

Instytut Hematologii i Transfuzjologii
w Warszawie
Klinika Hematologii
ul. Indiry Gandhi 14, 02-776 Warszawa
tel. +48 22 34 96 313, fax +48 22 34 96 178

Uniwersytet Medyczny
we Wrocławiu



RPW/13241/2023 P
Data: 2023-07-31

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
BIURO RADY DYSCYPLINY
NAUKI MEDYCZNE

wpł.
dnia 31-07-2023

L. dz. RN-BM/ 1374

Warszawa, 20.07.2023

VIDF

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
RADA DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE
Przewodnicząca

prof. dr hab. Agnieszka Haloń

Ocena

rozprawy doktorskiej lekarz Aleksandry Boguckiej-Fedorczuk pt. „Wpływ wybranych parametrów klinicznych i molekularnych na efektywność mobilizacji komórek macierzystych szpiku” wykonanej pod kierunkiem Pana Profesora dr hab. n.med. Tomasza Wróbla w Katedrze i Klinice Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Odkrycie potencjału komórek macierzystych do formowania kolonii hematopoetycznych zapoczątkowało badania nad wykorzystaniem HSC w leczeniu człowieka.

Historia odkrycia leczniczej roli komórek macierzystych rozpoczęło się od wybuchu bomby jądrowej w Japonii po konfrontacji medycyny z chorobą popromienną. W 1952r Charles C. Congdon, Delta Uphoff i Egon Lorenz badając myszy oraz świnki morskie udowodnili, że można uratować napromienione zwierzęta przeszczepiając im komórki szpiku. Fakt, że do regeneracji hematopoezy wystarczają macierzyste komórki krwiotwórcze po raz pierwszy wykazali u myszy Kanadyjczycy Till, McCulloch i Siminovitch w 1964 r.

Odkrycie obecności macierzystych komórek krwiotwórczych we krwi obwodowej dokonane przez Joan Goodam w 1962 r umożliwiło skokowy postęp w pracach nad wykorzystaniem tego źródła komórek do przeszczepienia.

Przeszczep komórek macierzystych krwi obwodowej (PBSCT) jest obecnie najczęściej wykonywanym zabiegiem transplantacyjnym w medycynie. Jego kliniczne wprowadzenie w 1986r zastąpiło szpik jako źródło komórek macierzystych do około 100% w przypadku przeszczepów autologicznych i do około 75% w przypadku przeszczepów allogenicznych.

Początkowo o obecności komórek macierzystych w materiale przeszczepowym świadczyła skuteczna regeneracja krwiotworzenia. Brakowało metod badania materiału na obecność komórek zdolnych do regeneracji szpiku, a hodowle komórkowe były zbyt wolne. Zbieranie

komórek macierzystych z krwi obwodowej było możliwe przez kilkakrotne leukaferazy. Kolejnymi krokami milowymi, które doprowadziły do obecnego stanu wiedzy były:

1. stwierdzenie zwiększonej liczby komórek macierzystych we krwi obwodowej w trakcie odnowy po podaniu cytostatyków,
2. udowodnienie, że czynniki wzrostu GM-CSF i G-CSF u myszy powodują wyrzut komórek macierzystych do krwi obwodowej.

Dzięki tym wszystkim odkryciom obecnie proces mobilizacji umożliwiający zbiórkę komórek macierzystych z krwi obwodowej stał się możliwy.

Jak przedstawia we wstępie pracy doktorantka istnieje aktualnie kilka schematów mobilizacji komórek krwiotwórczych opierających się na podawaniu G-CSF w monoterapii lub w skojarzeniu z cytostatykami. U części pacjentów do uzyskania koniecznej do odtworzenia szpiku liczby komórek CD34+ wystarcza pojedyncza, u innych dwie lub więcej leukaferaz, u części pacjentów pomimo powtarzanych prób mobilizacji komórek macierzystych w tym z wykorzystaniem immunostymulatorów np. plerixaforu we krwi obwodowej nie ma wystarczającej liczby komórek macierzystych do przeprowadzenia procedury. Mimo szerokiej wiedzy i nowoczesnych możliwości technicznych nadal u 20-40% pacjentów procedura mobilizacji kończy się niepowodzeniem, które definiujemy jako brak odpowiedniego „wyrzutu” liczby komórek CD34+ do krwi obwodowej. Za czynniki sprawcze niepowodzenia mobilizacji uważa się min. cytostatyki, których zastosowanie we wcześniejszym leczeniu uważa się za potencjalnie utrudniające późniejszą mobilizację (w tym, talidomid, melfalan, lenalidomid), wiek pacjenta oraz rozpoznanie chłoniaka nieziarniczego.

Jak wskazują liczne badania miRNA odgrywa rolę w hematopoezie, w tym różnicowaniu i proliferacji HSC. Szczególnie często w tym kontekście wymienia się rodziny miR-125, miR-126, ale także miR-155, miR-223, miR-142, miR-144 oraz miR-150 wykazujące wysoką ekspresję w układzie krwiotwórczym. Dane powyższe stały się dla doktorantki podstawą do poszukiwania wpływu w/w cząstek na proces mobilizacji.

W oparciu o przesłanki zawarte we wstępie dysertacji doktorantka sformułowała cele analiz, którymi były próby identyfikacji cech klinicznych i molekularnych, w tym ekspresji miR pozwalające na zdefiniowanie cech chorych, które pozwolą typować grupę, w której konieczne będzie a priori zastosowanie plerixaforu.

Dla zrealizowania postawionych celów, po uzyskaniu stosownych zgód Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu doktorantka przeprowadziła zaplanowane analizy naukowe.

Udział w badaniu wzięło 45 pacjentów, w tym 19 kobiet i 26 mężczyzn w wieku od 44 do 62 lat; mediana 52,9 lat. Z uwagi na heterogenność chorób nowotworowych układu chłonnego grupę badaną celowo zawężono do chorych z rozpoznaniem chłoniaków nieziarniczych z komórek B, co wydaje się bardzo słuszne. U każdego z badanych doktorantka analizowała skuteczność mobilizacji komórek macierzystych przed HSCT w kontekście cech klinicznych, takich jak: rozpoznanie, płeć, wiek, liczba cykli chemioterapii, waga, BMI czy choroby towarzyszące czy też rodzaj chemioterapii mobilizacyjnej oraz parametrów molekularnych: ekspresja miR-125a, miR-125b, miR-126, miR155, miR-223 we krwi obwodowej w dwóch punktach czasowych.

Wybór tematu rozprawy doktorskiej uważam za bardzo ciekawy i aktualny.

Rozprawa doktorska lekarz Aleksandry Boguckiej-Fedorczuk liczy 75 stron standardowego maszynopisu według typowego, powszechnie akceptowanego układu, który obejmuje: wstęp, cele i założenia pracy, materiały i metodykę, wyniki wraz z ich omówieniem, dyskusję, wnioski, streszczenie, wykaz cytowanego piśmiennictwa, spis tabel i rycin. Autorka we wstępie zamieściła obszerny wykaz skrótów, pomocny w dalszej lekturze rozprawy. Streszczenie pracy zostało przetłumaczone na język angielski.

We wstępie pracy autorka w sposób dość książkowy, ale mimo to niezbędny dla dobrego zrozumienia pracy przedstawiła merytoryczne podstawy podłoża pracy.

Badania przeprowadzono w Katedrze Histologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Wykorzystując metody badawcze doktorantka oceniła ogólną skuteczność mobilizacji (37 vs 8 pacjentów). W grupie 37 chorych ze skuteczną procedurą mobilizacji 16 chorych miało przeprowadzoną jedną a 21 chorych dwa zabiegi leukaferez.

Doktorantka wykazała istotność statystyczną w kontekście liczby uzyskanych komórek CD34+ zależnie od BMI., chociaż moim zdaniem może to być związane z matematycznym podziałem liczby uzyskanych komórek na większą liczbę kilogramów chorego, gdyż powierzchnia szpikowa nie zmienia się z BMI.

Ciekawy natomiast jest wykazany przez doktorantkę negatywny, statystycznie istotny wpływ występowania chorób współistniejących ($p=0.0014$) na ilość komórek uzyskanych w mobilizacji. Obecność infekcji pozytywnie korelowała z efektywnością procedury (ilość zebranych komórek CD34+) ($p=0.03$).

W badaniu nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniem któregośkolwiek z badanych miR a skutecznością bądź nie mobilizacji komórek macierzystych u chorych, u których mobilizacja była skuteczna. Nie wykazano również zależności pomiędzy stężeniem miR a czasem przyjmowania G-CSF ani ilością leukaferez. Doktorantka wykazała dodatnią korelację pomiędzy ilością komórek hematopoetycznych pobranych podczas separacji a stężeniem miR-125a przed

jej wykonaniem ($p=0.01$), oraz ilością komórek CD34+ w czasie zabiegu leukaferazy ($p=0,0009$). Doktorantka wykazała również zależność pomiędzy zmianą ekspresji miR-223 w trakcie mobilizacji a ilością komórek CD34+ w trakcie separacji ($p=0.16$). U wszystkich badanych ekspresja miR-223 w drugim punkcie czasowym była niższa niż wyjściowo, a u chorych, u których różnica była bardziej nasiloną stwierdzono większe stężenie HSC w pobranym za pomocą leukaferazy separacie.

Doktorantka oceniała również stężenia poszczególnych miR jeszcze przed podaniem G-CSF z parametrami, które różniły badanych. Nie stwierdziła istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniami poszczególnych miR a schematem chemioterapii zastosowanym w mobilizacji, ilości linii leczenia zrealizowanego uprzednio, rozpoznaniem ani płcią.

Wykazała natomiast istotną statystycznie ujemną korelację pomiędzy mierzonym w pierwszym punkcie czasowym stężeniem miR126 a wiekiem chorych ($p=0,03$). Podobnie ujemna korelacja łączyła stężenie miR-155 i miR-223 i wagę badanych (odpowiednio $p=0,04$ i $p=0,02$). Stężenie miR-155 było znacząco niższe u chorych z całkowitą odpowiedzią na leczenie ($p=0,04$). Mediana ilości kopii miR-155/ul dla osób z odpowiedzią CR wynosiła 12,85 (zakres: 3,58 – 123,75) zaś u badanych z odpowiedzią częściową wynosiła 61 (zakres: 18,4-220).

Doktorantka wykazała ponadto istotną statystycznie korelację dodatnią pomiędzy stężeniem WBC oraz NEUT a stężeniem miR-125a (odpowiednio: $p=0,002$ i $p=0,001$).

W mojej ocenie zaplanowanie doświadczeń oraz ich realizacja świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu metodycznym Doktorantki.

Doktorantka przeprowadziła bardzo ciekawą dyskusję na temat uzyskanych wyników, wyjaśniła również wcześniejsze moje wątpliwości dotyczące problemu przeliczania liczby komórek CD34+ na kg/mc u osób z wysokim BMI. Dyskusja przeprowadzona została przez Doktorantkę w sposób dojrzały. Doktorantka odniosła własne wyniki do dostępnych danych literaturowych, a sposób przeprowadzenia analizy uzyskanych wyników potwierdza dobre przygotowanie merytoryczne i szeroką wiedzę w zakresie tematyki prowadzonych badań.

Interesującym uzupełnieniem tej części rozprawy jest odniesienie wyników własnych do danych z literatury.

Przeprowadzone badania stały się podstawą do sformułowania przez Autorkę 6 wniosków. 1. Mobilizacja HSC u chorych z rozpoznaniem NHL jest dość skuteczną procedurą, jednak istnieje grupa chorych, u których kończy się ona niepowodzeniem. 2. Nie udało się zidentyfikować grupy tzw. poor mobilizers na podstawie ekspresji badanych miR. 3. Spadek ekspresji miR-223 korelował z wyższym stężeniem komórek CD34+ w separacie. Dynamika zmian ekspresji

miR-223 w badanych punktach czasowych może być więc predykatorem efektywności mobilizacji HSC. 4. Ekspresja miR-125a w dniu spodziewanej leukaferazy koreluje pozytywnie z ilością komórek CD34+/kg m.c. dawcy w krwi obwodowej oraz w separacie pobranym w drodze leukaferazy. Ekspresja miR-223 w dniu spodziewanej leukaferazy koreluje natomiast negatywnie z ilością komórek CD34+/kg m.c. dawcy separowanych w drodze leukaferazy. Oba miR wydają się mieć udział w procesach hematopoezy. 5. U pacjentów, którzy w trakcie mobilizacji przebyli infekcję w stopniu maksymalnie 2 wg CTCAE 5.0 ilość pobranych komórek CD34+ była znacząco wyższa niż u osób, które nie przechodziły infekcji. Wydaje się to świadczyć o pozytywnym wpływie krótkotrwałego stanu zapalnego na procesy hematopoezy.

Kontrowersyjny wydaje się wniosek 6, w którym doktorantka stwierdza, że, czynnikami negatywnie rokującymi dla efektywności mobilizacji są: nadwaga i otyłość. Wątpliwości nie budzi druga część wniosku. Mniej komórek pozyskano u pacjentów z chorobami współistniejącymi w porównaniu z nieobciążonymi badanymi. Zgadzam się z doktorantką, że w tych grupach koniecznym może się okazać dodatkowe wspomaganie mobilizacji, np. poprzez zastosowanie plerixaforu.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska lekarz Aleksandry Boguckiej-Fedorczuk charakteryzuje się trafnością wyboru tematu. Doktorantka wykazała się umiejętnością wykorzystania dostępnej bibliografii oraz formułowania celów planowanych badań naukowych i wniosków z nich wypływających. Zawarta w rozprawie analiza tematu jest spójna i przyczynia się do poznania omawianej tematyki, toteż jest cennym uzupełnieniem dostępnego piśmiennictwa naukowego. Autorka nie ustrzegła się błędów edycyjnych i interpunkcyjnych. Mówiąc o ilości komórek macierzystych należy moim zdaniem używać formy ilość, nie zaś stężenie, które Doktorantka stosuje, HSC nie jest substancją rozpuszczoną w roztworze. Drobne błędy nie umniejszają wartości pracy, zostały szczegółowo omówione z doktorantką. Autorka w pełni zrealizowała zaplanowany cel, dobrze opanowała warsztat badawczy i wykazała doskonałe przygotowanie merytoryczne. Rozprawa ma dużą wartość poznawczą i stanowi podstawę do kontynuowania badań naukowych w tej dziedzinie.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca autorstwa lekarz Aleksandry Boguckiej-Fedorczuk spełnia wszystkie warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 oraz art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2018r poz. 1669 z późn.zm). Tym samym zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lekarz Aleksandry Boguckiej-Fedorczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wnioskuje o uznanie pracy za wyróżniającą.

dr hab. n. med. Marzena Wątek



