



Prof. dr hab. med. Piotr Trzonkowski
Kierownik Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej
GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
Ul. Dębinki 7, bud. 27, II piętro, 80 -211 Gdańsk
Tel. 58 3491590, 1593 fax 58 3491591
e-mail: piotr.trzonkowski@gumed.edu.pl

Gdańsk 20.06.2024

**Recenzja rozprawy doktorskiej Łukasza Jerzego Suprewicza:
„Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach
grzybiczych”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska to praca doświadczalna, której celem była ocena wpływu ludzkiej gelsoliny (pGSN) na wrodzoną odpowiedź immunologiczną. Doktorant opisał sposób działania oraz analizę efektów przeciwzapalnych tego czynnika w stosunku do neutrofilów i komórek śródbłonna. W pracy testował także działanie pGSN w modelu 3D bariery krew-mózg w obecności białka S1 pochodzącego z wirusa SARS-CoV-2. Doktorant wykazał, iż pGSN stymuluje ekspresję receptorów „scavengerowych” typu I klasy B (SR-B) na powierzchni ludzkich neutrofilów, co skutkuje stymulacją fagocytozy. Czynniki te ogranicza też stan zapalny hamując wydzielanie cytokin i chemokin prozapalnych, hamuje wytwarzanie pułapek neutrofilowych oraz przeciwdziała zwiększonej przepuszczalności bariery krew-mózg w obecności białka S1. Właściwości te mogą stać się przyczynkiem do wykorzystania pGSN w terapii zakażeń.

Praca ma układ nowoczesnej rozprawy doktorskiej, tj. składa się z trzech opublikowanych już prac, z czego jedna to praca przeglądowa, a dwie kolejne to prace doświadczalne. We wszystkich pracach Pan Łukasz Suprewicz jest pierwszym autorem. Na uwagę zasługuje fakt, że wszystkie prace opublikowane zostały w bardzo dobrych pismach międzynarodowych posiadających historię cytowań (IF) oraz wymóg recenzji przed publikacją. W pewnym sensie odciąża to recenzenta pracy doktorskiej, ponieważ przynajmniej sześciu anonimowych recenzentów i trzech edytorów oceniało wyniki wcześniej i dopuściło je do publikacji.



Jak wspomniano, pierwsza praca (Neurologia i Neurochirurgia Polska, 2023: 57, 1, s. 14-25) ma charakter przeglądowy i właściwie wprowadza do tematyki rozprawy doktorskiej. Właściwe wyniki znajdują się w kolejnych dwóch pracach [Microbiology Spectrum, 2023: 11, 2, 13 (P2) oraz Journal of Neuroinflammation, 2022: 19, 16 (P3)].

W pracy P2 badano zdolność pGSN do nasilania nieswoistej odpowiedzi immunologicznej w ludzkich neutrofilach w przebiegu zakażeń grzybiczych. Wykazano, że związek ten zwiększa fagocytozę, w szczególności znacząco poprawia ich efektywność fagocytarną wobec *Candida auris*. Co ciekawe, preinkubacja z pGSN znacząco zmniejszała formowanie się NETów i produkcji ROS podczas ekspozycji neutrofilów na *C. auris*. Dodatkowo, znacząco obniżało się też wydzielanie IL-4, IL-6 i TNF- α , a zwiększał się poziom przeciwzapalnej IL-10. Kolejną obserwacją pracy był znaczący wzrost ekspresji genów dla receptorów scavengerowych klasy B (SR-B), szczególnie CD36 i SCARB1, po dodaniu pGSN. Wykazano, że to właśnie stymulowanie ekspresji SR-B przez pGSN w ludzkich neutrofilach zwiększa fagocytozę *C. auris*.

W kolejnej pracy (P3) Doktorant zajął się niezwykle wtedy aktualnym tematem, tj. wpływem pGSN na przepuszczalność bariery krew-mózg (BBB) w modelu infekcji wirusem SARS-CoV-2. Wykazano, że obecność białka S1 wirusa zwiększa tę przepuszczalność, a obecność pGSN znosi ten niekorzystny efekt. Przechodzenie małych, dodatnio naładowanych znaczników molekularnych (4kDa-Dextran) przez BBB wskazuje na uszkodzone połączenia międzykomórkowe jako powód zwiększenia przepuszczalności po działaniu białka S1. Z kolei białko pGSN wywierało ochronny wpływ na integralność bariery krew-mózg, odwracając zwiększoną przepuszczalność spowodowaną przez SARS-CoV-2 S1, zarówno w warunkach statycznych, jak i w modelu 3D z przepływem. Kolejnym protekcyjnym efektem wywieranym przez pGSN w trakcie infekcji SARS-COV-2 był wpływ tego czynnika na komórki śródbłonna. Dodanie białka S1 wirusa spowalniało migrację komórek śródbłonna, a dodanie pGSN istotnie odwróciło ten efekt w stosunku do samego S1. Dodatkowo, wykazano, że pGSN może nieznacznie przywrócić ekspresję



VEGFR2 zmniejszoną przez S1, sugerując, że pGSN może pośrednio przeciwdziałać hamowaniu migracji komórek przez S1, potencjalnie przez znany efekt przeciwzapalny i wpływ na formowanie białek ścisłych połączeń międzykomórkowych. Podobnie jak w poprzedniej pracy, także w modelu infekcji wirusem SARS-COV-2 pGSN redukowało sekrecję cytokin prozapalnych wywołaną przez białko S1. Dodatkowo wykazano, że pGSN ogranicza aktywację NF- κ B wyzwalaną przez białko S1 w komórkach śródbłonna. Największe hamowanie wydzielania odnotowano dla IL-8 i TNF- α . Efekt hamowania wydzielania IL-8 i TNF- α indukowanego przez S1 może mieć szczególne znaczenie neuroprotektcyjne w COVID-19 jako że obie cytokiny mają zdolność do uszkodzania śródbłonna i zwiększania przepuszczalności BBB. Wyniki są zgodne z wcześniejszymi wynikami sugerującymi rolę pGSN w regulacji przepuszczalności naczyń mózgowych. Kolejnym opisanym ochronnym działaniem pGSN wobec BBB jest przywrócenie ekspresji białek tworzących ścisłe połączenia międzykomórkowe hamowanej przez białko S1 SARS-CoV-2. Badanie ekspresji tych białek w komórkach hCMEC/D3 po ekspozycji na podjednostkę S1 wirusa wykazało, że pGSN może odwracać negatywny wpływ S1 na połączenia międzykomórkowe. Podjednostka S1 zmniejszała ekspresję białek tworzących te połączenia o 20-25%, a pGSN przywracało ekspresję tych białek do poziomów zbliżonych do kontrolnych. Wyniki badań sugerują ochronną rolę pGSN wobec śródbłonna naczyniowego i bariery naczyniowej w centralnym układzie nerwowym w infekcji SARS-CoV-2..

Układ doświadczeń w pracy jest właściwy i adekwatny do stawianych hipotez. Wnioski są poparte uzyskanymi wynikami. Nie znalazłem istotnych pomyłek lub błędów w pracy. Na szczególną uwagę zasługuje bardzo rozwinięty warsztat doświadczalny Doktoranta i adekwatność zaproponowanych modeli doświadczalnych. Także bardzo responsywne podejście do aktualnej sytuacji epidemiologicznej w kontekście wyników pracy P3 zasługuje na pochwałę.

W konkluzji uważam wyniki za oryginalne, w szczególności umiejętne połączenie obserwacji dotyczących mechanizmów działania badanego białka z

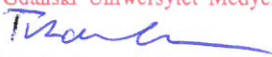


Prof. dr hab. med. Piotr Trzonkowski
Kierownik Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej
GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
Ul. Dębinki 7, bud. 27, II piętro, 80 -211 Gdańsk
Tel. 58 3491590, 1593 fax 58 3491591
e-mail: piotr.trzonkowski@gumed.edu.pl

potencjalnymi implikacjami praktycznymi. Szczególnie istotne jest uzyskanie obiecujących wyników w kontekście zakażenia SARS-COV-2 i jego neurologicznych konsekwencji. Na uwagę zasługuje też bardzo dobry warsztat badawczy Autora. Nie mam uwag krytycznych.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. 2021 poz. 478, 619, 1630) i wnioskuję o dopuszczenie Łukasza Jerzego Suprewicza do dalszych części przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o wyróżnienie pracy ze względu na bardzo przekrojowy opis mechanizmów działania badanego białka oraz praktyczne implikacje tych procesów dla leczenia infekcji i ich powikłań. Na uwagę zasługują też nowoczesne metody badawcze zwiększające precyzję wyników. Niebagatelnym jest też fakt, iż wyniki zostały już opublikowane w dobrych pismach międzynarodowych, a we wszystkich tych publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej
Gdański Uniwersytet Medyczny

prof. dr hab. med. Piotr Trzonkowski