WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

ZAKŁAD FIZJOLOGII DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
LABORATORIUM CENTRUM BADAŃ PRZEDKLINICZNYCH
DEPARTAMENT OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHYSIOLOGY
LABORATORY OF CENTRE FOR PRECLINICAL RESEARCH

Rada Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Ocena pracy doktorskiej mgr Ewy Waszkiewicz, pt.:
„Wpływ wieku i interleukiny 6 na proces uszkodzenia mięśnia sercowego indukowany lipopolisacharydem bakteryjnym"

Mimo nieustannego postępu w medycynie wskaźnik śmiertelności na oddziałach intensywnej terapii nadal jest wysoki. Jedną z najczęstszych przyczyn tych zgonów jest niewydolność krążenia w przebiegu wstrząsu septycznego.

Zaburzenia autoregulacji mikrokrążenia prowadzące do rozwoju wstrząsu septycznego są m.in. efektem działania cytokin uwalnianych z komórek zapalnych aktywowanych podczas infekcji, na przykład w odpowiedzi na obecność we krwi toksyn bakteryjnych, takich jak lipopolisacharyd ściany bakteryjnej (LPS). Wzrost produkcji jednej z takich cytokin, interleukiny 6 (IL-6), jest charakterystyczny dla przewlekłego stanu zapalnego. Dane z piśmiennictwa wskazują na złożony, negatywny wpływ tej interleukiny na mięsień sercowy. Niektórzy uznają IL-6 za niezależny czynnik prognostyczny w chorobach układu sercowo-naczyniowego. Nie jest jednak znany dokładny mechanizm w jakim IL-6 uszkadza mięsień sercowy w przebiegu wstrząsu septycznego. Mało wiadomo o odmiennościach patomechanizmów uszkodzenia mięśnia sercowego u osób starszych - grupie najbardziej narażonej zarówno na wstrząs septyczny, jak i zaburzenia czynności układu krążenia. Szczególnie brak jest danych dotyczących wewnątrzkomórkowych mechanizmów działania interleukiny 6 w kardiomiocytach osób w starszym wieku.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Ewy Waszkiewicz wypełnia tę lukę i dostarcza nowych, cennych informacji na temat patofizjologii wstrząsu septycznego.

W swojej pracy mgr Ewa Waszkiewicz oceniała w modelu zwierzęcym wpływ stanu zapalnego wywołanego podaniem LPS na aktywację szlaków przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego w kardiomiocytach myszy w zależności od wieku zwierzęcia oraz obecności genu IL-6. Dokonała analizy wpływu niskiej, tzw. „hartującej" (0,1mg/kg m.c.) i wysokiej (10 mg/kg m.c.) dawki LPS na aktywację wewnątrzkomórkowych szlaków związanych z pobudzeniem receptora gp130 (JAK/STAT, MEK/ERK, PI3K/Akt), a wtórnie na stopień nasilenia apoptozy w kardiomiocytach.

Badania zostały przeprowadzone na samcach myszy szczepu C57BL6/J pozbawionych funkcjonalnego genu IL-6 (IL-6 KO) oraz na zwierzętach kontrolnych (dzikich) tego szczepu wytwarzających IL-6 (IL-6 WT). W celu porównania wpływu wieku na ewentualną zmianę aktywności kaskady kinaz przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego użyto w.w myszy w młodym wieku i w wieku podeszłym (odpowiednio 3- lub 24-miesięczne zwierzęta). Oceniano poziom apoptozy wykorzystując metodę TUNEL w preparatach histologicznych. W celu oznaczenia poziomu ekspresji i aktywacji białek biorących udział w odpowiedzi kardiomiocytów na czynniki uszkadzające oraz regulowane przez IL-6 (STAT3, ERK1/2, Akt1/2/3), a także białek wpływających na apoptozę (Bcl-2 i p53) przeprowadzono badania metodą Western Blot wykorzystując fosfospecyficzne przeciwciała pierwszorzędowe, oraz metodę chemiluminescencji.

Doktorantka wykazała u młodych zwierząt, zarówno IL-6 WT jak i IL-6 KO, aktywujący wpływ wysokiej dawki LPS na szlaki przekaźnictwa JAK/STAT oraz MEK/ERK, z jednoczasowym spadkiem ekspresji endogennych inhibitorów STAT3 (PIAS i SOCS3) oraz brakiem wpływu na szlak PI3K/Akt, obserwowanym przy podaniu niskiej dawki LPS. Brak IL-6 powodował jedynie zniesienie hamowania ekspresji SOCS3.

Z kolei u zwierząt kontrolnych Doktorantka wykazała wpływ wysokiej dawki LPS na spadek ekspresji białek regulacyjnych apoptozę (Bcl-2 i p53), co wtórnie zwiększało poziom tego zjawiska w kardiomiocytach. Podanie wcześniejsze, tzw. dawki hartującej LPS częściowo zapobiegało indukcji apoptozy wywołanej wstrząsem septycznym. Brak IL-6 nie wpływał na poziom białek regulacyjnych apoptozę.

Praca mgr Ewy Waszkiewicz stanowi obszerny raport z cyklu badań nad wpływem wieku i interleukiny 6 na proces uszkodzenia mięśnia sercowego indukowany liposacharydem bakteryjnym. Doktorantka udokumentowała wpływ dootrzewnowego podania LPS na zmiany aktywności szlaków przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego związanego z cytoprotekcją i uszkodzeniem kardiomiocytów. Wykazała wrażliwość na endotoksynę w zależności od wieku. Nie stwierdziła natomiast istotnego wpływu IL-6 na aktywność szlaków przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego kardiomiocytów w odpowiedzi na LPS, co jak rozumiem w sposób istotny ogranicza nadzieje pokładane w tej cząsteczce w kontekście potencjalnych terapii.

Praca ma bardzo staranną szatę edytorską i graficzną. Konstrukcja pracy jest poprawna, a cytowane piśmiennictwo przekracza 200 pozycji. Nie uważam jednak tego za atut, gdyż praca doktorska powinna być syntetyczna, a dobór piśmiennictwa krytyczny. Należy tu jednak zauważyć, że autorka zamieszcza bardzo dobrze przygotowany, obszerny wstęp do swojej pracy i tak rozbudowane piśmiennictwo jest tym po części usprawiedliwione. Dyskusja wyników jest pogłębiona, a doktorantka krytycznie interpretuje zgromadzone dane i formuje adekwatnie wnioski.

Wykonana przez Doktorantkę praca badawcza nie budzi zastrzeżeń merytorycznych. Niewątpliwie szeroki wachlarz użytych różnych, często bardzo pracochłonnych technik doświadczalnych wyróżnia ją. Rycina zawierająca objaśnienia poszczególnych procedur przeprowadzonych podczas doświadczeń stanowiłaby niewątpliwie cenne uzupełnienie pracy.

Z obowiązku recenzenta mam kilka spostrzeżeń, uwag i zapytań:

1. czy Doktorantka miała na myśli syntezę IL-6 pisząc na stronie 31:

„ Za tworzenie IL-6 odpowiadają również komórki uczestniczące w przebudowie tkanki łącznej…"

2. s. 48 opis grupy kontrolnej jest trudny do zrozumienia

„.. grupa pierwsza-kontrolna otrzymała dootrzewnowo placebo- roztwór 0.9% NaCl, w którym rozpuszczono LPS…" Rozumiem, że Doktorantka miała na myśli rozpuszczany LPS w kolejnych grupach doświadczalnych?

3. s. 50 metoda TUNEL jest to metoda enzymatycznego znakowania końców dwuniciowego DNA, które powstają w procesie apoptozy. Opis tej metody wymaga uzupełnienia w pracy

4. s. 50 powinno być badania metodą immunohistochemiczną zamiast immunohistopatologiczną?

5. s. 57 brakuje nazwy metody użytej do oceny stężenia IL-6 w surowicy.

Z opisu metody wynika, że był to test ELISA.

6. s. 61 Wykres 7.2; skrót IL-6 obecny na wykresie wymaga usunięcia

7. na wykresach brakujące jednostki wymagają uzupełnienia

8. te same skróty, używane wielokrotnie w tekście pracy nie wymagają ponownego wyjaśniania

9. terminologia wymaga ujednolicenia, np. Western Blot lub Western Blotting; grupa kontrolna lub referencyjna

10. Poprawny skrót kinazy 3-fosfatydyloinozytolu to PI3K. Autorka w wielu miejscach zapisuje go błędnie - IP3K

W podsumowaniu brakuje wyjaśnienia potencjalnego, klinicznego zastosowania postawionych wniosków. Jest to istotne w kontekście postawionych celów, z których jasno wynika, iż praca ma w swoich założeniach odległych potencjał translacyjny.

Przedstawione powyżej uwagi nie umniejszają merytorycznej wartości pracy.

Podsumowując: praca doktorska mgr Ewy Waszkiewicz jest bardzo dobrze zaplanowanym i przeprowadzonym projektem badawczym, którego realizacja doprowadziła do postawienia kilku konkretnych wniosków. Wyniki tej pracy dostarczyły istotnych informacji na temat patogenezy wstrząsu septycznego. Chciałabym podkreślić także widoczny wkład pracy Doktorantki w przeprowadzenie złożonych doświadczeń, w tym eksperymentalnych oraz wnikliwą analizę otrzymanych wyników.

Z głębokim przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi rozprawa w pełni spełnia wymogi określone w Ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym oraz w Ustawie o stopniach naukowych i tytule

naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, a także w stosownych aktach wykonawczych.

Niniejszym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Ewy Waszkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. n. med. Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska Warszawa, 1 września 2016

KIEROWNIK
Zakładu Fizjologii
Doświadczalnej i Klinicznej
Dr hab. n. med. Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska

ul. Banacha 1B •02-097 Warszawa• ul. Pawińskiego 3c • 02-106 Warszawa
tel: (0-22) 116-61-13 • tel: (0-22) 572 07 08 • e-mail: fizjolog@wum.edu.pl • www.wum.edu.pl/fizjologia