

Warszawa, 26.07.2024 r.

prof. dr hab. n. med. Marta Wróblewska  
em. kierownik Zakładu Mikrobiologii Stomatologicznej  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

## **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**mgr Łukasza Suprewicza**

**pt. „Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej  
w zakażeniach grzybiczych”**

***Promotor: prof. dr hab. n. med. Robert Bucki***

***Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Ewelina Piktel***

Tematyka recenzowanej rozprawy doktorskiej jest niezmiernie istotna ze względu na coraz większe znaczenie w medycynie zakażeń grzybiczych i ograniczone możliwości terapii tych infekcji.

Pandemia COVID-19 (ang. coronavirus disease 2019) stanowiła niespotykany dotąd w skali globalnej problem zdrowia publicznego, w tym >775 milionów przypadków tej choroby zgłoszonych do Światowej Organizacji Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO) i >7 milionów zgonów z tego powodu. Obecnie wiadomo, że przebieg kliniczny tego schorzenia i związana z nim śmiertelność w dużej mierze zależy od nadmiernej odpowiedzi immunologicznej organizmu gospodarza na zakażenie wirusowe. Oprócz infekcji SARS-CoV-2, w przebiegu COVID-19 istotne znaczenie mają też zakażenia bakteryjne oraz – w coraz większym stopniu – grzybicze.

Innym problemem w ostatnich latach jest szerzenie się na świecie nowego gatunku drożdżaka – *Candida auris* (opisanego po raz pierwszy w 2009 r.), który wyróżnia się niespotykaną dotąd wśród drożdżaków z rodzaju *Candida* wirulencją. Gatunek ten znacznie częściej niż inne grzyby drożdżopodobne powoduje zakażenia uogólnione, ze śmiertelnością wynoszącą nawet 30–60%. *C. auris* cechuje się też opornością na prawie wszystkie aktualnie dostępne leki przeciwgrzybicze. Oporność na flukonazol wykazuje >90% szczepów tego gatunku, na worykonazol – 3–73% izolatów, a na amfoterycynę B – 13–35% szczepów *C. auris*. Dodatkowym zagrożeniem są problemy w identyfikacji tego gatunku przez automatyczne systemy diagnostyczne, stosowane rutynowo w wielu klinicznych laboratoriach mikrobiologicznych na świecie.

Wobec tej niepokojącej sytuacji epidemiologicznej na świecie, priorytetem jest poszukiwanie nowych metod terapii tych zakażeń – nie tylko w aspekcie bezpośredniego działania przeciwdrobnoustrojowego, lecz także z możliwością modyfikacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza poprzez działanie przeciwzapalne w tkankach, a jednocześnie wzmocnienie nieswoistych mechanizmów obronnych pacjenta. Taką rolę w organizmie człowieka może odgrywać immunoterapia z zastosowaniem rekombinowanej ludzkiej gelsoliny osoczowej. Rozprawa doktorska Pana mgr Łukasza Suprewicza zawiera oryginalne badania aktywności tego białka wobec organizmu gospodarza oraz w odniesieniu do wzmocnienia fagocytozy drożdżaków z gatunku *C. auris* przez neutrofile.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Łukasza Suprewicza stanowi cykl trzech tematycznie spójnych artykułów, opublikowanych w języku angielskim w 2023 r. (publikacja nr 1 – przeglądowa; publikacja nr 2 – oryginalna) oraz w 2022 r. (publikacja nr 3 – oryginalna) w recenzowanych czasopismach naukowych, którym przypisano współczynnik oddziaływania (ang. Impact factor, IF) i punktację Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN). Doktorant jest pierwszym autorem wszystkich trzech prac, stanowiących opracowania zbiorowe.

Rozprawa doktorska mgr Łukasza Suprewicza ma układ typowy dla prac doktorskich stanowiących cykl publikacji i liczy 112 stron. Rozprawa obejmuje następujące części: Spis treści, Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń, Wprowadzenie, Omówienie prac składających się na rozprawę doktorską (ta część rozprawy zawiera Cele pracy, Materiały i metody badawcze, Wyniki badań, Wnioski oraz Piśmienictwo), kserokopie trzech publikacji stanowiących cykl będący przedmiotem rozprawy, Streszczenie w języku polskim, Streszczenie w języku angielskim, Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej, Oświadczenia współautorów rozprawy doktorskiej, Uchwałę Komisji Bioetycznej oraz Dorobek naukowy.

We wstępie rozprawy (rozdział „Wprowadzenie”) liczącym 10 stron Doktorant przedstawił charakterystykę gelsoliny osoczowej, szczególnie w zakresie właściwości przeciwzapalnych tego białka i modulacji innych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Doktorant wskazał na znaczenie w medycynie wykrycia obniżonego stężenia gelsoliny osoczowej (hipogelsolinemia) w diagnostyce wielu chorób, takich jak urazy wielonarządowe, zawał mięśnia sercowego, wstrząs septyczny, zakażenie SARS-CoV-2 i inne schorzenia. Ta część rozprawy doktorskiej uzupełniona jest ryciną i tabelą zawierającą szczegółowy przegląd literatury w odniesieniu do hipogelsolinemii i innych markerów w wybranych jednostkach chorobowych. W dalszej części wstępu Doktorant przedstawił coraz większe znaczenie zakażeń grzybiczych u ludzi (w tym *Candida auris* i infekcji grzybiczych w przebiegu COVID-19) oraz możliwości opracowania nowych terapii tych chorób. Doktorant wskazał też na potencjalne wykorzystanie rekombinowanej ludzkiej gelsoliny osoczowej (ang. recombinant human plasma gelsolin, Rhu-pGSN) w leczeniu zapaleń płuc o etiologii bakteryjnej lub w przebiegu COVID-19.

Doktorant sformułował jeden cel główny i trzy szczegółowe cele pracy. Celem głównym pracy doktorskiej było zbadanie roli gelsoliny osoczowej w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej w przebiegu zakażeń grzybiczych. Cele szczegółowe obejmują następujące zagadnienia:

1. Ocena wpływu pGSN na procesy fagocytozy oraz generowanie zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NET) w odpowiedzi na obecność drożdżaków.
2. Identyfikacja molekularnych mechanizmów przeciwzapalnego działania pGSN w stosunku do neutrofilów i komórek śródbłonka poddanych działaniu mediatorów zapalnych.
3. Ocena przeciwzapalnego działania pGSN z wykorzystaniem modeli 2D i 3D bariery krew-mózg w odpowiedzi na działanie białka S pochodzącego z SARS-CoV-2.

W rozdziale „Materiały i metody badawcze” rozprawy (11 stron) wymienione są metody laboratoryjne zastosowane w badaniach eksperymentalnych. Jak zaznaczył Doktorant, techniki te są szczegółowo omówione w dwóch oryginalnych publikacjach włączonych do niniejszej rozprawy. W analizie statystycznej wyników badań eksperymentalnych zastosowano odpowiednie metody, a za wartość istotną statystycznie w obu publikacjach oryginalnych (P2 i P3) przyjęto  $p \leq 0,05$ .

Rozdział „Wyniki badań” (6 stron) zawiera dziewięć części, w których Doktorant przedstawił wyniki przeprowadzonych eksperymentów naukowych, wymienionych w rozdziale „Materiały i metody badawcze”. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawione są w formie opisowej, z odniesieniem do odpowiednich rycin zawartych w oryginalnych publikacjach P2 i P3 wchodzących w skład cyklu będącego przedmiotem rozprawy doktorskiej.

Na podstawie przeprowadzonych badań naukowych Pan mgr Łukasz Suprewicz sformułował cztery wnioski, odpowiadające celom założonym w niniejszej rozprawie doktorskiej:

1. Gelsolina osoczowa wykazuje działanie immunomodulujące wobec ludzkich neutrofilów – pobudza fagocytozę i hamuje NETozę.
2. Pobudzanie fagocytozy w ludzkich neutrofilach zależy od stymulowanego przez gelsolinę osoczową wzrostu ekspresji receptorów „scavengerowych” klasy B.
3. Gelsolina osoczowa zmniejsza wydzielanie cytokin i chemokin prozapalnych przez ludzkie neutrofile w odpowiedzi na *Candida auris*.
4. Gelsolina osoczowa ogranicza zwiększoną przepuszczalność bariery krew-mózg indukowaną przez białko S1 poprzez zmniejszenie wydzielania cytokin prozapalnych, hamowanie aktywacji czynnika transkrypcji NF- $\kappa$ B, zmniejszenie degradacji białek tworzących ścisłe połączenia międzykomórkowe oraz stymulację migracji komórek.

Piśmiennictwo zawiera 84 pozycje literatury (przedstawione według kolejności cytowania w tekście rozprawy), z których około 2/3 opublikowanych jest w latach 2018 – 2024. Bibliografia zawarta jest też w poszczególnych pracach stanowiących cykl: 100 pozycji piśmiennictwa w publikacji nr 1 (artykuł przeglądowy), 48 – w publikacji nr 2

(artykuł oryginalny) oraz 81 – w publikacji nr 3 (artykuł oryginalny). Z obowiązku recenzenta zmuszona jestem wskazać brak ujednolicenia tekstu w wykazie cytowanego piśmiennictwa (zamiennie podano pełne nazwy czasopism lub skróty nazw czasopism, w niektórych pozycjach literatury nazwy czasopism wydrukowano małymi literami, a w niektórych publikacjach brak jest numeru wolumenu i stron). Mam też zastrzeżenia w odniesieniu do braku kursywy w nazwach gatunkowych drobnoustrojów.

W dalszej części rozprawy załączone są kserokopie trzech artykułów stanowiących cykl publikacji będący przedmiotem recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Pierwszy artykuł z prezentowanego cyklu, zatytułowany „Blood-brain barrier function in response to SARS-CoV-2 and its spike protein”, ukazał się w czasopiśmie „Neurologia i Neurochirurgia Polska” w 2023 r. (IF: 2,9; punktacja MEiN: 140). Jest to praca przeglądowa, w której Doktorant i współautorzy opisali szczegółowo aktualny stan wiedzy na temat neurologicznych powikłań obserwowanych u pacjentów z COVID-19. W publikacji tej wyjaśniony jest patomechanizm uszkodzenia naczyń krwionośnych w mózgu wskutek zakażenia SARS-CoV-2 oraz wzmożonego stanu zapalnego wywołanego przez białko S tego wirusa, jednak konieczne jest zbadanie podłoża tych procesów na poziomie molekularnym. W artykule przedstawiono interakcje między cząsteczkami komórek gospodarza i białkiem S wirusa jako mechanizm pozwalający na wnikanie SARS-CoV-2 do mózgu, a także znaczenie mutacji genów kodujących białko S tego wirusa w patofizjologii COVID-19 oraz aktualne i potencjalne nowe metody leczenia tej choroby.

Publikacja nr 2 to artykuł zatytułowany „Plasma gelsolin enhances phagocytosis of *Candida auris* by human neutrophils through scavenger receptor class B”, który ukazał się w czasopiśmie „Microbiology Spectrum” w 2023 r. (IF: 3,7; punktacja MEiN: 100). W pracy tej zbadano z użyciem modelu *in vitro* możliwość stymulowania przez gelsolinę osoczkową (pGSN) fagocytozy komórek drożdżaka *Candida auris* przez ludzkie neutrofile. W odniesieniu do bakterii gelsolina osoczkowa wiąże te komórki i stymuluje ich fagocytozę przez makrofagi, a we krwi cechuje się działaniem depolimeryzującym aktyne. W tej publikacji wykazano, że pGSN znacząco zwiększa fagocytozę i wewnątrzkomórkowe zabijanie *C. auris* przez neutrofile. Jednocześnie udokumentowano, że podczas stymulacji fagocytozy tych drożdżaków przez neutrofile, zmniejszeniu ulega wytwarzanie przez nie zewnątrzkomórkowych pułapek (ang. neutrophil extracellular traps, NET) i spadek wydzielania cytokin prozapalnych. Dodatkowo badania ekspresji genów wykazały, że gelsolina osoczkowa wzmacnia odpowiedź immunologiczną gospodarza poprzez szlak zależny od receptora „wymiatającego” klasy B (ang. scavenger receptor class B, SR-B). Tak więc terapeutyczne zastosowanie rekombinowanej postaci pGSN może zwiększyć odpowiedź immunologiczną pacjenta podczas zakażenia o etiologii *C. auris*.

Trzeci wchodzący w skład cyklu artykuł pt. „Recombinant human plasma gelsolin reverses increased permeability of the blood-brain barrier induced by the spike protein of the SARS-CoV-2 virus” jest pracą, która została opublikowana w 2022 r. w czasopiśmie „Journal of Neuroinflammation” (IF: 9,3; punktacja MEiN: 100). W tej pracy Doktorant

i współautorzy poddali analizie *in vitro* modele 2D i 3D bariery krew-mózg w celu oceny, czy gelsolina osoczowa (pGSN) ma zdolność obniżenia wzmożonej przepuszczalności bariery krew-mózg indukowanej przez białko S pochodzące z SARS-CoV-2. W obu modelach potwierdzono takie działanie gelsoliny osoczowej. Co więcej, w tych modelach bariery krew-mózg w obecności gelsoliny osoczowej za pomocą różnych technik badawczych stwierdzono obniżenie prozapalnej aktywacji szlaków sygnałowych, obniżenie wytwarzania cytokin prozapalnych (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) oraz wzmożoną ekspresję białek tworzących ścisłe połączenia międzykomórkowe. Gelsolina osoczowa przywróciła też migrację komórek hCMEC/D3, hamowanych przez białko S pochodzące z SARS-CoV-2, co ma znaczenie dla angiogenezy i naprawy uszkodzonych naczyń krwionośnych. Tak więc w tej publikacji wykazano, że gelsolina osoczowa ma właściwości przeciwzapalne i działanie ochronne na integralność śródbłonna naczyń krwionośnych mózgu (zarówno w modelu statycznym, jak i z przepływem), toteż potencjalnie możliwe będzie zastosowanie tego związku w terapii pacjentów z ciężkim przebiegiem COVID-19, zwłaszcza z powikłaniami neurologicznymi.

Z obowiązku recenzenta chciałabym przedstawić następujące uwagi:

- obecnie w tłumaczeniu na język polski skrótów HIV oraz AIDS nie zaleca się używania określenia „upośledzenie” odporności (str. 17), a raczej „niedobór” odporności (jak w wykazie skrótów)
- cytowane przez Doktoranta na str. 21 rozprawy dane pochodzą z innej publikacji (Tannous et al., 2020) niż podano w rozprawie – nr 23 (Self et al., 2019); w opisie użyto mylnego określenia „W formie wielokrotnych dawek, u jednego pacjenta z grupy placebo...” – stwierdzenie to dotyczy fazy badania z podaniem 3 dawek Rhu-pGSN osobom w grupie badanej, a efekty niepożądane wystąpiły u pacjenta w grupie placebo tego badania
- wyjaśnienie terminu NEToza podane jest na stronie 31, podczas gdy skrót ten jest już wcześniej użyty w tekście rozprawy (w tytule podrozdziału 4.2.6 – str. 27) bez wyjaśnienia
- odnośnie do wniosku nr 3: chemokiny są zaliczane do cytokin, więc określenie „cytokin i chemokin” należy zmienić na „chemokin i innych cytokin”
- w tekście rozprawy zauważyłam błędy edytorskie, które oczywiście nie mają wpływu na bardzo wysoką wartość naukową pracy, np. brak niektórych skrótów w „Spisie skrótów” (np. cDNA, PCT, SIP, SSO); brak przetłumaczenia skrótu PMA (octan mirystynianu forbolu), błąd w tłumaczeniu skrótu NFKBIE na język polski (gamma zamiast epsilon); używanie słowa „medium” zamiast „podłoże” i „figura” zamiast „rycina”.

Stwierdzam, że w przeprowadzonej pracy badawczej Doktorant wykazał się ogromną wiedzą w zakresie tematyki rozprawy doktorskiej i artykułów stanowiących cykl publikacji. Doktorant cechuje się umiejętnością samodzielnego zaplanowania pracy naukowej i przeprowadzenia badań eksperymentalnych, a analiza i interpretacja uzyskanych wyników jest szczegółowa. Wnioski wynikające z przeprowadzonych doświadczeń są sformułowane poprawnie i są spójne z założonymi celami pracy doktorskiej. Ze względu na to, że niniejsza

rozprawa doktorska oparta jest na cyklu trzech publikacji, metody badawcze zastosowane w przeprowadzonych przez Doktoranta eksperymentach naukowych oraz analiza uzyskanych wyników zostały pozytywnie ocenione przez niezależnych recenzentów renomowanych czasopism naukowych. Pragnę podkreślić imponujący dotychczasowy dorobek naukowy Doktoranta (sumaryczny IF 151,891; punktacja MEiN: 3200), co świadczy o wyjątkowo dużym doświadczeniu Pana mgr Łukasza Suprewicza w prowadzeniu badań naukowych.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Łukasza Suprewicza stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Pod względem merytorycznym pracę tę oceniam bardzo wysoko ze względu na nowatorskie odkrycia w zakresie mechanizmów korzystnego działania gelsoliny osoczowej w infekcji SARS-CoV-2 i w odpowiedzi immunologicznej gospodarza na zakażenie grzybem drożdżopodobnym *C. auris*.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Łukasza Suprewicza spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023, poz. 742), toteż zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej Pana mgr Łukasza Suprewicza ze względu na nowatorskie odkrycia w zakresie mechanizmów korzystnego działania gelsoliny osoczowej w infekcji SARS-CoV-2 i w odpowiedzi immunologicznej gospodarza na zakażenie grzybem drożdżopodobnym *C. auris*, zastosowanie nowoczesnych technik laboratoryjnych oraz wyjątkowo dużą wartość naukową (IF 15,9; punktacja MEiN: 340) cyklu publikacji będącego przedmiotem recenzowanej pracy doktorskiej.

.....  
Marta Wróblewska