



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirszfelda

Polskiej Akademii Nauk

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

tel. (4871) 337 1172, (4871) 370 9930, fax: (4871) 337 2171

<https://hirszfeld.pl>

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
BIURO RADY DYSCYPLINY  
NAUKI MEDYCZNE

wpł.  
dnia 17-08-2023

L. dz. RN-BM/ 1439

W dr

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
RADA DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE  
zastępca przewodniczącego

M. Podhorska-Okołów  
prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okołów

Wrocław, 10.08.2023

**Ocena rozprawy doktorskiej lek. Aleksandry Boguckiej-Fedorczuk  
z tytułu:**

**„Wpływ wybranych parametrów klinicznych i molekularnych na efektywność  
mobilizacji komórek macierzystych szpiku”**

Promotor pracy: prof. dr hab. n. med. Tomasz Wróbel  
Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku  
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

1. Ocena merytoryczna

1.1 Trafność podjętej tematyki badawczej i jej oryginalność

Przeszczepienie autologicznych komórek krwiotwórczych poprzedzone wysokodawkowaną chemioterapią jest uznaną metodą leczenia chorób nowotworowych układu krwiotwórczego. Pomimo coraz to nowszych metod wdrażanych do leczenia pacjentów hematoonkologicznych, autologiczna transplantacja komórek macierzystych w wielu sytuacjach klinicznych stanowi najlepszą opcję terapeutyczną. Stąd też analiza czynników związanych z efektywnością mobilizacji komórek macierzystych ze szpiku do krwi obwodowej dla pozyskania ich odpowiedniej liczby do transplantacji ma istotne znaczenie dla praktyki klinicznej. Temu zagadnieniu jest poświęcona recenzowana praca. Doktorantka i Jej Promotor za cel wyznaczyli sobie próbę identyfikacji parametrów klinicznych oraz czynników molekularnych związanych z niską skutecznością procedury mobilizacji. Przedmiotem badań molekularnych stały się wybrane cząsteczki mikroRNA potencjalnie regulujące hematopoezę i mogące wpływać na proliferację i uwalnianie macierzystych komórek krwiotwórczych ze szpiku do krwiobiegu.

Badaniem objęto 45 pacjentów z charakteryzującą się potencjalnie gorszą efektywnością mobilizacji chorobą (ang. *non-Hodgkin lymphoma*, NHL). Znaczenie podjętych badań jest o tyle istotne, iż stwarzają one możliwość (i) wykorzystania stosunkowo prostej analizy ekspresji krążącego we krwi mikroRNA jako jednego z parametrów oceny efektywności mobilizacji oraz (ii) przeniesienia uzyskanych wyników do praktyki klinicznej, z uwagi na rozważenie wprowadzenia dodatkowej metody wspomaganie mobilizacji, np. podania plerixaforu (antagonisty receptora CXCR4) u pacjentów o niskim potencjale mobilizacyjnym. W tym świetle podjęcie tematu „Wpływ wybranych parametrów klinicznych i molekularnych na efektywność mobilizacji komórek macierzystych szpiku” uważam za szczególnie zasadne.

#### 1.2 Ocena uzyskanych rezultatów i ich znaczenie dla nauki i praktyki

Wyniki swojej pracy Doktorantka opisuje w dwóch podrozdziałach. Pierwszy z nich poświęcony jest wynikom analiz skuteczności mobilizacji w odniesieniu do parametrów klinicznych, laboratoryjnych, toksyczności narządowej i hematologicznej oraz ekspresji cząsteczek mikroRNA. Natomiast w drugim opisane zostały wyniki analiz zależności pomiędzy ekspresją badanych miRNA a potencjalnie wpływającymi na mobilizację parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi. Na ich podstawie Doktorantka formułuje 6 wniosków.

Badania wykazały, iż u 37 (82%) chorych spośród 45 badanych pacjentów mobilizacja była skuteczna, czyli uzyskano przynajmniej  $2 \times 10^6$  komórek CD34+ / kg m.c. w separacie. Zaobserwowano, iż na liczbę pozyskanych komórek CD34+ negatywny wpływ ma występowanie chorób współistniejących oraz (związane z przewlekłym stanem zapalnym) nadwaga i otyłość pacjenta. Z kolei przebycie infekcji podczas mobilizacji pozytywnie wpływało na efektywność tej procedury. Z analizowanych cząsteczek miRNA, ekspresja miRNA-223 w dniu leukaferozy negatywnie korelowała ze stężeniem komórek CD34+ w separacie, natomiast odmiennie ekspresja miRNA-125a korelowała pozytywnie zarówno ze stężeniem komórek CD34+ w separacie leukaferetycznym jak i we krwi obwodowej pacjentów. Co ciekawe, wyższą ekspresję miRNA-125a obserwowano również u chorych, którzy w trakcie mobilizacji przebyli infekcję (w stopniu maksymalnie 2 wg CTCAE). Jak podkreśla Doktorantka, obserwacja ta mogłaby sugerować, iż spowodowany infekcją krótkotrwały stan zapalny może mieć pozytywny wpływ na mechanizmy hematopoezy. Toteż istotnym z poznawczego punktu byłoby rozszerzenie badań nad tym zagadnieniem. Ciekawym byłoby również podjęcie dalszych badań dotyczących białek, których ekspresja może być modulowana przez potencjalnie istotne z klinicznego punktu widzenia cząsteczki miRNA-125a oraz miRNA-223. Jak zauważa Autorka, w przypadku miRNA-223, analiza dynamiki zmian ekspresji w trakcie mobilizacji mogłyby posłużyć za czynnik prognostyczny efektywności mobilizacji.

### 1.3 Poprawność formalno – językowa, stylistyczna i interpunkcyjna

Poprawność formalno – językowa, stylistyczna i interpunkcyjna pracy nie budzi większych zastrzeżeń, choć Autorka nie uniknęła drobnych błędów językowych (błędów literowych czy np. użycia niefortunnego sformułowania „reakcja łańcuchowej polimerazy”) czy redakcyjnych. Ich obecność jednak nie umniejsza w istotny sposób wartości pracy.

## 2. Ocena metodologiczna

### 2.1 Dobór literatury, umiejętności wykorzystania źródeł

Autorka bardzo sprawnie porusza się w tematyce badawczej, cytując zarówno prace źródłowe, dla podkreślenia znaczenia nieco starszych odkryć, jak również dobrze wykorzystuje najnowsze dane literaturowe. W sumie cytowanych jest 88 wyselekcjonowanych pozycji piśmienniczych.

### 2.2 Poprawność formułowania problemów i hipotez (założenia badawcze)

Doktorantka odpowiednio formułuje cele i założenia swojej pracy. W oparciu o dane kliniczne i wyniki badań molekularnych (analizę ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA) podejmuje próbę identyfikacji pacjentów o niskim potencjale mobilizacyjnym.

### 2.3 Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętności ich zastosowania

Badaniem objęto 45 chorych poddanych procedurze mobilizacji komórek macierzystych szpiku w Klinice Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu w latach 2018-2021. U wszystkich pacjentów zdiagnozowano chorobę z grupy chłoniaków z dojrzałych komórek B (pacjenci z NHL, charakteryzują się potencjalnie gorszą efektywnością mobilizacji niż np. HL). Wszystkim chorym podano chemioterapię przeciwnowotworową a od +5 dnia po zakończonej chemioterapii wykonywano iniekcje G-CSF (ang. *granulocyte colony stimulating factor*). Dodatkowym kryterium włączenia było uzyskanie częściowej lub pełnej remisji choroby. Za kryterium wyłączenia przyjęto niewydolności narządowe, choroby towarzyszące powyżej 2 stopnia wg CTCAE, stałe przyjmowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych, dodatni wywiad stosowania leków uznanych za czynnik ryzyka nieskutecznej mobilizacji (fludarabina, melfalan, lenalidomid), przebycie mobilizacji w przeszłości, przeszczepienie komórek krwiotwórczych w wywiadzie, planowane zastosowanie plerixaforu w bieżącej mobilizacji. Zastosowanie powyższych kryteriów pozwoliło na dobór najbardziej jednolitej grupy do badań.

Badania prowadzono z wykorzystaniem dobrze dobranej metodologii: cytometrii przepływowej, zaawansowanych technik biologii molekularnej i odpowiednich narzędzi

statystycznych. Efektywność mobilizacji określano poprzez cytofluometryczną analizę komórek CD34+ we krwi obwodowej pacjentów oraz w uzyskanym drogą aferezy preparacie komórkowym. Ekspresję wybranych mikroRNA analizowano z użyciem odwrotnej transkrypcji (ang. *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*; RT-qPCR) oraz nowatorskiej technologii emulsyjnego PCR (ang. *droplet digital PCR*; ddPCR) do ilościowego oznaczania mikroRNA. Stężenia mikroRNA określano w dwóch punktach czasowych: (i) dobie poprzedzającej planowane włączenie G-CSF, tj. w czwartej dobie po chemioterapii oraz (ii) bezpośrednio przed rozpoczęciem pierwszej aferezy lub, w przypadku niewystarczającej liczby komórek CD34+ we krwi obwodowej badanych, w ostatniej dobie przyjmowania G-CSF. Ponadto w trakcie mobilizacji u pacjentów wykonywano rutynowe badania kontrolne obejmujące morfologię krwi (oceniając stężenie leukocytów, neutrofilii, hemoglobiny i płytek krwi), parametry biochemiczne (monitorowano stężenie bilirubiny, aminotransferaz wątrobowych, kreatyniny, CRP) oraz przeprowadzano kliniczną ocenę obecności cech infekcji.

#### 2.4 Poprawność układu pracy i struktury podziału treści

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska ma odpowiedni dla tego typu opracowań układ obejmujący, po wykazie użytych skrótów, następujące rozdziały: Wstęp, Cele i założenia, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz Streszczenie w języku polskim i w języku angielskim, Biografię jak również Spis tabel i Spis rycin.

Piętnastostronicowy Wstęp Autorka rozpoczyna od przedstawienia charakterystyki nowotworów układu chłonnego i ich klasyfikacji. Następnie omawia procedurę autologicznej transplantacji komórek krwiotwórczych (ang. *autologous transplantation of hematopoietic stem cells*, autoH SCT) i towarzyszącej jej mobilizacji komórek macierzystych ze szpiku do krwi obwodowej opisując molekularne podłoże tego procesu, w tym znaczenie interakcji chemokiny CXCL12 (SDF-1) z jej receptorem CXCR4 i wpływ G-CSF. Krótko omawiane są również czynniki mogące wpływać na skuteczność mobilizacji. W tej części pracy Doktorantka nie wspomina jednak o potencjalnych immunogenetycznych aspektach efektywności tego procesu. Stosowany w Klinice schemat mobilizacji przedstawiono na Rycinie 1. (I tu moja drobna uwaga redakcyjna: pojawiają się na nim wyjaśnienia skrótów, które nie zostały użyte). Wstęp zakończony jest krótką charakterystyką mikroRNA oraz opisem znaczenia funkcjonalnego i regulacyjnej roli cząsteczek mikroRNA w hematopoezie. Przytaczane są wyniki opracowań dotyczących udziału cząsteczek miRNA, tj. miRNA-125a, miRNA-125b, miRNA-126, miRNA-155 oraz miRNA-223, w różnicowaniu i proliferacji HSC. Cząsteczki te były przedmiotem badań niniejszej pracy.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawiła cele i założenia swojej pracy. Następnie, w rozdziale Materiały i metody, scharakteryzowała analizowaną grupę pacjentów, przebieg mobilizacji oraz opisała metody wykorzystywane do określenia efektywności mobilizacji (bezwzględnej liczby komórek CD34+ we krwi obwodowej oraz liczby komórek CD34+ w separacie na kg m.c. biorcy), przeprowadzenia badań ekspresji mikroRNA i statystycznej analizy wyników.

I tu pojawia się drobna nieścisłość. Autorka podaje wiek analizowanych pacjentów w zakresie od 44 do 62 lat (Tabela 3, str. 24) a następnie opisując „ocenę powikłań mobilizacji” (str. 27) podaje, iż do grupy ryzyka zakażeń należeli pacjenci powyżej 75 r.ż. (a takich nie było w analizowanej grupie).

Na str. 26 pojawia się kolejna nieścisłość dotycząca optymalnego stężenia komórek do wykonania separacji. Nieścisłości dotyczą również wersji stosowanych powszechnych kryteriów terminologii CTCAE (wersja 5.0 w treści pracy lub 6.0 w wykazie skrótów).

Opatrzony 6 tabelami i 11 rycinami rozdział Wyniki składa się z 2 głównych podrozdziałów poświęconych czynnikom związanym ze skutecznością mobilizacji oraz zależnościom pomiędzy ekspresją badanych cząsteczek mikroRNA i czynnikami wpływającymi na mobilizację. (Uwaga: ani na rycinach, ani w opisie pod rysunkami nie podano wartości p (choć były istotne statystycznie)).

Po rozdziale Dyskusja Autorka zamieściła Wnioski oraz Streszczenia pracy w języku polskim i angielskim.

#### Wniosek końcowy (konkluzja)

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. Aleksandry Boguckiej-Fedorczuk pt. „Wpływ wybranych parametrów klinicznych i molekularnych na efektywność mobilizacji komórek macierzystych szpiku” wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia doktora. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust 1. ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Wnioskuje zatem do Wysockiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Aleksandry Boguckiej-Fedorczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Katarzyna Bogunia-Kubik

The first part of the document is a list of names and titles, including:
   
 1. Mr. J. H. ...
   
 2. Mr. ...
   
 3. Mr. ...
   
 4. Mr. ...
   
 5. Mr. ...
   
 6. Mr. ...
   
 7. Mr. ...
   
 8. Mr. ...
   
 9. Mr. ...
   
 10. Mr. ...
   
 11. Mr. ...
   
 12. Mr. ...
   
 13. Mr. ...
   
 14. Mr. ...
   
 15. Mr. ...
   
 16. Mr. ...
   
 17. Mr. ...
   
 18. Mr. ...
   
 19. Mr. ...
   
 20. Mr. ...
   
 21. Mr. ...
   
 22. Mr. ...
   
 23. Mr. ...
   
 24. Mr. ...
   
 25. Mr. ...
   
 26. Mr. ...
   
 27. Mr. ...
   
 28. Mr. ...
   
 29. Mr. ...
   
 30. Mr. ...
   
 31. Mr. ...
   
 32. Mr. ...
   
 33. Mr. ...
   
 34. Mr. ...
   
 35. Mr. ...
   
 36. Mr. ...
   
 37. Mr. ...
   
 38. Mr. ...
   
 39. Mr. ...
   
 40. Mr. ...
   
 41. Mr. ...
   
 42. Mr. ...
   
 43. Mr. ...
   
 44. Mr. ...
   
 45. Mr. ...
   
 46. Mr. ...
   
 47. Mr. ...
   
 48. Mr. ...
   
 49. Mr. ...
   
 50. Mr. ...
   
 51. Mr. ...
   
 52. Mr. ...
   
 53. Mr. ...
   
 54. Mr. ...
   
 55. Mr. ...
   
 56. Mr. ...
   
 57. Mr. ...
   
 58. Mr. ...
   
 59. Mr. ...
   
 60. Mr. ...
   
 61. Mr. ...
   
 62. Mr. ...
   
 63. Mr. ...
   
 64. Mr. ...
   
 65. Mr. ...
   
 66. Mr. ...
   
 67. Mr. ...
   
 68. Mr. ...
   
 69. Mr. ...
   
 70. Mr. ...
   
 71. Mr. ...
   
 72. Mr. ...
   
 73. Mr. ...
   
 74. Mr. ...
   
 75. Mr. ...
   
 76. Mr. ...
   
 77. Mr. ...
   
 78. Mr. ...
   
 79. Mr. ...
   
 80. Mr. ...
   
 81. Mr. ...
   
 82. Mr. ...
   
 83. Mr. ...
   
 84. Mr. ...
   
 85. Mr. ...
   
 86. Mr. ...
   
 87. Mr. ...
   
 88. Mr. ...
   
 89. Mr. ...
   
 90. Mr. ...
   
 91. Mr. ...
   
 92. Mr. ...
   
 93. Mr. ...
   
 94. Mr. ...
   
 95. Mr. ...
   
 96. Mr. ...
   
 97. Mr. ...
   
 98. Mr. ...
   
 99. Mr. ...
   
 100. Mr. ...

J. H. ...  
 Secretary