



Prof.dr hab. Krystyna Bieńkowska-Szewczyk
Uniwersytet Gdański
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed
Zakład Biologii Molekularnej Wirusów
Abrahama 58, 80-307 Gdańsk
Tel. (58) 523 6381
e-mail:krystyna.bienkowska-szewczyk@biotech.ug.gda.pl

Gdańsk, 8 listopada 2024

Recenzja pracy doktorskiej Pani Mgr Dagny Lorent zatytułowanej:

Analiza poziomu przeciwciał po zakażeniu SARS-CoV-2 albo szczepieniu przeciwko COVID-19 w populacji wielkopolskiej w latach 2020-2022

Praca doktorska Pani Mgr Dagny Lorent jest oparta na badaniach przeprowadzonych w okresie pandemii wywołanej przez koronawirusa SARS-CoV-2. Skala i skutki tej pandemii były tak ogromne, że wyboru tematu pracy nie trzeba uzasadniać – praca stanowi wkład do globalnej analizy zjawisk zachodzących w trakcie pandemii, a w szczególności charakterystyki odpowiedzi humoralnej na zakażenie i szczepienia. Przedstawione w pracy mgr Lorent badania prowadzone równoległe z rozwojem pandemii i odzwierciedlające dynamikę zdarzeń nie tylko dotyczących wykrywania przeciwciał anty-SARS-CoV2, ale także m.in. dostępności i kolejności podawania szczepionek, metod testowania i ochrony przed infekcją, stanowią swoistą kronikę i wizualizację przebiegu pandemii w określonej populacji – mieszkańców Poznania.

Rozprawa doktorska jest oparta na czterech artykułach opublikowanych w latach 2021- 2024. Wszystkie artykuły opublikowane zostały w tym samym czasopiśmie : Vaccines (MDPI) i ukazywały się w kolejnych latach, stanowią więc spójny cykl publikacji, zawierający szeroki zbiór informacji seroepidemiologicznych.

W pierwszym okresie pandemii w wielu krajach prowadzono badania nad skalą i rozprzestrzenieniem się zakażeń SARS-CoV2 i natychmiast publikowano wyniki takich badań, zgodnie z przyjętym międzynarodowym porozumieniem o powszechnej dostępności do danych dotyczących pandemii, zarówno danych dotyczących samego wirusa jak i różnego typu analiz epidemiologicznych. Badania takie były prowadzone zarówno przez instytucje rządowe jak i laboratoria naukowe i wymagały współpracy naukowców i klinicystów. W ten nurt wpisała się pierwsza z włączonych do rozprawy doktorskiej publikacji. W tym artykule, opublikowanym w 2021r., zatytułowanym "Prevalence of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Poznan", Poland, after the First Wave of the COVID-19 Pandemic" badania były oparte o dużą zróżnicowaną grupę ochotników, liczącą 1500 osób, dobranych tak, aby była to grupa reprezentatywna wg



różnych kryteriów , takich jak płeć , wiek i objawy chorobowe. Co ważne, dla kilku uczestników badania udało się porównać wyniki po 10 tygodniach po pierwszych testach. Ponieważ w tym czasie (w okresie letnim 2020 r) skala zakażeń w Polsce była wciąż nieznaczna, obecność przeciwciał anti-SARS-CoV-2 wykryto u niewielkiej liczby osób, więc możliwości interpretacji i porównania danych dla różnych uczestników badania były ograniczone. Wskazano jednak na czynniki, które sprzyjają zakażeniu, takie jak podeszły wiek czy intensywne kontakty socjalne, co raportowano w wielu krajach. Dzisiaj te wnioski wydają się oczywiste, co jednak wynikało z nagromadzenia i weryfikacji danych w różnych populacjach. Bardzo istotne było potwierdzenie, że przeciwciała wykrywano u osób nie chorujących na Covid (zakażenie bezobjawowe), co w tamtym czasie było jeszcze przedmiotem dyskusji. Wszystkie analizy były wykonane i porównane przy użyciu komercyjnych testów ELISA i Western blotting , co pozwoliło na ocenę i porównanie wiarygodności tych testów. W dyskusji zawartej w tej publikacji ciekawym elementem była próba porównania wyników badań uzyskanych w Poznaniu z danymi z Madrytu; natomiast nie podjęto próby porównania danych z Poznania z częstością występowania przeciwciał anti-SARS-CoV-2 w innych rejonach Polski , co zapewne byłoby trudne tym okresie ze względu na bardzo ograniczoną dostępność szczegółowych danych w skali krajowej.

Wiele raportów publikowanych zarówno w tym pierwszym okresie jak i w latach późniejszych, dotyczyło analizy częstości pojawiania się przeciwciał anti-SARS CoV2 w wybranych grupach zawodowych , szczególnie tych , gdzie ryzyko zakażenia uważano za najwyższe, takich jak personel medyczny. W trzech późniejszych publikacjach badania Doktorantki skupiły się na określonych grupach zawodowych.

Pierwsza z tych prac (The longitudinal analysis on the anti-SARS-CoV-2 antibodies among healthcare workers in Poland—before and after BNT126b2 mRNA COVID-19 vaccination), była opublikowana w 2022 r, w zupełnie innej sytuacji epidemiologicznej i dotyczyła ograniczonej grupy osób , 90-ciu pracowników medycznych z dwóch jednostek klinicznych : Kliniki Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz Oddziału Położniczo-Ginekologicznego Szpitala Powiatowego we Wrześni. Tak ściśle zdefiniowana grupa mogła być monitorowana dużo bardziej precyzyjnie. Zebrane dane pokazały nie tylko ogromny wzrost zakażeń w okresie objętym badaniem, ale także duże zróżnicowanie danych serologicznych. Był to okres tzw. drugiej fali pandemii, gdy pojawiły się nowe, bardziej wirulentne i szybciej rozprzestrzeniające się warianty SARS-CoV2, a jednocześnie pojawiły się szczepionki mRNA . Możliwe było określenie ilości przeciwciał przed i po infekcji , po pierwszej i drugiej dawce szczepionki oraz po różnym upływie czasu od szczepienia. Co więcej , dwie jednostki szpitalne na których oparły się badania, reprezentowały różne środowiska kliniczne o odmiennym profilu personelu i pacjentów. Uzyskano więc szeroką gamę wyników serologicznych; poszukiwano zależności w zakresie częstości, tempa pojawiania się i zanikania

przeciwciał anty-SAR-CoV-2, wskazując m.in. na wpływ wcześniejszego przebycia COVID-19 na poziom przeciwciał poszczepiennych. W pracy zastosowano testy zarówno skierowane na wykrywanie białka S jak i białka N, co umożliwiło rozróżnianie odpowiedzi na zakażenie i reakcji na szczepienie. Wyniki potwierdziły udokumentowaną już na całym świecie wysoką skuteczność szczepionek mRNA, przy czym pokazały, że działają one niezależnie od płci i wieku. Opublikowanie takich wyników było w tym czasie bardzo istotnym i potrzebnym argumentem w sytuacji wahania, niepewności i obaw przed przyjmowaniem szczepionek, co było problemem także w środowiskach medycznych.

W następnej pracy badania skupiły się na grupie nauczycieli, zgodnie z założeniem, że podobnie jak personel medyczny, jest to grupa szczególnie narażona na zakażenie ze względu na szerokie kontakty społeczne. W artykule: "Differences in BNT126b2 and ChAdOx1 Homologous Vaccination Antibody Response among Teachers in Poznan, Poland" opublikowanym rok później (2023r) opisano analizy wykonane po szczepieniach rozpoczętych w 2021 r, skupiając się na porównaniu działania dwóch rodzajów szczepionek, szczepionki opartej na mRNA i wektorowej, skonstruowanej na bazie adenowirusa. Wśród 81 nauczycieli, którzy uczestniczyli w badaniu, byli zarówno nauczyciele ze szkół podstawowych, którzy byli – zgodnie z przyjętym wówczas w Polsce schematem podawania szczepień – szczepieni preparatem wektorowym, jak i nauczyciele akademicki, którzy otrzymali preparat mRNA. Taki dobór testowanych grup stworzył bardzo interesujący układ do badań porównawczych, szczególnie że wszystkie badane osoby nie przeszły wcześniej zakażenia SARS-CoV2; analizowano więc tylko odpowiedź poszczepienną. Pokazano tutaj, udokumentowane także w innych raportach, różnice w skutkach działania obydwu szczepionek: wyższe miano przeciwciał odnotowano po szczepieniu preparatem mRNA niż szczepionką wektorową, natomiast przy szczepionce adenowektorowej odpowiedź utrzymywała się dłużej. O skuteczności obydwu szczepionek świadczył fakt, że uczestnicy badania byli chronieni przed zakażeniem przez okres monitorowania opisany w pracy. Autorzy przeprowadzili także ankiety dotyczące skutków ubocznych szczepionek, co jest istotne dla pełnego obrazu programu i strategii szczepień.

W ostatnim artykule z cyklu prac prezentowanych w rozprawie doktorskiej, zatytułowanej „Anti-SARS-CoV-2 antibodies level and COVID-19 vaccine boosters among healthcare workers with the highest SARS-CoV-2 infection risk – follow up study”, (2024 r) Autorzy opublikowali wyniki badań przeprowadzonych w późnej fazie pandemii. Wrócono tutaj do grupy pracowników medycznych (69 osób), z których wielu uczestniczyło we wcześniejszej fazie badań, co jest znaczącym walorem tej pracy. Motywem przewodnim tej pracy było nie tylko określenie poziomu przeciwciał indukowanych kolejnymi dawkami szczepionki lecz także analiza postaw pracowników służby zdrowia, a szczególnie ich motywacji do przeciwstawiania się programowi szczepień, co jest zagadnieniem opisywanym i studiowanym w wielu krajach. Zaobserwowano znaczne zróżnicowanie poziomu przeciwciał w opisywanej grupie.



UNIWERSYTET GDAŃSKI



przedstawiono też indywidualne przypadki , gdy np. miano przeciwciał odbiegało od średnich wartości. Dane uzyskane w tej pracy potwierdziły celowość i skuteczność podawania dawek przypominających (boosters), co w owym czasie było monitorowane w wielu krajach np. w Izraelu, jednocześnie wskazując na konieczność lepszego nagłaśniania programu szczepień , ponieważ nawet w środowisku klinicznym, które powinno być świadome zagrożeń związanych z infekcją oraz lepiej poinformowane o działaniu ochronnym szczepionek, wątpliwości i obawy były bardzo silne. Podobnie jak w poprzednich pracach, oznaczanie miana przeciwciał wykonywano przy użyciu komercyjnych testów , głównie firmy Euroimmun. Stąd pierwsze pytanie – czy po wykonaniu w sumie ogromnej liczby testów Autorka mogłaby ocenić i porównać czułość i dokładność tych testów? Czy w trakcie kolejnych lat pracy zaobserwowano zmiany w tym zakresie? Czy były próby analizy przeciwciał innymi metodami (np. „homemade” tests?)

Poza czterema wymienionymi artykułami, na treść rozprawy doktorskiej składają się rozdziały: wstęp , streszczenia, szczegółowe omówienia treści i wyników poszczególnych publikacji oraz dyskusje podsumowującą wszystkie uzyskane dane w kontekście danych literaturowych. Autorka zamieściła też podsumowanie wyników wraz z planami dalszych badań, wykaz skrótów oraz formalne załączniki : zgodę komisji bioetycznej i oświadczenia w sprawie udziału autorki w powstaniu prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Spis literatury zawiera 200 pozycji, wśród których jest znaczna liczba raportów WHO , Centers for Disease Controls, i innych instytucji / agencji (EMA, dane ze stron rządowych).

W wstępie do rozprawy doktorskiej Autorka omówiła wszystkie zagadnienia istotne dla zrozumienia i analizy wyników jej pracy, rozpoczynając od ogólnej charakterystyki koronawirusów, poprzez dokładniejszy opis budowy, replikacji i patogenezę SARS-CoV2, charakterystykę wariantów tego wirusa oraz odpowiedzi immunologicznej na zakażenie, przechodząc kolejno do zagadnień bardziej praktycznych, tj. diagnostyki i szczepionek , przedstawiając też program szczepień i przebieg pandemii w Polsce. W części dotyczącej biologii molekularnej wirusa SARS-CoV2 znalazły się dwa drobne błędy merytoryczne: Autorka określiła długość genomu wirusa jako 30 tys pz (par zasad), co jest oczywiście omyłką , bo pary zasad to jednostka długości DNA , a dla wirusa RNA (nić pojedyncza) długość łańcucha jest podawana jako liczba nukleotydów. Nieprecyzyjne jest też sformułowanie dotyczące tzw .replikazy SARS-CoV-2: replikaza nie zawiera dwóch nakładających się ramek odczytu , powstają one wskutek „ ribosomal frameshifting” czyli przesunięcia ramki odczytu , co więcej , ramki odczytu dotyczą genu , a nie powstającego białka. Nie można też powiedzieć , że replikaza ma charakter polimerazy RNA zależnej od RNA (RdRp), bo dotyczy to tylko właściwej polimerazy o takiej specyficznej aktywności, która jest tylko jednym z 16 białek kodowanych przez rejon określany mianem replikazy. W części epidemiologicznej i charakterystyce wariantów zabrakło trochę odniesienia do bazy danych GISAID , gdzie na bieżąco raportowano pojawianie się wariantów , także włączając stale aktualizowane dane z Poznania.



Całość wstępu jest napisana bardzo przejrzyście i w interesujący sposób przedstawia dynamikę przebiegu pandemii, szczególnie w Polsce, a plan tego rozdziału i dobór materiału są logiczne i przemyślane.

Bardzo pomocnym dla czytelnika pracy są krótkie omówienia poszczególnych publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, ze wskazaniem na najważniejsze wyniki i wnioski uzyskane w tych pracach. W każdej z publikacji przedstawiono główne elementy metodyczne: dobór i charakterystykę grupy uczestników badania, część laboratoryjną i analizy statystyczne. Pomocnym (choć oczywiście szczegóły można znaleźć w publikacjach) dla zobrazowania tej części byłby ogólny opis, jak badania były realizowane, jak organizowano przepływ informacji i materiałów (może schemat?), podsumowanie i charakterystyka testów i producentów.

Jako cel pracy Doktorantka podała poznanie odpowiedzi obronnej organizmu na zakażenie SARS-CoV-2 lub szczepionkę, co jest sformułowaniem zbyt ogólnym – wymagałoby to także analizy odpowiedzi komórkowej. Cel pracy został bardziej precyzyjnie sformułowany w zadaniach szczegółowych określających zakres wykonanych prac. Wyniki swojej pracy i ich znaczenie Doktorantka szczegółowo i rzetelnie omówiła w rozdziale „Dyskusja”, konfrontując uzyskane przez siebie dane z danymi literaturowymi, co nie jest łatwym zadaniem, biorąc pod uwagę, że obecnie pod hasłem „antibody responses SARS-Cov2” w bazie PUBMED pojawia się 6200 publikacji, przy czym wiele z tych prac przedstawia bardzo rozbieżne wyniki. Taka rozbieżność wynikała często z przeprowadzania badań w bardzo różnych populacjach i odmiennych strategii kontroli pandemii w różnych krajach. Jednak główne spostrzeżenia co do częstości, tempa pojawiania się i zanikania przeciwciał anty-SARS-CoV-2, skuteczności szczepionek i czynników istotnych w kontekście badań seroprewalencji opisane w pracy Mgr Lorent są zgodne z większością danych raportowanych na świecie. Chciałabym w związku z tym zapytać Doktorantkę, do jakiego stopnia badane w pracy populacje można uznać za typowe, czy w świetle obecnie znanych danych wyniki uzyskane w Poznaniu i w okolicach różnią się od innych rejonów Polski? Następne moje pytanie dotyczy wspomnianego w dyskusji efektu ADE – czy zdaniem Doktorantki, w wypadku wirusa SARS-CoV-2, możemy wykluczyć powstawanie tego zjawiska, opisanego głównie dla niektórych flawiwirusów?

Sposób przedyskutowania i interpretacji wyników projektu w rozdziale „Dyskusja” świadczy o wiedzy i bardzo dobrej orientacji Autorki w swojej tematyce badawczej. W podsumowaniu Doktorantka prócz wypunktowania najważniejszych wyników pracy i ich znaczenia dla sytuacji epidemiologicznej, wspomniała o dalszych perspektywach tej pracy. W idealnych warunkach badawczych byłoby bardzo potrzebna i ciekawa korelacja badań serologicznych z określeniem sekwencji wirusa, identyfikacją wariantu i indywidualnych mutacji, jak również danych genetycznych zakażonych osób. W świetle coraz głębszego poznawania różnych następstw i komplikacji związanych z przejściem COVID-19 uzyskiwanie takich danych byłoby bardzo cenne. Bardzo cenna jest też niewątpliwie kolekcja próbek biologicznych zebranych podczas realizacji projektu doktorskiego P. Mgr Lorent.

Podsumowując, prezentowana praca doktorska zawiera bardzo szeroki zbiór informacji w zakresie badania reakcji humoralnej na zakażenie SARS-CoV-2 i różne formy szczepień w określonych populacjach, jak również odzwierciedla przebieg różnych faz pandemii. Praca jest starannie zredagowana, przejrzysty sformułowany tekst jest napisany bardzo poprawnym językiem, poza bardzo nielicznymi wyjątkami nie ma w pracy błędów literowych i formalnych. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 28/2024/Internet z dnia 20 marca 2024 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie P. Mgr Dagny Lorent do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

