



Warszawa, dnia 30.08.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Piotra Jancewicza pt.: „Ocena skuteczności filtrowania i wpływu filtracji na jakość ubogoleukocytarnych koncentratów krwinek płytkowych otrzymanych z użyciem laboratoryjnych zestawów do filtrowania”.

Niniejszą recenzję rozprawy doktorskiej lek. Piotra Jancewicza pt.: „Ocena skuteczności filtrowania i wpływu filtracji na jakość ubogoleukocytarnych koncentratów krwinek płytkowych otrzymanych z użyciem laboratoryjnych zestawów do filtrowania” sporządziłam w wykonaniu uchwały Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z dnia 29.06.2023 r.

Przedłożona mi do oceny rozprawa jest poświęcona badaniom wpływu filtrowania koncentratu płytek krwi na jego jakość oraz skuteczności samego procesu filtrowania. Filtrowanie (leukoredukcja) składników krwi, w tym koncentratu krwinek płytkowych jest powszechnie stosowaną metodą eliminacji leukocytów ze składników krwi. Wprowadzenie ubogoleukocytarnych składników krwi do krwiolecznictwa było skutkiem wyników wielu badań naukowych wskazujących na istniejący związek pomiędzy leukocytami i produktami ich metabolizmu – cytokinami – a wieloma powikłaniami poprzetoczeniowymi. Ponadto, eliminacja wirusów związanych z leukocytami (np. CMV, HTLV) może zapobiec ich przeniesieniu drogą przetoczenia oraz reaktywacji wirusów u chorych już zakażonych. Przetaczanie leukocytów ma działanie immunomodulacyjne, a więc może wpływać na występowanie pooperacyjnych zakażeń i nawrotów nowotworów, zatem usunięcie ich drogą filtracji może ograniczyć te działania. Działanie filtrów polega na wykorzystywaniu większych, w porównaniu z krwinkami czerwonymi i płytkami krwi rozmiarów leukocytów oraz zjawisko adhezji leukocytów do powierzchni filtra. W mechanizmie działania należy rozpatryć również adhezję związaną z oddziaływaniami międzykomórkowymi. Obecnie stosowane filtry usuwają z koncentratów krwinek płytkowych od 3 do 5 log krwinek białych, redukując ich liczbę poniżej wartości progowej dla wielu powikłań związanych z przetaczaniem leukocytów. Leukoredukcja nie wpływa w istotny sposób na aktywność metaboliczną i funkcje samych płytek krwi. Wykazano, natomiast poprawę parametrów biochemicznych i wzrostu poprzetoczeniowego w przypadku składnika krwi, w którym przed przechowywaniem zredukowano liczbę leukocytów. Jednak leukoredukcja z zastosowaniem filtrów może wpływać na jakość koncentratów krwinek płytkowych, a tym samym na skuteczność

terapeutyczną ich przetoczeń. Pomimo prowadzonych na ten temat badań, wprowadzania nowych rozwiązań technologicznych w filtrach wiedza na ten jest wciąż niepełna i powinna być uzupełniana. Dlatego też temat badań podjętych przez Doktoranta jest wysoce aktualny i ważny praktycznie.

Recenzowana rozprawa doktorska jest opracowaniem zwartym – oprawionym wydrukiem komputerowym zawierającym 63 strony, w tym 8 tabel, 12 rycin i 106 pozycji piśmiennictwa. Jej układ jest typowy dla dysertacji i zawiera 7 rozdziałów oraz szereg podrozdziałów. Wstępna część rozprawy to obszerny, zajmujący 20 stron wydruku komputerowego, przegląd danych z piśmiennictwa, dotyczącego badanych zagadnień. Doktorant scharakteryzował krwinki białe oraz ich funkcje. Dużą część wstępu poświęcił niepożądanym reakcjom i zdarzeniom, które mogą występować po przetoczeniu składników krwi. Autor powołując się na piśmiennictwo wskazuje na możliwego sprawcę tych niepożądanych działań, a mianowicie leukocyty znajdujące się w składnikach krwi. Przetoczone leukocyty lub uwalniane przez nie cytokiny mogą stanowić czynnik powodujący ryzyko zakażeń bakteryjnych, przeniesienie patogenów wirusowych lub pasożytów a także pewne niepożądane reakcje immunologiczne. Dlatego też kolejne podrozdziały Autor poświęcił wpływowi leukocytów w składnikach krwi, wskazaniom do stosowania ubogoleukocytarnych składników krwi, metodom ich usuwania oraz opisowi filtrów. Ta część omawianego rozdziału dowodzi umiejętności korzystania przez Doktoranta z piśmiennictwa naukowego. Doktorant jednak nie ustrzegł się pewnych nieścisłości. Cytując w podrozdziale 1.3.1.1. dotyczącym prawdopodobieństwa zakażeń bakteryjnych u biorców koncentratów krwinek płytkowych na stronie 11 autor przytacza pracę Folks TM i wsp. (poz. 21 spisu piśmiennictwa) pisząc, że jest ona poświęcona częstości występowania posocznicy poprzetoczeniowej, natomiast opis samej pracy sugeruje, że badania poświęcone były mechanizmom uaktywnienia się zakażenia HIV-1 latentnego lub o bardzo niskim poziomie replikacji wirusa. Z kolei, na tej samej stronie Doktorant przytacza pracę Narvios i wsp. (poz. 22 spisu piśmiennictwa) pisząc, że „początkowo wzrost bakterii w KKP jest hamowany poprzez supresyjne działanie leukocytów oraz czynników osoczowych ...”, następnie, że „częstość występowania zanieczyszczeń bakteryjnych ...” tymczasem opis badań w przytoczonym piśmiennictwie dotyczy badań nad prewencją zakażenia CMV poprzez przetaczanie ubogoleukocytarnych składników krwi chorym po allogenicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych. Kolejną, przytoczoną przez Doktoranta pracą jest opis badań Preiksaitis i wsp. (poz. 23 spisu piśmiennictwa) pisząc, że jest ona poświęcona, podobnie jak powyżej opisana przez recenzenta poz. 22 spisu piśmiennictwa, fagocytozie przez leukocyty bakterii m.in.

Serratia spp, *Escherichia spp*, natomiast opis samej pracy sugeruje, że badania dotyczyły ryzyka przeniesienia CMV przez składniki krwi u chorych po przeszczepieniu narządów.

Na stronie 12 Doktorant przytacza pracę Muir IC i wsp. (poz. 28 spisu piśmiennictwa) oraz pracę Novotny VM i wsp. (poz. 29 spisu piśmiennictwa) pisząc, że badania w nich opisane szacują liczbę serologicznie dodatnich CMV oraz adresują rodzaj komórek białych jako miejsce bytowania wirusa CMV. Natomiast autorzy pierwszej z wymienionych powyżej prac badali wpływ ubogoleukocytarnego KKP na częstość występowania poprzetoczeniowych reakcji gorączkowych, w drugiej opis badań i uzyskane wyniki sugerują, że przetaczanie ubogoleukocytarnych składników krwi może znacznie zmniejszyć syntezę przeciwciał anty-HLA. Ponadto, na stronie 13 autor powołuje się na pozycję piśmiennictwa 38 oraz wymienia nazwiska autorów Sloand i wsp., natomiast pod wskazaną pozycją wpisano Bacal CJ i wsp.: *Blood apheresis technologies – a eritical revier on challenges towards efficient blood separation and treatment. Mater Adv., 2021 (2):7210-7236.*

Weryfikacji wymaga również tabela III (str. 23) dotycząca zawartości leukocytów w składnikach płytkowych krwi. Doktorant zawarł w niej informacje, które wymagają korekty, np. zawartość leukocytów w jednostce KKP otrzymanej z krwi pełnej wynosi $<0,05 \times 10^9$; liczba leukocytów w KKP zlewanym - $<1 \times 10^9$ w ostatecznej jednostce. Powołanie się na pozycję piśmiennictwa 75, przy interpretacji powyższej tabeli, sugeruje bardziej badania nad czynnikami ryzyka związanymi z ostrymi reakcjami po przetoczeniu krwinek płytkowych i krwinek czerwonych

NieZRęcznie brzmią powtarzane kilkakrotnie, w przedstawionej pracy, sformułowania „ilość” (np. str. 12,17,30 i inne) - słowo „ilość” jest używane w odniesieniu do rzeczowników niepoliczalnych, natomiast w połączeniu z rzeczownikami policzalnymi powinno się stosować „liczba”.

Doktorant podjął się zadania badawczego, którego celem była ocena efektywności usuwania leukocytów z koncentratów krwinek płytkowych przez wybrane filtry laboratoryjne. Celem poznawczym ocenianej pracy była próba oceny wpływu filtracji na jakość ubogoleukocytarnych koncentratów płytek krwi co może wpływać na skuteczność terapeutyczną preparatów.

Realizując cel badawczy doktorant przebadał 168 preparatów krwinek płytkowych, uzyskanych w sposób zgodny z procedurami, z krwi pełnej pobranej od dawców krwi, które następnie zostały spulowane w białostockim RCKiK. Spulowane koncentraty płytek krwi zostały poddane leukoredukcji przy użyciu trzech rodzajów filtrów: 8 koncentratów przy użyciu filtrów Fresenius Hemo Care GmbH BioP (Niemcy); 10 – przy użyciu filtrów Terumo IMUGARD III-

PL (Japonia) i 10 – filtrów PALL Medical LRP10 (USA). Dużym niedostatkim metodologicznym jest brak charakterystyki porównywalnych w badaniach filtrów tzn. takich cech jak materiał, z którego zbudowany jest poszczególny rodzaj filtrów, ich mechanizm działania, objętość filtrów. Czyli tych cech, które doktorant porównywał i które determinowały uzyskane wyniki: liczbę leukocytów, straty ilościowe płytek krwi, aktywację płytek, czas filtracji i objętość ostatecznego preparatu. Bardzo szcątkowo informację dotyczącą samej budowy filtrów, doktorant opisuje w dyskusji.

Badania laboratoryjne w badanym materiale były wykonywane bezpośrednio przed i po filtrowaniu. Dobór metod jest adekwatny do celu badania i nie budzi zastrzeżeń.

W analizie statystycznej autor zastosował uznane metody statystyczne, pozwalające na wiarygodną ocenę uzyskanych wyników.

Najważniejszą częścią pracy są wyniki badań własnych opisane na 12 stronach. W tym zbiorze danych i porównań doktorant przedstawił informacje, które potrafił uporządkować i poddać analizie.

Sam rozdział „Wyniki” można podzielić na ocenę procesu filtracji koncentratu krwinek płytkowych przy użyciu badanych filtrów, wpływu filtracji na morfologię płytek krwi, porównanie ekspresji niektórych antygenów płytkowych po kontakcie z badanymi filtrami oraz badanie związku pomiędzy liczbą usuniętych leukocytów a liczbą, odsetkową i bezwzględną, płytek krwi oraz związków pomiędzy aktywacją krwinek płytkowych a odsetkową utratą liczby płytek krwi.

Doktorant stwierdził, że czas trwania procesu filtrowania był najdłuższy w przypadku stosowania filtrów Terumo, natomiast utrata objętości preparatu po leukoredukcji była statystycznie większa po stosowaniu filtrów Fresenius BioP, podobnie jak wpływ tych filtrów na bezwzględna i względną utratę liczby płytek krwi. Autor w pkt. 4.1.3, str. 33, błędnie napisał, że ocenia utratę objętości KKP, gdy tymczasem oceniał liczbę bezwzględną i odsetkową utraconych płytek krwi. Pewną niezręcznością jest też opis tabeli IV – stosowanie dwóch pojęć „ilość” i „liczba”; w połączeniu z rzeczownikami policzalnymi powinno się pisać „liczba”. Oceniając skuteczność badanych filtrów doktorant stwierdził, że była ona skuteczna w każdym przypadku badanego filtra i pozwoliła na redukcję krwinek białych z 99,99% skutecznością. Badając wpływ filtracji na morfologię płytek krwi Autor nie stwierdził istotnego wpływu żadnego z badanych filtrów. Chociaż obserwował większe zmiany w wartościach MPV i PDW w przypadku stosowania filtrów Fresenius BioP. Uzyskane wyniki wykazały również, że procedura filtracji nie miała istotnego wpływu na ekspresję antygenów CD42b; CD62P oraz

CD63. Doktorant natomiast obserwował większą ale nieistotną statystycznie, ekspresję CD62P i CD63 po stosowaniu filtrów Fresenius.

Autor badań wykazał, że niezależnie od rodzaju stosowanego w leukoredukcji filtru nie ma związku między bezwzględną utratą liczby leukocytów a bezwzględną i odsetkową utratą liczby płytek krwi, podobnie nie stwierdził związku między odsetkową stratą liczby krwinek płytkowych a odsetkiem płytek krwi wykazujących ekspresję antygenów CD42b i CD62P.

Doktorant wykazał silny wzajemny związek pomiędzy odsetkową utratą liczby płytek krwi a odsetkiem krwinek, które wykazywały ekspresję antygeny CD63. Związek ten dotyczył trzech rodzajów badanych filtrów.

Wyniki badań zostały przedstawione w formie czytelnych wykresów. Związki analizowane były za pomocą analizy korelacji Spearman's Rank, który to test nie znalazł się w opisie metod statystycznego opracowania wyników. Doktorant w tabeli przedstawił wartość współczynnika korelacji r oraz wartość p .

Wyniki zostały omówione i przedyskutowane na 7 stronach i porównane z wieloma danymi z piśmiennictwa. Lektura tego rozdziału świadczy o dobrej znajomości przez Doktoranta badanych zagadnień. Doktorant wykazuje tu dojrzałość naukową wyrażającą się umiejętnością właściwej interpretacji literatury dotyczącej badanych zagadnień i umiejętności porównywania własnych wyników z wynikami innych badaczy. Chciałabym, jednak jako recenzent zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia: na stronie 45 doktorant powołuje się na pracę Henschlera i wsp., w której autorzy skupili się na określeniu mechanizmów regulujących wiązanie leukocytów w elementach filtra antyleukocytarnego, ale brak tej pracy w pozycjach wykazu piśmiennictwa; na str. 47, 48, 49, niezręczność polegająca na stosowaniu słowa „ilość” zamiast „liczba” używanego w odniesieniu do rzeczowników policzalnych.

Rozprawę kończy 5 wniosków logicznie wynikających z przedstawionych i omówionych wyników badań. Chciałabym zasugerować złagodzenie sformułowania punktu 2 i 4, że „utratę liczby płytek krwi, której wielkość zależy od rodzaju zastosowanego filtra do usuwania leukocytów” i „których stopień zależy od rodzaju zastosowanego filtra do usuwania leukocytów”. Na stwierdzoną utratę liczby płytek krwi i zmiany morfologii krwinek płytkowych może mieć bowiem wpływ materiał, z którego zbudowane są filtry, sama ich konstrukcja, zastosowana modyfikacja powierzchni, wreszcie objętość samego filtra. W pracy nie przedstawiono charakterystyki filtrów, nie są znane podstawowe cechy badanych filtrów. Utratę liczby płytek krwi i zmiany ich morfologii oceniono porównując producentów filtrów. Dlatego też proponuję w powyższych wnioskach zrezygnować z określenia „od rodzaju zastosowanego filtra”. Ważny praktycznie jest wniosek 5, że przy wyborze zestawu do

filtrowania KKP należy uwzględnić aktywację płytek krwi, ich utratę oraz czas filtracji. Pozwoli to na zwiększenie skuteczności terapeutycznej koncentratu krwinek płytkowych i personalizację leczenia składnikiem krwi.

Rozprawę kończy streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz 106 pozycji piśmiennictwa ułożonych według kolejności cytowani, zawierających w większości artykuły w języku angielskim, a także artykuły w języku polskim, doniesienia zjazdowe oraz książki. Dodatkowo Doktorant umieścił wykaz 8 tabel i 12 rycin.

Poczynione wyżej uwagi, do których jestem zobowiązana z racji powierzonej mi funkcji recenzenta, mają na celu pomóc Doktorantowi w udoskonaleniu opracowania i prezentacji wyników badań w aspekcie przygotowania ich do publikacji. Uwagi te nie umniejszają mojej pozytywnej oceny rozprawy. Jej niewątpliwie mocną stroną jest jej znaczenie praktyczne. Realizując pracę Doktorant wykazał się podstawową wiedzą w zakresie transfuzjologii i biologii komórek krwi.

Reasumując, stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska lek. Piotra Jancewicza pt.: „Ocena skuteczności filtrowania i wpływu filtracji na jakość ubogoleukocytarnych koncentratów krwinek płytkowych otrzymanych z użyciem laboratoryjnych zestawów do filtrowania” stanowi bardzo ciekawe opracowanie o dużym znaczeniu praktycznym i stymulującym do dalszych badań. W pełni odpowiada ona na wytyczony cel pracy. Doktorant wykazał umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W moim przekonaniu oceniana dysertacja spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych. Mam więc zaszczyt i przyjemność wnioskować do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. Piotra Jancewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

9170444 Prof. nadz. dr hab. n. med. Jolanta Korosa
specjalista transfuzjolog