

Prof. dr hab. n. med. Tomasz Mach
Katedra i Kliniki Gastroenterologii i Hepatologii
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Ul. Jakubowskiego 2, 30-688 Kraków

Kraków, dnia 27.01.2024 r.

O C E N A

rozprawy doktorskiej lek. Adama Tworka pt.

"Skuteczność leczenia osoczem ozdrowieńców oraz wybrane aspekty odpowiedzi immunologicznej w przebiegu choroby COVID-19"

na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne
wykonana na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego
Uniwersytetu Medycznego z dnia 20.12.2023 r. i pisma Pani Prof. dr hab. Marty Struga -
Wiceprzewodniczącej Rady z dnia 04.01.2024 r.

Przekazana do recenzji rozprawa doktorska lek. Adama Tworka pt. Skuteczność leczenia osoczem ozdrowieńców oraz wybrane aspekty odpowiedzi immunologicznej w przebiegu choroby COVID-19 ma formę spójnego tematycznie zbioru 3 prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych o łącznym wskaźniku oddziaływania (Impact Factor - IF) 13,773 i punktacji MEiN 310. Prace zostały opublikowane w latach 2021-2023, a Doktorant jest pierwszym autorem we wszystkich, co potwierdza jego wiodącą rolę w realizacji projektu badawczego i opracowaniu artykułów. Rozprawa pochodzi z Kliniki Chorób Wewnętrznych i Gastroenterologii z Pododdziałem Leczenia Nieswoistych Chorób Zapalnych Jelit Państwowego Instytutu Medycznego Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji w Warszawie, której Kierownikiem, a zarazem promotorem Doktoranta jest pani Prof. dr hab. n. med. Grażyna Rydzewska

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi następujące publikacje:

1. **A. Tworek**, K. Jaroń, B. Uszyńska-Kałuża, A. Rydzewski, R. Gil, A. Deptała, E. Franek, R. Wójtowicz, K. Życińska, I. Walecka, M. Cicha, W. Wierzba, A. Zaczyński, Z. J. Król, G. Rydzewska: *Convalescent plasma treatment is associated with lower mortality and better outcomes in high risk COVID-19 patients – propensity score matched case-control study*. International Journal of Infectious Diseases, 2021; 105: 209-215.
Impact Factor = 12.073; MEiN = 100 pkt.
2. **A. Tworek**, K. Jaroń, B. Uszyńska-Kałuża, A. Rydzewski, M. Cicha, W. Wierzba, A. Zaczyński, Z. J. Król, G. Rydzewska:

The persistence of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies after COVID-19: A one-year observation. Is a SARS-CoV-2 vaccination booster dose necessary? Central European Journal of Immunology, 2023; 48 (2): 92-96.

Impact Factor = 1.3; MEiN = 70 pkt.

3. A. Tworek, A. Rydzewski, K. Lewandowski, M. Głuszek-Osuch, G. Rydzewska:
COVID-19 humoral response. Medical Studies/Studia Medyczne, 2023; 39 (3): 296–303.
Impact Factor = 0.4; MEiN = 140 pkt.

Rozprawa doktorska ma typowy układ dla tego rodzaju opracowań naukowych i złożona jest ze spisu treści, wykazu stosowanych skrótów, streszczeń w języku polskim i angielskim, wstępu z 7 podrozdziałami, uzasadnieniem połączenia publikacji w jeden cykl. Następnie przedstawione są założenia i cel pracy, materiał i metody, kopie 3 opublikowanych prac, podsumowanie z 4 wnioskami oraz bibliografią z 41 pozycjami z ostatnich lat (2018-2023 oraz 2 z 2014 r. i 1967 r.). Na końcu Doktorant zamieścił kopie opinii Komisji Bioetycznej i oświadczeń współautorów poszczególnych 3 publikacji, którzy określili w sposób opisowy i procentowy udział autora i współautora w powstaniu pracy z wyrażaniem zgody na wykorzystanie publikacji w rozprawie doktorskiej, co potwierdzili własnym podpisem. Całość rozprawy z załącznikami liczy 73 strony.

Lek. Adam Tworek podzielił wstęp rozprawy na kilka podrozdziałów, które umożliwiają szczegółowe zapoznanie się z problematyką poruszaną w pracy, a zostały opracowane z uwzględnieniem aktualnego piśmiennictwa. I tak Doktorant obszernie opisał chorobę COVID-19 wywoływaną przez koronawirusa SARS-CoV-2. Następnie przedstawił początek epidemii COVID-19 na świecie i w Polsce podając, że pierwsze przypadki tej choroby obserwowano w Wuhan w Chinach w listopadzie 2019 r., zaś pierwszy przypadek zachorowania na COVID-19 w Polsce potwierdzono na początku 2020 r. Wirusa SARS-CoV-2 wyizolowano i zidentyfikowano w styczniu 2020 r., a po 2 miesiącach WHO ogłosiła pandemię. W kolejnej części wstępu Doktorant szczegółowo opisał budowę SARS-CoV-2, który jest jednoniciowym wirusem RNA i na powierzchni ma liczne białka kolca, czemu zawdzięcza charakterystyczny wygląd korony i nazwę. SARS-CoV-2 posiada wysoki potencjał zmienności, jego RNA ulega bowiem mutacji podczas procesu replikacji w zakażonej komórce, co jest charakterystyczne dla wirusów RNA, jak np. HCV, HIV, wirus grypy itp. i powoduje z czasem trwania pandemii powstawanie wielu jego wariantów antygenowych indukujących zmienną odpowiedź immunologiczną. Następnie Doktorant przedstawił kilka

wariantów SARS-CoV-2, które powodują objawy kliniczne COVID-19, a mogą się różnić zależnie od samego wirusa i osobniczych cech zakażonego. Omawiając COVID-19 załączył tabelę z poszczególnymi objawami, z których do najczęstszych należą: gorączka, katar, kaszel, ból głowy, uczucie znacznego zmęczenia, ból mięśni, utrata węchu i smaku, zaznaczył jednak, że u około jednej trzeciej osób zakażonych symptomy choroby nie występują. W dalszej części wstępu Doktorant omówił metody diagnostyczne stosowane w rozpoznawaniu zakażenia SARS-CoV-2, czyli metodę PCR, testy antygenowe i serologiczne, a także dodatkowo porównał je w tabeli z podaniem czułości, swoistości i liczby dni okna diagnostycznego. Następnie lek. Adam Tworek przedstawił odpowiedź humoralną, do jakiej dochodzi u chorych w przebiegu zakażenia, z podaniem rodzaju i budowy przeciwciał przeciwwirusowych. Obszerny wstęp kończy podrozdział dotyczący możliwości zastosowania przeciwciał monoklonalnych w terapii COVID-19, ze stwierdzeniem, że z powodu wysokiego potencjału zmienności genetycznej SARS-CoV-2 leczenie tego typu przeciwciałami może mieć wysoką skuteczność przeciwko określonym wariantom wirusa, lecz z szybką utratą skuteczności.

Podsumowując bardzo dobrze opracowany wstęp należy stwierdzić, że Doktorant jest zorientowany w problematyce dotyczącej choroby COVID-19 i posługuje się właściwie dobranym aktualnym piśmiennictwem.

W dalszej części pracy doktorskiej lek. Adam Tworek przedstawił 3 cele badań, których jest ocena: (1) skuteczności i bezpieczeństwa leczenia osoczem ozdrowieńców pacjentów chorych na COVID-19 oraz identyfikację grupy chorych, u których ta terapia pozwoli przynieść największy efekt kliniczny, (2) czasu utrzymywania się odpowiedzi immunologicznej w postaci przeciwciał neutralizujących IgG, po podaniu osocza ozdrowieńców oraz po przebytej infekcji COVID-19 oraz (3) wpływu wieku pacjenta, chorób towarzyszących i ciężkości zachorowania na czas trwania odpowiedzi immunologicznej u chorych po przebyciu zakażenia SARS-CoV-2.

W rozdziale Materiał i metody, Doktorant stwierdził, że na badania przeprowadzone w Centralnym Szpitalu Klinicznym MSWiA w Warszawie uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej. Pierwsze badanie pt. *Convalescent plasma treatment is associated with lower mortality and better outcomes in high risk COVID-19 patients – propensity score matched case-control study* – realizowane było w początkowym okresie pandemii w Polsce (od 24.04.2020 r. do

28.08.2020 r.) i 102 pacjentów leczono osoczem ozdowieńców. Kryteriami kwalifikacji do badania były: aktywna choroba COVID-19 z potwierdzonym testami PCR zakażeniem SARS-CoV-2 w wymazie z nosogardzieli, objawowa postać choroby COVID-19 oraz uwidocznienie w badaniach obrazowych (TK lub RTG) charakterystycznych dla COVID-19 zmian płucnych. Wyleczenie potwierdzano przy pomocy dwóch ujemnych testów PCR. Stężenie w surowicy swoistych przeciwciał przeciw podjednostkom S1 oraz S2 SARS-CoV-2 mierzono odpowiednim testem immnologicznym, który charakteryzował się wysoką, ponad 90% specyficznością i swoistością. Doktorant podał, że głównym punktem końcowym badania było zmniejszenie śmiertelności, a wyniki analizował przy pomocy właściwie dobranych testów statystycznych.

W pierwszej publikacji lek. Adam Tworek wraz zespołem Kliniki wykazał, że terapia osoczem ozdowieńców była wysoce skuteczna, zwłaszcza po jej wprowadzeniu na wczesnym etapie leczenia. Powodowała znacznie mniejszą śmiertelność sięgającą 13,7% w grupie chorych przyjmujących to osocze w porównaniu do 34,3% w grupie kontrolnej. Badanie oceniające efekty leczenia osoczem ozdowieńców ujawniło wyższą korzyść kliniczną u pacjentów, którym osocze podawano we wczesnym okresie COVID-19, tzn. do 72 godzin od pojawienia się objawów, u pacjentów z ciężkim jej przebiegiem i chorobami towarzyszącymi, zwłaszcza niewydolnością krążenia i chorobą nowotworową. Doktorant udowodnił, że zaawansowany wiek, przebyty zawał mięśnia sercowego, aktywna choroba nowotworowa oraz czas trwania hospitalizacji wiązały się z gorszym przebiegiem choroby COVID-19. Ograniczeniem pracy był brak randomizacji, co stwierdził Doktorant na końcu tej publikacji.

W drugim badaniu pt. *The persistence of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies after COVID-19: A one-year observation. Is a SARS-CoV-2 vaccination booster dose necessary?* - Doktorant z zespołem Kliniki oceniał czas utrzymywania się odpowiedzi humoralnej u chorych z COVID 19. Do tych badań, które trwało w okresie 15.03.2020-26.06.2021 r., włączono 38 ozdowieńców, a stężenie przeciwciał anty-SARS-Cov-2 badano co 2 miesiące. U zakażonych wiodący był wariant B.1.1.7 – Alpha wirusa SARS-CoV-2. Obserwacja czasu trwania odpowiedzi humoralnej była zaprzestana z powodu wprowadzenia masowych szczepień ochronnych przeciwko SARS-CoV-2. Badania te wykazały utrzymywanie się wysokich stężeń przeciwciał neutralizujących SARS-CoV-2 u ozdowieńców przez okres 6 i 12 miesięcy od momentu zachorowania, a po 12 miesiącach od zakażenia ponad 56%

pacjentów posiadało nadal ochronny ich poziom. We wnioskach Doktorant podał, że jego badania pozwalają na lepsze zrozumienie odpowiedzi immunologicznej do jakiej dochodzi u chorych w przebiegu COVID-19 oraz umożliwiły wyciągnięcie wniosków, które mogą być przydatne w ewentualnych przyszłych pandemiach.

W trzeciej publikacji o charakterze poglądowym pt. *COVID-19 humoral response* - Doktorant przedstawił przegląd badań dotyczących odpowiedzi humoralnej przeciwko SARS-CoV-2 u chorych z COVID-19, zwłaszcza przeciwciał neutralizujących, które są kluczowe w identyfikowaniu i niszczeniu wirusów. Na podstawie danych z dobrze dobranej literatury stwierdził, że SARS-CoV-2 za pomocą białka kolca łączy się z receptorem ACE2 i wnika do ludzkich komórek, zaś terapie oparte na przeciwciałach neutralizujących z powodu zmienności tego wirusa, a więc wraz z coraz nowszymi jego wariantami, stają się coraz mniej skuteczne.

Uzyskane wyniki badań upoważniły lek. Adama Tworka do postawienia 4 wniosków, które odpowiadają celom rozprawy. Stwierdził mianowicie istotne zmniejszenie śmiertelności u pacjentów z COVID-19 leczonych osoczem ozdrowieńców, przy czym większe korzyści mogli odnieść pacjenci z cięższym przebiegiem choroby i po szybkim rozpoczęciu terapii w pierwszych dniach choroby oraz u pacjentów z chorobami towarzyszącymi, a zwłaszcza z niewydolnością krążenia i aktywną chorobą nowotworową. Doktorant wykazał, że wyższe stężenie przeciwciał neutralizujących występowało u dawców osocza z cięższym przebiegiem COVID-19, zaś u 56.75% pacjentów po przebyciu COVID-19 ochronne miano przeciwciał utrzymywało się po 12 miesiącach od zdiagnozowania choroby.

Oceniając pracę doktorską uważam, że badania Doktoranta mają charakter nowatorski i duże znaczenie poznawcze. Szczególne ich znaczenie polegało na tym, że zostały przeprowadzone w początkowym okresie pandemii COVID-19, kiedy w tym czasie do walki z chorobą o wysokiej śmiertelności, zaangażowane były wszelkie dostępne metody terapii objawowej, przeciwzapalnej, często z leczeniem na oddziałach intensywnej terapii. W tym okresie nie dysponowano jeszcze lekami przeciwwirusowymi hamującymi replikację SARS-CoV-2. W takich warunkach podjęte przez Doktoranta z zespołem nowe terapie osoczem ozdrowieńców chorych z COVID-19 miały duże znaczenie, stworzyły potencjalne szanse na skrócenie i osłabienie przebiegu choroby. Dopiero ogromny postęp w rozumieniu mechanizmów replikacji SARS-CoV-2 i liczne badania kliniczne, doprowadziły do

wyprodukowania i udostępnienia leków przeciwwirusowych znacznie modyfikujących przebieg zakażenia, a aktualizowana profilaktyka COVID-19 u szczepionych zapobiega jej rozwojowi lub łagodzi przebieg tej choroby.

Badania będące podstawą rozprawy doktorskiej, zostały przeprowadzone przez lek. Adama Tworka z zespołem w okresie początkowym pandemii, czyli w pierwszej połowie 2020 r. W tym okresie nie było dostępnych terapii hamujących replikację wirusa, co skutkowało łatwym rozprzestrzenianiem się nowo odkrytego wirusa SARS-CoV-2. Zakażenia te doprowadzały do ciężkich, dramatycznych niewydolności oddechowych i układu krążenia, zwłaszcza u osób starszych, z wielochorobowością, z niedoborami odporności. W tym okresie przed erą szczepień ochronnych wprowadzonych pod koniec 2020 r., poszukiwano intensywnie leków przeciwwirusowych i innych metod walki z wirusem SARS-CoV-2, w tym uwzględniających obecność przeciwciał monoklonalnych, które mogły być wyindukowane przez układ odpornościowy chorych. Zastosowanie przez Doktoranta z zespołem Kliniki osocza ozdowieńców stanowiło w tym okresie nową metodą terapii tych chorych.

Lek. Adam Tworek przeprowadził dobrze zaplanowane badania kliniczne, uzyskał na nie oficjalną zgodę komisji bioetycznej, zastosował odpowiednie metody diagnostyczne i laboratoryjne, wyniki opracował przy pomocy analizy statystycznej, poprawnie je udokumentował i omówił, wyciągnął wnioski, które odpowiadają na założony cel i w związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska w pełni spełnia kryteria tego typu pracy naukowej. Publikacje wchodzące w skład rozprawy zostały uprzednio już pozytywnie zrecenzowane przez niezależne zespoły redakcyjne pism, co podkreśla wartość tych prac i czyni je ogólnie dostępnymi, prace Doktoranta ukazały się bowiem w pismach o zasięgu międzynarodowym.

Po szczegółowym zapoznaniu się z przedstawioną do oceny rozprawą doktorską lek. Adama Tworka stwierdzam, że nie zgłaszam krytycznych uwag formalnych i merytorycznych.

Wniosek końcowy

Lek. Adam Tworek w swojej rozprawie doktorskiej, stanowiącej cykl 3 opublikowanych uprzednio prac naukowych, a więc już recenzowanych przez redakcje pism, których łączny Impact Factor wynosi 13,773 i punktacji MEIN 310, przedstawił jasno założenia i cel pracy, zastosował stosowne do tematyki metody badawcze, badania przeprowadził na dużej

grupie chorych z COVID-19, starannie przeanalizował wyniki, z uwzględnieniem aktualnego piśmiennictwa, a przede wszystkim, co wymaga podkreślenia, badania Doktoranta mają charakter nowatorski i posiadają ważne znaczenie kliniczne, wnoszą bowiem nowe fakty do problematyki terapii i skuteczności leczenia osoczem ozdrowieńców chorych z COVID-19, które były zastosowane w okresie początkowym pandemii, kiedy nie były dostępne inne metody terapii przeciwwirusowej.

W podsumowaniu stwierdzam, że **Rozprawa doktorska lek. Adama Tworka spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668)** i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Adama Tworka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

27-01-2025

data sporządzenia recenzji

prof. dr hab. med. Tomasz Mach

