

UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

Klinika Hematologii

ul. M. Skłodowskiej 24, 15-089 Białystok

tel. 85 748 5603, faks 85 7447026

e-mail: piotr.radziwon@wp.pl



Białystok, 14.01.2021 r.

O C E N A

rozprawy na stopień doktora nauk biologicznych mgr **Kamili Anny Czubak-Prowizor**
pt. „*Mechanizmy niepożądanych reakcji związanych z przetaczaniem koncentratów krwinek
czerwonych w badaniach in vitro oraz in vivo*”

Przetoczenia krwi i jej składników często ratują życie lub zdrowie chorych. Wiemy, jednak, że z krwiolecznictwem związane jest ryzyko wystąpienia niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych, w tym mogących prowadzić do zgonu biorcy. Dużą sztuką jest umiejętność oceny, w którym momencie ryzyko związane z niedokrwistością, czy też małopłytkowością jest wyższe od ryzyka związanego z przetoczeniem składników krwi. Szczególny niepokój budzą dane wskazujące na korelację przetoczeń składników krwi z szybszą wznową i większą śmiertelnością z powodu choroby nowotworowej, większą zapadalnością na nowotwór, czy też większą ilością powikłań pooperacyjnych, w tym infekcji oraz większym ryzykiem powikłań zakrzepowo-zatorowych. Poznanie procesów zachodzących w trakcie przechowywania składników krwi i wpływu produktów powstających w ich wyniku ułatwia ocenę ryzyka związanego z przetoczeniem i może być pomocne przy określaniu ograniczeń i przeciwwskazań do transfuzji oraz stanowić wskazówki służące doskonaleniu preparatyki i przechowywania koncentratów krwinek czerwonych. Dostępne dane o mechanizmie powstawania niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych nie są wyczerpujące i jednoznaczne, stąd też podjęty przez doktorantkę temat badawczy mający na celu ocenę wpływu czasu przechowywania koncentratów krwinek czerwonych oraz zawartości w nich leukocytów na działanie prokoagulacyjne, prooksydacyjne oraz modulujące przeżywalność i proliferację komórek nowotworowych, a także ocenę wybranych parametrów stresu oksydacyjnego po przetoczeniu KKCz u chorych na ostre białaczki szpikowe jest w pełni aktualny i zasługuje na uznanie.

Przedłożona mi do oceny rozprawa zawiera 188 stron wydruku komputerowego, w tym: 15 tabel, 50 rycin i 310 pozycji piśmiennictwa. Praca podzielona została na część teoretyczną oraz część doświadczalną i składa się z 18 rozdziałów oraz szeregu podrozdziałów.

Część teoretyczna rozprawy to obszerny, zajmujący 34 strony maszynopisu opis zmian zachodzących w przechowywanych KKCz, przegląd randomizowanych badań klinicznych oceniających wpływ okresu przechowywania KKCz na skuteczność i bezpieczeństwo przetoczeń, omówienie wpływu przetoczeń u chorych na nowotwory oraz stres oksydacyjny po przetoczeniu krwinek czerwonych w wybranych grupach biorców.

Z obowiązku recenzenta zgłaszam następujące uwagi do tej części pracy doktorskiej:

Skróty

Str. 8.

- APTT to nie jest czas kefalinowo-kaolinowy osocza lecz czas częściowej tromboplastyny po aktywacji.

Wprowadzenie

Str. 15.

- Drugi akapit: Zdanie „Przechowywanie jest konieczne, aby zapewnić odpowiednią ilość jednostek dla potrzeb służby zdrowia.” jest niepotrzebne i nieprawdziwe, ponieważ przechowywanie nie ma wpływu na ilość jednostek.

- KKCz przechowywane są w temp 2-6°C a nie 2-4°C.

Str. 16.

- Zmiany w trakcie przechowywania nie prowadzą do immunomodulacji KKCz. Immunomodulacja z definicji to klinicznie znacząca zmiana funkcji układu immunologicznego biorecy indukowana przetoczeniem składnika krwi.

Str. 17.

- Filtracja nie ma istotnego wpływu na wzrost stężenia hemoglobiny po przetoczeniu. Także przetoczenie 1 j KKCz powinno powodować wzrost jej stężenia o 1 g/dl.

Str. 21.

- Za niedopuszczalny ustalony jest stopień/poziom >0,8% hemolizy, a nie >1,0% – Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 6 marca 2019 r. w sprawie wymagań dobrej praktyki pobierania krwi i jej składników, badania, preparatyki, przechowywania, wydawania i transportu dla jednostek organizacyjnych publicznej służby krwi (Dz.Ur. MZ. 2019 r., poz.25).

- Pozakomórkowa hemoglobina może być przyczyną poprzetoczeniowych reakcji niepożądanych, a nie zdarzeń (błędne tłumaczenie z cytowanych publikacji). Zgodnie z ustawową definicją zdarzenie niepożądane to niezamierzone i niekorzystne zdarzenie związane z pobieraniem, badaniem, preparatyką, przechowywaniem, wydawaniem i transportem krwi lub jej składników, mające miejsce przed, w trakcie, lub po przetoczeniu krwi lub jej składnika, mogące prowadzić do wystąpienia niepożądanej reakcji.

Str. 27.

- Ze zdania: „We wczesnych badaniach dowiedziono, iż w 40. dniu przechowywania dochodzi do znacznego zwiększenia poziomu IL-1 oraz IL-8 w supernatantach KKCz względem dnia pierwszego [120].” nie wynika, czy jeszcze stężenie innych cytokin wzrasta w trakcie przechowywania KKCz. Stąd też informacja w zdaniu kolejnym: „Wysokie poziomy TNF- α , IL-6 oraz IL-1 (czynników bezpośrednio hamujących erytropoezę poprzez blokowanie wytwarzania krwinek czerwonych w szpiku kostnym) potwierdziły również inne zespoły badawcze [122, 123].” jest niepełna i nie wyjaśnia, czy stężenie TNF- α , IL-6 i IL-1 zmienia się w trakcie przechowywania KKCz. Konieczne jest uzupełnienie informacji w tym akapicie.

Str. 28.

- Niezrozumiałe jest stwierdzenie: „Leukoredukcja przed przechowywaniem zmniejsza ilość IL-1, IL-6, IL-8 i TNF- α w przechowywanych KKCz [120]. Nie zaobserwowano zmiany stężenia IL-6 w czasie przechowywania jednostek niefiltrowanych,…” Leukoredukcja na

pewno nie ma wpływu na stężenie IL-6 w KKCz. Może mieć jednak wpływ na uwalnianie tej cytokiny w trakcie przechowywania KKCz.

- Wskazane jest precyzyjne wyjaśnienie – w odniesieniu do poprzedniej uwagi - wpływu przechowywania i leukoredukcji na stężenia TNF-, IL-6 i IL-1.

Str. 38.

- W tabeli 3 nieprawidłowo zostało użyte słowo „ostra” jako jeden ze stopni nasilenia niedokrwistości. Słowo „ostra” oznacza dynamikę narastania niedokrwistości. Zamiast słowa „ostra” powinno być użyte słowo „ciężka”.

Str. 45.

- Stwierdzenie w p. 5.1. „...obniżenie powinowactwa tlenu do Hb w przechowywanych krwinkach czerwonych...” jest nieprawdziwe. W przechowywanych KKCz dochodzi do spadku stężenia 2,3-DPG, co powoduje wzrost powinowactwa hemoglobiny do tlenu.

Ponadto, w odniesieniu do informacji na stronie 61 o przetoczeniu pacjentom napromieniowanego UKKCz (NUKCCz) niedosyt budzi brak omówienia w *Części teoretycznej* tego składnika i wpływu napromieniowania na krwinki czerwone i jakość KKCz. Napromieniowanie promieniami gamma istotnie wpływa na erytrocyty, co wymaga zgodnie z obowiązującymi przepisami skrócenia czasu ich przechowywania do 28 dni.

Doktorantka podjęła się trudnego zadania badawczego - sprawdzenia hipotezy zakładającej, że supernatanty z przechowywanych przez 42 dni KKCz, w szczególności z niefiltrowanych jednostek wykazują działanie pro-zakrzepowe, pro-oksydacyjne oraz że mogą one wzmacniać proliferację komórek nowotworowych. Opierając się na szerokim przeglądzie piśmiennictwa mgr Kamila Czubak-Prowizor postawiła w pełni uzasadnione trzy cele badawcze: 1) ocena parametrów czynnościowych płytek krwi w krwi pełnej po uprzedniej inkubacji z supernatantami izolowanymi z KKCz oraz UKKCz w 1. oraz 42. dniu przechowywania, 2) ocena działania supernatantów izolowanych z KKCz oraz UKKCz w 1. oraz 42. dniu przechowywania na wybrane linie ludzkich komórek nowotworowych, 3) ocena wybranych markerów stresu oksydacyjnego po przetoczeniu koncentratu krwinek czerwonych lub koncentratu krwinek płytkowych u chorych na ostre białaczki szpikowe.

Realizując cel badawczy doktorantka zastosowała zasługującą na wyróżnienie bardzo szeroką gamę metod badawczych. W analizie statystycznej mgr Kamila Czubak-Prowizor zastosowała uznane metody statystyczne, pozwalające na wiarygodną ocenę uzyskanych wyników. Poniżej zgłaszam kilka uwag do tej części pracy:

Str. 56.

- Nieprawidłowo zostały podane akty prawne regulujące pobieranie krwi od dawców. Powinno być: ustawa z dnia 22 sierpnia 1997 r. o publicznej służbie krwi (Dz.U. 2019 r., p.1222), rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 11 września 2017 r. w sprawie warunków pobierania krwi od kandydatów na dawców krwi i dawców krwi (Dz.U. 2017 r., p. 1741).

Str. 61.

- Zastosowanie w badaniach *in vitro* KKCz i UKKCz, ale przeprowadzenie oceny wpływu przetoczeń innego rodzaju składnika (NUKCCz) znacznie utrudnia kompleksową analizę uzyskanych wyników badań.

- Wskazane jest podanie jakie NUKKP zostały przetoczone pacjentom ? zlewane z krwi pełnej, czy z aferezy ?

Str. 77.

- Podrozdział 9.3.5.3. Czas APTT nie jest czasem kefalinowo-kaolinowym tylko czasem częściowej tromboplastyny po aktywacji.

Str. 79, str. 80, str. 112.

- W metodzie oznaczania żywotności komórek, w metodzie oznaczania proliferacji komórek oraz w metodzie pomiaru wewnątrzkomórkowego poziomu RFT brak jest informacji jak były przygotowywane kontrole pozytywne.

Str. 85.

- W tytule podrozdziału 9.5 powinno być NUKKCz zamiast KKCz.

Najważniejszą częścią pracy są wyniki badań własnych opisane na 36 stronach. W tym obszernym zbiorze danych i porównań doktorantka przedstawiła informacje, które potrafiła logicznie uporządkować i poddać wielokierunkowej analizie. Otrzymane wyniki mają nie tylko znaczenie poznawcze ale również praktyczne. Wskazują one na korzyści wynikające z usuwania leukocytów z koncentratów krwinek czerwonych oraz potwierdzają, że substancje gromadzące się w nadsączu przechowywanych KKCz są aktywne biologicznie i niosą ze sobą ryzyko stymulowania niepożądanego reakcji poprzetoczeniowej. Poniżej wskazują drobne niedociągnięcia tego podrozdziału.

- Przedstawione ryciny nr 19, 21, 22, 24, 24, 25, 26, 27, 28 są zbyt małe, co znacznie obniża ich czytelność.

Str. 109, 110, 111,

- W badaniach opisanych w podrozdziałach 10.3.1.1.; 10.3.1.2.; 10.3.1.3.; brakuje oceny wpływu samej cisPt na przeżywalność, proliferację komórek oraz wewnątrzkomórkowy poziom RFT. Uniemożliwia to pełną ocenę wpływu działania supernatantów na badane parametry.

Str. 114, 115, 116, 117, 118, 119

- W badaniach opisanych w podrozdziałach 10.3.1.5.; 10.3.2.1.; 10.3.2.2.; brakuje oceny wpływu samej cisPt na aktywność kaspazy-3/7 oraz kaspazy-9, przeżywalność i proliferację komórek, oraz wewnątrzkomórkowy poziom RFT. Uniemożliwia to pełną ocenę wpływu działania supernatantów na badane parametry.

Str. 121

- W tytule podrozdziału 10.4. powinno być NUKKCz zamiast KKCz

Str. 122

- Rycina 43 - brak informacji do czego odnosi się informacja w legendzie „ $p < 0,001$ ”.

Str. 124

- Rycina 46 - brak informacji do czego odnosi się informacja w legendzie „ $*** p < 0,001$ ” oraz „ $\# p < 0,05$ ”.

- Rycina 47 - brak informacji do czego odnosi się informacja w legendzie „ $*** p < 0,001$ ”.

Str. 125

- Rycina 48 - brak informacji do czego odnosi się informacja w legendzie „ $** p < 0,01$ ”.

Str. 126

- Rycina 49 - brak informacji do czego odnosi się informacja w legendzie „*** $p < 0,001$ ” oraz „# $p < 0,05$ ”.

- Rycina 50 - brak informacji do czego odnosi się informacja w legendzie „*** $p < 0,001$ ” oraz „* $p < 0,05$ ”.

Str. 127

- Podrozdział 10.5. „*Retrospektywna analiza niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych zaistniałych w WWCOiT im. M. Kopernika w Łodzi w latach 2013-2016*” w moim przekonaniu nie wnosi do pracy doktorskiej istotnej informacji i jest zbędny. Tym bardziej, że we *Wprowadzeniu* Doktorantka nie zawarła przeglądu niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych.

Doktoranta przeprowadziła dyskusję na 23 stronach maszynopisu, w której przedstawiła przegląd badań oceniających wpływ czasu przechowywania koncentratu krwinek czerwonych na ryzyko wystąpienia niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych oraz porównanie wyników własnych z danymi z piśmiennictwa. Na podkreślenie zasługuje rezerwa, jaką doktoranta prezentuje do uzyskanych wyników i ostrożność z jaką formułuje wnioski na nich oparte. Dużą zaletą i osiągnięciem rozprawy jest wykonana ocena wpływu supernatantów KKCz na funkcje płytek krwi. Doktorantka wykazała, że w ubogoleukocytarnych koncentratkach krwinek czerwonych, w przeciwieństwie do składników nieubogoleukocytarnych obserwuje się znacząco mniejsze ilości bioaktywnych substancji zanieczyszczających. Substancje te mogą mieć wpływ modulujący układ odpornościowy biorcy składnika krwi, co może mieć znaczenie kliniczne, szczególnie w przypadku immunoterapii - metody coraz częściej stosowanej w leczeniu chorych na nowotwory. Stwierdzona przez doktorantkę mniejsza generacja mikrocząsteczek oraz brak uwalniania cytokin w ubogoleukocytarnych koncentratkach krwinek czerwonych w porównaniu do KKCz i KKCz bez kożuszka leukocytarno-płytkowego dostarczają ważne argumenty do toczącej się dyskusji nad wprowadzeniem powszechnego stosowania leukoredukcji w składnikach krwi w naszym kraju. Stąd też wyniki otrzymane przez doktorantkę mogą mieć duże znaczenie praktyczne. Na szczególne wyróżnienie zasługują nowatorskie badania oceniające działanie supernatantów KKCz na linie ludzkich komórek nowotworowych oraz ich wpływ na cytotoksyczność cisplatyny. Niedosyt budzi brak omówienia w dyskusji wpływu napromieniowania KKCz i UKKCz na badane zjawiska.

Z obowiązku recenzenta zgłaszam poniższe uwagi redakcyjne:

Str. 133

- Stwierdzenie: „Interesujący jest fakt, że KKCz otrzymane od dawców płci męskiej charakteryzują się większym poziomem hemolizy w porównaniu do jednostek uzyskanych od kobiet [84].” Budzi dużą wątpliwość i nie ma oparcia w cytowanej publikacji.

Str. 148

- W związku z badaniami pacjentów z AML, którym przetoczono napromieniowane składniki krwi wskazane jest poprawienie KKCz na NKKCz oraz UKKCz na NUKKCz.

Str. 154-155

- Zgodnie z moją wcześniejszą uwagą dotyczącą podrozdziału 10.5. sugerowałbym usunięcie końcowego fragmentu dyskusji dotyczącego podsumowania stwierdzonych w WWCOiT im. M. Kopernika w Łodzi niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych.

Rozprawę kończy czteropunktowe podsumowanie wyników oraz 3 wnioski stanowiące dowód, że autorka w pełni zrealizowała zamierzenie badawcze przedstawione w celu pracy. Proponuję doprecyzować treść wniosków, tak by odnosiły się tylko do badań, które zostały wykonane w ramach pracy doktorskiej.

Str. 157

- We wnioskach 1 i 2 należy uzupełnić, że dotyczą one badań *in vitro*.
- Druga część wniosku 1 „...nadreaktywność płytek krwi po przetoczeniu KKCz może być jedną z przyczyn występowania powikłań zakrzepowo-zatorowych u niektórych biorców.” jest tylko przypuszczeniem, które nie opiera się na wynikach wykonanych badań, ponieważ nie zostały przeprowadzone obserwacje na pacjentach. Moim zdaniem ta część wniosku powinna zostać usunięta.
- Trzeci wniosek wymaga doprecyzowania, że zostały przetoczone NUKKCz i NUKKP. Druga część tego wniosku „...co może mieć istotne znaczenie w przebieg kliniczny choroby i zastosowane leczenie (chemioterapię).” jest spekulacją – wpływ na przebieg kliniczny nie był badany w ocenianej rozprawie.

Nie jestem przekonany o konieczności podawania całej legendy w spisie tabel i rycin. Moim zdaniem wystarczyłby sam tytuł.

Wymienione wyżej uchybienia w głównej mierze redakcyjne w nie rzutują istotnie na wartość pracy. Reasumując, stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska jest opracowaniem ciekawym, o znaczeniu praktycznym i stymulującym do dalszych badań. W pełni odpowiada ona na wytyczony cel pracy. Magister Kamila Czubak-Prowizor wykazała umiejętność zaplanowania badań, przedstawienia wyników i właściwej ich interpretacji w oparciu o znajomość światowego i rodzimego piśmiennictwa oraz dużą wiedzę w zakresie tematu rozprawy.

W moim przekonaniu oceniana praca spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora nauk biologicznych wnosząc przeto wniosek do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Kamili Anny Czubak-Prowizor do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. n. med. Piotr Radziwon