

Prof. dr hab. Grażyna Korczak-Kowalska  
Zakład Immunologii  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Warszawski

**Ocena rozprawy doktorskiej lekarz Marii Jaworskiej-Wilczyńskiej,  
zatytułowanej:**

**Ocena wybranych elementów układu odpornościowego i krzepnięcia w celu  
przewidywania wystąpienia zespołu po perikardiotomii u chorych po operacjach  
pomostowania aortalno-wieńcowego**

Organizm poddawany jest nieustannemu działaniu wielu czynników zewnętrznych i wewnętrznych, wpływających na jego funkcję, w tym również na układ odpornościowy. Ocena roli mechanizmów immunologicznych w patogenezie chorób, jak również zmian określonych parametrów immunologicznych ma ogromne znaczenie w prawidłowej diagnostyce i terapii wielu schorzeń. W ten nurt poszukiwań wpisują się również badania przeprowadzone przez lekarz Marię Jaworską-Wilczyńską.

Przedstawiona do oceny dysertacja zawiera na 146 stronach wszystkie wymagane rozdziały. Zamieszczono łącznie 18 rycin i 43 tabel. Zachowano również odpowiednie proporcje pomiędzy rozdziałami.

Ważną częścią pracy jest Wstęp, w którym Doktorantka zajmuje się zespołem po perikardiotomii (PPS). Przytacza najnowsze informacje, hipotezy dotyczące patogenyzy tego zespołu, epidemiologii i obrazu klinicznego. Część uwagi poświęca problemom związanym z rozpoznaniem zespołu po perikardiotomii, różnicowaniem i leczeniem. Opisuje też dokładnie metodę pomostowania aortalno-wieńcowego. Charakteryzuje zakres badań, w tym również immunologicznych, wykonywanych u pacjentów podkreślając potrzebę poszukiwań markerów immunologicznych, których ocena byłaby pomocna w prognozowaniu.

Na tle literatury przedmiotu, oraz własnych przemyśleń, Doktorantka formułuje hipotezę badawczą. Opisuje cele pracy, w tym ocenę przydatności pomiarów stężeń wybranych cytokin, zarówno prozapalnych (IL-1 $\beta$ , -6, -8, -12p70, TNF), jak również IL-10, cytokiny o działaniu supresyjnym, jako markerów pozwalających na wyróżnienie, wśród pacjentów poddanych operacji pomostowania aortalno-wieńcowego, grupy zagrożonej rozwojem zespołu po perikardiotomii. Innym ważnym celem była ocena przydatności

receptorów błonowych leukocytów i płytek krwi jako markerów pozwalających na wyróżnienie grupy zagrożonej rozwojem zespołu po perikardiotomii.

Lekarz Maria Jaworska-Wilczyńska dokładnie charakteryzuje badaną grupę pacjentów oraz metodykę badań. Do oceny badanych parametrów immunologicznych stosowano cytometrię przepływową, metodę nowoczesną, pozwalającą na jednoczesową analizę wielu parametrów. Należy tu podkreślić, że technika ta jest coraz częściej wykorzystywana w diagnostyce immunologicznej, a właściwie znalazła już w niej swoje znaczące miejsce. Doktorantka wyczerpująco opisuje samą metodę, jak również uzasadnia wybór ocenianych receptorów komórkowych i cytokin. W tabeli wymienia stosowane w badaniach przeciwciała połączone z odpowiednimi fluorochromami. Zastosowano również niezbędne kontrole. Należy podkreślić dokładną i wyczerpującą analizę statystyczną wyników.

Biorąc pod uwagę wpływ zabiegów chirurgicznych na funkcję układu odpornościowego i rozwój reakcji zapalnej, w tym syntezę wielu cytokin prozapalnych, wybór 5 dnia po operacji do analizy produkcji wybranych cytokin wydaje się uzasadniony. Doktorantka wykazała, że rodzaj operacji, z użyciem lub bez użycia krążenia pozaustrojowego, nie miał wpływu na rozwój zespołu po perikardiotomii oraz badane parametry immunologiczne. Natomiast, wystąpienie tego zespołu było związane z niższymi stężeniami IL-8 i IL-1 $\beta$  przed operacją oraz większym wzrostem stężenia tych cytokin po operacji.

Ocena stężenia IL-8 i IL-1 $\beta$  wykazała istotny wzrost stężenia tych cytokin u pacjentów, u których rozwinął się w późniejszym okresie zespół po perikardiotomii. W przypadku IL-8, jej dynamika wzrostu, okazała się parametrem zdecydowanie różniącym obie grupy pacjentów, z PPS i bez PPS. Zgadzam się z opinią Doktorantki, że duży wzrost stężenia IL-8 może odgrywać ważną rolę w zapoczątkowaniu i podtrzymaniu procesu zapalnego u podatnych pacjentów (z niższym stężeniem IL-8 wyjściowo) po operacji kardiochirurgicznej. Na podstawie uzyskanych w badaniach wyników, Doktorantka sugeruje, że pomiar stężenia IL-8 w surowicy może być przydatny w praktyce klinicznej dla wyodrębnienia grupy zagrożonej rozwojem zespołu po perikardiotomii.

Doktorantka postuluje, że nadmierny wyrzut IL-8 w odpowiedzi na niedotlenienie okołoperacyjne, stymulację przez cytokiny lub też infekcję, indukuje zmianę fenotypu komórek mezotelium do miofibroblastów, a w konsekwencji dalszą progresję zapalenia.

Chciałabym poznać opinię Doktorantki, dlaczego właśnie u osób z niskimi stężeniami IL-8 w krążeniu przed operacją obserwuje się znacząco wyższy wzrost stężenia tej cytokiny w 5 dobie po operacji?

Natomiast, dynamika zmian stężenia IL-10, cytokiny o działaniu supresyjnym, nie różniła się istotnie pomiędzy badanymi grupami. Sugeruje to, że odpowiedź przeciwwzapalna może być osłabiona w tej grupie pacjentów.

Na podstawie przeprowadzonej analizy ekspresji markerów powierzchniowych leukocytów, Doktorantka wykazała, że dynamika zmian populacji granulocytów i monocytów w grupach z PPS i bez PPS była porównywalna. Również w 5 dobie po operacji nie stwierdzono istotnej zmiany w liczbie monocytów z ekspresją receptora zmiataacza kompleksu hemoglobina-haptoglobina (CD163). Obserwowano natomiast wzrost liczby granulocytów wykazujących ekspresję receptora CD64, choć był on porównywalny w obu grupach. Dynamika wzrostu liczby/odsetka monocytów z ekspresją CD64 była również porównywalna w obu grupach. Zgadzam się z Doktorantką, że powodem obserwowanego zjawiska była prawdopodobnie operacja kardiochirurgiczna.

U pacjentów obserwowano natomiast wzrost liczby monocytów z ekspresją receptora CD36. Pacjenci z PPS wykazywali istotny wzrost liczby monocytów CD36<sup>+</sup> w porównaniu z dniem przed operacją. Natomiast pacjenci bez PPS wykazywali tendencję spadkową liczby tych komórek w 5 dobie. Tak więc, wzrost liczby monocytów z ekspresją antygeny CD36 był związany z wystąpieniem zespołu po perikardiotomii. Nasuwa się więc pytanie, czy można wykorzystać te obserwacje w celach prognostycznych i jakie może być ich znaczenie?

Operacja pomostowania aortalno-wieńcowego powodowała znaczącą aktywację płytek krwi i ich zwiększoną tendencję do tworzenia agregatów płytkowo-leukocytarnych i zwiększoną ekspresję selektyny CD62P, obserwowaną u pacjentów po obu typach operacji. Ocena zmiany liczby agregatów płytkowo-leukocytarnych między pacjentami z PPS i bez PPS wykazała jedynie tendencję do większej liczby agregatów złożonych z monocytów i aktywowanych płytek krwi z ekspresją P-selektyny u pacjentów z PPS.

Opis wyników obejmuje wieloparametrowe analizy danych klinicznych i laboratoryjnych. Doktorantka w swoich poszukiwaniach próbowała wyodrębnić parametry, które można w przyszłości wykorzystać w celach prognostycznych. W tabelach i na wykresach zamieszcza wyniki wieloparametrowej analizy statystycznej.

Dodatkowo, w Aneksie zamieszczono szczegółowe wyniki oznaczeń wykonanych u poszczególnych pacjentów, co może pozwolić kolejnym grupom badaczy porównać z własnymi danymi i pomóc w wyciągnięciu ewentualnych wniosków.

Doktorantka wnikliwie i kompetentnie odnosi się do własnych wyników i dyskutuje je na tle cytowanej, obszernej literatury przedmiotu, liczącej 174 pozycje. Dyskusja jest niezwykle ważną i dojrzałą częścią pracy.

Na uwagę zasługuje edytorska strona pracy. Rozprawa napisana jest bardzo starannie, Doktorantka w jasny sposób przekazuje założenia pracy, wyniki i ich znaczenie w badaniach światowych oraz ewentualne zastosowanie w klinice. Ale w tego typu rozprawach trudno ustrzec się popełnienia błędów, choć nie obniżających wartości pracy. Można zastanowić się czy bardziej poprawnym określeniem jest sformułowanie „granulocyty rosły”, czy też „liczba granulocytów rosła” itp..

Opisy tabel zwykle zamieszczane są pod tabelami, ale takie przedstawienie też nie jest błędne. Wyniki analizy stężeń IL-8 i IL-1 $\beta$  przedstawiono w tabeli 28 i na rycinie 15, a nie 12, jak to zostało napisane.

W opisie metod powinny być podane warunki wirowania komórek poddawanych znakowaniu przeciwciałami monoklonalnymi.

Na uwagę zasługuje natomiast, dokładny i przejrzysty opis modelu badawczego oraz wyników przeprowadzonych badań i ich dyskusja.

Przedstawiona do oceny rozprawa jest oryginalnym, wartościowym i samodzielnym osiągnięciem doktorantki. Wyniki prowadzonych badań wnoszą nowe informacje do wiedzy dotyczącej roli mechanizmów immunologicznych w patogenezie rozwoju zespołu po perikardiotomii u chorych poddanych operacji pomostowania aortalno-wieńcowego. Należy też zaznaczyć, że wyniki badań zostały już opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Oceniana rozprawa doktorska stanowi również ważny punkt wyjścia do dalszych badań i zasługuje na wyróżnienie.

Rozprawa spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Składam do Rady Naukowej Instytutu Kardiologii im. Prymasa Tysiąclecia Stefana Kardynała Wyszyńskiego wniosek o dopuszczenie lekarz Marii Jaworskiej-Wilczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, na podstawie rozprawy, zatytułowanej: *Ocena wybranych elementów układu odpornościowego i krzepnięcia w celu przewidywania wystąpienia zespołu po perikardiotomii u chorych po operacjach pomostowania aortalno-wieńcowego.*

Warszawa, 24.05.2013r.

Prof. dr hab. Grażyna Korczak-Kowalska