



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

## 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 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$ ) 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 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$ ) 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