

Warszawa, dnia 23 października 2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

lek. Piotra Jancewicza

“Ocena skuteczności filtrowania i wpływu filtracji na jakość ubogoleukocytarnych koncentratów krwinek płytkowych otrzymanych z użyciem laboratoryjnych zestawów do filtrowania”

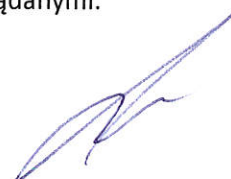
Napisanej pod kierunkiem

Prof. dr hab. n. med. Piotra Marka Radziwona

Podstawą recenzji jest otrzymany egzemplarz rozprawy doktorskiej w postaci wydruku komputerowego, liczący 63 strony i składający się z siedmiu rozdziałów (Wstępu, Celu pracy, Materiałów i metod, Wyników, Dyskusji, Wniosków i Streszczenia, także w języku angielskim), wykazu piśmiennictwa (106 pozycji) oraz wykazu siedmiu tabel i 12 rycin. Praca złożona jest z części teoretycznej i badawczej. Układ rozdziałów i kompozycja rozprawy doktorskiej nie budzą wątpliwości.

Autor rozprawy podejmuje bardzo istotne zagadnienie dotyczące procesu filtracji zlewanych z kożuszków leukocytarno-płytkowych koncentratów krwinek płytkowych (ZI KKP) oraz przedstawia ryzyko związane z przetaczaniem zanieczyszczonych leukocytami składników krwi.

Przetoczenie składników krwi z zawartymi w nich resztkowymi leukocytami może wywołać u biorcy wiele niepożądanych reakcji opartych na dwóch podstawowych mechanizmach o charakterze immunologicznym. Pierwszy z nich występuje wtedy, gdy leukocyty zawarte w składnikach krwi stymulują reakcję w komórkach i tkankach biorcy, wywołując na przykład potransfuzyjną chorobę przeszczep przeciw gospodarzowi (TA-GvHD) lub niehemolityczne gorączkowe reakcje poprzetoczeniowe (FNHTR). Drugi mechanizm związany jest z rozpoznaniem obcych antygenów HLA na leukocytach dawcy przez komórki T biorcy. Takie mechanizmy rozpoznania obcego antygeny HLA dawcy przez limfocyty T biorcy prowadzą do powstawania u biorcy przeciwciał anti-HLA, które mogą być przyczyną oporności u pacjentów na przetaczane KKP. W celu ograniczenia ryzyka związanego z obecnością resztkowych leukocytów w przetaczanych składnikach krwi od lat stosowane są różne metody preparatyki, które skutkują obniżeniem liczby leukocytów lub ich inaktywacją, a w konsekwencji zabezpieczają biorców m.in. przed ww. poważnymi reakcjami niepożądanymi.



We *Wstępie* przedstawionej rozprawy (1.1. Wykorzystanie ubogoleukocytarnych składników krwi) Autor wymienia poważne niepożądane reakcje spowodowane przetoczeniem resztkowych leukocytów wraz ze składnikami krwi, które szczegółowo omawia w rozdziale 1.3 *Wpływ przetoczeń allogenicznych leukocytów znajdujących się w składnikach krwi na organizm biorcy*. Podkreśla także, że przetoczenie składników krwi z zawartymi w nich leukocytami może spowodować również przeniesienie infekcji bakteryjnych, wirusowych (m.in. HTLV, CMV, EBV) czy też patologicznych prionów. We *Wstępie* omówiono także niektóre metody usuwania leukocytów z komórkowych składników krwi i krwi pełnej, takie m.in. jak przemywanie komórkowych składników krwi czy też oddzielanie kożuszka leukocytarno-płytkowego z KKCz podkreślając, że każda z tych metod zapewnia tylko częściową eliminację leukocytów i nie zapewnia otrzymania ubogoleukocytarnego składnika krwi. W kolejnym podrozdziale *Wstępu* (pkt. 1.6.) przedstawiono wskazania do stosowania ubogoleukocytarnych składników krwi, uwzględniając grupy biorców, którzy bezwzględnie wymagają stosowania takich składników krwi. W pracy podkreślono także, że optymalną obecnie metodą usuwania leukocytów z komórkowych składników krwi jest poddawanie ich filtracji przy zastosowaniu filtrów do usuwania leukocytów. Wprawdzie filtracja stosowana jest od wielu lat, to w większości przypadków ocena procesu filtracji ogranicza się przede wszystkim do oceny jego skuteczności, czyli odpowiedzi na pytanie czy składnik krwi poddany filtracji zawiera $< 1 \times 10^6$ leukocytów w preparacie, czy można go uznać za ubogoleukocytarny? Oceniając proces filtracji KKP należy wziąć pod uwagę, że krwinki płytkowe zarówno podczas pobierania krwi, jak i wykonywania zabiegów aferezy ulegają aktywacji, a każda dodatkowa procedura, w tym np. filtrowanie może potencjalnie tę aktywację nasilać. Obecnie w Polsce do użytku klinicznego wydawane są wyłącznie ubogoleukocytarne koncentraty krwinek płytkowych (UKKP), otrzymywane m.in. przy zastosowaniu różnych, dostępnych na rynku wyrobów medycznych, rodzajów zestawów do usuwania leukocytów z tych składników. Celem pracy Autora rozprawy było przedstawienie wyników badań dotyczących zarówno skuteczności usuwania leukocytów oraz odzyskania krwinek płytkowych, jak i wyników badań dotyczących stopnia aktywacji krwinek płytkowych w KKP poddanych procesowi filtracji przy zastosowaniu różnych rodzajów filtrów. W celu pracy (Rozdział 2) wymieniono cel ogólny: *porównanie efektywności usuwania leukocytów z koncentratów płytek krwi przez wybrane filtry laboratoryjne oraz wpływu filtracji na jakość ubogoleukocytarnych koncentratów krwinek płytkowych*. Nie przedstawiono informacji w jaki sposób główny cel będzie realizowany. Dopiero w *Materiałach i metodach* przedstawiono cele szczegółowe, tzn. porównanie skuteczności filtracji KKP i stopnia aktywacji krwinek płytkowych w KKP poddanych procesowi usuwania leukocytów przy zastosowaniu trzech rodzajów filtrów: Fresenius Hemo Care GmbH BioP (Niemcy), Terumo IMUGARD III-PL (Japonia) i PALL Medical LRP (USA).



Próbki KKP do badań pobierano przed i po filtracji, w których oznaczano liczbę leukocytów, liczbę krwinek płytkowych, parametry morfologii krwinek płytkowych (MPV-średnią objętość krwinki płytkowej wyrażonej w fl, PDW-wskaźnik anizocytozy krwinek płytkowych, wyrażony w %, PCT-stosunek masy krwinek płytkowych do całkowitej masy składnika, wyrażonej w %) oraz oceniano stopień aktywacji krwinek płytkowych na podstawie ekspresji antygenów CD 42b, CD 62P, CD 63.

Wyniki badań przedstawiono na 12 rycinach oraz w 5 tabelach. Stwierdzono, że czas filtracji z zastosowaniem filtrów Fresenius oraz Pall był statystycznie istotnie krótszy niż czas filtracji z zastosowaniem filtrów Terumo. W pracy nie przedstawiono średniej objętości KKP przed filtracją i po filtracji, ale wyliczono stratę objętości, która była największa w przypadku filtrów Fresenius, a najmniejsza w przypadku filtrów Terumo. Średnie objętości KKP podano dopiero w *Dyskusji*. Ocena skuteczności filtracji wykazała, że każdy ze stosowanych filtrów usuwa leukocyty ze skutecznością 99,99%. Filtracja z zastosowaniem wszystkich badanych filtrów nie miała istotnego wpływu na wielkość krwinki płytkowej, ale stwierdzono, że filtracja z użyciem filtru Fresenius BioP wiązała się z wyraźniej większymi zmianami wartości MPV i PDV w porównaniu do filtra Terumo Hemacare IMUGARD III-PL oraz znamienne większymi zmianami wartości PCT w porównaniu z pozostałymi ocenianymi filtrami.

Stwierdzono ponadto, że proces filtracji nie miał istotnego wpływu na ekspresję antygenów CD 42b, CD62P oraz CD63, ale stwierdzono większą (nieznaną statystycznie) ekspresję CD62P i CD63 po filtracji z użyciem filtrów Fresenius. W *Dyskusji* przeanalizowano wyniki badań odnosząc się do licznych pozycji piśmiennictwa, szczególnie powołując się na pozycje z ostatnich lat.

Na podstawie analizy wyników badań stwierdzono:

1. Porównywalną, wysoką skuteczność usuwania leukocytów, niezależnie od rodzaju zastosowanego filtra.
2. Że strata liczby krwinek płytkowych zależy od rodzaju stosowanego filtra
3. Że strata liczby krwinek płytkowych może być związana ze wzrostem aktywacji i adhezji
4. Że proces filtracji powoduje zmiany morfologii krwinek płytkowych, których stopień zależy od rodzaju filtra, a przy wyborze zestawu do filtrowania KKP należy uwzględnić aktywację płytek oraz ich stratę i czas filtracji.

Rozprawa Doktorska Lek. Piotra Jancewicza "Ocena skuteczności filtrowania i wpływu filtracji na jakość ubogoleukocytarnych koncentratów krwinek płytkowych otrzymanych z użyciem laboratoryjnych zestawów do filtrowania" stanowi istotną pozycję o znaczeniu zarówno naukowym, jak i praktycznym. Zagadnienia w niej zawarte mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia procesu filtracji i mogą stanowić praktyczne wskazówki dla osób zajmujących się tą tematyką.



Nadmienić należy jednak, że Autor rozprawy doktorskiej nie ustrzegł się pewnych nieścisłości i błędów, które powinny zostać wzięte pod uwagę w przypadku przygotowywania pracy do publikacji:

1. W pracy zastosowano różne nazewnictwo. Dotyczy to m.in. poważnych reakcji niepożądanych, które raz nazywane są odczynami, innym razem poprzetoczeniową reakcją. Chociaż w prawidłowy sposób zatytułowano rozdział 1.3.1.4. *Niehemolityczne reakcje gorączkowe*, to już w tekście poniżej zastosowano termin *odczyny*. Wielokrotnie stosowane są *ilości* zamiast *liczba* leukocytów. W wielu miejscach stosowany jest termin koncentrat płytek krwi zamiast koncentrat krwinek płytkowych
2. Informacje dotyczące reakcji niepożądanych spowodowanych przetoczeniem leukocytów znajdują się w różnych rozdziałach (1.1; 1.3.1), podobne powtórzenia dotyczą metod redukcji liczby leukocytów w składnikach krwi (1.1; 1.7.).
3. Na podstawie wrywkowego sprawdzenia niektórych pozycji stwierdzono, że w pozycji 76 błędnie zapisano nazwisko pierwszego autora. Powinno być *Mittal S.*, zamiast *Metal S.*, co utrudniło weryfikację tej pozycji. Jednocześnie pozycja piśmiennictwa 76 i 84 dotyczy tego samego artykułu. W piśmiennictwie nie wymieniono także publikacji Henschlera i wsp., na których powołano się w tekście *Dyskusji*.
4. W pkt. 3.1. *Materiał do badań* zawarto nieprawidłowy zapis: *Do badań nie przeznaczono koncentrat krwinek płytkowych otrzymany z krwi pełnej pobranej od 168 honorowych dawców krwi z krwi pełnej pobranej od 168 honorowych dawców krwi.*
5. Zapisy w pkt. 3.3 *Preparatyka* informują o dodaniu do kożuszków leukocytarno-płytkowych roztworu wzbogacającego SSP+, a w konsekwencji otrzymaniu KKP/RW i w związku z powyższym taki rodzaj składnika krwi powinien być wymieniany w całej pracy. Nie podano także składu mieszaniny osocza i roztworu wzbogacającego, której skład procentowy trudno obliczyć, ponieważ nie podano średniej objętości kożuszków leukocytarno-płytkowych.
6. Zbędne wydają się edukacyjne informacje dotyczące budowy leukocytów (pkt.1.2.)

Podsumowanie

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską lek. Piotra Jancewicza "Ocena skuteczności filtrowania i wpływu filtracji na jakość ubogoleukocytarnych koncentratów krwinek płytkowych otrzymanych z użyciem laboratoryjnych zestawów do filtrowania" oceniam pozytywnie. Od strony merytorycznej rozprawa doktorska nie budzi zastrzeżeń. Doktorant wykazał się umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań, analizy wyników i wyciągania wy wpływających z nich wniosków.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz



stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j.Dz.U. z 2017 r. poz. 1789.) oraz art.179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające Ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2018 r. poz.1669 z późn.zm.). Wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. Piotra Jancewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Elżbieta Lachert



Zakład Transfuzjologii

Instytut Hematologii i Transfuzjologii
