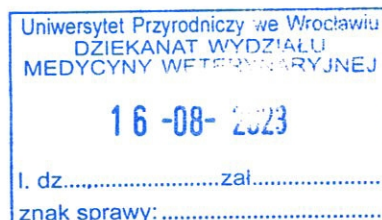


Dr hab. Iwona Taszkun, profesor uczelni
Zakład Diagnostyki Klinicznej i Dermatologii Weterynaryjnej
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin 2023-08-28



Recenzja pracy doktorskiej lek. wet. Michała Rafała Płóciennika pt: Ekspresja receptora glikokortykosteroidowego w tkance płucnej, w nerkach i wątrobie świń ze wstrząsem endotoksycznym indukowanym podaniem lipopolisacharydu z *Escherichia coli* O111:B2

Pracę wykonano w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w ramach Interdyscyplinarnej Szkoły Doktorskiej (Umowa nr POWR.03.0200-00-1008/17). Na przeprowadzenie części doświadczalnej uzyskano zgodę I Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach we Wrocławiu nr 43/2016. Wobec zwierząt stosowano wytyczne Dyrektywy UE 2010/63/UE.

Promotorami pracy są: dr hab. inż. Liliana Kiczak, prof. UPWr z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu i prof. dr hab. Waldemar Goździk z Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Praca liczy 78 stron maszynopisu i ma układ klasyczny. Po stronie tytułowej rozprawy, podziękowaniach Doktoranta kierowanych do wszystkich, dzięki którym rozprawa powstała i spisie treści liczącym 11 rozdziałów, lek. wet. M. R. Płóciennik prezentuje wykaz zastosowanych w pracy skrótów, streszczenie w j. polskim i j. angielskim, rozpoczynając na stronie 10 rozdział: Wstęp.

Doktorant podzielił Wstęp na 9 podrozdziałów, w których zapoznał nas ze współczesnym stanem wiedzy dotyczącym sepsy i wstrząsu septycznego, skupiając się na dwóch zasadniczych punktach: leczenia sepsy i wykorzystania świni domowej jako modelu w translacyjnych badaniach biomedycznych. Wstęp zajął Autorowi 14 stron. W trakcie jego pisania Doktorant posiłkował się 96 publikacjami naukowymi, z czego 11 jest publikowanych przed rokiem 2000, 16 publikowanych po roku 2020.

Sepsa, jak pisze we Wstępie lek. wet. M.R. Płóciennik, jest specyficzną reakcją organizmu na zakażenie. Obecnie definiuje się ją jako zagrażającą życiu dysfunkcję narządową spowodowaną zaburzoną regulacją odpowiedzi ustroju na zakażenie. Jak zdążył się zorientować Recenzent, istnieją kontrowersje odnośnie samej definicji tego stanu chorobowego czy też jego poprawnej polskiej nazwy. W roku 2016 w czasopiśmie JAMA – J Am Med Assoc został opublikowany konsensus dotyczący definicji sepsy, wstrząsu septycznego oraz SIRS (*Systemic Inflammatory Response Syndrom*). Polska Grupa Robocza ds. Sepsy przy Polskim Towarzystwie Anestezjologii i Intensywnej Terapii określenia „sepsa” użyła przy tłumaczeniu aktualnych wytycznych Surviving Sepsis Campaign odnośnie postępowania w sepsie i wstrząsie septycznym. Niezależnie od polemiki akademickiej polskich naukowców dotyczących nomenklatury, sepsa stanowi duży problem medycyny ratunkowej, ponieważ szacuje się, że śmiertelność wewnątrzszpitalna w przypadku

rozwinęcia się wstrząsu septycznego może dochodzić nawet do 60%. Jak słusznie zauważa Doktorant „ W celu poprawy przeżywalności i ograniczenia długofalowych następstw przebycia sepsy konieczne staje się poszukiwanie doskonalszych metod jej leczenia i wczesnego rozpoznawania”.

Mechanizm sepsy jest skomplikowany, wielopłaszczyznowy i zachodzi na poziomie komórkowym oraz tkankowym. Najczęstszą jej przyczyną jest czynnik zakaźny, a najlepiej poznanym patomechanizmem jest mechanizm działania lipopolisacharydu. Lipopolisacharyd (LPS) jest endotoksyną występującą w ścianie komórkowej większości bakterii Gram-ujemnych. Uwalniana jest ona w momencie zniszczenia komórki bakteryjnej, czy to przez naturalne mechanizmy odpornościowe, czy to chemioterapeutyki. Po przedostaniu się do krwiobiegu łączy się ze specjalnymi białkami wiążącymi (LBP). Taki kompleks jest wychwytywany przez receptory CD14 znajdujące się na powierzchni monocytów, makrofagów i neutrofilów oraz receptory wolno krążące w osoczu. Po związaniu kompleksu LBP-lipopolisacharyd z CD14 dochodzi do przekazania sygnału do wnętrza komórki przy pomocy receptorów TLR (w przypadku LPS jest to TLR 2 i 4) oraz białka MD-2. Przekazany sygnał powoduje odłączenie inhibitora od czynnika jądrowego NFκB, który, uaktywniony w ten sposób, wnika do jądra komórkowego i indukuje ekspresję genów kodujących mediatory reakcji zapalnej. W wyniku tego następuje wyrzut cytokin i chemokin prozapalnych takich jak: interleukina 1, interleukina 6, interleukina 12, interleukina 15, interleukina 18 oraz TNF-α. TNF-α jest jednym z głównych mediatorów reakcji septycznej ponieważ stymuluje leukocyty i komórki śródbłonna do wydzielania innych cytokin oraz samego siebie. W efekcie dochodzi do rozwoju uogólnionej reakcji zapalnej, w której biorą udział liczne cytokiny i chemokiny. Dochodzi do zmian na poziomie narządowym, w wyniku których rozwija się ich niewydolność. Jak wskazują dane piśmiennictwa, poziom TNF-α jest wysoki u wszystkich pacjentów z ostrą sepsą. W efekcie dochodzi do rozwoju uogólnionej reakcji zapalnej, w której biorą udział również leukotrieny (silne mediatory niedokrwienia), prostaglandyny (PGE2 i prostacyklina rozszerzają naczynia obwodowe), tromboksany (zwąza naczynia i zwiększa zlepianie się trombocytów), białka ostrej fazy, ICAM, PAF (stymuluje agregację i degranulację neutrofilów oraz wzmacnia zlepianie trombocytów) oraz rodniki tlenowe. Największą rolę w patogenezie sepsy i rozwoju niewydolności narządowej przypisuje się śródbłonkowi, ponieważ po stymulacji mediatorami prozapalnymi, warunkuje on adhezję i migrację leukocytów do okolicznych tkanek. Rezultatem tego jest uszkodzenie zarówno śródbłonna, jak i tkanek. Leukocyty gromadzą się na powierzchni śródbłonna przy pomocy selektyn (selektyny P i E na śródbłonku i selektyny L na limfocytach) po wzbudzeniu przez mediatory prozapalne. Następuje adhezja i rulonizacja, w których uczestniczą cząsteczki adhezji międzykomórkowej (ICAM). Odpowiednio silnie związane ze śródbłonkiem leukocyty migrują następnie do otaczających tkanek, głównie przez ściany żyłek postkapilarnych (w mniejszym stopniu przez włosniczki). Całość procesu prowadzi do uszkodzenia śródbłonna. Cytokiny prozapalne indukują apoptozę komórkową, na którą nakłada się działanie uaktywnionych neutrofilów prowadzące do wytworzenia rodników tlenowych. Do rozwoju niewydolności wielonarządowej w przebiegu sepsy przyczynia się również tlenek azotu(II) (NO), który jest intensywnie wytwarzany przez stymulowaną prozapalnymi cytokinami syntazę tlenkoazotową iNOS. Tlenek azotu wypiera z oksydazy mitochondrialnego cytochromu c (tzw. kompleks IV) tlen. Następuje upośledzenie łańcucha oddechowego i zwiększone powstawanie rodników tlenowych takich jak, m.in., anion nadtlenkowo-azotynowy, który nieodwracalnie uszkadza struktury komórek, prowadząc do ich apoptozy. Jako że w sepsie dochodzi do zaburzeń mitochondrialnych na poziomie różnych tkanek, prowadzi ona do niewydolności wielonarządowej.

Do roku 2016 rozpoznanie sepsy stawiano na podstawie stwierdzenia objawów SIRS. Obecny kryterium rozpoznania sepsy jest nagła zmiana wyniku oceny siedmiu uznanych parametrów w 5-cio stopniowej skali **SOFA** (*Sepsis-related organ failure assessment score*) o co najmniej 2 punkty, jeśli występuje podejrzenie zakażenia. Następnym etapem jest potwierdzenie obecności specyficznego patogenu w badaniach mikrobiologicznych. Nie ma specyficznego markera laboratoryjnego potwierdzającego sepsę. W praktyce stosowane oznaczenia CRP i prokalcytonina (PCT) ze względu na niewystarczającą czułość i swoistość są wykorzystywane jedynie do monitorowania (oceny nasilenia) stanu zapalnego (PCT wykazuje większą skuteczność w monitorowaniu sepsy z towarzyszącą niewydolnością wielonarządową). W wykrywaniu procesu zapalnego i do oceny skuteczności leczenia stosuje się również morfologię z rozmazem i oceną procentowej obecności poszczególnych elementów morfotycznych, OB oraz oznaczanie stężenia interleukiny 6. Dysfunkcję narządową monitoruje się za pośrednictwem badań laboratoryjnych takich jak: gazometria krwi żyłnej i tętniczej, poziom mleczanów w surowicy, ocena parametrów hemostazy, nerkowych (kreatynina, mocznik) czy wątrobowych (AspAT, AlAT, bilirubina). W procesie diagnostycznym dużą rolę odgrywają również badania obrazowe, mające na celu zlokalizowanie ogniska zakażenia. W zależności od przypuszczalnej etiologii wykonuje się RTG płuc, USG (gł. jamy brzusznej), TK i inne.

Leczenie sepsy jest długotrwałe i obarczone dużym ryzykiem niepowodzenia. Powinno się odbywać na oddziałach intensywnej terapii. Stosuje się w nim antybiotykoterapię, płynoterapię, glikokortykosteroidy, leki obkurczające naczynia krwionośne i pobudzające kurczliwość mięśnia sercowego. Współczesna wiedza w dziedzinie etiopatogenezy, zasad diagnostyki i standardów postępowania leczniczego w sepsie jest dobrze znana doktorantowi lek. wet. Michałowi Rafałowi Płóciennikowi, co przedstawił on szczegółowo na stronach rozdziału „Wstęp”.

Kolejne strony Wstępu zawierają opis zwierzęcych modeli sepsy. Doktorant skupił się na świni domowej jako modelu stosowanym w badaniach translacyjnych, który został wykorzystany w jego pracy doświadczalnej. Świnia domowa zajmuje szczególne miejsce jako zwierzę modelowe w badaniach biomedycznych, ponieważ jej genom jest w 94% zbieżny z genomem człowieka (Dzięgieł N i wsp. Postępy Hig Med Dosw, 2018, 72,1032-42). Świnia domowa wykazuje też szereg cech anatomicznych i fizjologicznych niemal identycznych z ludzkimi. Jest zwierzęciem modelowym w transplantologii i łatwym w przeprowadzaniu modyfikacji genowych. Wykazuje identyczne dysfunkcje białek wywołujące w ten sam sposób niektóre choroby ludzi, dlatego jest nieocenionym zwierzęciem w poznawaniu mechanizmów chorób, testowaniu nowych leków i metod leczenia. Doktorant do wywołania sepsy u świni domowej wykorzystał model Frostella opublikowany w 2014, z późniejszymi modyfikacjami, co stawia część doświadczalną pracy na wysokim poziomie.

Lek. wet. M.R. Płóciennik cele pracy doktorskiej zamieścił na stronie 25. Celem Doktoranta było zbadanie ekspresji receptora glikokortykosteroidowego w tkankach (płuca, wątroba i nerki) i ocena jego aktywacji wewnątrzkomórkowej po zastosowaniu skojarzonej terapii przy użyciu kortyzolu i tlenu azotu u świni domowej we wstrząsie endotoksycznym. Pierwszym etapem pracy było przygotowanie świńskiego modelu wstrząsu u zwierząt 16-to tygodniowych i wadze około 27 kg, co zostało opisane szczegółowo w rozdziale: „Materiał i metody” na stronach 26-37. Doświadczalnym świniom domowym podawano dożylnie roztwór LPS dwufazowo w dawkach 2,5 µg/kg/godz przez 1,5 godz. i 0,5 µg/kg/godz przez kolejnych 8,5 godz. a przez kolejne 10 godzin w grupie badanej prowadzono skojarzoną terapię eksperymentalną podając dożylnie od trzeciej godziny trwania wlewu LPS trzykrotnie

hydrokortyzon w dawce 25 mg i wziewnie w sposób ciągły tlenek azotu w stężeniu 30 ppm. Grupę kontrolną zwierząt obserwowano i leczono objawowo. Zwierzęta po doświadczeniu poddano eutanazji. Prezentowany w pracy nowatorski model wstrząsu septycznego wydaje się być bardziej zbliżonym do występującego naturalnie wstrząsu septycznego u ludzi niż wcześniej publikowane, na co wskazują uzyskane przez Doktoranta wyniki badań histologicznych.

Ilość, lokalizację i ekspresję receptora GKS badano w próbkach pobranych narządów tj. nerkach, wątrobie i płucach z wykorzystaniem trzech nowoczesnych metod laboratoryjnych po wykonaniu i ocenie mikroskopowej tradycyjnych preparatów histologicznych. Doktorant wykorzystane w pracy metody badawcze opisał szczegółowo na stronach 29-37. Rozdział elektroforetyczny białek metodą Western blotting umożliwił identyfikację i analizę receptorów GKS (frakcji cytoplazmatycznej i jądrowej) w badanych tkankach względem białka referencyjnego GAPDH o masie 100 i 85 kDa oraz białka 17 kDa odpowiadającemu histonowi H3. Zastosowana metoda immunohistochemiczna badania tkanek z wykorzystaniem przeciwciała anti-GKS firmy Abcam pozwoliła na ocenę stopnia ekspresji receptora GKS w cytoplazmie i jądrze metodą mikroskopową, w której do oceny wyników zastosowano skalę półilościowej IRS wg Remmele. Natomiast metodą real time PCR oceniono poziom ekspresji transkryptu dla genów następujących cytokin; IL-1, IL-6, TNF- α i TGF- β z użyciem odczynników i aparatury firmy Bio-Rad oraz metody pomiaru wg Pfaffla. Podczas realizacji projektu celem analizy uzyskanych wyników zastosowano odpowiednie oprogramowania: Statistica 13.3, Microsoft Excel ImageJ i Image Lab.

Uzyskane wyniki badań Doktorant przedstawił w rozdziale : „Wyniki” na stronach 38-68. Wskaźniki wstrząsu septycznego wywołanego LPS zostały przedstawione w tabeli 7 na stronie 39. Uwzględniają one pomiary 8 parametrów w grupie kontrolnej i badanej zwierząt w 5ciu punktach: wyjściowo i po 4, 8, 12 i 20 godzinach trwania doświadczenia. Na stronach 40-46 przedstawiono uzyskane wyniki badania nerek, na stronach 47-53- płuc, a na stronach 54-60- wątroby. Wyniki opisano i zaprezentowano graficznie w postaci ponumerowanych i opisanych rycin. Ta część pracy jest przedstawiona sumiennie i jednorodnie, co ułatwia Recenzentowi analizę uzyskanych wyników. Na stronie 62 rozpoczyna się kolejny rozdział „Dyskusja”, czego nie uwzględniono w spisie treści. Uzyskane przez doktoranta wyniki pozwalają stwierdzić, że zastosowana eksperymentalna terapia kombinowana (hydrokortyzon i tlenek azotu) w świńskim modelu wstrząsu septycznego wywołanego LPS nie zmieniła ekspresji receptora GKS cytoplazmatycznego i jądrowego w nerkach, wątrobie i płucach. Doktorant w rozdziale :”Dyskusja” powołuje się na wyniki uzyskane przez innych Autorów (poz. 43,95,96), które wskazują, że terapia kombinowana, która On zastosował, wykazuje „obiecujące działania terapeutyczne”. Recenzentowi jednak brakuje dokładnej i wnikliwej analizy i wyjaśnienia dlaczego Doktorantowi nie udało się tej tezy potwierdzić i w czym tak naprawdę tkwi to „obiecujące działanie terapeutyczne”. Natomiast sam model sepsy trwający 20 godzin dał obraz histologiczny zbliżony do naturalnie występującego przebiegu u ludzi, co jest sukcesem Doktoranta.

Ostatnie strony rozprawy doktorskiej lek. wet. M.R. Płóciennika to :”Spis rycin” i „Spis tabel” zamieszczonych w tekście ora „Bibliografia”.

Podsumowując Recenzent zwraca uwagę Doktorantowi na chaos rozprawy doktorskiej, co utrudnia jej analizę (przede wszystkim brak wydzielonych wniosków) i drobne błędy takie jak: str. 62- „Sepsa jest ciężką ogólnoustrojową chorobą”.

Reasumując stwierdzam, że badania będące przedmiotem dysertacji doktorskiej Pana lek. wet. Michała Rafała Płóciennika pt.:” Ekspresja receptora glikokortykosteroidowego w tkance płucnej, w nerkach i wątrobie świń ze wstrząsem endotoksycznym indukowanym podaniem lipopolisacharydu z Escherichia coli O111:B2” zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane na reprezentatywnym materiale z zastosowaniem nowoczesnych technik badawczych. Zarówno sposób przeprowadzenia badań jak i opracowanie wyników oraz ich konfrontacja z danymi piśmiennictwa, wskazują na opanowanie przez Doktoranta zagadnień teoretycznych i praktycznych będących przedmiotem recenzowanej dysertacji doktorskiej. Na uznanie zasługuje ogromna pracowitość badań, wyczerpująca i przejrzysta dokumentacja wyników badań, a także znaczenie uzyskanych wyników dla modelowych badań translacyjnych. Dzięki zastosowaniu odpowiednich technik badawczych praca wnosi ważne elementy dla modelowych badań biomedycznych.

W mojej ocenie przedstawiona dysertacja doktorska spełnia ustawowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim, zgodnie z wymaganiami artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W oparciu o przedstawioną powyżej pozytywną ocenę przedkładam Radzie Dyscypliny Weternaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wnioski o dopuszczenie Pana lek. wet. Marcina Rafała Płóciennika do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk weterynaryjnych i dyscyplinie weternaria (ROZPORZĄDZENIE MINISTRA EDUKACJI I NAUKI z dnia 11 października 2022 r.)

Dr hab. Iwona Taszkun, profesor uczelni
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Kierownik
Zakładu Diagnostyki Klinicznej
i Dermatologii Weterynaryjnej

Dr hab. Iwona Taszkun