGAAAGGAGATGTGTGAGAAGTATG GGGTGGTGGCTTTGTCTGG
TGF-β1	CTACTACGCCAAGGAGGTCAC GCCCGAGAGAGCAATACAGG

Startery projektowano korzystając z programu Molecular Beacon Software (Bio-Rad) i danych dostępnych w bazie Pubmed.

Produkt reakcji PCR wykrywano poprzez pomiar wzrostu fluorescencji spowodowanego wiązaniem barwnika EvaGreen do dwuniciowego DNA. Specyficzność każdej przeprowadzonej reakcji potwierdzano analizując krzywą topnienia w każdym dołku płytki. Jako gen referencyjny zastosowano gen kodujący dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. GAPDH), aby znormalizować ilości cDNA (RNA) w poszczególnych próbkach. Do określania względnej ekspresji docelowych genów w próbkach pochodzących z wątroby, płuc i nerek zastosowano metodę Pfaffla⁹⁹. Ekspresję genów na poziomie mRNA przedstawiono w jednostkach względnych (JW) przyjmując poziom ekspresji dla jednej ze świń w grupie kontrolnej jako punkt odniesienia.

6.6. Odczynniki i zestawy analityczne

Tab. 4 Odczynniki wykorzystane podczas realizacji części laboratoryjnej badania

Odczynnik lub zestaw analityczny	Producent
Alkohol etylowy (C ₂ H ₅ OH)	POCH S.A., Polska
Chlorek sodu (NaCl)	POCH S.A., Polska
Deoksynukleotydy (dNTP)	Thermo Fischer Scientific Inc., USA
Dodecylosiarczan sodu (SDS)	Sigma- Aldrich Co., USA
Triton X-100	Sigma- Aldrich Co., USA
Diwodorofosforan potasu (KH ₂ PO ₄)	POCH S.A., Polska
Wodorofosforan potasu (Na ₂ HPO ₄)	POCH S.A., Polska

Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fischer Scientific Inc., USA
Pierce™ Western Blot Signal Enhancer	Thermo Fischer Scientific Inc., USA
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fischer Scientific Inc., USA
Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues	Thermo Fischer Scientific Inc., USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer Scientific Inc., USA
Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Ampules, 2 mg/mL	Thermo Fischer Scientific Inc., USA
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa	Thermo Fischer Scientific Inc., USA
Pierce™ Reversible Protein Stain Kit for PVDF Membranes	Thermo Fischer Scientific Inc., USA
StartingBlock™ T20 (PBS) Blocking Buffer	Thermo Fischer Scientific Inc., USA
TRI Reagent® RNA Isolation Reagent	Sigma- Aldrich Co., USA
Trans-Blot Turbo RTA Midi 0.2 µm PVDF Transfer Kit	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
10% Criterion™ TGX Stain-Free™ Protein Gel, 26 well, 15 µl	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Pierce™ Lane Marker Reducing Sample Buffer	Thermo Fischer Scientific Inc., USA
RNeasy Micro Kit (50)	Quiagen, Inc., USA
SuperScript™ III Reverse Transcriptase	Thermo Fischer Scientific Inc., USA
SsoFast EvaGreen Supermix	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Recombinant Anti-Glucocorticoid Receptor antibody [EPR19621] (ab183127)	Abcam
Anti-Histone H3 antibody — ChIP Grade (ab12079)	Abcam
Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H+L) code: 705-035-003	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.
Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) code: 111-035-045	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.
Anti-Mouse IgG (Fab specific)– Peroxidase antibody produced in goat Product numer: A9917	Sigma- Aldrich Co., USA

6.7. Oprogramowanie i narzędzia bioinformatyczne

W przeprowadzonych badaniach użyto następującego oprogramowania:

- 1) Image Lab
- 2) Statistica 13.3
- 3) Microsoft Excel
- 4) ImageJ

6.8. Analiza statystyczna

Do analiz statystycznych używano testów nieparametrycznych ze względu na odbiegający od normalnego rozstęp danych. Wszystkie oznaczenia biochemiczne i molekularne wykonano w trzech powtórzeniach. Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm minimum, maksimum. Do porównywania danych pomiędzy grupami zastosowano test U-Manna Whitneya. W przypadku analizy zmiany parametrów klinicznych pomiędzy stanem wyjściowym i kolejnymi czasami od momentu rozpoczęcia eksperymentu w obrębie danej grupy zastosowano test Wilcoxon dla par obserwacji. Wartość $p < 0,05$ przyjęto jako istotną statystyczną. Analizy statystyczne przygotowywano korzystając z programu Statistica 13.3.

6.9. Aparatura

Tab. 5 Wykaz aparatury wykorzystanej do przeprowadzenia badań.

Urządzenie	Producent
Criterion™ Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
The Spark® multimode microplate reader	Tecan Group Ltd., Szwajcaria
Wirówka z chłodzeniem 5415R	Eppendorf, Niemcy
ChemiDoc™ MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Termocykler (MJ-Mini)	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Wealtec HB-2 – blok grzejny	Wealtec corp., USA
Wytrząsarka do płytek- Titramax 101	Heidolph Instruments, Niemcy
Wytrząsarka Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., USA
TKA Micromed Demineralizator destylator wody	Thermo Scientific
TissueRuptor	Qiagen, Inc., USA

6.10. Roztwory przygotowywane samodzielnie wykorzystywane w pracy

Tab. 6 Wykaz roztworów przygotowywanych samodzielnie wykorzystywanych w badaniach laboratoryjnych.

Nazwa roztworu (zastosowanie)	Skład	
PBS	KH ₂ PO ₄ NaCl Na ₂ HPO ₄	1,47 mM 137 mM 4,3 mM
Bufor elektrodowy	Tris base Glicyna SDS	25,01 mM 192,4 mM 3,467 mM

7. Wyniki

7.1. Dane kliniczne

Badania wykonano na 23 świnich rasy polska biała zwistoucha w wieku 16 tygodni. Zwierzęta ważyły przeciętnie 27 kilogramów. Grupę badaną stanowiło 12 (n = 12), grupę kontrolną 11 zwierząt. Wszystkie zwierzęta włączone do badania przeżyły 20-godzinny czas obserwacji.

W celu potwierdzenia wprowadzenia zwierząt we wstrząs endotoksyczny oceniano wybrane parametry życiowe, przedstawione w Tab. 7. Przed rozpoczęciem wlewu endotoksyny stan kliniczny zwierząt był stabilny, a odczytane wartości parametrów życiowych mieściły się w zakresie norm. Po czterech godzinach w obu grupach odnotowano zwiększenie częstości pracy serca, silne obniżenie rzutu serca, gwałtowny wzrost ciśnień w tętnicy płucnej wraz ze wzrostem oporów w krążeniu systemowym i płucnym oraz blisko dwukrotny wzrost stężenia mleczanów we krwi w stosunku do czasu wyjściowego, co jednoznacznie świadczyło o wystąpieniu hipodynamicznego wstrząsu endotoksycznego i niedotlenieniu organizmu. Parametrem, który istotnie statystycznie różnił się między grupami, było średnie ciśnienie w tętnicy płucnej, zarówno po 4 jak i 8 godzinach od rozpoczęcia wlewu endotoksyny, wyraźnie kontrolowane inhalacją tlenu azotu w grupie badanej. W 8 godzinie trwania obserwacji utrzymywała się tachykardia oraz notowano dalszy wzrost temperatury ciała. Rzut serca powrócił do wartości bliskich wyjściowym, zaś spadające stężenie mleczanów odzwierciedliło prawidłowo prowadzone leczenie. W 12 i 20 godzinie w obu grupach utrzymywała się tachykardia i gorączka, natomiast poziom mleczanów konsekwentnie spadał. W całym czasie trwania eksperymentu stabilne pozostawało ciśnienie tętnicze krwi i ośrodkowe ciśnienie żyłne, parametry te były bowiem bezpośrednim celem interwencji medycznych.

Tabela 7. Wskaźniki wstrząsu wywołanego przez wlew lipopolisacharydu (częstość akcji serca, rzut serca, średnie ciśnienie w tętnicy płucnej, średnie ciśnienie tętnicze, ośrodkowe ciśnienie żyłne, ciśnienie zaklinowania, temperatura) oraz hipoperfuzji (stężenie mleczanu) zarejestrowane na początku badania oraz w 4, 8, 13 i 20 godzinie jego trwania.

	Grupa	wyjściowo	4 godziny	8 godzin	12 godzin	20 godzin
HR, uderzenia/min	kontrolna	70 ± 5	129 ± 13 [#]	134 ± 8	125 ± 8	121 ± 8
	badana	83 ± 8	105 ± 11 [#]	122 ± 12	124 ± 9	116 ± 10
CO, L/min/m²	kontrolna	3.4 ± 0.3	2.4 ± 0.1 [#]	3.4 ± 0.4	4.4 ± 0.5	4.9 ± 0.5
	badana	4.2 ± 0.3	2.4 ± 0.3 [#]	3.6 ± 0.4	4.2 ± 0.3	4.9 ± 0.4
MPAP, mmHg	kontrolna	19 ± 1	38 ± 3	34 ± 3	29 ± 2	26 ± 2
	badana	18 ± 1	29 ± 2 [*]	27 ± 1 [*]	25 ± 1	21 ± 1
MAP, mmHg	kontrolna	93 ± 3	90 ± 7	99 ± 6	87 ± 7	82 ± 3
	badana	102 ± 3	94 ± 6	101 ± 8	103 ± 8	92 ± 6
CVP, mmHg	kontrolna	7 ± 1	6 ± 1	7 ± 1	8 ± 1	8 ± 1
	badana	6 ± 1	5 ± 2	8 ± 1	9 ± 1	8 ± 1
PCWP, mmHg	kontrolna	9 ± 1	12 ± 3	10 ± 1	10 ± 1	13 ± 2
	badana	8 ± 1	10 ± 2	11 ± 1	11 ± 1	12 ± 1
Temperatura, °C	kontrolna	37.1 ± 0,3	38.7 ± 0.4	39.8 ± 0.5	40.3 ± 0.4	40.4 ± 0.4
	badana	36.9 ± 0.18	38.5 ± 0.2	39.1 ± 0.4	39.6 ± 0.4	40.2 ± 0.6
Mleczany, mmol/L	kontrolna	2.49 ± 0.39	4.19±0.46	3.42±0.61	2.15±0.29	1.16±0,13
	badana	2.21 ± 0.34	4.02±0.71	2.89±0.47	2.09±0.56	1.55±0.44

CO, rzut serca; CVP, ośrodkowe ciśnienie żyłne; HR, częstość pracy serca; MAP, średnie ciśnienie tętnicze; MPAP, średnie ciśnienie w tętnicy płucnej; PCWP, ciśnienie zaklinowania. Wartości przedstawiono jako średnie ± odchylenie standardowe.

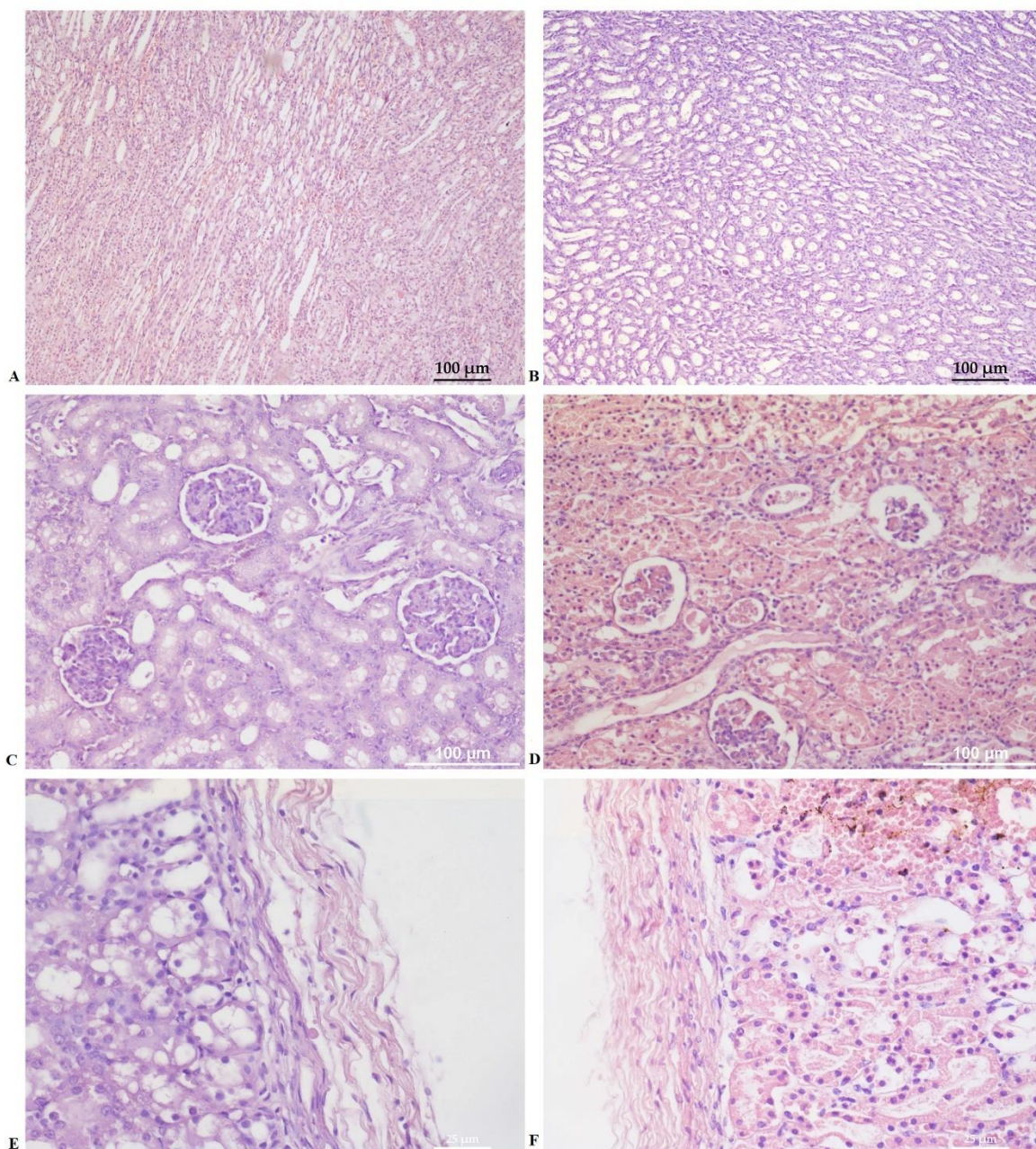
* p<0,05 w stosunku do grupy kontrolnej (test U Mann-Whitney)

p<0,05 w stosunku do danego parametru w czasie wyjściowym (t=0) (test kolejności par Wilcoxon)

7.2. Nerki

7.2.1. Ocena histologiczna preparatów

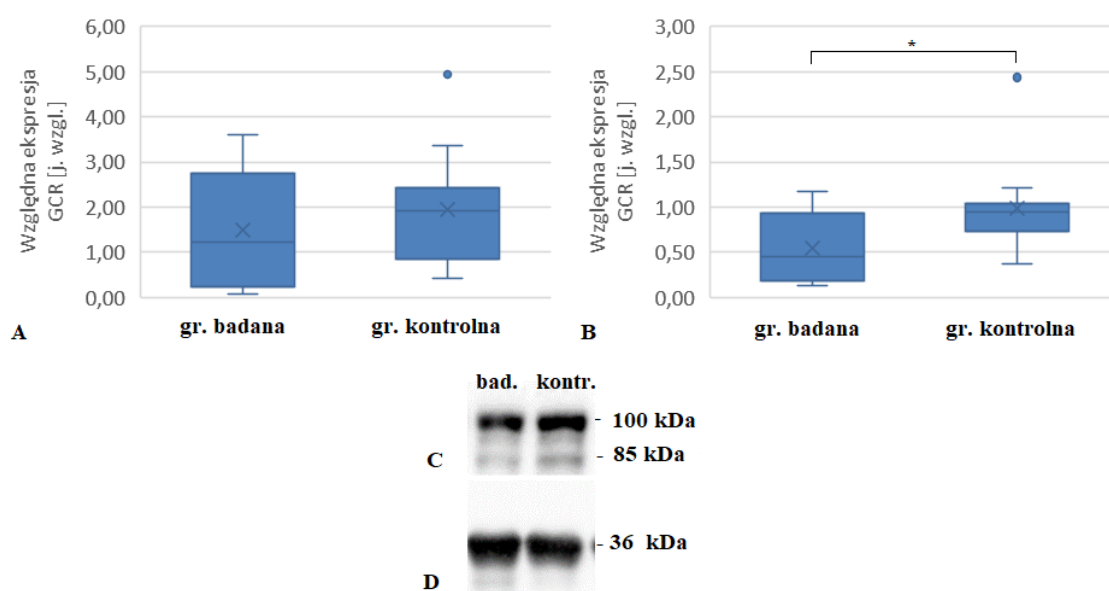
W nerkach w grupie badanej, jak i kontrolnej zaobserwowano liczne zmiany histopatologiczne (Ryc.3). Do najczęściej obserwowanych zaliczały się patologie dotyczące kłębuszków oraz cewek nerkowych. Kłębuszki nerkowe w wielu preparatach nosiły znamiona obrzęku, zaś w części z nich były obkurczone. W cewkach nerkowych obserwowano najczęściej poszerzenie ich światła oraz niejednokrotnie wyraźną wakuolizację cytoplazmy komórek nabłonka wyściełającego kanaliki mogącą odpowiadać wydalaniu dużej ilości niezagęszczonego moczu wtórnie do agresywnej płynoterapii oraz uwarunkowań patofizjologicznych. W niektórych preparatach stwierdzono obecność nacieków śródmiąższowych oraz podtorebkowych. W części próbek stwierdzono także pogrubienie łącznotkankowej torebki narządu.



Ryc. 3 Mikrofotografie wybranych zmian histopatologicznych w nerkach. Po stronie lewej zamieszczono mikrofotografie preparatów nerki z grupy badanej natomiast po stronie prawej mikrofotografie preparatów nerki z grupy kontrolnej. A. praktycznie niezmienny patologiczne fragment rdzenia nerki. Widoczne kanaliki proste o typowej budowie, głównie w przekrojach stycznych; B. fragment rdzenia nerki, uwagę zwraca poszerzone światło kanalików, mogące być świadectwem nasilonej diurezy; C. praktycznie niezmienny patologicznie fragment kory nerki, prawidłowe morfologiczne kłębuszki nerkowe; D. zmieniony patologicznie fragment kory nerkowej, widoczne silnie obkurczone kłębuszki nerkowe; E. torebka nerkowa i powierzchowna warstwa kory nerki; F. pogrubiała torebka nerkowa z widocznym z widocznym przekrwieniem w górnej części preparatu.

7.2.2. Analiza ekspresji GR w homogenatach białkowych nerek

Aby sprawdzić, czy wziewnie podawany tlenek azotu połączony z małymi dawkami kortyzonu w badanym modelu wstrząsu endotoksycznego prowadzi do zwiększenia ilości receptora glikokortykosteroidowego w nerkach, zastosowano technikę Western blot. Analizowano homogenat uzyskany z nerek jako białko referencyjne wykorzystano GAPDH. Wyniki uzyskane dla homogenatu tkankowego nerek nie potwierdziły występowania statystycznie istotnych różnic dla prążka o masie cząsteczkowej około 100 kDa. Odnotowano statystycznie istotnie różnicę pomiędzy grupami dla prążka o masie około 85 kDa. Wyniki przedstawiono na Ryc. 4.

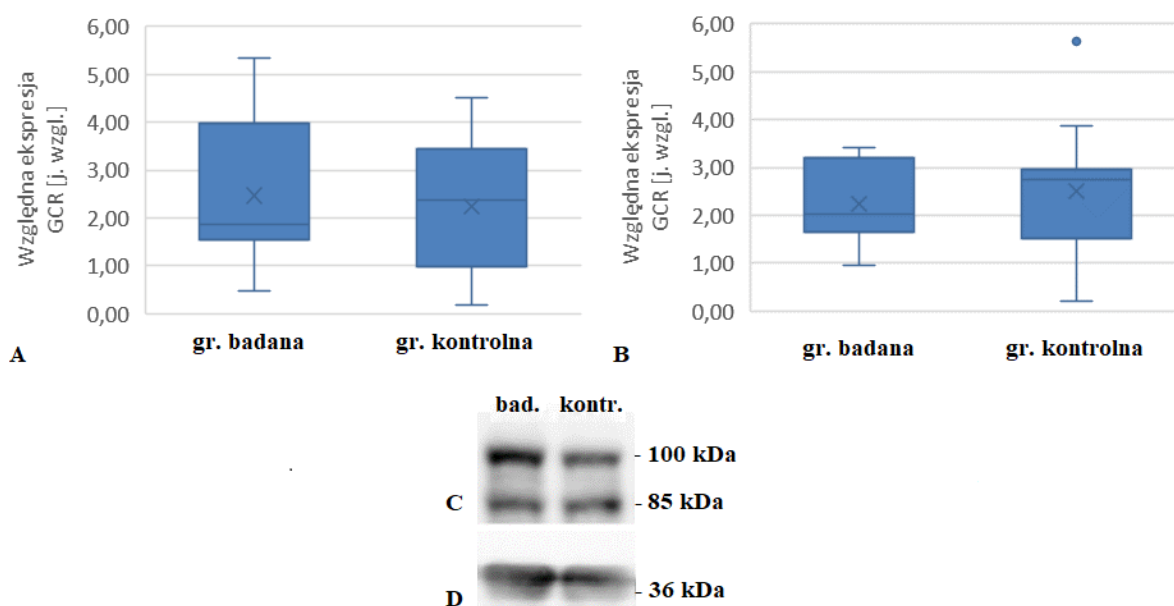


Ryc. 4 Względna ekspresja receptora glikokortykosteroidowego względem białka referencyjnego – GAPDH oznaczona metodą Western blot w homogenacie nerek. A. względna ekspresja prążka o masie około 100 kDa; Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm zakres nieodstających \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną B. względna ekspresja prążka o masie około 85 kDa; Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm zakres nieodstających \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną . C. reprezentatywny obraz receptora glikokortykosteroidowego, prążki o masie 100 kDa oraz 85 kDa; D. reprezentatywny obraz białka referencyjnego, wykorzystywanego do znormalizowania wyników - GAPDH o masie około 36 kDa.

W kolejnym kroku wykonano subfrakcjonowanie komórkowe, uzyskując z homogenatów nerek frakcje białek cytoplazmatycznych oraz białek jądrowych związanych z chromatyną. Pozwoliło to na sprawdzenie metodą Western blot, czy efektem działania tlenu azotu połączonego z małymi dawkami kortyzonu w nerkach

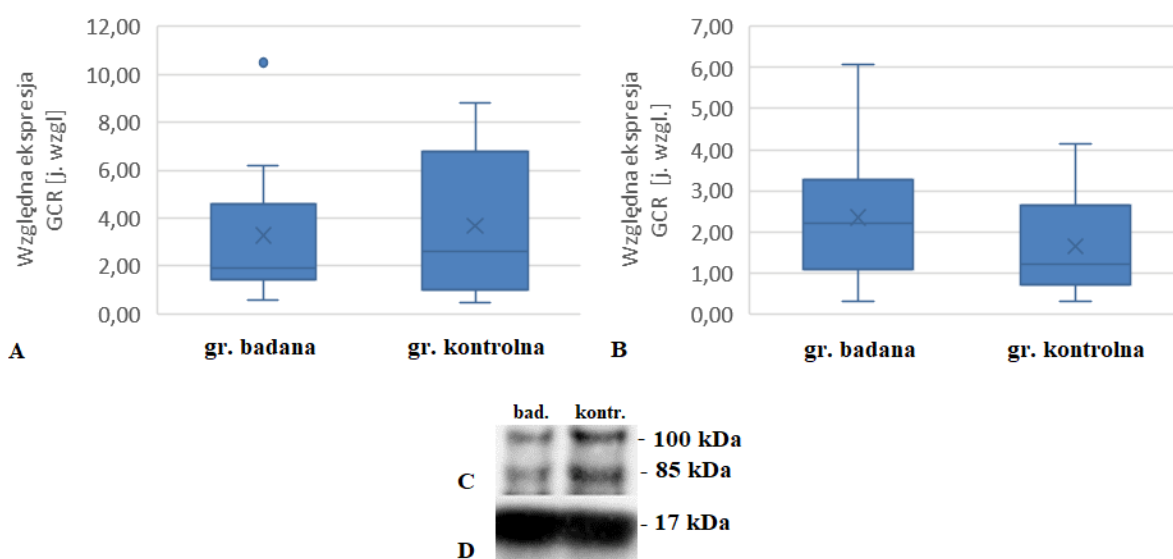
może być nasiloną aktywacją receptora glikokortykosteroidowego, a w konsekwencji zwiększony transport jego aktywnej formy do jądra komórkowego.

Wyniki uzyskane dla frakcji białek cytoplazmatycznych pozyskanej z nerek poddano analizie w oprogramowaniu ImageLab. Analizowano dwa prążki o masie odpowiednio około 100 kDa oraz 85 kDa. Podobnie jak w homogenacie tkankowym nie odnotowano statystycznych istotnie różnic pomiędzy grupami w przypadku prążka o masie 100 kDa oraz dodatkowo różnic takich nie stwierdzono także dla niższego prążka. Wyniki zostały przedstawione na Ryc. 5.



Ryc. 5 Względna ekspresja receptora glikokortykosteroidowego względem białka referencyjnego - GAPDH oznaczona metodą Western blot we frakcji białek cytoplazmatycznych, pozyskanej z nerek. A. względna ekspresja prążka o masie około 100 kDa; Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną B. względna ekspresja prążka o masie około 85 kDa; Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm zakres nieodstających \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną C. reprezentatywny obraz dla receptora glikokortykosteroidowego, prążki o masie 100 kDa oraz 85 kDa; D. typowy obraz dla białka referencyjnego GAPDH, wykorzystywanego do znormalizowania wyników - prążek o masie około 36 kDa.

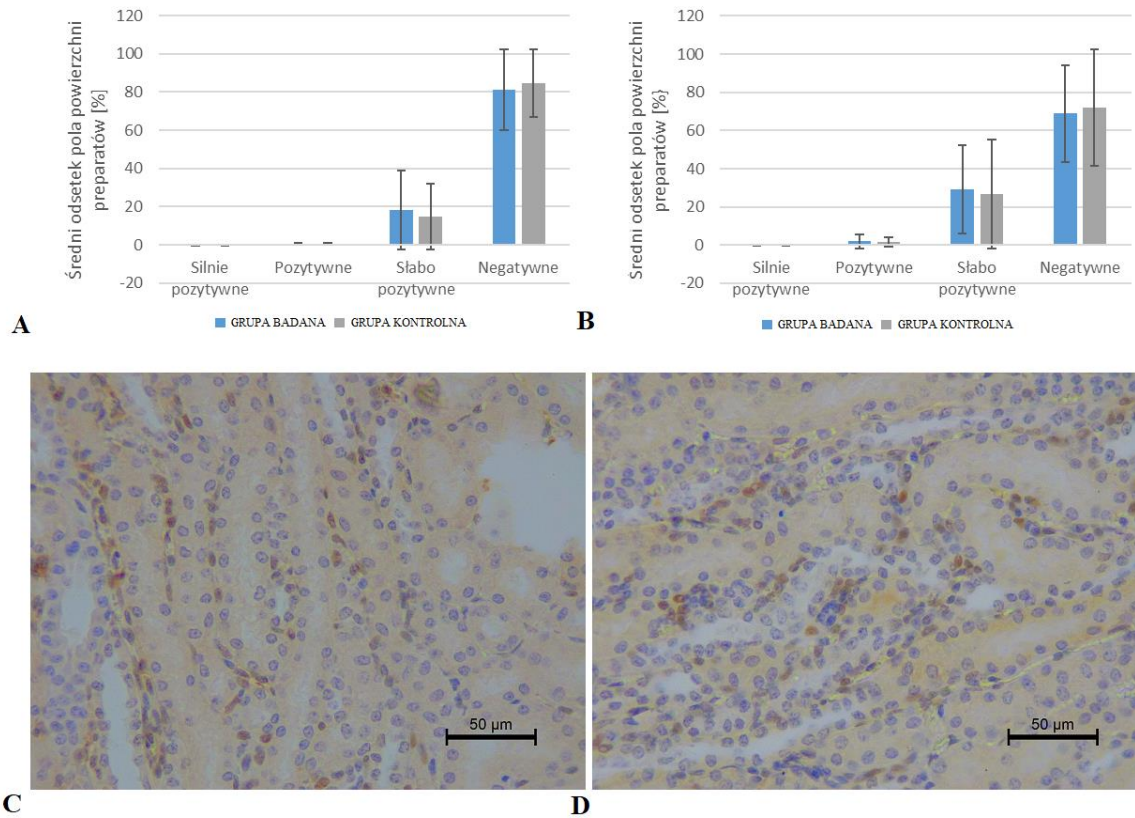
Wyniki uzyskane dla frakcji białek jądrowych związanych z chromatyną z nerek poddawano analizie w oprogramowaniu ImageLab. Badano dwa prążki o masie odpowiednio około 100 kDa oraz 85 kDa. Podobnie jak we frakcji białek cytoplazmatycznych z nerki nie odnotowano statystycznych istotnie różnic pomiędzy grupami dla żadnego z badanych prążków (Ryc. 4).



Ryc. 6 Względna ekspresja receptora glikokortykosteroidowego względem białka referencyjnego - histonu H3 oznaczona metodą Western blot we frakcji białek jądrowych związanych z chromatyną z nerek. A. względna ekspresja prążka o masie około 100 kDa; Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm zakres nieodstających \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną B. względna ekspresja prążka o masie około 85 kDa; Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną C. typowy obraz - prążki o masie 100 kDa oraz 85 kDa odpowiadają receptorowi glikokortykosteroidowemu; D. typowy obraz dla białka referencyjnego - prążek o masie około 17 kDa odpowiada histonowi H3 wykorzystanemu do znormalizowania wyników.

7.2.3. Analiza immunohistochemiczna preparatów nerek

Preparaty z nerek wybarwione na obecność receptora glikokortykosteroidowego badano dwutorowo: poddawano je ocenie manualnej z zastosowaniem skali IRS wg Remelle⁹⁷, zaś cyfrowe skany preparatów analizowano przy pomocy oprogramowania ImageJ. Odrębnej ocenie podlegała reakcja cytoplazmatyczna oraz reakcja jądrowa. Ekspresję receptora glikokortykosteroidowego odnotowano przede wszystkim w komórkach nabłonkowych wyściełających kanaliki nerkowe. Wyniki oceny manualnej zamieszczono w Tab. 8, natomiast wyniki analizy wykonanej przy pomocy oprogramowania zamieszczono na Ryc. 7. Analiza statystyczna danych nie wykazała obecności istotnych różnic pomiędzy grupą badaną a kontrolną.



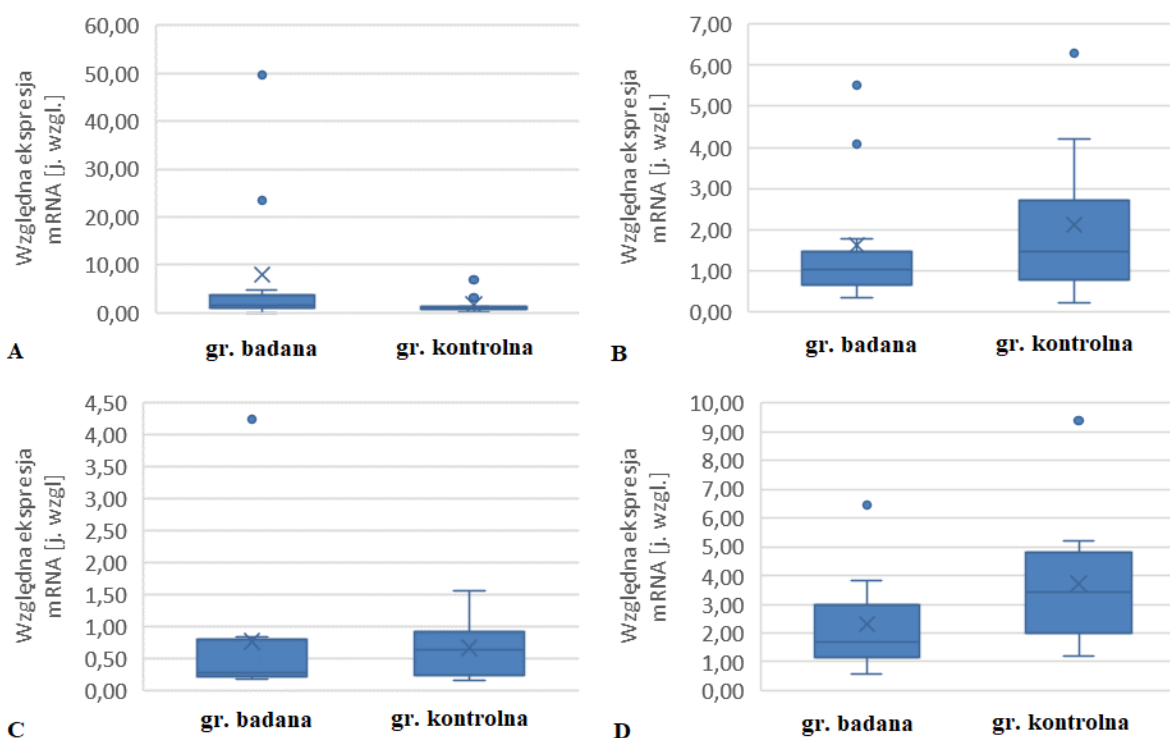
Ryc. 7 Nerki - ekspresja receptora glikokortykosteroidowego, badanie immunohistochemiczne. Cyfrowe skany preparatów analizowano przy użyciu oprogramowania ImageJ. Poprzez nałożenie odpowiednich masek program kwalifikował obszary danego preparatu o poszczególnym natężeniu reakcji barwnej do jednej z kategorii: wysoce pozytywne, pozytywne, słabo pozytywne lub negatywne. Końcowy wynik dla każdej kategorii wyrażony został jako procent pola powierzchni badanych preparatów o danej intensywności zabarwienia. A. reakcja cytoplazmatyczna, średnia \pm odchylenie standardowe; B. reakcja jądrowa, średnia \pm odchylenie standardowe; C. mikrofotografia przedstawiająca przykładowy preparat z grupy kontrolnej, charakteryzujący się umiarkowanym natężeniem reakcji cytoplazmatycznej oraz jądrowej; D. mikrofotografia przedstawiająca przykładowy preparat z grupy badanej charakteryzujący się umiarkowanym natężeniem reakcji cytoplazmatycznej oraz jądrowej.

Tab. 8 Wynik badania immunohistochemicznego w kierunku ekspresji receptora glikokortykosteroidowego w nerkach. Do półilościowej oceny natężenia reakcji posłużono się skalą IRS wg Remelle.

REAKCJA							
CYTOPLAZMATYCZNA				JĄDROWA			
Grupa badana		Grupa kontrolna		Grupa badana		Grupa kontrolna	
P17Q	++	P19S	N/A	P17Q	-	P19S	N/A
P22V	+	P21U	++	P22V	-	P21U	-
P24Ż	+++	P23X	+	P24Ż	-	P23X	-
P26BA	N/A	P25W	-	P26BA	N/A	P25W	-
P28BC	+	P27BB	N/A	P28BC	-	P27BB	N/A
P33BH	-	P29BD	+++	P33BH	++	P29BD	-
P34BI	++	P31BF	N/A	P34BI	++	P31BF	N/A
P37BL	++	P32BG	N/A	P37BL	+	P32BG	N/A
P38BM	+++	P35BJ	++	P38BM	+	P35BJ	+++
P41BP	+++	P36BK	++	P41BP	+++	P36BK	+++
P42BQ	+++	P39BN	N/A	P42BQ	-	P39BN	N/A
P45BT	++			P45BT	-		

7.2.4. Analiza ekspresji mRNA wybranych cytokin w nerkach

Aktywność receptora glikokortykosteroidowego badano dodatkowo poprzez pomiar ekspresji wybranych genów, kontrolowanych przez ten receptor - kluczowych cytokin zapalnych, takich jak IL-1 β , IL-6, TNF- α oraz TGF- β . Z próbek nerek od wszystkich osobników wyizolowano RNA, przeprowadzono odwrotną transkrypcję, a następnie reakcję PCR w czasie rzeczywistym. Uzyskane wyniki przedstawiono na Ryc. 8. Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi grupami dla żadnego z analizowanych genów.

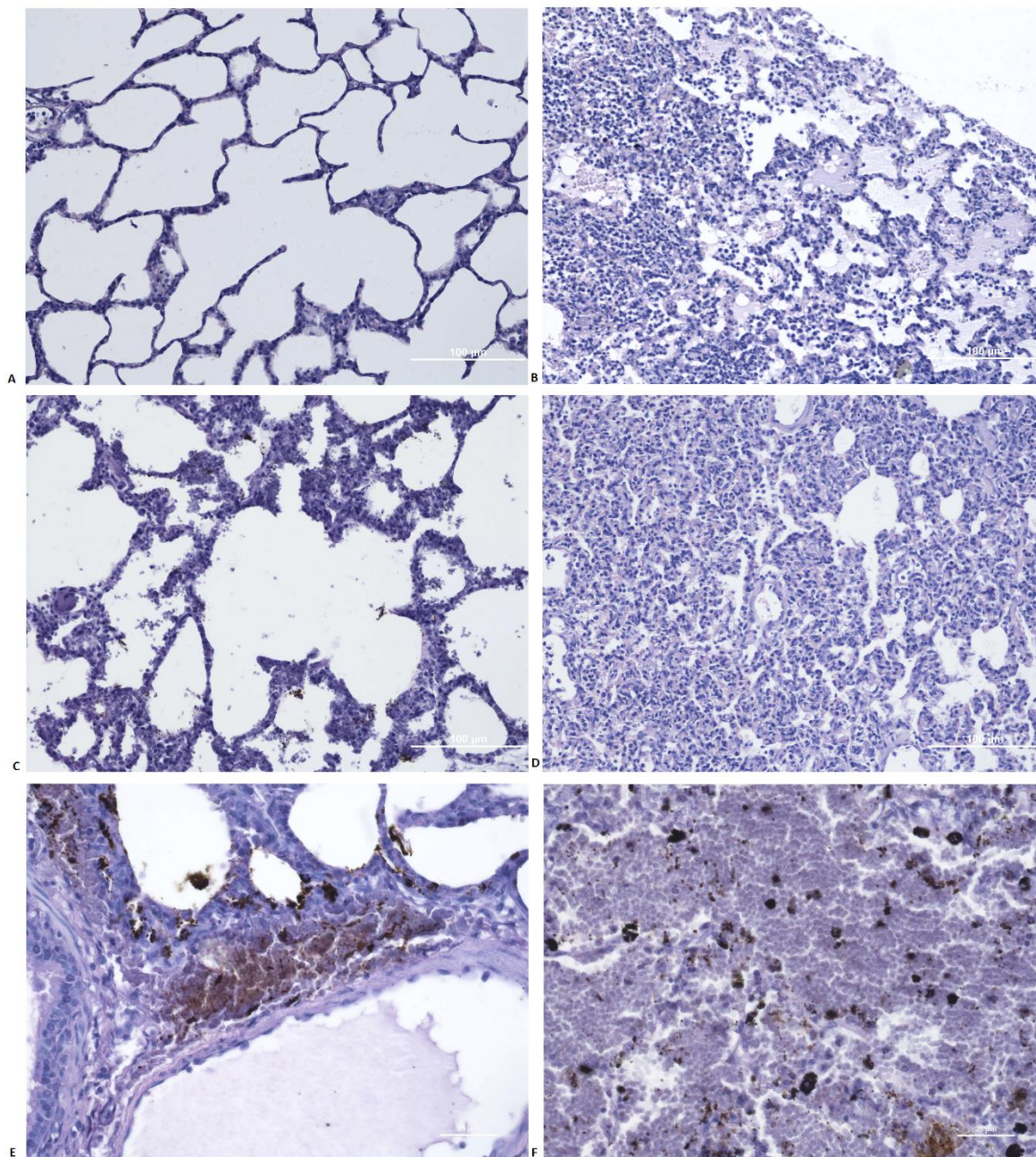


Ryc. 8 Względna ekspresja wybranych cytokin zapalnych w nerkach osobników z grupy kontrolnej i osobników z grupy badanej zmierzona metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wykres ramka - wąsy przedstawia uzyskane wyniki w podziale na grupy. Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm zakres nieodstających \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną. Przypadki odstające nie były wyłączone z analizy. A. IL-1 β ; B. IL-6; C. TNF- α ; D. TGF- β .

7.3. Płuca

7.3.1. Ocena histologiczna preparatów

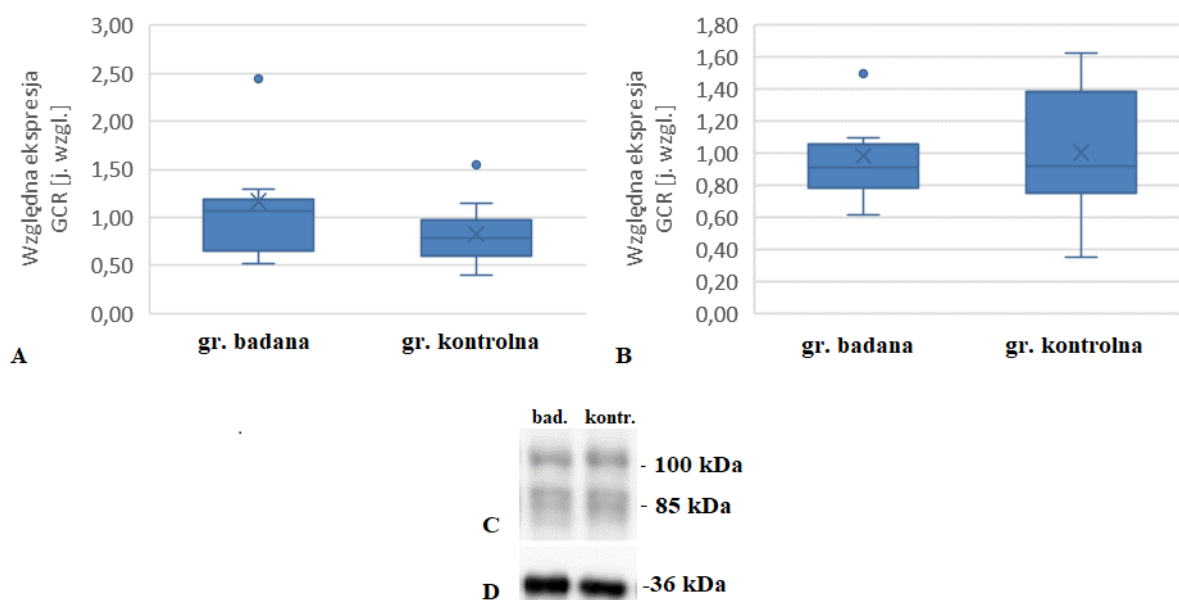
Zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej w badaniu mikroskopowym stwierdzono przekrwienie płuc z krwawieniem do przestrzeni pęcherzykowych. Obserwowano także obecność makrofagów obładowanych hemosyderyną. W obu grupach obserwowano mikrozakrzepy szkliste w świetle naczyń włosowatych. Wśród częstych obserwacji notowano także śródmiąższowe nacieki zapalne z pogrubieniem ścian pęcherzyków płucnych. Częstość i stopień nasilenia nacieków w grupie kontrolnej była większa niż w grupie badanej. Poglądowe mikrofotografie zamieszczono na Ryc. 9.



Ryc. 9 Mikrofotografie preparatów płuc barwionych metodą H&E. Po stronie lewej przedstawiono obrazy obserwowane w grupie badanej, po stronie prawej obrazy obserwowane w grupie kontrolnej. A. Nieznacznie pogrubione przegrody międzypęcherzykowe, brak wysięku w świetle pęcherzyków płucnych B. Obrzęk płuc, duże nacieki limfocytarne. W pęcherzykach płucnych obserwowano wysięk; C Umiarkowanie pogrubione przegrody międzyprzedsionkowe nacieczone jednojądrzastymi komórkami układu białokrwinkowego.; D masywny naciek zapalny w przestrzeniach międzypęcherzykowych zaburzający budowę histologiczną płuc; E niewielki zastój krwi F. obraz masywnego zastój krwi w płucach, widoczne złogi hemosyderyny.

7.3.2. Analiza ekspresji GR w homogenatach białkowych płuc

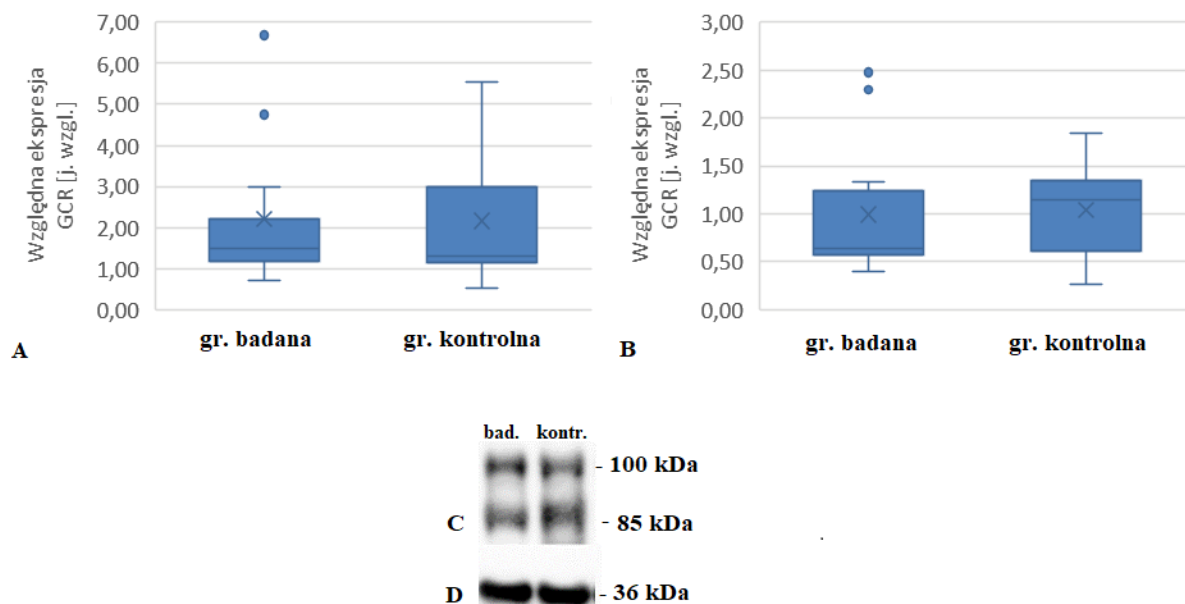
Aby sprawdzić, czy wziewnie podawany tlenek azotu połączony z małymi dawkami kortyzonu w świńskim modelu wstrząsu endotoksycznego prowadzi do zwiększenia ilości receptora glikokortykosteroidowego w płucach, zastosowano technikę Western blot. Analizowano homogenat uzyskany z tkanki płucnej jako białko referencyjne zastosowano GAPDH. Wyniki uzyskane dla homogenatu tkankowego płuc nie potwierdziły występowania statystycznie istotnych różnic dla prążków o masie cząsteczkowej około 100 kDa oraz 85 kDa. Wyniki zostały przedstawione na Ryc. 10.



Ryc. 10 Względna ekspresja receptora glikokortykosteroidowego względem białka referencyjnego - GAPDH oznaczona metodą Western blot w homogenacie płuc. Przedstawiono wyniki dla dwóch prążków o masie cząsteczkowej około 100 i 85 kDa. Nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą badaną a kontrolną. A. względna ekspresja prążka o masie około 100 kDa; Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm zakres nieodstających \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną B. względna ekspresja prążka o masie około 85 kDa; Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm zakres nieodstających \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną C. reprezentatywny obraz - prążki o masie około 100 kDa oraz 85 kDa; D. reprezentatywny obraz przedstawiający ekspresję białka referencyjnego GAPDH, wykorzystywanego w celu znormalizowania wyników - prążek o masie około 36 kDa.

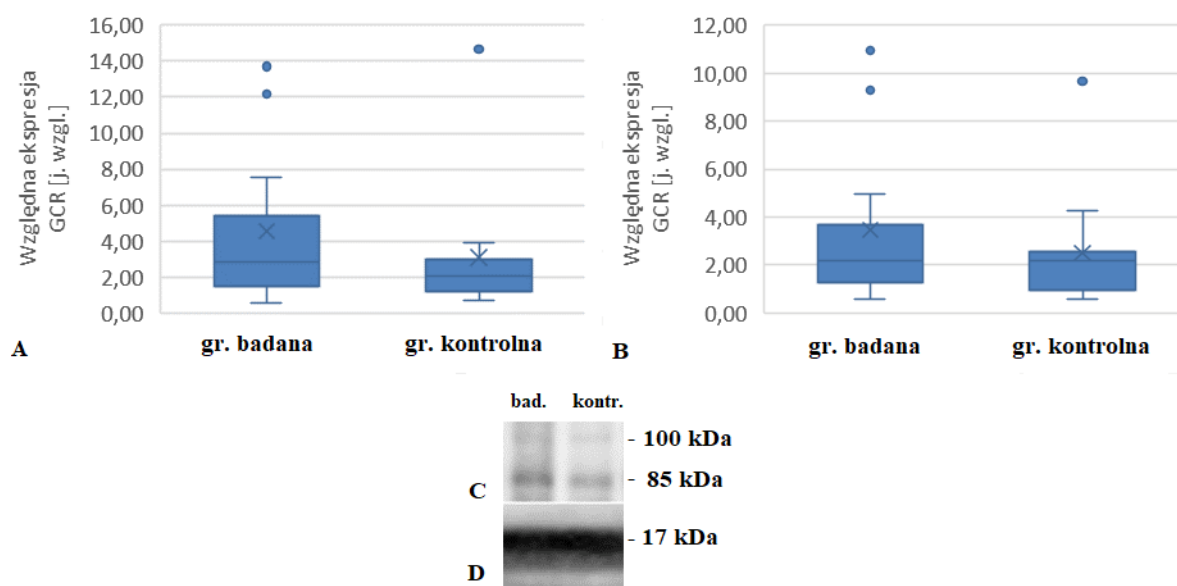
W kolejnym kroku wykonano subfrakcjonowanie komórkowe, uzyskując z płuc frakcje białek cytoplazmatycznych oraz białek jądrowych związanych z chromatyną. Pozwoliło to na sprawdzenie metoda Western blot, czy efektem działania tlenu azotu połączonego z małymi dawkami kortyzonu w płucach może być nasilona aktywacja receptora glikokortykosteroidowego, a w konsekwencji zwiększony transport jego aktywnej formy do jądra komórkowego.

Wyniki uzyskane dla frakcji białek cytoplazmatycznych z tkanki płucnej poddano analizie w oprogramowaniu ImageLab. Analizowano dwa prążki o masie odpowiednio około 100 kDa oraz 85 kDa. Podobnie jak w homogenacie tkankowym nie odnotowano statystycznie istotnie różnic pomiędzy grupami w przypadku obu badanych prążków. Wyniki przedstawiono na Ryc. 11.



Ryc. 11 Względna ekspresja receptora glikokortykosteroidowego względem białka referencyjnego- GAPDH oznaczona metodą Western blot we frakcji białek cytoplazmatycznych z płuc. Nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą badaną a kontrolną. A. względna ekspresja prążka o masie około 100 kDa; Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm zakres nieodstających \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną B. względna ekspresja prążka o masie około 85 kDa; Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm zakres nieodstających \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną C. typowy obraz - prążki receptora o masie 100 kDa oraz 85 kDa; D. typowy obraz dla białka referencyjnego GAPDH, wykorzystanego w celu znormalizowania wyników - prążek o masie około 36 kDa.

Wyniki uzyskane dla frakcji białek jądrowych związanych z chromatyną z płuc poddano analizie w oprogramowaniu ImageLab. Analizowano dwa prążki o masie odpowiednio 100 kDa oraz 85 kDa. Białkiem referencyjnym w tym przypadku był histon H3. Podobnie jak we frakcji białek cytoplazmatycznych z płuc nie odnotowano statystycznych istotnie różnic pomiędzy grupami dla żadnego z badanych prążków. Wyniki zostały zaprezentowane na Ryc. 12.



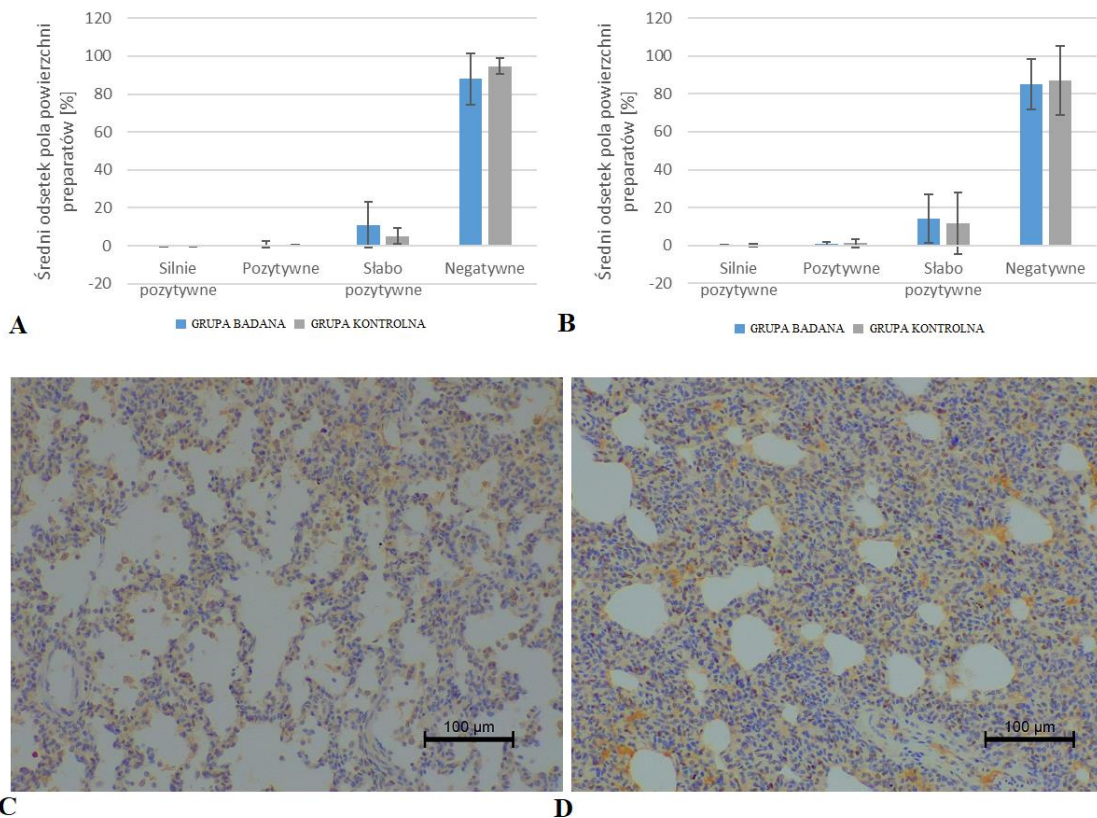
Ryc. 12 Względna ekspresja receptora glikokortykosteroidowego względem białka referencyjnego - histonu H3 oznaczona metodą Western blot we frakcji białek jądrowych związanych z chromatyną z płuc. Nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą badaną i kontrolną. A. względna ekspresja prążka o masie około 100 kDa; Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm zakres nieodstających \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną B. względna ekspresja prążka o masie około 85 kDa; Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm zakres nieodstających \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną C. reprezentatywny obraz dla receptora glikokortykosteroidowego - prążki o masie około 100 kDa oraz 85 kDa; D. reprezentatywny obraz dla białka referencyjnego histon H3, wykorzystanego w celu znormalizowania wyników - prążek o masie około 17 kDa.

7.3.3. Analiza immunohistochemiczna preparatów płuc

Preparaty immunohistochemiczne badano dwutorowo: poddawano je ocenie histopatologicznej (skala IRS wg Remelle)⁹⁷, zaś cyfrowe skany preparatów analizowano przy pomocy oprogramowania ImageJ. Odrębnej ocenie podlegała reakcja cytoplazmatyczna oraz reakcja jądrowa. Wyniki analizy przeprowadzonej przy pomocy oprogramowania przedstawiono na Ryc. 13, natomiast wyniki analizy manualnej przedstawiono w Tab. 9. Ekspresję receptora glikokortykosteroidowego notowano przede wszystkim w komórkach nabłonkowych wyściełających pęcherzyki płucne - pneumocytach oraz komórkach typowych dla nacieków zapalnych (makrofagi, neutrofile). Analiza statystyczna danych nie wykazała obecności statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą badaną a kontrolną.

Tab. 9 Wynik badania immunohistochemicznego w kierunku ekspresji receptora glikokortykosteroidowego w płucach. Do półilościowej oceny natężenia reakcji posłużono się skalą IRS wg Remelle.

REAKCJA							
CYTOPLAZMATYCZNA				JĄDROWA			
Grupa badana		Grupa kontrolna		Grupa badana		Grupa kontrolna	
P17Q	++	P19S	N/A	P17Q	-	P19S	N/A
P22V	++	P21U	N/A	P22V	-	P21U	N/A
P24Ż	++	P23X	N/A	P24Ż	++	P23X	N/A
P26BA	+++	P25W	+	P26BA	++	P25W	-
P28BC	++	P27BB	++	P28BC	-	P27BB	-
P33BH	+++	P29BD	+	P33BH	++	P29BD	-
P34BI	+	P31BF	++	P34BI	-	P31BF	+++
P37BL	+	P32BG	++	P37BL	++	P32BG	+++
P38BM	-	P35BJ	++	P38BM	-	P35BJ	+++
P41BP	+++	P36BK	++	P41BP	-	P36BK	+++
P42BQ	++	P39BN	++	P42BQ	-	P39BN	++
P45BT	+++			P45BT	-		

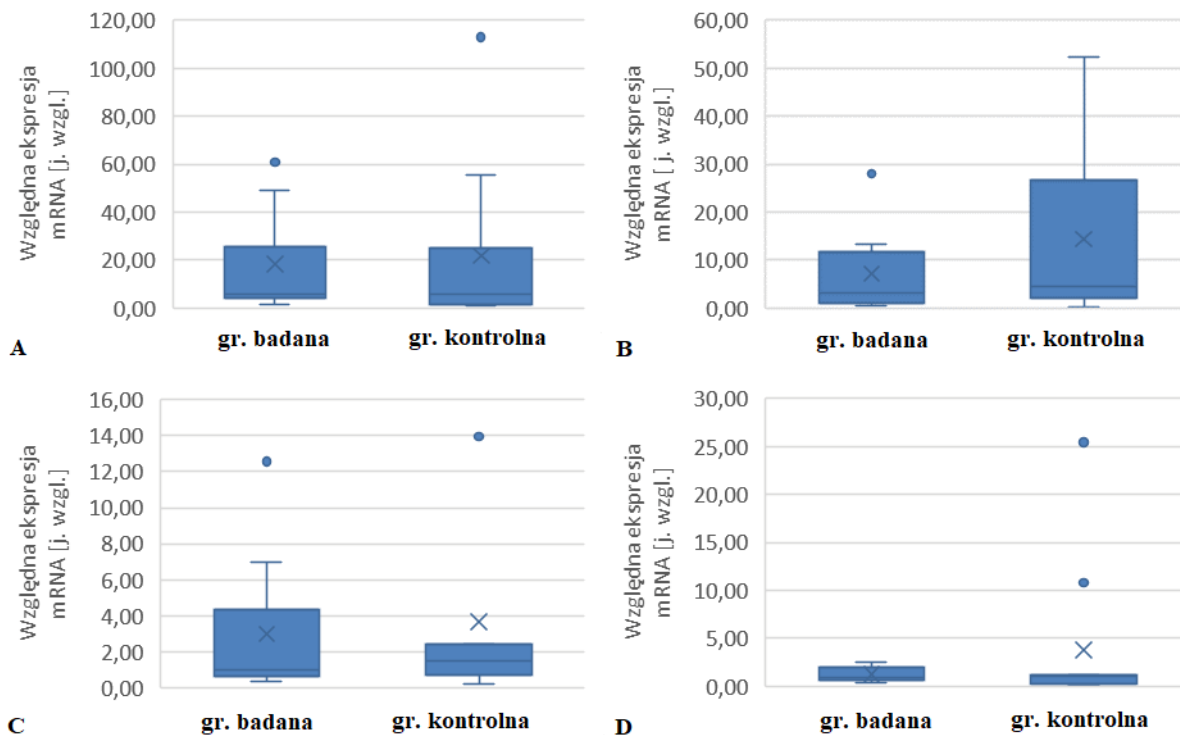


Ryc. 13 Płuca - ekspresja receptora glikokortykosteroidowego, badanie immunohistochemiczne. Cyfrowe skany preparatów analizowano przy użyciu oprogramowania ImageJ. Poprzez nałożenie odpowiednich masek program kwalifikował obszary danego preparatu o poszczególnym natężeniu reakcji barwnej do jednej z kategorii: wysoce pozytywne, pozytywne, słabo pozytywne lub negatywne. Końcowy wynik dla każdej kategorii wyrażony został jako procent pola powierzchni badanych preparatów o danej intensywności zabarwienia. A. reakcja cytoplazmatyczna, średnia \pm odchylenie standardowe; B. reakcja jądrowa, średnia \pm odchylenie standardowe; C. mikrofotografia przedstawiająca przykładowy preparat z grupy badanej charakteryzujący się niewielkim natężeniem reakcji cytoplazmatycznej oraz jądrowej; D. mikrofotografia przedstawiająca przykładowy preparat z grupy kontrolnej charakteryzujący się umiarkowanym natężeniem reakcji cytoplazmatycznej oraz niewielkim jądrowej.

7.3.4. Analiza ekspresji mRNA wybranych cytokin w płucach

Aktywność receptora glikokortykosteroidowego analizowano poprzez badanie ekspresji wybranych genów, kontrolowanych przez ten receptor - kluczowych cytokin zapalnych: IL-1 β , IL-6, TNF- α oraz TGF- β . Z próbek płuc od wszystkich osobników wyizolowano RNA, przeprowadzono odwrotną transkrypcję, a następnie reakcję PCR w czasie rzeczywistym. Uzyskane wyniki przedstawiono na Ryc. 14. Nie stwierdzono

różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi grupami dla żadnego z analizowanych genów. Uwagę zwraca relatywnie duża ilość przypadków odstających.

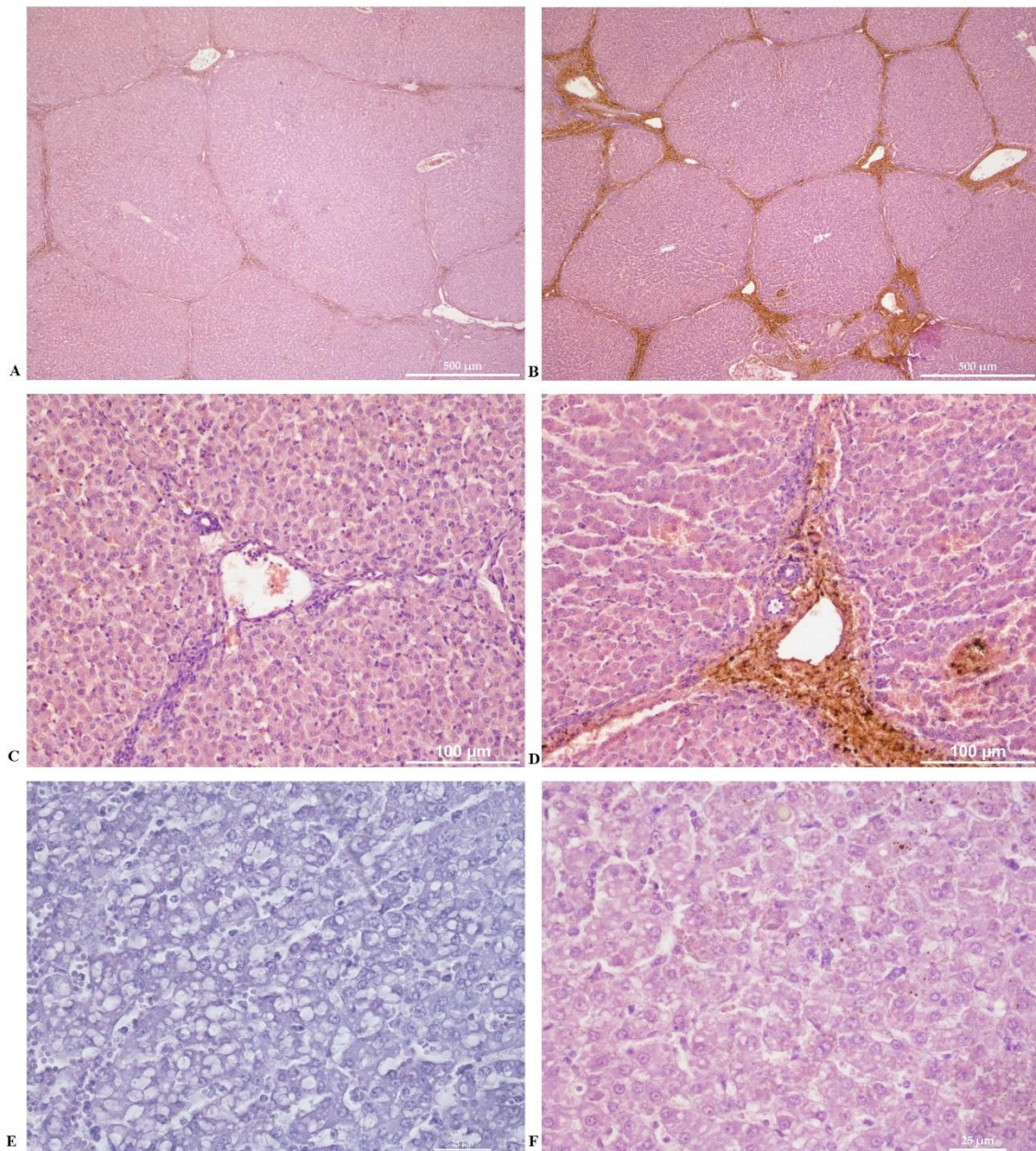


Ryc. 14 Względna ekspresja wybranych cytokin zapalnych w płucach osobników z grupy kontrolnej i osobników z grupy badanej zmierzona metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wykres ramka - wąsy przedstawia uzyskane wyniki w podziale na grupy. Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm zakres nieodstających \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną. Przypadki odstające nie były wyłączone z analizy. A. IL-1 β ; B. IL-6; C. TNF- α ; D. TGF- β .

7.4. Wątroba

7.4.1. Ocena histologiczna preparatów

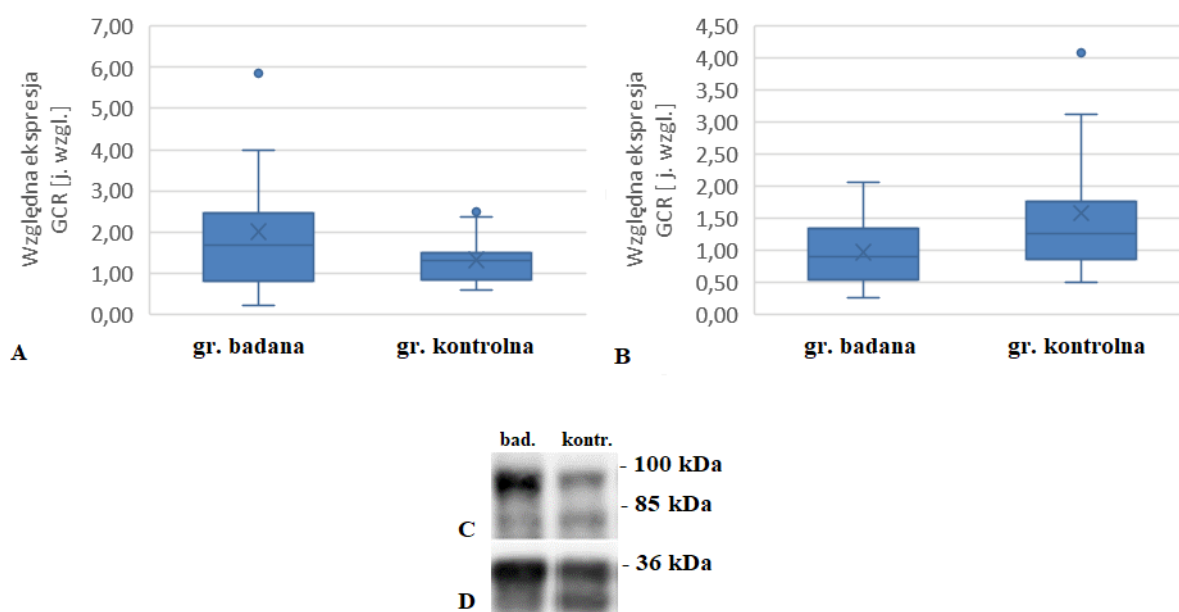
W badanych preparatach zaobserwowano liczne zmiany histopatologiczne, ale stopień ich nasilenia lub liczebność nie były związane z daną grupą. Do najczęściej obserwowanych zmian w preparatach wątroby należy stłuszczenie wątroby, przekrwienie narządu oraz obecność zmian autolitycznych. W wielu przypadkach obserwowano cechy zastojów żółci oraz obrzęku narządów. U niektórych zwierząt występowały nacieki międzyzrądkowe. Przykładowe mikrofotografie zamieszczono na Ryc. 15.



Ryc. 15 Mikrofotografie obrazujące wybrane zmiany histopatologiczne stwierdzone podczas badania wątroby. Po stronie lewej zamieszczono mikrofotografie preparatów nerki z grupy badanej, natomiast po stronie prawej mikrofotografie preparatów wątroby z grupy kontrolnej. A. praktycznie niezmienny patologiczne fragment wątroby. Widoczna zachowana budowa zrazikowa. W przestrzeniach bramno - żółciowych swoiście gatunkowo cienka warstwa tkanki łącznej luźnej oddzielającej zraziki anatomiczne. B. widoczne poszerzenie warstwy łącznotkankowej z cechami zastoju żółci. C. triada wątrobowa - żyła wrotna, tętnica wątrobowa i przewód żółciowy, prawidłowy obraz. D. triada wątrobowa - żyła wrotna, tętnica wątrobowa i przewód żółciowy. Widoczny zastój żółci oraz złogi hemosyderyny. E. fragment gronka wątrobowego z wyraźnie zaznaczoną wakuolizacją - prawdopodobnie na tle steatozy wątroby w przebiegu sepsy. F. Obraz wątroby o znacznie mniejszym nasileniu steatozy.

7.4.2. Analiza ekspresji GR w homogenatach białkowych wątroby

Aby sprawdzić, czy wziewnie podawany tlenek azotu połączony z małymi dawkami kortyzonu w badanym modelu wstrząsu septycznego prowadzi do zwiększenia ilości receptora glikokortykosteroidowego w wątrobie, zastosowano technikę Western blot. Analizowano homogenaty uzyskane z wątroby jako białko referencyjne zastosowano GAPDH. Wyniki uzyskane dla homogenatu z wątroby nie potwierdziły występowania statystycznie istotnych różnic dla prążków o masie cząsteczkowej około 100 kDa oraz 85 kDa (Ryc.14).

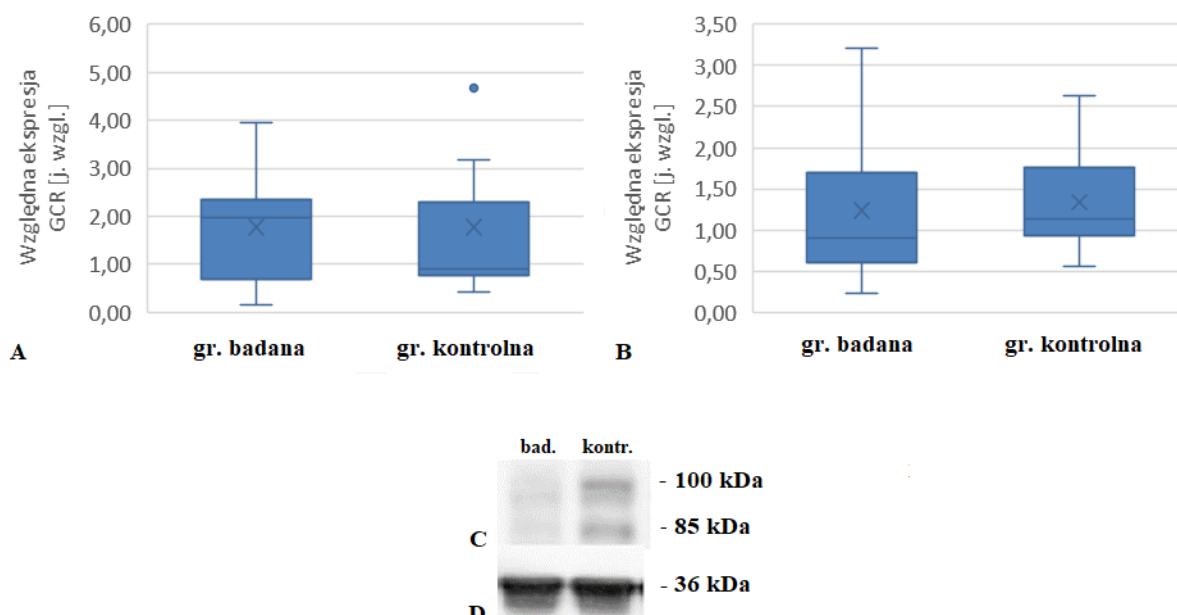


Ryc. 16 Względna ekspresja receptora glikokortykosteroidowego względem białka referencyjnego - GAPDH oznaczona metodą Western blot w homogenacie wątroby. Nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą badaną a kontrolną. A. względna ekspresja prążka o masie około 100 kDa; Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm zakres nieodstających \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną B. względna ekspresja prążka o masie około 85 kDa; Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm zakres nieodstających \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną C. reprezentatywny obraz, prążki o masie 100 kDa oraz 85 kDa odpowiadające receptorowi; D. typowy obraz przedstawiający białko referencyjne GAPDH, wykorzystane do znormalizowania wyników - prążek o masie około 36 kDa.

W kolejnym kroku wykonano subfrakcjonowanie komórkowe, uzyskując z próbek wątroby frakcje białek cytoplazmatycznych oraz białek jądrowych związanych z chromatyną. Pozwoliło to na sprawdzenie metodą Western blot, czy efektem działania NO połączonego z małymi dawkami kortyzonu w wątrobie może być nasiloną

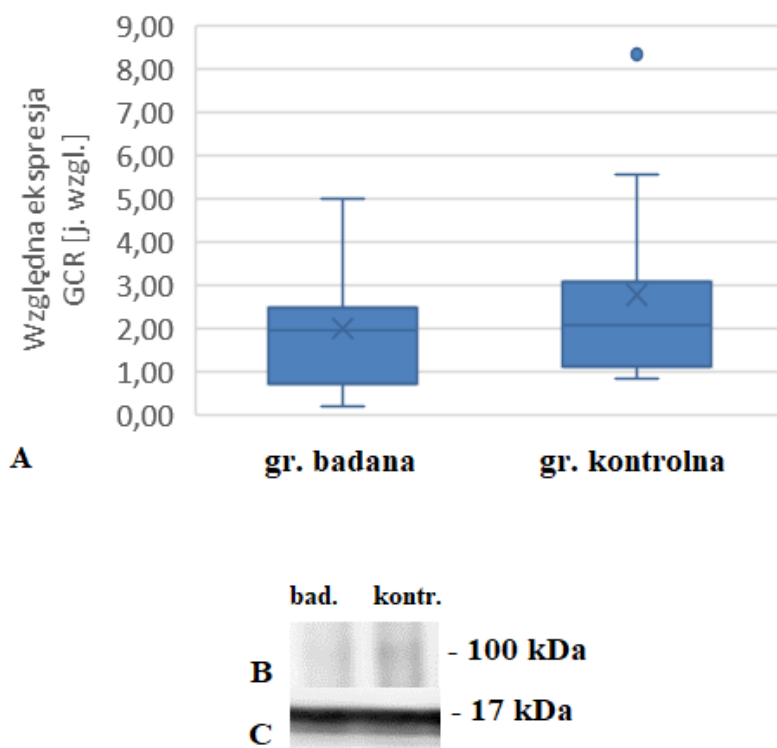
aktywacja receptora glikokortykosteroidowego, a w konsekwencji zwiększony transport jego aktywnej formy do jądra komórkowego.

Wyniki uzyskane dla frakcji białek cytoplazmatycznych z wątroby poddawano analizie w oprogramowaniu ImageLab - prążki o masie odpowiednio około 100 kDa oraz 85 kDa. Podobnie jak w homogenacie tkankowym nie odnotowano statystycznych istotnie różnic pomiędzy grupami w przypadku obu badanych prążków (Ryc. 17).



Ryc. 17 Względna ekspresja receptora glikokortykosteroidowego względem białka referencyjnego - GAPDH oznaczona metodą Western blot we frakcji białek cytoplazmatycznych z wątroby. Przedstawiono wyniki dla dwóch prążków o masach, odpowiednio 100 i 85 kDa. Nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą badaną a kontrolną. A - względna ekspresja prążka o masie około 100 kDa; Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm zakres nieodstających \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną B. względna ekspresja prążka o masie około 85 kDa; Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną C. reprezentatywny obraz - prążki receptora o masie około 100 kDa oraz 85 kDa; D. reprezentatywny obraz przedstawiający białko referencyjne GAPDH, wykorzystane w celu znormalizowania wyników, prążek o masie około 36 kDa.

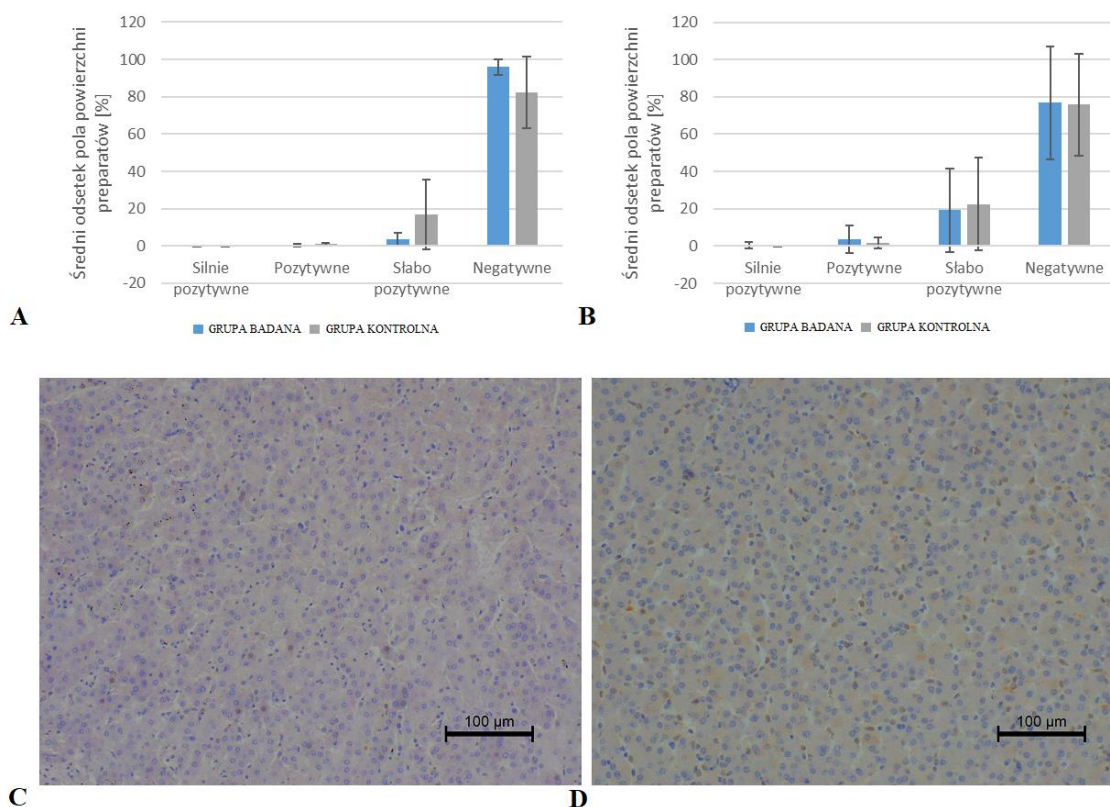
Wyniki uzyskane dla frakcji białek związanych z chromatyną homogenatu z wątroby poddano analizie w oprogramowaniu ImageLab (Ryc. 18). Analizowano wybrany prążek o masie około 100 kDa. Nie odnotowano statystycznych istotnie różnic pomiędzy grupami dla badanego prążka.



Ryc. 18 Względna ekspresja receptora glikokortykosteroidowego względem białka referencyjnego - histonu H3 oznaczona metodą Western blot - we frakcji białek związanych z chromatyną z wątroby. Przedstawiono wyniki dla prążka o masie cząsteczkowej 100 kDa. Nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą badaną a kontrolną. A - względna ekspresja prążka o masie około 100 kDa; Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyli \pm zakres nieodstających \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną B - reprezentatywny obraz receptora, prążek o masie 100 kDa; D - reprezentatywny obraz przedstawiający białko referencyjne, histon H3, wykorzystane do znormalizowania wyników, prążek o masie około 17 kDa.

7.4.3. Analiza immunohistochemiczna preparatów wątroby

Preparaty immunohistochemiczne badano dwutorowo: poddawano je ocenie histopatologicznej (skala IRS wg Remelle, Tab. 10)⁹⁷, zaś cyfrowe skany preparatów analizowano przy pomocy oprogramowania ImageJ (Ryc. 19). Odrębnej ocenie podlegała reakcja cytoplazmatyczna oraz reakcja jądrowa. Ekspresji receptora glikokortykosteroidowego w większości przypadków nie odnotowano. W preparatach, w których obserwowano ekspresję występowała ona w hepatocytach. Analiza statystyczna danych uzyskanych w toku analizy cyfrowej skanów oraz badania mikroskopowego nie wykazała statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą badaną a kontrolną.



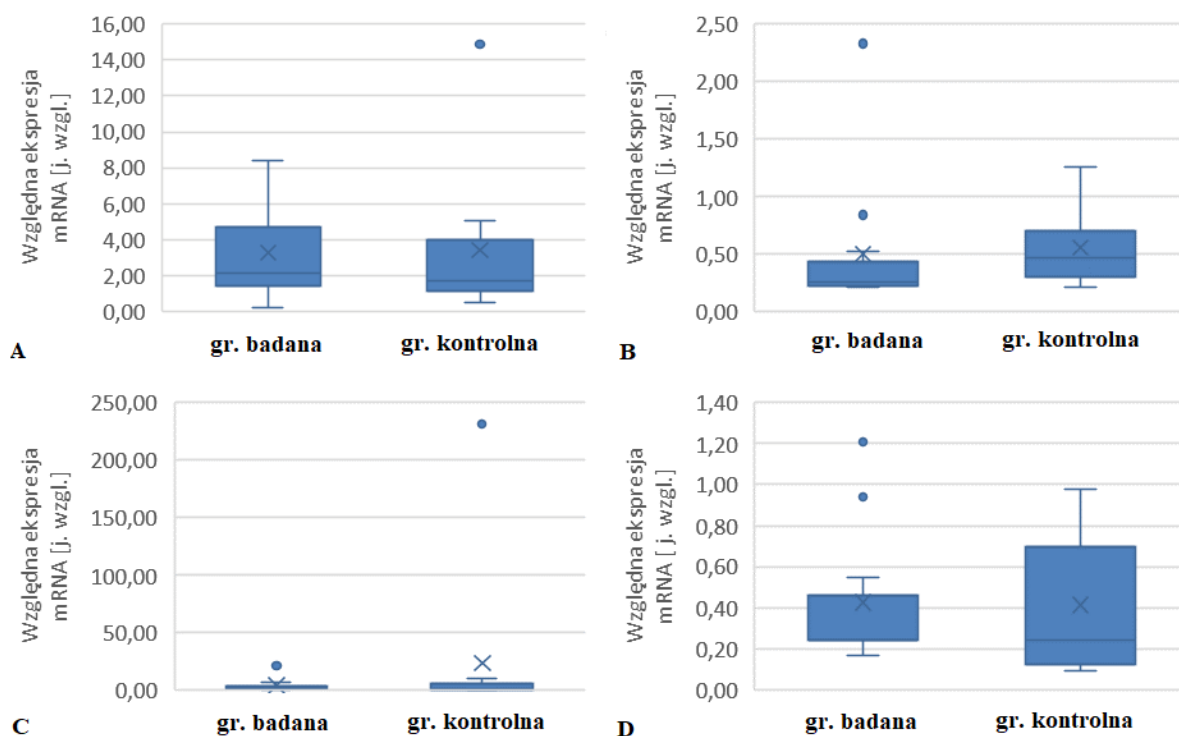
Ryc. 19 Wątroba - ekspresja receptora glikokortykosteroidowego, badanie immunohistochemiczne. Cyfrowe skany preparatów analizowano przy użyciu oprogramowania ImageJ. Poprzez nałożenie odpowiednich masek program kwalifikował obszary danego preparatu o poszczególnym natężeniu reakcji barwnej do jednej z kategorii: wysoce pozytywne, pozytywne, słabo pozytywne lub negatywne. Końcowy wynik dla każdej kategorii wyrażony został jako procent pola powierzchni badanych preparatów o danej intensywności zabarwienia. A. reakcja cytoplazmatyczna, średnia \pm odchylenie standardowe; B. reakcja jądrowa, średnia \pm odchylenie standardowe; C. mikrofotografia przedstawiająca przykładowy preparat z grupy badanej charakteryzujący się brakiem wystąpienia reakcji cytoplazmatycznej oraz jądrowej; D. mikrofotografia przedstawiająca przykładowy preparat z grupy kontrolnej charakteryzujący się niewielkim natężeniem reakcji cytoplazmatycznej jądrowej.

Tab. 10 Wynik badania immunohistochemicznego w kierunku ekspresji receptora glikokortykosteroidowego w wątrobie. Do oceny posłużono się skalą IRS wg Remelle.

REAKCJA							
CYTOPLAZMATYCZNA				JĄDROWA			
Grupa badana		Grupa kontrolna		Grupa badana		Grupa kontrolna	
P17Q	-	P19S	-	P17Q	-	P19S	+
P22V	-	P21U	N/A	P22V	-	P21U	N/A
P24Ż	-	P23X	-	P24Ż	-	P23X	-
P26BA	-	P25W	-	P26BA	-	P25W	-
P28BC	-	P27BB	N/A	P28BC	-	P27BB	N/A
P33BH	-	P29BD	-	P33BH	++	P29BD	++
P34BI	-	P31BF	N/A	P34BI	-	P31BF	N/A
P37BL	-	P32BG	-	P37BL	-	P32BG	++
P38BM	-	P35BJ	-	P38BM	-	P35BJ	++
P41BP	-	P36BK	-	P41BP	-	P36BK	-
P42BQ	-	P39BN	-	P42BQ	+	P39BN	-
P45BT	-			P45BT	+		

7.4.4. Analiza ekspresji mRNA wybranych cytokin w wątrobie

Aktywność receptora glikokortykosteroidowego badano poprzez badanie ekspresji wybranych genów, kontrolowanych przez ten receptor - kluczowych cytokin zapalnych: IL-1 β , IL-6, TNF- α oraz TGF- β . Z próbek wątroby od wszystkich osobników wyizolowano RNA, przeprowadzono odwrotną transkrypcję, a następnie reakcję PCR w czasie rzeczywistym. Uzyskane wyniki przedstawiono na Ryc. 20. Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi grupami dla żadnego z analizowanych genów. Uwagę zwraca relatywnie duża ilość przypadków odstających.



Ryc. 20 Względna ekspresja wybranych cytokin zapalnych w wątrobach osobników z grupy kontrolnej i osobników z grupy badanej zmierzona metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wykres ramka - wąsy przedstawia uzyskane wyniki w podziale na grupy. Dane są przedstawione jako mediana \pm kwartyle \pm zakres nieodstających \pm minimum, maksimum. Dodatkowo w celach ilustracyjnych znakiem „X” oznaczono średnią arytmetyczną. Przypadki odstające nie były wyłączone z analizy. A. IL-1 β ; B. IL-6; C. TNF- α ; D. TGF- β .

8. DYSKUSJA

Sepsa jest ciężką, ogólnoustrojową chorobą, która stwarza wiele trudności diagnostycznych oraz terapeutycznych i wiąże się z niepewnym rokowaniem. O ile w krajach z wysokim wskaźnikiem rozwoju społecznego prowadzi się dokładną ewidencję przypadków i zgonów oraz dostępne są zaawansowane terapie, to w krajach rozwijających się sytuacja jest znacznie gorsza i skala problemu jest prawdopodobnie niedoszacowana⁴⁴. Etiopatogeneza wstrząsu septycznego oraz jego leczenie od dziesiątek lat stanowią przedmiot zainteresowania lekarzy klinicyistów, farmakologów i innych specjalistów, zajmujących się szeroko pojętą medycyną. Na przestrzeni lat badano wiele potencjalnych terapii, jednak nie znaleziono uniwersalnego i skutecznego lekarstwa. Obiecujące wyniki badań przedklinicznych wielokrotnie nie znajdowały potwierdzenia w praktyce klinicznej⁹⁴. Współcześnie postuluje się zwiększenie znaczenia indywidualizacji w podejściu do leczenia oraz stratyfikację pacjentów septycznych według stanu ich systemu odpornościowego, co umożliwi w przyszłości podejmowanie decyzji o zastosowaniu różnych wariantów terapii skojarzonych i adjuwantowych, stanowiących obiecującą perspektywę przyszłych badań klinicznych⁹⁴. W rozprawie przedstawiono wyniki uzyskane podczas badania przedklinicznego, oceniającego skuteczność terapii kombinowanej – wziewnego tlenu azotu połączonego z dożylnym podawaniem hydrokortyzonu w przebiegu wstrząsu endotoksycznego. Celem przeprowadzonych badań była ocena, jak zastosowana terapia kombinowana wpływa na liczbę i wewnątrzkomórkową lokalizację receptora glikokortykosteroidowego w narządach, w których dochodzi do ciężkiej niewydolności w przebiegu sepsy – w płucach, wątrobie i nerkach. Wykazano, że świńskim modelu wstrząsu endotoksycznego w płucach, wątrobie i nerkach zarówno ekspresja, jak i wewnątrzkomórkowa lokalizacja receptora glikokortykosteroidowego nie zmienia się po zastosowaniu terapii kombinowanej w porównaniu do standardowej terapii.

Ze względu na powszechną ekspresję receptora glikokortykosteroidowego w tkankach organizmu i wpływ tego receptora na ekspresję tysięcy genów oś podwzgórzowo-prysadkowo-nadnerczowa (HPA) stanowi jeden z kluczowych mechanizmów adaptacyjnych i moduluje wiele procesów w organizmie, a poprzez mechanizm wielostopniowego sprzężenia zwrotnego ma bezpośredni wpływ na

dynamikę uwalniania kortyzolu⁷⁰. Wykazano, że aktywacja osi HPA jest kluczowa dla przeżycia sepsy⁴⁴, zaś z drugiej strony nadekspresja receptora glikokortykosteroidowego (transgeniczne myszy) ogranicza stan zapalny i zwiększa przeżywalność po wstrząsie endotoksycznym indukowanym podaniem LPS¹⁰⁰. Dlatego zastosowanie glikokortykosteroidów w procesie leczenia sepsy wydaje się dobrym pomysłem, ponieważ jednak wnioski z dotychczas przeprowadzonych badań klinicznych są sprzeczne⁴⁴, wg. najnowszych zaleceń dotyczących leczenia sepsy można rozważyć dożylną podaż kortykosteroidów u pacjentów we wstrząsie endotoksycznym wymagających terapii wazopresyjnej w dawce 200 mg hydrokortyzonu na dobę⁴¹. Prawdopodobną przyczyną tych problemów jest fakt, że u większości pacjentów w przebiegu sepsy pojawiają się odwracalne zaburzenia osi HPA, od roku 2008 określane jako niedoczynność kory nadnerczy związana z ciężkim stanem klinicznym (CIRCI - ang. Critical Illness-Related Corticosteroid Insufficiency)⁷⁷. Obok dysfunkcji elementów osi HPA, do CIRCI może przyczyniać się tzw. oporność na glikokortykosteroidy, która powoduje, że tkanki peryferyjne nie odpowiadają we właściwy sposób na sygnał płynący od osi HPA⁷⁷. Za rozwój oporności na glikokortykosteroidy prawdopodobnie może być odpowiedzialny niższy poziom ekspresji receptora glikokortykosteroidowego u pacjentów z sepsą⁴⁴, jak również obniżona zdolność do wiązania ligandu przez receptor glikokortykosteroidowy (wpływ endotoksyn)¹⁰¹, co upośledza transport receptora do jądra komórkowego, a co za tym idzie odpowiedź komórki na sygnał płynący z pobudzonej osi HPA⁴⁴. Stąd duże nadzieje pokłada się w tzw. terapii kombinowanej, gdzie razem z glikokortykosteroidem używa się dodatkowego czynnika, tak aby w efekcie uniknąć rozwoju oporności na glikokortykosteroidy i skorzystać z ich potencjału leczniczego⁴⁴. Przykładem takiej terapii kombinowanej jest połączenie hydrokortyzonu z NO, zastosowane w świńskim modelu wstrząsu septycznego indukowanego endotoksyną⁴³. Autorzy tej publikacji wykazali, że terapia, polegająca na jednoczesnym podawaniu hydrokortyzonu w dawce 3.5 mg/kg oraz wziewnej podaży tlenu azotu (30 ppm), spowodowała zahamowanie odpowiedzi zapalnej i ograniczenie zmian histopatologicznych, typowych dla sepsy, obserwowanych w płucach, nerkach i wątrobach. Jednocześnie, w tej samej grupie zwierząt, stosując barwienie immunohistochemiczne, wykazano nasiloną ekspresję receptora glikokortykosteroidowego w płucach, nerkach i wątrobie. Należy podkreślić, że jest to jedyna dostępna publikacja opisująca ekspresję receptora glikokortykosteroidowego

w świńskim modelu wstrząsu septycznego indukowanego endotoksyną po zastosowaniu terapii kombinowanej hydrokortyzonem i wziewnym NO. Przedstawione w rozprawie wyniki wskazują, że w świńskim modelu wstrząsu septycznego indukowanego endotoksyną, stworzonym przez prof. C. Frostella i współpracowników^{95,96}, po zastosowaniu terapii kombinowanej hydrokortyzonem i wziewnym NO nie stwierdzono zmian w ekspresji i lokalizacji receptora glikokortykosteroidowego w płucach, nerkach i wątrobie. Da i współpracownicy⁴³ preparaty immunohistochemiczne oceniali jedynie metodą manualną (koncentrując się na ocenie liczności komórek pozytywnie wybarwionych), natomiast w rozprawie obok metody manualnej, w której posłużono się skalą IRS wg Remelle⁹⁷, do oceny natężenia reakcji cytoplazmatycznej i jądrowej wykorzystano również program ImageJ. Obydwie metody analizy nie wykazały istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami zwierząt. Co więcej analogiczne rezultaty uzyskano po przeprowadzeniu subfrakcjonowania komórkowego w homogenatach uzyskanych z badanych narządów, analizowanych techniką Western blot. Analiza ilości receptora glikokortykosteroidowego w pełnym homogenacie tkankowym metodą Western blot również nie wykazała różnic pomiędzy grupami. Do rozbieżności w końcowych wnioskach w ocenie ekspresji receptora glikokortykosteroidowego mógł się przyczynić fakt, że metodologia i czas trwania eksperymentu były różne, Da i współpracownicy⁴³ wstrząs endotoksyczny uzyskali poprzez trwający sześć godzin wlew LPS — przez pierwsze 2,5 godziny substancję podawano w dawce 25 µg/kg/godz., zaś przez pozostałe 3,5 godziny w dawce 5 µg/kg/godz., po czym (po 6 godz.) eksperyment zakończono. W modelu, nad którym pracowano w rozprawie, podawano LPS w tempie 2,5 µg/kg/godz. przez pierwsze 1,5 godziny, natomiast przez kolejne 8,5 godziny w tempie 0,5 µg/kg/godz., a następnie kontynuowano eksperyment przez kolejne 10 godzin. Taki sposób przeprowadzenia eksperymentu jest bliższy realiom klinicznym, w porównaniu do 6 godzin zastosowanych przez Da i współpracowników⁴³. Zazwyczaj pacjenci nie rozpoczynają kompleksowego leczenia tak szybko a rozwinięcie pełnego spektrum wstrząsu septycznego może wymagać dłuższego czasu.

Dłuższy czas pomiędzy zakończeniem wlewu endotoksyny a eutanazją (10 godzin) pozwolił na ocenę długoterminowych efektów kombinowanej terapii. Zmiany histopatologiczne obserwowane w badanych narządach (płuca, nerki, wątroba) były typowe dla przebiegu sepsy u ludzi^{102,103}. W preparatach z płuc odnotowano cechy

obrzęku płuc, nacieki zapalne i zastój krwi. W grupie zwierząt poddanych terapii kombinowanej stwierdzono mniejsze nasilenie nacieków zapalnych w porównaniu z grupą kontrolną. Szereg zmian obserwowano także w wątrobie (hepatoliza, wakuolizacja hepatocytów, nacieki zapalne, cechy zastoju krwi) oraz nerkach (zaburzenia w obrębie kłębuszków nerkowych, nacieki zapalne i obraz kanalików, wskazujący na nasiloną diurezę), przy czym nie stwierdzono różnic pomiędzy grupami. Z przeprowadzonych badań histopatologicznych wynika, że jedyne różnice, wskazujące na możliwe działanie przeciwzapalne terapii kombinowanej, pojawiły się w płucach. Ten lokalny efekt można wynikać z faktu, że tlenek azotu podawany był w formie wziewnej i płuca były organem, w obrębie którego mógł działać bezpośrednio.

Tak jak wspomniano wyżej, oprócz badań immunohistochemicznych przeprowadzono analizę ilości i lokalizacji receptora glikokortykosteroidowego za pomocą metody Western blot. We wszystkich preparatach, zarówno pełnych homogenatach, jak i po przeprowadzeniu subfrakcjonowania komórkowego w celu uzyskania frakcji białek cytoplazmatycznych i frakcji białek związanych z chromatyną stwierdzono obecność więcej niż jednego prążka. Prążek o najwyższej masie cząsteczkowej (około 100 kDa) to receptor glikokortykosteroidowy, natomiast prążek o wielkości około 85 kDa to najprawdopodobniej produkt proteolizy badanego receptora. Receptor glikokortykosteroidowy jest niezwykle labilny w warunkach *in vitro*, m. in. z powodu podatności na działanie różnorodnych proteaz, m.in. proteaz serynowych, cysteinowych oraz elastaz^{104,105}, i mimo zastosowania mieszaniny inhibitorów podczas przygotowywania preparatów najprawdopodobniej nastąpił proces trawienia receptora. Dla pewności przeprowadzono analizę densytometryczną obu prążków, która dała analogiczne wyniki. Terapia kombinowana polegająca na jednoczesnym podawaniu hydrokortyzonu oraz wziewnej podaży tlenu azotu nie spowodowała spodziewanego wzrostu ilości receptora glikokortykosteroidowego w badanych narządach, pozostał on na podobnym poziomie jak u zwierząt we wstrząsie endotoksycznym poddanych standardowej terapii. Nie wpłynęła również na wewnątrzkomórkową lokalizację receptora glikokortykosteroidowego, ilość receptora w cytoplazmie i jądrze komórkowym nie różniła się pomiędzy badanymi grupami. Oznaczałoby to, że zastosowana terapia kombinowana (niska dożylna dawka hydrokortyzonu i wziewny tlenek azotu) nie przyczyniła się do degradacji receptora

glikokortykosteroidowego, jak również nie zahamowała jego zdolności do wiązania ligandów (glikokortykosteroidów) i przemieszczania się do jądra komórkowego.

Dopełnieniem przeprowadzonych badań było sprawdzenie ekspresji genów, które regulowane są przez receptor glikokortykosteroidowy. Receptor ten wpływa na ekspresję bardzo wielu genów, wśród nich znajdują się kluczowe cytokiny prozapalne, takie jak IL-1 β , IL-6, TNF- α oraz TGF- β . Powstające z tych transkryptów białka mają bezpośredni związek z nasileniem reakcji zapalnej oraz przebiegiem procesu leczenia. W żadnym z badanych organów nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi grupami w zakresie ekspresji analizowanych genów. Taki wynik jest zgodny z tym, że nie zaobserwowano różnic w ilości i wewnątrzkomórkowej lokalizacji receptora glikokortykosteroidowego w badanych organach, co przełożyło się na podobny poziom ekspresji genów, regulowanych przez ten receptor. Na podstawie tych wyników można wnioskować, że w badanym modelu wstrząsu septycznego indukowanego endotoksyną u zwierząt poddanych kombinowanej terapii nie rozwinęła się oporność na glikokortykosteroidy.

Podczas przeprowadzania eksperymentu zauważono, że zwierzęta z grupy poddanej terapii kombinowanej znajdowały się w nieco lepszej kondycji klinicznej od zwierząt z grupy kontrolnej, co znalazło odzwierciedlenie w lepszych wartościach ciśnienia w tętnicy płucnej w czwartej i ósmej godzinie trwania wlewu endotoksyny (lokalny efekt wazodylatacyjny tlenu azotu w krążeniu płucnym). Ponieważ zwierzęta w niejednorodny sposób reagowały na infuzję endotoksyny, utrzymanie ich w doświadczeniu wymagało terapii o różnym stopniu intensywności. Było to spowodowane tym, że osiągnięcie minimalnych wartości parametrów, takich jak saturacja, ciśnienie tętnicze krwi, częstość pracy serca, końcowo-wydechowe stężenie dwutlenku węgla, zwiększających prawdopodobieństwo pomyślnego ukończenia doświadczenia, wymagało stosowania różnych parametrów wentylacji, objętości bolusów płynów oraz różnych dawek norepinefryny. Zarówno niejednakowa reakcja zwierząt na endotoksynę, jak i konieczne modyfikacje leczenia, mogły mieć wpływ na duży rozrzut uzyskanych wyników. Do eksperymentu nie wprowadzono dodatkowych grup kontrolnych, wychodząc z założenia, że dostępne dane literaturowe jednoznacznie wskazują, że terapia kombinowana – wziewny tlenek azotu połączony z wlewem kortykosteroidu wykazują najbardziej obiecujące działania terapeutyczne^{43,95,96}. Pozwoliło to na ograniczenie liczby zwierząt, użytych

w doświadczenie, zgodnie z zaleceniami, związanymi z ochroną zwierząt (zasada 3R - Replacement, Reduction, and Refinement, czyli zastępowanie, zmniejszenie, udoskonalanie).

Podsumowując, w rozprawie wykazano, że 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.

Główne wnioski:

1. Wziewnie podawany tlenek azotu połączony z małymi dawkami hydrokortyzonu w świńskim modelu wstrząsu endotoksycznego nie zmienia ekspresji receptora glikokortykosteroidowego na poziomie białka w płucach oraz w wątrobie i nerkach.
2. Pod wpływem działania tlenu azotu połączonego z małymi dawkami kortyzonu nie następuje nasilona aktywacja receptora glikokortykosteroidowego (zwiększony transport do jądra komórkowego), co potwierdzono dwiema technikami, opartymi o wykrywanie białka (Western blot i immunohistochemia) oraz analizą ekspresji genów, regulowanych przez ten receptor, zarówno w płucach, jak i w nerkach i wątrobie.
3. Zmiany histopatologiczne obserwowane w badanych narządach w obu grupach zwierząt były charakterystyczne dla wstrząsu endotoksycznego, jedynie w płucach świń poddanych terapii kombinowanej stwierdzono mniej nacieków zapalnych w porównaniu z grupą kontrolną.

9. Spis rycin

Ryc. 1 Schematyczne ujęcie sepsy obrazujące procesy patofizjologiczne i typy komórek zaangażowane w proces. str. 11

Ryc. 2 Wziewnie podawany tlenek azotu odwraca hipoksemię i nadciśnienie płucne w przebiegu wazokonstrykcji hipoksemicznej. Prowadzi to do zwiększonego natlenowania krwi. str. 18

Ryc. 3 Mikrofotografie obrazujące wybrane zmiany histopatologiczne stwierdzone podczas badania nerek str. 41

Ryc. 4 Względna ekspresja receptora glikokortykosteroidowego względem białka referencyjnego- dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego oznaczona metodą Western blot w homogenacie nerek. str. 42

Ryc. 5 Względna ekspresja receptora glikokortykosteroidowego względem białka referencyjnego- dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego oznaczona metodą Western blot we frakcji cytoplazmatycznej homogenatu nerek. str. 43

Ryc. 6 Względna ekspresja receptora glikokortykosteroidowego względem białka referencyjnego- histonu H3 oznaczona metodą Western blot we frakcji białek związanych z chromatyną homogenatu nerek. str. 44

Ryc. 7 Wynik badania immunohistochemicznego w kierunku ekspresji receptora glikokortykosteroidowego w nerkach. str. 45

Ryc. 8 Względna ekspresja mRNA wybranych cytokin zapalnych w homogenatach nerki. str. 47

Ryc. 9 Mikrofotografie spod mikroskopu optycznego preparatów płuc barwionych metodą HE. str. 48

Ryc. 10 Względna ekspresja receptora glikokortykosteroidowego względem białka referencyjnego- dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego oznaczona metodą Western blot w homogenacie płuc. str. 49

Ryc. 11 Względna ekspresja receptora glikokortykosteroidowego względem białka referencyjnego- dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego oznaczona metodą Western blot we frakcji białek cytoplazmatycznych z płuc. str. 50

Ryc. 12 Względna ekspresja receptora glikokortykosteroidowego względem białka referencyjnego- histonu H3 oznaczona metodą Western blot we frakcji białek jądrowych związanych z chromatyną z płuc. str. 51

Ryc. 13 Wynik badania immunohistochemicznego w kierunku ekspresji receptora glikokortykosteroidowego w płucach. str. 53

Ryc. 14 Względna ekspresja mRNA wybranych cytokin zapalnych w płucach. str. 54

Ryc. 15 Mikrofotografie obrazujące wybrane zmiany histopatologiczne stwierdzone podczas badania wątroby. str. 55

Ryc. 16 Względna ekspresja receptora glikokortykosteroidowego względem białka referencyjnego- dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego oznaczona metodą Western blot w homogenacie wątroby. str. 56

Ryc. 17 Względna ekspresja receptora glikokortykosteroidowego względem białka referencyjnego- dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego oznaczona metodą Western blot we frakcji białek cytoplazmatycznych z wątroby. str. 57

Ryc. 18 Względna ekspresja receptora glikokortykosteroidowego względem białka referencyjnego- histonu H3 oznaczona metodą Western blot we frakcji białek jądrowych związanych z chromatyną z wątroby. str. 58

Ryc. 19 Wynik badania immunohistochemicznego w kierunku ekspresji receptora glikokortykosteroidowego w wątrobie. str. 59

Ryc. 20 Względna ekspresja mRNA wybranych cytokin zapalnych w wątrobie. str. 61

10. Spis tabel

Tab. 1 Wykaz skrótów użytych w tekście str. 5

Tab. 2 Kryteria oceny mikroskopowej preparatów immunohistochemicznych str. 32

Tab. 3 Startery zastosowane w ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Str. 34

Tab. 4 Odczynniki wykorzystane podczas realizacji części laboratoryjnej badania str. 34

Tab. 5 Wykaz aparatury wykorzystanej do przeprowadzenia badań str. 36

Tab. 6 Wykaz roztworów przygotowywanych samodzielnie wykorzystywanych w badaniach laboratoryjnych str. 37

Tab. 7 Wskaźniki wstrząsu wywołanego przez wlew lipopolisacharydu str. 39

Tab. 8 Wynik badania immunohistochemicznego w kierunku ekspresji receptora glikokortykosteroidowego w nerkach str. 46

Tab. 9 Wynik badania immunohistochemicznego w kierunku ekspresji receptora glikokortykosteroidowego w płucach str. 52

Tab. 10 Wynik badania immunohistochemicznego w kierunku ekspresji receptora glikokortykosteroidowego w wątrobie str. 60

11. Bibliografia

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA - J Am Med Assoc.* 2016;315(8):801-810. doi:10.1001/jama.2016.0287
2. Ford H, Systems H, Re- CW. The Ne w E n g l a n d Jour n a l o f Me d i c i n e EARLY GOAL-DIRECTED THERAPY IN THE TREATMENT OF SEVERE SEPSIS AND SEPTIC SHOCK. 2001;345(19):1368-1377.
3. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 2020;395(10219):200-211. doi:10.1016/S0140-6736(19)32989-7
4. Vincent JL, Jones G, David S, Olariu E, Cadwell KK. Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America : a systematic review and meta-analysis. *Crit Care.* 2019;23(1):1-11. doi:10.1186/s13054-019-2478-6
5. Niederman MS, Baron RM, Bouadma L, et al. Initial antimicrobial management of sepsis. *Crit Care.* 2021;25(1):1-11. doi:10.1186/s13054-021-03736-w
6. Rangel Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The Natural History of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS): A Prospective Study. *JAMA J Am Med Assoc.* 1995;273(2):117-123. doi:10.1001/jama.1995.03520260039030
7. Llewelyn MJ, Cohen J. Tracking the Microbes in Sepsis : Advancements in Treatment Bring Challenges for Microbial Epidemiology. *Clin Infect Dis.* 2007;44(10):1343-1348. doi:10.1086/515403
8. Miao H, Chen S, Ding R. Evaluation of the Molecular Mechanisms of Sepsis Using Proteomics. *Front Immunol.* 2021;12(October):1-18. doi:10.3389/fimmu.2021.733537
9. Behzadi P, García-Perdomo HA, Karpiński TM. Toll-Like Receptors: General Molecular and Structural Biology. *J Immunol Res.* 2021;2021. doi:10.1155/2021/9914854
10. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Prim.* 2016;2. doi:10.1038/nrdp.2016.45
11. Rubio I, Osuchowski MF, Shankar-Hari M, et al. Current gaps in sepsis immunology: new opportunities for translational research. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(12):e422-e436. doi:10.1016/S1473-3099(19)30567-5
12. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1 +CD11b+ population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med.* 2007;204(6):1463-1474. doi:10.1084/jem.20062602
13. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Blériot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest.* 1991;88(5):1747-1754. doi:10.1172/JCI115493

14. Hotchkiss RS. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2014;13(12):862-874. doi:10.1038/nri3552.Sepsis-induced
15. Lonsdale DO, Shah R V., Lipman J. Infection , Sepsis and the Inflammatory Response : Mechanisms and Therapy. *Front Med.* 2020;7(December):10-15. doi:10.3389/fmed.2020.588863
16. Jiang L, Yao Y, Sheng Z. The Role of Regulatory T Cells in the Pathogenesis. 2012;32(8). doi:10.1089/jir.2011.0080
17. Gao Y, Yao Y, Zhang X, Chen F, Meng X, Chen X. Regulatory T Cells : Angels or Demons in the Pathophysiology of Sepsis ? 2022;13(February). doi:10.3389/fimmu.2022.829210
18. O'Brien M. The Reciprocal Relationship Between Inflammation and Coagulation. *Top Companion Anim Med.* 2012;27(2):46-52. doi:10.1053/j.tcam.2012.06.003
19. Camerer E, Kolstø AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res.* 1996;81(1):1-41. doi:10.1016/0049-3848(95)00209-X
20. Van Hinsbergh VWM. Endothelium - Role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol.* 2012;34(1):93-106. doi:10.1007/s00281-011-0285-5
21. Nakamura S, Imamura T, Okamoto K. Tissue factor in neutrophils: Yes. *J Thromb Haemost.* 2004;2(2):214-217. doi:10.1111/j.1538-7836.2004.00548.x
22. Tang H, Ivanciu L, Popescu N, et al. Sepsis-induced coagulation in the baboon lung is associated with decreased tissue factor pathway inhibitor. *Am J Pathol.* 2007;171(3):1066-1077. doi:10.2353/ajpath.2007.070104
23. Gando S, Otomo Y. Local hemostasis, immunothrombosis, and systemic disseminated intravascular coagulation in trauma and traumatic shock. *Crit Care.* 2015;19(1):1-11. doi:10.1186/s13054-015-0735-x
24. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(36):15880-15885. doi:10.1073/pnas.1005743107
25. Cheng Z, Abrams ST, Alhamdi Y, et al. Circulating Histones Are Major Mediators of Multiple Organ Dysfunction Syndrome in Acute Critical Illnesses. *Crit Care Med.* 2019;47(8):E677-E684. doi:10.1097/CCM.0000000000003839
26. Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med.* 2009;15(11):1318-1321. doi:10.1038/nm.2053
27. Semeraro N, Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M. Coagulopathy of Acute Sepsis. *Semin Thromb Hemost.* 2015;41(6):650-658. doi:10.1055/s-0035-1556730
28. Kulp A, Kuehn MJ. Biological Functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol.* 2010;64:163-184. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073413

29. Molinaro A, Holst O, Lorenzo F Di, et al. Chemistry of lipid a: At the heart of innate immunity. *Chem - A Eur J*. 2015;21(2):500-519. doi:10.1002/chem.201403923
30. Caroff M, Novikov A. Lipopolysaccharides: structure, function and bacterial identification. *Oilseeds fats, Crop Lipids*. 2020;27:0-9.
31. Jarczак D, Kluge S, Nierhaus A. Sepsis — Pathophysiology and Therapeutic Concepts. 2021;8(May):1-22. doi:10.3389/fmed.2021.628302
32. Sato R, Nasu M. A review of sepsis-induced cardiomyopathy. *J Intensive Care*. 2015;3(1):1-7. doi:10.1186/s40560-015-0112-5
33. Kell DB, Pretorius E. On the translocation of bacteria and their lipopolysaccharides between blood and peripheral locations in chronic, inflammatory diseases: the central roles of LPS and LPS-induced cell death. *Integr Biol (United Kingdom)*. 2015;7(11):1339-1377. doi:10.1039/c5ib00158g
34. Vincent JL. The Clinical Challenge of Sepsis Identification and Monitoring. *PLoS Med*. 2016;13(5):1-10. doi:10.1371/journal.pmed.1002022
35. Garnacho-Montero J, Gutiérrez-Pizarra A, Escoresca-Ortega A, Fernández-Delgado E, López-Sánchez JM. Adequate antibiotic therapy prior to ICU admission in patients with severe sepsis and septic shock reduces hospital mortality. *Crit Care*. 2015;19(1):1-8. doi:10.1186/s13054-015-1000-z
36. Rochweg B, Alhazzani W, Sindi A, et al. Fluid resuscitation in sepsis: A systematic review and network meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2014;161(5):347-355. doi:10.7326/M14-0178
37. williams, B J. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav*. 2019;176(3):139-148. doi:10.1097/CCM.0000000000003960.Evaluation
38. Schortgen F, Lacherade JC, Bruneel F, et al. Effects of hydroxyethylstarch and gelatin on renal function in severe sepsis: A multicentre randomised study. *Lancet*. 2001;357(9260):911-916. doi:10.1016/S0140-6736(00)04211-2
39. Delaney A, Finnis M, Bellomo R, et al. Initiation of vasopressor infusions via peripheral versus central access in patients with early septic shock: A retrospective cohort study. *EMA - Emerg Med Australas*. 2020;32(2):210-219. doi:10.1111/1742-6723.13394
40. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Executive Summary: Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for the Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Crit Care Med*. 2021;49(11):1974-1982. doi:10.1097/CCM.0000000000005357
41. Ji W, Meng Y, Bo L, Wan X, Deng X. *Interpretation of Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for the Management of Sepsis and Septic Shock 2021*. Vol 41.; 2021. doi:10.3760/cma.j.cn131073.20211210.01201
42. Sundar S. Treating sepsis in dying patients is futile. *BMJ*. 2019;367(December):6706. doi:10.1136/bmj.l6706
43. Da J, Chen L, Hedenstierna G. Nitric oxide up-regulates the glucocorticoid receptor and blunts the inflammatory reaction in porcine endotoxin sepsis. *Crit*

- Care Med.* 2007;35(1):26-32. doi:10.1097/01.CCM.0000250319.91575.BB
44. Vandewalle J, Libert C. Glucocorticoids in Sepsis: To Be or Not to Be. *Front Immunol.* 2020;11(July):1-14. doi:10.3389/fimmu.2020.01318
 45. Signori D, Magliocca A, Hayashida K, et al. Inhaled nitric oxide: role in the pathophysiology of cardio-cerebrovascular and respiratory diseases. *Intensive Care Med Exp.* 2022;10(1). doi:10.1186/s40635-022-00455-6
 46. Bazsó A, Szappanos Á, Patócs A, Poór G, Shoenfeld Y, Kiss E. The importance of glucocorticoid receptors in systemic lupus erythematosis. A systematic review. *Autoimmun Rev.* 2015;14(4):349-351. doi:10.1016/j.autrev.2014.12.007
 47. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327(6122):524-526. doi:10.1038/327524a0
 48. Lundberg JO, Weitzberg E. Nitric oxide signaling in health and disease. *Cell.* 2022;185(16):2853-2878. doi:10.1016/j.cell.2022.06.010
 49. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001;357(3):593-615. doi:10.1042/0264-6021:3570593
 50. Gantner BN, LaFond KM, Bonini MG. Nitric oxide in cellular adaptation and disease. *Redox Biol.* 2020;34(April):101550. doi:10.1016/j.redox.2020.101550
 51. Lancaster JR. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide - Biol Chem.* 1997;1(1):18-30. doi:10.1006/niox.1996.0112
 52. Ahmad A, Dempsey SK, Daneva Z, et al. Role of nitric oxide in the cardiovascular and renal systems. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9). doi:10.3390/ijms19092605
 53. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response - Nature Immunology. *Nat Immunol.* 2001;2(10):907-916. <http://www.nature.com/ni/journal/v2/n10/abs/ni1001-907.html%0Apapers3://publication/uuid/07B0E5D9-42E7-4B68-A95C-E820803D435F>
 54. Förstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1995;352(4):351-364. doi:10.1007/BF00172772
 55. Miller MR, Megson IL. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol.* 2007;151(3):305-321. doi:10.1038/sj.bjp.0707224
 56. Barnes M, Brisbois EJ. Clinical use of inhaled nitric oxide: Local and systemic applications. *Free Radic Biol Med.* 2020;152(August 2019):422-431. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.029
 57. Ignarro LJ, Napoli C, Loscalzo J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: An overview. *Circ Res.* 2002;90(1):21-28. doi:10.1161/hh0102.102330
 58. Akaberi D, Krambrich J, Ling J, et al. Mitigation of the replication of SARS-CoV-

- 2 by nitric oxide in vitro. *Redox Biol.* 2020;37. doi:10.1016/j.redox.2020.101734
59. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med.* 2005;26(1-2 SPEC. ISS.):3-31. doi:10.1016/j.mam.2004.09.002
60. Dong BM, Abano JB, Egan TM. Nitric oxide ventilation of rat lungs from non-heart-beating donors improves posttransplant function. *Am J Transplant.* 2009;9(12):2707-2715. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02840.x
61. Weinberger B, Laskin DL, Heck DE, Laskin JD. The toxicology of inhaled nitric oxide. *Toxicol Sci.* 2001;59(1):5-16. doi:10.1093/toxsci/59.1.5
62. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(7):3030-3034. doi:10.1073/pnas.89.7.3030
63. Hallman M, Waffarn F, Bry K, et al. Surfactant dysfunction after inhalation of nitric oxide. *J Appl Physiol.* 1996;80(6):2026-2034. doi:10.1152/jappl.1996.80.6.2026
64. Trzeciak S, Dellinger RP, Parrillo JE, et al. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: Relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Ann Emerg Med.* 2007;49(1). doi:10.1016/j.annemergmed.2006.08.021
65. Trzeciak S, Cinel I, Dellinger RP, et al. Resuscitating the microcirculation in sepsis: The central role of nitric oxide, emerging concepts for novel therapies, and challenges for clinical trials. *Acad Emerg Med.* 2008;15(5):399-413. doi:10.1111/j.1553-2712.2008.00109.x
66. Goździk W, Goździk A. Inhaled nitric oxide effects outside the lungs - Experimental and clinical evidence. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Pol.* 2012;9(4):456-462. doi:10.5114/kitp.2012.32684
67. Goździk W, Goździk A. Inhaled nitric oxide effects outside the lungs - Proven and possible mechanisms. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Pol.* 2012;9(3):352-356. doi:10.5114/kitp.2012.30848
68. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(2):156-167. doi:10.1038/nrd2466
69. Talabér G, Jondal M, Okret S. Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: Immune regulation and aspects on local organ homeostasis. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;380(1-2):89-98. doi:10.1016/j.mce.2013.05.007
70. Spiga F, Walker JJ, Terry JR, Lightman SL. HPA axis-rhythms. *Compr Physiol.* 2014;4(3):1273-1298. doi:10.1002/cphy.c140003
71. Dallman MF, Akana SF, Cascio CS, Darlington DN, Jacobson L, Levin N. *Regulation of ACTH Secretion: Variations on a Theme of B.* Vol 43. ACADEMIC PRESS, INC.; 1987. doi:10.1016/b978-0-12-571143-2.50010-1
72. Jones MT, Hillhouse EW, Burden JL. DYNAMICS AND MECHANICS OF CORTICOSTEROID (Received. *J Endocrinol.* 1976;73:405-417.
73. Ronchetti S, Migliorati G, Bruscoli S, Riccardi C. Defining the role of

- glucocorticoids in inflammation. *Clin Sci*. 2018;132(14):1529-1543. doi:10.1042/CS20171505
74. Busillo JM, Cidlowski JA. The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: Ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24(3):109-119. doi:10.1016/j.tem.2012.11.005
 75. Elia I, Schmieler R, Christen S, Fendt S-M. Organ-Specific Cancer Metabolism and Its Potential for Therapy Ilaria: Adipokines and the Endocrine Role of Adipose Tissues. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;(January):251-263. doi:10.1007/164
 76. Marik PE. "Vitamin S" (Steroids) and Vitamin C for the treatment of severe sepsis and septic shock! *Crit Care Med*. 2016;44(6):1228-1229. doi:10.1097/CCM.0000000000001684
 77. Annane D, Pastores SM, Arlt W, et al. Critical illness-related corticosteroid insufficiency (CIRCI): a narrative review from a Multispecialty Task Force of the Society of Critical Care Medicine (SCCM) and the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Intensive Care Med*. 2017;43(12):1781-1792. doi:10.1007/s00134-017-4914-x
 78. Tübingen GASHLG and I of TMU of T. Hydrocortisone Therapy for Patients with Septic Shock New England Journal. *N Engl J Med*. 2011;365:687-696.
 79. Djillali Annane, MD, PhD Ve´ronique Se´bille, PhD Claire Charpentier, MD Pierre-Edouard Bollaert, MD, PhD Bruno Francois, MD Jean-Michel Korach, MD Gilles Capellier, MD, PhD Yves Cohen, MD, PhD Elie Azoulay, MD Gilles Troche´, MD Philippe Chaumet-Riffaut MEB. Effect of low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in pts with septic shock. [steroids] - SEE 5972. *J Am Med Assoc*. 2002;288(7):862.
 80. Schumer W. Steroids in the Treatment of Clinical Septic Shock. *Ann Sugery*. 1976;184(3):333-340.
 81. Minneci PC, Deans KJ, Eichacker PQ, Natanson C. The effects of steroids during sepsis depend on dose and severity of illness: An updated meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(4):308-318. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02752.x
 82. Timmermans S, Vandewalle J, Libert C. Dimerization of the Glucocorticoid Receptor and Its Importance in (Patho)physiology: A Primer. *Cells*. 2022;11(4). doi:10.3390/cells11040683
 83. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. *Cushing's Syndrome*. Vol 367.; 2006. www.thelancet.com
 84. Simpson SL. Refresher course for general practitioners: Addison's disease. *Br Med J*. 1950;2(4689):1164-1166. doi:10.1136/bmj.2.4689.1164
 85. Nick ZLU, Cidlowski JA. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1024:102-123. doi:10.1196/annals.1321.008
 86. Timmermans S, Souffriau J, Libert C. A general introduction to glucocorticoid biology. *Front Immunol*. 2019;10(JULY). doi:10.3389/fimmu.2019.01545

87. Vandevyver S, Dejager L, Libert C. On the Trail of the Glucocorticoid Receptor: Into the Nucleus and Back. *Traffic*. 2012;13(3):364-374. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01288.x
88. Weikum ER, Knuesel MT, Ortlund EA, Yamamoto KR. Glucocorticoid receptor control of transcription: Precision and plasticity via allostery. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(3):159-174. doi:10.1038/nrm.2016.152
89. Lim HW, Uhlenhaut NH, Rauch A, et al. Genomic redistribution of GR monomers and dimers mediates transcriptional response to exogenous glucocorticoid in vivo. *Genome Res*. 2015;25(6):836-844. doi:10.1101/gr.188581.114
90. McNally JC, Müller WG, Walker D, Wolford R, Hager GL. The glucocorticoid receptor: Rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science (80-)*. 2000;287(5456):1262-1265. doi:10.1126/science.287.5456.1262
91. Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ, Frazier KS. Swine as Models in Biomedical Research and Toxicology Testing. *Vet Pathol*. 2012;49(2):344-356. doi:10.1177/0300985811402846
92. Perleberg C, Kind A, Schnieke A. Genetically engineered pigs as models for human disease. *DMM Dis Model Mech*. 2018;11(1). doi:10.1242/dmm.030783
93. Ibrahim Z, Busch J, Awwad M, Wagner R, Wells K, Cooper DKC. Selected physiologic compatibilities and incompatibilities between human and porcine organ systems. *Xenotransplantation*. 2006;13(6):488-499. doi:10.1111/j.1399-3089.2006.00346.x
94. Cavaillon J, Singer M, Skirecki T. Sepsis therapies: learning from 30 years of failure of translational research to propose new leads. *EMBO Mol Med*. 2020;12(4):1-24. doi:10.15252/emmm.201810128
95. Göranson SP, Goździk W, Harbut P, et al. Organ dysfunction among piglets treated with inhaled nitric oxide and intravenous hydrocortisone during prolonged endotoxin infusion. *PLoS One*. 2014;9(5):1-7. doi:10.1371/journal.pone.0096594
96. Adamik B, Frostell C, Paslawska U, et al. Platelet dysfunction in a large-animal model of endotoxic shock; effects of inhaled nitric oxide and low-dose steroid. *Nitric Oxide - Biol Chem*. 2021;108(December 2020):20-27. doi:10.1016/j.niox.2020.12.008
97. Remelle W, Stegner H. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*. 1987;8(3):138-140.
98. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC profiler: An open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One*. 2014;9(5). doi:10.1371/journal.pone.0096801
99. Pfaffl M, Horgan G, Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(9).

doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2016.09.026

100. Reichardt HM, Umland T, Bauer A, Kretz O, Schütz G. Mice with an Increased Glucocorticoid Receptor Gene Dosage Show Enhanced Resistance to Stress and Endotoxic Shock. *Mol Cell Biol.* 2000;20(23):9009-9017. doi:10.1128/mcb.20.23.9009-9017.2000
101. Bergquist M, Jirholt P, Nurkkala M, Rylander C, Hedenstierna G, Lindholm C. Glucocorticoid receptor function is decreased in neutrophils during endotoxic shock. *J Infect.* 2014;69(2):113-122. doi:10.1016/j.jinf.2014.03.011
102. Garofalo AM, Lorente-Ros M, Goncalvez G, et al. Histopathological changes of organ dysfunction in sepsis. *Intensive Care Med Exp* . 2019;7(Suppl 1):1-15. doi:10.1186/s40635-019-0236-3
103. Tsokos M. Pathology of Sepsis. *Essentials Autops Pract.* Published online 2006:39-85. doi:10.1007/1-84628-026-5_3
104. Distelhorst C, Janiga K, Howard K, Strandjord S, Campbell E. Neutrophil elastase produces 52-kD and 30-kD glucocorticoid receptor fragments in the cytosol of human leukemia cells. *Blood.* 1987;70(3):860-868. doi:10.1182/blood.v70.3.860.860
105. Hubbard JR, Kalimi M. Influence of proteinase inhibitors on glucocorticoid receptor properties: recent progress and future perspectives. *Mol Cell Biochem.* 1985;66(2):101-109. doi:10.1007/BF00220777