

Dr hab. n. med. Tomasz Czerw
Narodowy Instytut Onkologii
im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy
Oddział w Gliwicach

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgra ROMANA MAŁACHOWSKIEGO
pt. „Bezpieczeństwo i wydajność procesu pobierania krwiotwórczych komórek
macierzystych z krwi obwodowej za pomocą separatora komórkowego”**

Wstęp

Przeszczepienie krwiotwórczych komórek macierzystych (ang. hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) jest uznaną metodą wykorzystywaną w leczeniu wielu nowotworów układu krwiotwórczego i chłonnego, a także niektórych schorzeń nienowotworowych, która pozwala potencjalnie uzyskać wyleczenie. W przypadku, gdy komórki krwiotwórcze zostały pozyskane od chorego mamy do czynienia z procedurą ich autotransplantacji (ang. autologous HSCT, autoHSCT), natomiast gdy pochodzą od honorowego dawcy mówimy o procedurze allotransplantacji (allogeneic HSCT, alloHSCT). Jeżeli chodzi o procedurę alloHSCT, dawcą jest najczęściej zgodna w zakresie głównego układu zgodności tkankowej (ang. human leukocyte antigens, HLA) osoba niespokrewniona lub też rodzeństwo pacjenta. W ostatnich latach możliwe stało się także wykonywanie transplantacji od tzw. dawców haploidentycznych, czyli w połowie zgodnych w zakresie HLA (rodzice, rodzeństwo bądź też dzieci chorego). Warunkiem niezbędnym do powodzenia procedury jest przeszczepienie odpowiedniej liczby krwiotwórczych komórek macierzystych. Ich źródłem może być szpik kostny, krew obwodowa bądź też krew pępowinowa. Obecnie komórki krwiotwórcze pobierane metodą aferezy z krwi obwodowej są wykorzystywane jako materiał transplantacyjny w przypadku praktycznie wszystkich procedur autotransplantacji oraz w blisko 70% zabiegów transplantacji allogenicznych. Afereza krwiotwórczych komórek macierzystych jest więc integralną częścią procedury transplantacyjnej, której skuteczność i

bezpieczeństwo warunkuje możliwość prowadzenia jej kolejnych etapów. Separator Spectra Optia (Terumo BCT) jest systemem często wykorzystywanym w pracowniach aferez. Pobieranie macierzystych komórek krwiotwórczych z użyciem procedury MNC (ang. mononuclear cell collection) jest stosowane od wielu lat i jest dokładnie scharakteryzowane w literaturze. Natomiast procedura ciągłego pobierania komórek jednojądrzastych cMNC (ang. continuous mononuclear cell collection) jest dostępna od kilku lat, a co za tym idzie doświadczenie kliniczne z nią związane jest mniejsze.

Mgr Roman Małachowski w swojej pracy doktorskiej podążył nakreślonym powyżej tropem. Podjął się porównania nowej procedury cMNC z procedurą MNC systemu aferezy Spectra Optia. Ponadto podjął próbę porównania i znalezienia najlepszego algorytmu, który można stosować przy przewidywaniu uzysku i określaniu objętości krwi do przetworzenia, zarówno dla protokołu MNC, jak i cMNC. Temat ten, szczególnie jeżeli chodzi o część dotyczącą poszukiwania najlepszego algorytmu, należy uznać za nowatorski i atrakcyjny naukowo, a jego podjęcie – za w pełni uzasadnione.

Struktura pracy

Praca ma typową strukturę obejmującą „Wstęp”, „Założenia i cele pracy”, „Metodykę”, „Wyniki”, „Dyskusję”, „Podsumowanie i wnioski”, „Streszczenie” oraz „Bibliografię”. Całość, zawarta na 115 stronach, jest uzupełniona o spis treści oraz wykaz skrótów.

UWAGA: Umieszczenie dodatkowo wykazu rycin oraz tabel umożliwiłoby czytelnikowi łatwiejsze odnajdywanie treści zwartych w pracy.

Ocena poszczególnych rozdziałów

Wstęp

We wstępie przedstawiono najistotniejsze informacje na temat transplantacji, rodzaju dawców i źródeł komórek krwiotwórczych oraz sposobów ich mobilizacji i peryferyzacji do krwi obwodowej. W sposób szczegółowy i wyczerpujący omówiono zagadnienia techniczne i kliniczne dotyczące procedur aferez, z uwzględnieniem systemu Spectra Optia i protokołów MNC i cMNC będącymi przedmiotem analizy. Omówiono także i przedstawiono tabelarycznie dotychczasowe doniesienia literaturowe dotyczące wykorzystania

poszczególnych algorytmów w optymalizacji procesu mobilizacji i gromadzenia komórek krwiotwórczych.

Struktura tego rozdziału jest optymalna. Adekwatnie wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy i przekonująco uzasadnia podjęcie tematu. Na szczególne wyróżnienie zasługuje część dotycząca aferez, która może służyć jako kompendium wiedzy dla personelu chcącego podjąć pracę i pracującego w pracowniach aferez.

Pewne, drobne, zastrzeżenia dotyczą warstwy językowej oraz kilku uwag merytorycznych, które w głównej mierze odnoszą się do części klinicznej. Nie wpływają one jednak znacząco na wysoką ocenę tej części dysertacji.

UWAGI:

W „Wykazie skrótów” na str. 4 zamiast „szpiczak mnogiego” powinno być „szpiczak mnogi”.

Należy zwrócić uwagę i ujednoczyć mianownictwo. W odniesieniu do procedury auto/alloHSCT powinno się używać terminu "przeszczepienie" lub „transplantacja”, a nie "przeszczep". Przeszczep natomiast to materiał (tkanka lub narząd) przeszczepiany.

W odniesieniu do komórek krwiotwórczych (rzeczownik policzalny), powinno się używać sformułowania liczba, a nie ilość. Autor używa tych określeń naprzemiennie i niekonsekwentnie.

Na str. 9 doktorant odnosi się do raportu Europejskiej Organizacji ds. Krwi i Transplantacji Szpiku (EBMT) z 2017 r. wymieniając między innymi wzrost liczby „przeszczepów komórek niehematopoetycznych”. Ta terminologia nie jest użyta prawidłowo, gdyż ta część cytowanego raportu odnosi się do liczby terapii komórkowych, takich jak np. infuzje limfocytów dawcy. Podobnie, leczenie z użyciem genetycznie modyfikowanych limfocytów T – CAR-T cells (ang. chimeric antigen receptor T cells) nie powinno być określane mianem transplantacji, a raczej immunoterapii.

W części dotyczącej mobilizacji komórek krwiotwórczych warto usystematyzować i zwrócić uwagę, że w przypadku honorowych, zdrowych dawców stosuje się wyłącznie mobilizację z użyciem czynnika wzrostu kolonii granulocytów (ang. granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), natomiast mobilizacja z użyciem G-CSF +/- chemioterapii +/- pleryksafor dotyczy pozyskiwania komórek krwiotwórczych do procedury autoHSCT. Autor

podaje, że w ostatnich latach wykazano bardzo dobre efekty chemomobilizacji z wykorzystaniem średnich dawek cytarabiny (ID-AraC) oraz G-CSF u pacjentów z chłoniakami ziarniczymi i nieziarniczymi. Warto uzupełnić, że dotyczy to także chorych na szpiczaka plazmocytoowego.

Podobnie w części dotyczącej dostępu naczyniowego warto zwrócić uwagę, że w przypadku honorowych, zdrowych dawców wykorzystuje się w przeważającej mierze dostęp do żył obwodowych, natomiast dostęp do żył centralnych dotyczy częściej chorych przygotowywanych do procedury autoHSCT.

Założenia i cel pracy

Cele pracy podzielono na trzy części:

1. Retrospektywne porównanie nowej procedury cMNC z procedurą MNC systemu aferezy Spectra Optia.
2. Retrospektywna walidacja algorytmów optymalizacji procesu gromadzenia komórek krwiotwórczych dla obu procedur cMNC i MNC.
3. Prospektywna ocena wybranego algorytmu oraz porównanie wyników z danymi zgromadzonymi retrospektywnie.

Przedstawione założenia są słuszne. Cele zostały sformułowane prawidłowo.

UWAGA: Cele mogły być przedstawione bardziej zwięźle. Autor niepotrzebnie streszcza tu ponownie dane uzasadniające podjęcie analizy przedstawione już szczegółowo we wstępie.

Pacjenci i metody

Grupę badaną stanowiło w ocenie retrospektywnej (cele analizy 1 oraz 2) 100 chorych na szpiczaka plazmocytoowego i chłoniaki poddanych procedurom MNC i cMNC (50 chorych na każdą z procedur), natomiast prospektywnie (cel 3 analizy) oceniono 41 chorych poddanych procedurze cMNC. U większości pacjentów zastosowano przed aferezą chemomobilizację, głównie z użyciem średnich dawek cytarabiny (ID-AraC) i G-CSF. Przedstawiono opis procedur pobierania komórek krwiotwórczych oraz metodykę oznaczania liczby komórek

krwiotwórczych CD34+. Metody analizy statystycznej zostały opisane w sposób wyczerpujący. Rozdział od strony merytorycznej i edytorskiej nie budzi zastrzeżeń. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi.

UWAGI: Nie podano wprost w której jednostce i komórce organizacyjnej przeprowadzono procedury aferez. Warto również wymienić w kilku punktach kryteria włączenia do analizy.

Wyniki

Jest to obszerny rozdział, w którym zaprezentowano wyniki dużej liczby analiz adekwatnych do założonych celów badania i przyjętej metodyki. Edycja tego rozdziału jest bardzo przejrzysta, a zamieszczenie licznych tabel i rycin ułatwia szybką orientację. Wyniki przedstawiono w sposób logiczny. Wiele z nich ma charakter nowatorski i stanowi o dużej wartości rozprawy. Na szczególną uwagę zasługuje wykazanie:

1. Porównanie protokołów MNC i cMNC:

- wydajność pobierania oparta na wyjściowej liczbie komórek CD34⁺ (CE2) była statystycznie wyższa dla protokołu MNC w porównaniu do cMNC
- ilości podanego pacjentowi antykoagulantu ACD(A) oraz liczba pobranych do pojemnika kolekcyjnego granulocytów nie różniły się pomiędzy procedurą MNC i cMNC
- w obu badanych grupach zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy liczbą przetworzonych TBV (ang. total blood volume) i ubytkiem płytek krwi u pacjenta
- protokół cMNC powoduje istotne statystycznie obniżenie poziomu hemoglobiny u pacjenta w odróżnieniu od protokołu MNC. Protokół MNC powoduje natomiast większą utratę płytek u pacjentów w porównaniu do cMNC.

2. Retrospektywna walidacja algorytmów:

- wyniki walidacji procedury MNC dały zbliżone wyniki dla wszystkich ocenianych algorytmów, zarówno w wyznaczeniu przewidzianego uzysku, jak i objętości krwi do przetworzenia. Wyniki te były spójne niezależnie od wyjściowej liczby komórek CD34⁺ we krwi pacjenta.

- w odniesieniu do procedury cMNC, algorytmy stworzone z wykorzystaniem regresji liniowej i nieliniowej miały tendencję do przeszacowywania uzysku lub wykazywały umiarkowaną korelację w przypadku liczby komórek CD34+ <100/ μ L krwi pacjenta przed aferezą. Jednocześnie, algorytmy te mogą nie doszacować objętości krwi do przetworzenia, co może skutkować koniecznością powtórzenia aferezy lub brakiem uzyskania odpowiedniej liczby komórek do transplantacji.
 - algorytm oparty na średniej wydajności CD34+ CE2 w przypadku obu procedur MNC i cMNC dał najlepszy rezultat, tj. wysoki stopień korelacji oraz brak tendencji do przeszacowania lub niedoszacowania.
3. Prospektywna walidacja algorytmu opartego na średniej wydajności CD34+ CE2 dla procedury cMNC:
- zastosowanie algorytmu w określaniu objętości krwi do przetworzenia skróciło czas procedury i ilość podanego pacjentowi antykoagulantu.

UWAGA: Brak legendy opisującej, jaki kolor wykresów odpowiada procedurze MNC i cMNC na rycinach dotyczących czynników mających wpływ na wydajność pobierania komórek CD34+ i płytek krwi.

Dyskusja

W dyskusji autor omawia wyniki własnych obserwacji w kontekście danych literaturowych. Jest to bogate i kompetentne opracowanie z krytycznym odniesieniem się do zaobserwowanych różnic. Tok dyskusji wskazuje na dużą wiedzę ekspercką autora oraz zdolność analitycznego podejścia do uzyskanych wyników. Autor słusznie podkreśla oryginalność swoich wyników w odniesieniu do analizy poszczególnych algorytmów predykcji uzysku krwiotwórczych komórek macierzystych, jak i objętości krwi do przetworzenia dla procedur MNC i cMNC. Przedstawia także przydatne klinicznie sugestie wynikające z uzyskanych wyników, odnośnie zalet i wad poszczególnych procedur (MNC i cMNC) oraz rekomenduje algorytm oparty na średniej wydajności CE2, jako najlepszy do stosowania w praktyce klinicznej.

UWAGA:

W kilku fragmentach dyskusji autor stwierdza, że w przypadku niedoszacowania objętości krwi do przetworzenia przy użyciu danego algorytmu, może to skutkować koniecznością powtórzenia aferezy lub nawet nieudaną mobilizacją. Bardziej precyzyjne wydaje się być stwierdzenie, że może to skutkować koniecznością powtórzenia aferezy lub brakiem uzyskania odpowiedniej liczby komórek do transplantacji. Sam proces mobilizacji może natomiast być skuteczny.

Wnioski

Wnioski są sformułowane prawidłowo. Odpowiadają postawionym celom i uzyskanym wynikom.

Bibliografia


Piśmiennictwo obejmuje 128 pozycji, pochodzących w większości z XXI wieku. Są one w pracy odpowiednio cytowane.

Podsumowanie

W przedstawionej do oceny pracy podjęto oryginalny i ważny z punktu widzenia praktyki klinicznej temat badawczy. Zastosowana metodyka pozwoliła na realizację założonych celów. Autor dowiódł umiejętności samodzielnego planowania i realizacji zadania naukowego, a także interpretacji wyników na tle właściwie wykorzystanego piśmiennictwa. Przedstawione uwagi, dotyczące w przeważającej mierze warstwy nomenklaturowej i edytorskiej, nie wpływają w sposób istotny na wysoką ocenę dysertacji. Praca „Bezpieczeństwo i wydajność procesu pobierania krwiotwórczych komórek macierzystych z krwi obwodowej za pomocą separatora komórkowego” odpowiada kryteriom stawianym rozprawom na stopień naukowy doktora.

Przedstawiam zatem Radzie Wydziału Lekarskiego w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi wniosek o dopuszczenie mgra Romana Małachowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę o uznanie pracy za wyróżniającą.

6191376
Dr hab.n.med. Tomasz Czerw
specjalista chorób wewnętrznych
specjalista hematologii
specjalista transplantologii klinicznej
LEKARZ

 7