



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

dr hab. Magdalena Druszczyńska, prof. UŁ
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
magdalena.druszczyńska@biol.uni.lodz.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Pawła Zapólnika

pt. „Analiza wpływu szczepienia BCG na częstość występowania oraz przebieg zakażeń SARS-CoV-2 wśród pracowników ochrony zdrowia w Polsce”

Na przestrzeni ostatnich lat obserwujemy z niepokojem narastającą transmisję nowych drobnoustrojów wywołujących infekcje o charakterze epidemicznym. Przykładem takiego patogenu jest drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego SARS-CoV-2 będący czynnikiem etiologicznym choroby koronawirusowej COVID-19. Pandemia Covid-19, która rozpoczęła się w 2020 roku, rozprzestrzeniła się na cały świat, powodując paraliż zdrowotny i gospodarczy. Obecna sytuacja epidemiologiczna tej choroby na świecie pozostaje dynamiczna i jest stale utrudniana przez naturalny proces mutacji wirusa SARS-CoV-2. Zagrożenie nową pandemią wymaga poszukiwania preparatów biologicznych, które mają właściwości immunomodulujące i są w stanie modyfikować odpowiedź zapalną. Szczepionka BCG (Bacillus Calmette-Guerin), będąca częścią uniwersalnych programów przeciwgruźliczych, nie tylko pobudza specyficzną pamięć immunologiczną przeciwko prątkom gruźlicy, ale także pobudza układ odpornościowy, co skutkuje nieswoistą ochroną przed innymi, niespokrewnionymi z prątkami, patogenami. Nieswoisty efekt ochronny BCG u niemowląt i małych dzieci zaobserwowano w kilku badaniach klinicznych, wykazując w nich zmniejszenie wskaźników umieralności, zachorowalności i hospitalizacji związanej z zakażeniami patogenami układu oddechowego. Najbardziej prawdopodobnym scenariuszem niespecyficznego działania BCG jest stymulacja komórek odporności wrodzonej, monocytów/makrofagów i komórek NK (Natural killer) na drodze tzw. „treningu

odpornościowego”, w którym komórki przeprogramowane epigenetycznie pozostają gotowe do reagowania na czynniki zakaźne. Przeprogramowanie tych komórek prowadzi do zmian biochemicznych i sekrecyjnych, które mogą wpływać na przebieg odpowiedzi odpornościowej poprzez modulację produkcji cytokin, chemokin lub innych mediatorów stanu zapalnego. To właśnie w nurt badań związanych z nieswoistym działaniem szczepionki BCG wpisuje się problematyka recenzowanej rozprawy doktorskiej wykonanej przez lek. Pawła Zapolnika pod kierunkiem dr hab. n. med. Hanny Czajki, prof. UR w Instytucie Nauk Medycznych Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego, której głównym celem była ocena wpływu rewakcytacji BCG na częstość występowania i ciężkość przebiegu zakażeń wirusem SARS-CoV-2 wśród pracowników ochrony zdrowia w Polsce. Podjęty temat uważam za w pełni uzasadniony pod względem poznawczym oraz ważny w kontekście terapeutycznym w związku z potencjalną możliwością kontrolowania reakcji zapalnej wzbudzonej przez prątki BCG. Pomimo ponad 100-letniej historii stosowania BCG w profilaktyce gruźlicy, mechanizm jej immunomodulacyjnego działania wciąż nie został w pełni wyjaśniony i wciąż nie jest jasne, w jaki sposób indukowane przez BCG przeprogramowanie epigenetyczne wpływa na rozwój odpowiedzi odpornościowej i jej dynamikę podczas infekcji wtórnych, w szczególności wirusowych.

Ocena formalna

Rozprawę doktorską Pana lek. Pawła Zapolnika stanowi zbiór trzech publikacji naukowych, w tym dwóch prac doświadczalnych i jednej pracy przeglądowej, opatrzonej 26-stronicowym opracowaniem, uwzględniającym opis metod badawczych i uzyskanych wyników badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej. Na zbiór ten składają się następujące artykuły:

(1) Czajka H., Zapolnik P., Krzych Ł., Kmiecik W., Stopyra L., Nowakowska A., Jackowska T., Darmochwał-Kolarz D., Szymański H., Radziewicz-Winnicki I., Mazur A. *A multi-center, randomised, double-blind, placebo-controlled phase III clinical trial evaluating the impact of BCG re-vaccination on the incidence and severity of SARS-CoV-2 infections among symptomatic healthcare professionals during the COVID-19 pandemic in Poland – first results.* *Vaccines* 2022, 10, 314. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020314>

(2) Zapolnik P., Kmiecik W., Nowakowska A., Krzych Ł., Szymański H., Stopyra L., Jackowska T., Darmochwał-Kolarz D., Mazur A., Czajka H. *A multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase III clinical trial evaluating the impact of BCG re-vaccination on the incidence and severity of SARS-CoV-2 infections among symptomatic healthcare professionals during the COVID-*

19 pandemic in Poland – evaluation of antibody concentrations. *Vaccines* 2023, 11, 75. <https://doi.org/10.3390/vaccines11010075>

(3) Zapolnik P., Kmieciak W., Mazur A., Czajka H. Trained immunity, BCG and SARS-CoV-2 general outline and possible management in COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 3218. <https://doi.org/10.3390/ijms24043218>

Jako recenzent stwierdzam, że wszystkie załączone prace stanowią spójny tematycznie zbiór artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych określanych przez ministra właściwego do spraw nauki, co stanowi spełnienie wymogu ustawowego. Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania (IF) wymienionych prac wynosi 15,591, co odpowiada 420 punktom MEiN (według wskaźników w roku publikacji). Wszystkie prace zostały opublikowane w ciągu ostatnich 2 lat, a ich indywidualny IF wynosi od 4,422 do 6,208. Lek. Paweł Zapolnik jest pierwszym autorem dwóch z trzech ujętych w cykl publikacji, a, jak wynika z załączonych do pracy oświadczeń, przedłożone prace stanowią indywidualny wkład Doktoranta w rozwój nauk medycznych.

Ocena merytoryczna

Recenzowana rozprawa doktorska ma układ typowy dla dysertacji przygotowanych w oparciu o dorobek publikacyjny. Składa się ona z krótkiego *Wstępu*, przedstawienia *Celu pracy*, zwięzłego opisu *Materiałów i metod* prowadzonych badań, syntetycznego omówienia uzyskanych *Wyników i dyskusji*, *Podsumowania wyników* oraz *Wniosków*, krótkiego *Streszczenia* w języku polskim i angielskim, a także *Piśmiennictwa* wykorzystanego do przygotowania w/w opracowania. Do pracy załączono również kopie publikacji będące podstawą rozprawy oraz oświadczenia współautorów wyrażających zgodę na ich włączenie do dysertacji wraz z informacją, że przedłożone prace stanowią indywidualny wkład Doktoranta w rozwój nauk medycznych.

W przygotowanym *Wstępie* Doktorant zawarł krótką charakterystykę szczepionki BCG oraz przedstawił hipotezę o ogólnym niespecyficznym jej działaniu pozwalającym na ograniczenie rozprzestrzeniania się SARS-CoV-2 i związanej z nim zachorowalności i śmiertelności. Po interesującym wprowadzeniu w tematykę rozprawy lek. Paweł Zapolnik przedstawił *Cel pracy* zdefiniowany jako ocena wpływu szczepienia BCG na częstość zakażeń wirusem SARS-CoV-2 oraz przebieg choroby COVID-19, który realizowano wydzielając sześć zasadniczych zadań badawczych obejmujących: (1) analizę liczby potwierdzonych przypadków zakażenia SARS-CoV-2 wśród uczestników badania (pracowników ochrony zdrowia sześciu polskich ośrodków); (2) określenie występowania zależności pomiędzy liczbą potwierdzonych infekcji SARS-CoV-2 oraz wynikiem testu tuberkulinowego, ilością blizn po szczepieniach BCG oraz wykonywanym zawodem medycznym; (3) ocenę stężenia przeciwciał anty SARS-CoV-2 w badanych grupach ochotników; (4)

analizę zależności między stężeniami przeciwciał anti-SARS-CoV-2 a płcią, wiekiem oraz wskaźnikiem masy ciała uczestników; (5) ocenę stężeń przeciwciał anti SARS-CoV-2 wśród objawowych i bezobjawowych uczestników badania; (6) ocenę wpływu wcześniejszego szczepienia BCG na odpowiedź na szczepienie przeciwko COVID-19. Cel główny pracy wraz z pozwalającymi go zrealizować celami cząstkowymi został przedstawiony w sposób jasny stanowiąc dobre uzasadnienie podjętych przez Doktoranta badań.

Wymienione w rozdziale *Materiały i metody*, a opisane szczegółowo w publikacjach stanowiących zręb doktoratu, techniki badawcze nie budzą żadnych zastrzeżeń. Obejmowały one m. in. wykonanie próby tuberkulinowej RT23 z użyciem oczyszczonych białek tuberkulinowych Tuberculin PPD RT23, izolację i detekcję RNA wirusa SARS-CoV-2, immunoenzymatyczną ocenę stężenia przeciwciał klasy IgG przeciwko antygenowi S1 wirusa SARS-Cov-2, a także wieloparametryczną analizę statystyczną uzyskanych wyników. Wszystkie dane wykorzystane do pracy doktorskiej uzyskano w ramach projektu pt. „Wieloośrodkowe, randomizowane, prowadzone metodą podwójnie ślepej próby badanie fazy III z grupą kontrolną przyjmującą placebo, oceniające wpływ szczepień przeciw gruźlicy na zapadalność i przebieg zakażeń wirusem SARS-CoV-2 oraz efekt uodpornienia po szczepieniu przeciw COVID-19 wśród pracowników ochrony zdrowia w Polsce podczas pandemii COVID-19”, (nr protokołu: BCG/COVID-19/UR/04/2020, EudraCT no. 2020-002111-22, NCT04648800) sfinansowanego przez Agencję Badań Medycznych w Warszawie. Prace badawcze prowadzone były równocześnie w sześciu ośrodkach medycznych w Polsce – Rzeszowie, Krakowie, Katowicach, Warszawie (dwa ośrodki) oraz Trzebnicy na grupie pracowników ochrony zdrowia, spośród których kryteria włączenia do badania spełniło ostatecznie 717 osób. Realizując postawione w doktoracie cele lek. Paweł Zapolnik wykazał się umiejętnością zastosowania różnych narzędzi badawczych, co pozwala ocenić wysoko potencjał naukowy Doktoranta.

W rozdziale *Wyniki i dyskusja* Doktorant przedstawił skrótowo główne rezultaty uzyskane w ramach kolejnych etapów prowadzonych badań. Pełne spektrum analiz wraz z merytoryczną dyskusją otrzymanych wyników zostało przedstawione w publikacjach naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Tematyka wszystkich wchodzących w skład recenzowanej dysertacji prac jest związana z niespecyficznym działaniem ochronnym szczepionki BCG. Ten niespecyficzny efekt zwany treningiem odpornościowym został szeroko opisany przez Doktoranta w pracy przeglądowej zatytułowanej *Trained immunity, BCG and SARS-CoV-2 general outline and possible management in COVID-19* (Int. J. Mol.Sci. 2023, 24, 3218). Publikacja ta, stanowiąc doskonały punkt wyjścia do omówienia prowadzonych przez Doktoranta badań, szczegółowo wyjaśnia mechanizm

immunomodulacyjnego działania BCG na przebieg odpowiedzi odpornościowej wzbudzonej przez wirusa SARS-CoV-2, czynnik etiologiczny COVID-19. Nawiązując do tego wątku, proszę Doktoranta o omówienie możliwości immunoterapeutycznego wykorzystania prątków BCG i krótkie przedstawienie mechanizmu ich działania. Praca przeglądowa wchodząca w skład rozprawy, stanowi dobre tło do omówienia wyników prowadzonych przez Doktoranta badań, które zawarte zostały w dwóch, wchodzących w skład dysertacji, oryginalnych publikacjach (1) *A multi-center, randomised, double-blind, placebo-controlled phase III clinical trial evaluating the impact of BCG re-vaccination on the incidence and severity of SARS-CoV-2 infections among symptomatic healthcare professionals during the COVID-19 pandemic in Poland – first results* (*Vaccines* 2022, 10, 314); (2) *A multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase III clinical trial evaluating the impact of BCG re-vaccination on the incidence and severity of SARS-CoV-2 infections among symptomatic healthcare professionals during the COVID-19 pandemic in Poland – evaluation of antibody concentrations* (*Vaccines* 2023, 11, 75). W rozdziałach *Podsumowanie wyników* i *Wnioski* Doktorant zawarł syntetyczny opis wyników zawartych w w/w publikacjach i przedstawił najważniejsze konkluzje z przeprowadzonych badań: (1) rewakcyacja szczepionką BCG nie ma wpływu na zachorowalność na COVID-19 wśród pracowników ochrony zdrowia w Polsce, (2) wcześniejsze szczepienie BCG nie ma wpływu na poziom przeciwciał anty SARS-CoV-2 indukowanych przez szczepionkę przeciwko COVID-19, (3) rozbieżności w wynikach analogicznych jak prowadzone przez Doktoranta badań uzyskiwanych w różnych ośrodkach na świecie wymagają kontynuacji badań w tym zakresie. W związku z tym nasuwa się pytanie, czy, w opinii Doktoranta, wytwarzanie przeciwciał jest miarodajnym wyznacznikiem wpływu szczepienia BCG na odporność protekcyjną przeciwko COVID-19? Prosiłabym również Doktoranta o szerszy komentarz na temat możliwych czynników mogących mieć wpływ na obserwowane w badaniach rozbieżności.

Recenzowaną rozprawę kończy *Streszczenie* przygotowane w języku polskim i angielskim, napisane poprawnie, dobrze oddające wszystkie treści zawarte w dysertacji oraz rozdział *Piśmiennictwo*, w którym wykorzystano 28 pozycji właściwie dobranej, literatury naukowej opublikowanej w latach 2003-2023. Wszystkie pozycje bibliograficzne zostały zacytowane w tekście poprawnie.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedstawiona mi do oceny dysertacja spełnia wszystkie ustawowe warunki stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora. Wysoko oceniam zarówno wartość merytoryczną wszystkich publikacji wchodzących w skład rozprawy, jak również przedstawione opracowanie w języku polskim będące skrótowym omówieniem celu naukowego i uzyskanych wyników.

Poszczególne rozdziały dysertacji zostały opracowane przez lek. Pawła Zapolnika z dużą dbałością o szczegóły świadcząc o Jego dużej pracowitości i zaangażowaniu w pracę badawczą. Ponadto bogaty dorobek naukowy Doktoranta, liczący aktualnie 11 publikacji o łącznym IF=35,497 (1180 pkt MEiN), w siedmiu spośród których Doktorant jest pierwszym autorem, oraz 8 doniesień (4 w formie wystąpień ustnych i 4 w postaci prezentacji plakatu) na zjazdach o zasięgu krajowym i międzynarodowym przekonują o dużej dojrzałości naukowej lek. Pawła Zapolnika.

Wobec powyższego stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. Pawła Zapolnika posiada istotną wartość poznawczą i spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1668 z późn. zm.) i stawiam wniosek o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Doceniając wysoki poziom merytoryczny zaprezentowanych publikacji wchodzących w skład dysertacji świadczący o dużej samodzielności i dojrzałości naukowej Doktoranta występuję do Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

KATEDRA IMMUNOLOGII
I BIOLOGII INFEKCYJNEJ UŁ


.....
dr hab. Magdalena Druszczyńska, prof. UŁ

dr hab. Magdalena Druszczyńska, prof. UŁ