

Białystok, 13 czerwca 2022 r.

Dr hab. n. med. Łukasz Bołkun

Klinika Hematologii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Wojciecha Fidyka „Subpopulacje limfocytów i profil cytokinowy w materiałach przeszczepowych pobieranych z krwi lub szpiku zdrowych dawców komórek macierzystych”

Przeszczepy komórek macierzystych od dawcy niespokrewnionego są uznana i powszechnie stosowaną metodą leczenia wielu chorób hematologicznych. W zależności od wskazań klinicznych oraz zgody dawcy, komórki te mogą być pozyskiwane w różny sposób. Najczęściej wykorzystywanymi źródłami są krew obwodowa po przeprowadzeniu procedury mobilizacji z wykorzystaniem granulocytarnego czynnika wzrostu (G-CSF) oraz szpik kostny. Mechanizmy mobilizacji za pomocą G-CSF nie zostały jeszcze w pełni wyjaśnione. Wiadomo, że G-CSF indukuje funkcjonalne zmiany w mikrośrodowisku szpiku, a enzymy uwalniane z komórek linii mieloidalnej trawią cząsteczki adhezyjne i upośledzają interakcje między chemokinami, ich receptorami i istotą międzykomórkową, prowadząc do uwolnienia komórek macierzystych (HSC-*hematopoietic stem cells*) do krwiobiegu. Wskutek aktywności G-CSF nasila się dojrzewanie komórek mieloidalnych w kierunku granulocytów. Komórki te uwalniają aktywne proteazy neutrofilowe katepsynę G i elastazę, jak również metaloproteinazę-9. To z kolei powoduje trawienie cząsteczek adhezyjnych, jak VCAM-1 (*Vascular cell adhesion protein 1*), CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*) i SDF-1 (*stromal-derived-factor-1*). Zaobserwowano także, że w fazie odnowy hematopoezy pomielosupresyjnej, ale nie mieloablacyjnej chemioterapii, liczba PBSC (*peripheral blood stem cells*) istotnie wzrasta. Ma to najprawdopodobniej złożony mechanizm, wtórny do wydzielania wielu cytokin odgrywających rolę w regeneracji krwiotworzenia. Możliwa jest

także nadprodukcja granulocytów obojętnochłonnych i wydzielanych przez nie enzymów proteolitycznych, które wpływają na uwalnianie do HSC krwioobiegu, czyli tak zwaną mobilizację. Jednakże, co należy podkreślić, wpływ poszczególnych cytokin lub udział poszczególnym subpopulacji limfocytów i ich wpływ na zdolność mobilizacji komórek CD34+ jest nadal skąpy. Dlatego też wybrany przez Doktoranta temat pracy należy uznać za aktualny i w pełni uzasadniony.

Przedstawiona do recenzji praca liczy 83 strony. Pracę uzupełniają: zamieszczony na początku spis użytych w tekście skrótów, spis treści oraz umieszczone na końcu: spis tabel, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis 123 pozycji piśmiennictwa.

W opracowaniu umieszczono 1 rycinę i 14 tabel. Praca napisana jest poprawną polszczyzną, pod względem edytorskim jest wykonana staranie, jednak Autor nie ustrzegł się pojedynczych błędów literowych i stylistycznych. Na pochwałę zasługuje fakt, że praca napisana jest jasnym, precyzyjnym językiem.

We wstępie Autor w wyczerpujący i jasny sposób przedstawił niezwykle rzetelnie aktualny stan wiedzy w zakresie wybranego przez siebie tematu. Swobodny sposób poruszania się w obszarze tego trudnego zagadnienia dowodzi dojrzałości naukowej Autora. Tekst wstępu według recenzenta mógłby być uzupełniony o zbiorczą tabelę cytokin lub rycinę przedstawiającą interakcję środowiska szpiku, co ułatwiłoby czytelnikowi zrozumienie zagadnienia.

W rozdziale „Cel pracy” autor przedstawił cztery cele podjętego projektu badawczego, polegającego na: 1) porównaniu stężeń cytokin prozapalnych i immunosupresyjnych we krwi i szpiku kostnym zdrowych dawców komórek macierzystych, 2) ocenie procentowego udziału poszczególnych subpopulacji we krwi oraz szpiku kostnym zdrowych dawców komórek macierzystych, 3) porównaniu skuteczności poboru hematopoetycznych komórek macierzystych z uwzględnieniem wybranych parametrów morfologii krwi i metod poboru, 4) analizie związku pomiędzy stężeniem wybranych cytokin, poziomu subpopulacji limfocytów oraz wybranych parametrów morfologii krwi na skuteczność poboru hematopoetycznych komórek macierzystych.

Materiał do badań pochodzący od 100 zdrowych osób pochodził od dwóch rodzajów dawców komórek macierzystych. Pierwszą grupę stanowili dawcy szpiku, a materiał

pozyskano jako integralną część donacji szpiku kostnego dla biorcy przeszczepu allogenicznego. Grupę drugą stanowili dawcy komórek macierzystych pozyskiwanych z krwi obwodowej metodą leukaferozy.

Wszystkie wykorzystane w badaniu próbki szpiku kostnego oraz krwi obwodowej pochodziły od zdrowych dawców hospitalizowanych w Klinice Transplantacji Szpiku i Onkohematologii Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego, oddział w Gliwicach.

Badania wykonano zgodnie z protokołem zaakceptowanym przez Lokalną Komisję Bioetyczną (uchwała KB/430-51/12 z dnia 15.02.20212).

Należy podkreślić staranność opisu przeprowadzonych i wykorzystanych przez Doktoranta metod badawczych, w tym cytometrii przepływowej użytej w celu analizy subpopulacji limfocytów krwi obwodowej. Do opisanej metody załączona jest tabela z dokładnym podaniem odpowiedniego przeciwciała użytego do analizy poszczególnego antygeny celem identyfikacji poszczególnej subpopulacji limfocytów.

Rozdział „Wyniki” jest bardzo szczegółowy i posiada charakter opisowy. Prawie każdy oceniany parametr jest przedstawiony w postaci tabeli lub ryciny, co bardzo ułatwia śledzenie tekstu i sposobu realizacji badań.

W pierwszej części rozdziału Doktorat ocenił w próbkach szpiku kostnego oraz krwi obwodowej, pobranych od dawców poddanych stymulacji czynnikiem wzrostu, dziewięć cytokin i wykazał znacznie wyższe stężenie IL-10, IL-2 IL-1 β oraz IFN- γ w krwi obwodowej w porównaniu do stężeń uzyskanych w szpiku kostnym. Jedynie w przypadku cytokiny TGF- β 1 stężenie uzyskane w szpiku było statystycznie wyższe w porównaniu do krwi obwodowej. W przypadku pozostałych cytokin Autor nie wykazał istnienia znamienne statystycznych różnic.

Następnie w kolejnej części pracy Autor w analizie z wykorzystaniem cytometrii przepływowej wykazał znacznie wyższe odsetki limfocytów, odsetki limfocytów T CD3+, limfocytów T-pomocniczych, komórek NK, oraz stosunku CD4+/CD8+ we krwi obwodowej w porównaniu do analizowanych parametrów szpiku kostnego. Jedynie w przypadku limfocytów B, odsetek ten był znamienne statystycznie wyższy w szpiku kostnym w porównaniu do uzyskanych wartości limfocytów B we krwi obwodowej.

Jednocześnie, w dalszej części rozdziału, Doktorant na podstawie uzyskanych stężeń cytokin jak i odsetka subpopulacji limfocytów wykazał brak istnienia statystycznych zależności pomiędzy stężeniami analizowanych cytokin, parametrów morfologii krwi, a liczbą komórek CD34+ w materiale przeszczepowym uzyskanym po mobilizacji, zarówno z krwi obwodowej jak i szpiku kostnego. Z drugiej strony, Doktorant wykazał możliwość prognozowania ilości komórek macierzystych w materiale przeszczepowym na podstawie odsetka limfocytów, a w szczególności limfocytów T pomocniczych oraz komórek NK we krwi obwodowej dawcy szpiku w momencie mobilizacji.

Należy podkreślić, iż praca ta stanowi pierwszą taką analizę mikrośrodowiska komórek krwiotwórczych u zdrowych dawców komórek macierzystych, pod kątem potencjalnego wpływu na skuteczność pobrania materiału przeszczepowego. Recenzent zachęca Doktoranta do podjęcia dalszej pracy w tej tematyce, a w szczególności podjęcie próby oceny zależności pomiędzy stężeniami uzyskanych cytokin w materiale przeszczepowym, a czasem potrzebnym do zasiedlenia szpiku i podjęcie funkcji przez komórki macierzyste.

Jedyną uwagą jaką ma recenzent do opisu przez Doktoranta wyników i różnic statystycznych, jest częste podawanie informacji głównie na rycinie o tym, że p było poniżej 0,05, nie podając przy tym dokładnych wartości p , co wydaje się kluczowe dla pokazania siły obserwowanej istotności statystycznej.

Następnie wyniki zostały omówione wyczerpująco w szerokiej, wnikliwej i krytycznej dyskusji opartej o współczesne, dobrze dobrane piśmiennictwo. Przeprowadzona dyskusja świadczy o dużej wiedzy doktoranta oraz krytycznym podejściu do uzyskanych wyników.

Podsumowanie pracy stanowi 5 uzasadnionych wniosków, wypływających z uzyskanych wyników badań, odpowiadających na założony cel badań.

Podsumowując stwierdzam, iż przedstawiona mi do oceny praca mgr Wojciecha Fidyka charakteryzuje się trafnością wyboru tematu oraz stanowi wartościowy i oryginalny dorobek naukowy. Doktorant wykazała się umiejętnością wykorzystania dostępnej bibliografii oraz formułowania celów planowanych badań naukowych i wniosków z nich wypływających. Zawarta w rozprawie analiza tematu jest spójna i przyczynia się do lepszego poznania omawianej tematyki, toteż jest cennym uzupełnieniem dostępnego piśmiennictwa

naukowego. Autor nie ustrzegł się drobnych błędów edycyjnych, które jednak nie umniejszają wartości pracy i zostały szczegółowo omówione z Doktorantem. Autor w pełni zrealizował zaplanowany cel, dobrze opanował niełatwy warsztat badawczy i wykazał doskonałe przygotowanie merytoryczne. Rozprawa ma dużą wartość poznawczą i stanowi podstawę do kontynuowania badań naukowych w tej dziedzinie.

Wykorzystanie przez doktoranta nowoczesnego, odpowiadającego najwyższym standardom światowym warsztatu naukowego, oryginalne, o dużej wartości naukowej wyniki przeprowadzonych badań, a dodatkowo rzeczowa i krytyczna ocena uzyskanych własnych danych oraz wysoka staranność opracowania statystycznego wyników, jak również szata graficzna, upoważniają mnie do wystąpienia do Wysokiej Rady o przyznanie wyróżnienia za wybitną rozprawę doktorską.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca autorstwa lekarza Wojciecha Fidyka spełnia wszystkie warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 oraz art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2018r poz. 1669 z późn.zm). Tym samym zwracam się do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. M Skłodowskiej- Curie – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie magistra Wojciecha Fidyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Łukasz Bołkun

dr hab. med. Łukasz Bołkun
specjalista w dziedzinie
hematologii, transplantologii
2255551

U3