



Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

DZIEDZINA: nauki medyczne i nauki o zdrowiu

DYSCYPLINA: nauki medyczne

ROZPRAWA DOKTORSKA

Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych

Łukasz Jerzy Suprewicz

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

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

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej UMB

Kierownik jednostki: prof. dr hab. n. med. Robert Bucki

Rozprawa doktorska zrealizowana w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej UMB

Białystok, 2024



Medical University of Białystok

Field of Medical and Health Sciences

Scientific discipline: Medical Sciences

Doctoral Thesis

Immunoprotective features of human plasma gelsolin in fungal infections

Łukasz Jerzy Suprewicz

Supervisor: Prof. Robert Bucki, M.D., PhD

Assisting supervisor: Ewelina Piktel, M.Sc., PhD

Department of Medical Microbiology and Nanobiomedical Engineering, MUB

Head of Department: Prof. Robert Bucki, M.D., PhD

The doctoral thesis was carried out as a part of education at the Doctoral School of MUB

Białystok, 2024

Na wstępie chciałbym wyrazić moją najgłębszą wdzięczność mojemu Promotorowi, prof. dr hab. Robertowi Buckiemu, za jego nieocenione wsparcie, cierpliwość i wiedzę, które były dla mnie przewodnikiem przez cały proces badawczy. Jego pasja i zaangażowanie w naukę były i są dla mnie nieustającą inspiracją.

Równie serdeczne podziękowania kieruję do dr hab. Eweliny Piktel, Promotora pomocniczego oraz do całego zespołu Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej, za cenne wskazówki, konstruktywną krytykę oraz poświęcony czas, które znacząco przyczyniły się do ukończenia tej pracy.

Nie mogę również nie wyrazić wdzięczności mojej żonie, Klaudii, za jej niewzruszone wsparcie, zrozumienie i miłość, które były moją ostoją w najbardziej wymagających momentach tej podróży. Dziękuję za wszystkie poświęcone chwile, które umożliwiły mi skoncentrowanie się na realizacji moich ambicji naukowych.

Podziękowania kieruję również w stronę mojego dziadka, Jerzego, którego mądrość i doświadczenie życiowe stanowiły dla mnie bezcenne źródło inspiracji i motywacji w dążeniu do celu.

Praca została sfinansowana przez:
Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu Preludium bis 1 o numerze
NCN/1/PR/20/002/1122,
Narodową Agencję Wymiany Akademickiej, która finansowała staż naukowy
w Rowan University, NJ, USA (PPN/STA/2021/1/00003/U/00001)
oraz
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku w ramach projektów naukowych o numerach
SUB/1/DN/22/008/1122, SUB/1/DN/21/005/1122 i SUB/1/DN/22/006/1122

Spis treści

1. Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej.....	7
2. Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń.....	8
3. Wprowadzenie	13
3.1. Gelsolina osoczowa.....	13
3.2. Hipogelsolinemia - potencjał diagnostyczny	14
3.3. Wyzwania i perspektywy w zwalczaniu zakażeń grzybiczych.....	17
3.4. <i>Candida auris</i>	18
3.5. Zakażenia grzybicze w przebiegu COVID-19	19
3.6. Możliwości wykorzystania gelsoliny osoczowej w praktyce klinicznej.....	21
3.6.1. Rhu-pGSN u pacjentów hospitalizowanych z pozaszpitalnym zapaleniem płuc ...	21
3.6.2. Rhu-pGSN w leczeniu ciężkiego zapalenia płuc wywołanego przez COVID-19..	21
4. Omówienie prac składających się na rozprawę doktorską	23
4.1. Cele pracy.....	23
4.2. Materiały i metody badawcze	25
4.2.1. Rekombinowana ludzka gelsolina osoczowa (Rhu-pGSN).....	25
4.2.2. Pobranie krwi i izolacja neutrofilów.....	25
4.2.3. Szczep <i>Candida auris</i>	26
4.2.4. Hodowla komórek śródbłonna bariery krew-mózg	26
4.2.5. Mikroskopia konfokalna	26
4.2.6. Ocena fagocytozy, NETozy i wewnątrzkomórkowej przeżywalności grzybów	27
4.2.7. Ocena sekrecji cytokin i chemokin oraz produkcji reaktywnych form tlenu	28
4.2.8. Ocena ekspresji białek metodą Western Blot	28
4.2.9. Analiza ekspresji genów	28
4.2.10. Model 3D bariery krew-mózg w przepływie oraz ocena przepuszczalności.....	29
4.2.11. Ocena migracji.....	29
4.2.12. Analiza statystyczna	29

4.3. Wyniki badań	30
4.3.1. pGSN nasila fagocytozę i wewnątrzkomórkowe zabijanie komórek <i>C. auris</i> przez ludzkie neutrofile.	30
4.3.2. pGSN hamuje wydzielanie NETów przez neutrofile	31
4.3.3. pGSN zmniejsza proces zapalny wywołany przez <i>C. auris</i>	31
4.3.4. Receptory klasy B typu „scavenger” jako cel dla pGSN na ludzkich neutrofilach.	31
4.3.5. pGSN hamuje wzrost przepuszczalności BBB indukowany przez białko S1 SARS-CoV-2.	32
4.3.6. pGSN odwraca hamowanie migracji komórek hCMEC/D3 wywołanej przez białko S1.	33
4.3.7. pGSN redukuje sekrecję cytokin prozapalnych wywołaną przez białko S1 SARS-CoV-2 na wczesnym etapie stymulacji komórek.	33
4.3.8. pGSN zapobiega inhibicji ekspresji białek tworzących ścisłe połączenia międzykomórkowe wywołanej przez białko S1 SARS-CoV-2.	34
4.3.9. pGSN ogranicza aktywację NF- κ B wyzwalaną przez białko S1 w komórkach śródbłonna.	34
4.4. Wnioski	36
4.5. Piśmiennictwo	37
5. Publikacja nr 1 (P.1)	42
6. Publikacja nr 2 (P.2)	54
7. Publikacja nr 3 (P.3)	67
8. Streszczenie w języku polskim	83
9. Streszczenie w języku angielskim	84
10. Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej	85
11. Oświadczenia współautorów rozprawy doktorskiej	88
12. Uchwała Komisji Bioetycznej	104
13. Dorobek naukowy	105
13.1. Wykaz publikacji naukowych	105

13.1.1. Prace przeglądowe	105
13.1.2. Prace oryginalne	106
13.2. Komunikaty zjazdowe – czynnie prezentowane prace jako pierwszy autor.....	110
13.3. Projekty badawcze	111
13.4. Staż naukowy	112
13.5. Wykaz innych aktywności naukowych.....	112
13.6. Stypendia krajowe	112

1. Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej

Łączna wartość Impact Factor dla cyklu publikacji: 15,9

Łączna ilość punktów MEiN dla cyklu publikacji: 340

Lista publikacji stanowiących rozprawę doktorską:

Praca przeglądowa:

Publikacja nr 1 (P.1) – Suprewicz, Ł., Fiedoruk, K., Czarnowska, A., Sadowski, M., Strzelecka, A., Galie, P.A., Janmey, P.A., Kułakowska, A., Bucki, R.

Blood-brain barrier function in response to SARS-CoV-2 and its spike protein.

Neurologia i Neurochirurgia Polska, 2023: 57, 1, s. 14-25. DOI: 0.5603/PJNNS.a2023.0014

IF: 2,9 **MEiN:** 140 pkt. **Data publikacji:** 22.02.2023 r.

Prace oryginalne:

Publikacja nr 2 (P.2) – Suprewicz, Ł., Skłodowski, K., Walewska, A., Deptuła, P., Sadzyńska, A., Eljaszewicz, A., Moniuszko, M., Janmey, P.A., Bucki, R.

Plasma Gelsolin Enhances Phagocytosis of Candida auris by Human Neutrophils through Scavenger Receptor Class B.

Microbiology Spectrum, 2023: 11, 2, 13 pp. DOI: 10.1128/spectrum.04082-22

IF: 3,7 **MEiN:** 100 pkt. **Data publikacji:** 21.02.2023 r.

Publikacja nr 3 (P.3) – Suprewicz, Ł., Tran, K.A., Piktel, E., Fiedoruk, K., Janmey, P.A., Galie, P.A., Bucki, R.

Recombinant human plasma gelsolin reverses increased permeability of the blood–brain barrier induced by the spike protein of the SARS-CoV-2 virus.

Journal of Neuroinflammation, 2022: 19, 16 pp. DOI: 10.1186/s12974-022-02642-4

IF: 9,3 **MEiN:** 100 pkt. **Data publikacji:** 24.11.2022 r.

2. Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń

ABP (ang. actin-binding protein) - białko wiążące aktynę

AIDS (ang. acquired immunodeficiency syndrome) - zespół nabytego niedoboru odporności

AKT (ang. serine/threonine kinase) - kinaza serynowo-treoninowa

AML (ang. acute myeloblastic leukemia) - ostra białaczka szpikowa

ANOVA (ang. analysis of variance) - analiza wariancji

BBB (ang. blood-brain barrier) - bariera krew-mózg

BSA (ang. bovine serum albumin) - surowicza albumina bydlęca

CAC (ang. COVID-19-associated candidiasis) - kandydoza związana z COVID-19

CAM (ang. COVID-19-associated mucormycosis) - mukormykoza związana z COVID-19

CAP (ang. community-acquired pneumonia) - pozaszpitalne zapalenie płuc

CAPA (ang. COVID-19-associated pulmonary aspergillosis) - aspergiloza związana z COVID-19

CFW (ang. calcofluor white) - barwnik fluorescencyjny uwidaczniający ściany komórkowe grzybów

CGD (ang. chronic granulomatous disease) - przewlekła choroba ziarniniakowa

CHUK (ang. inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase) - inhibitor kinazy jądrowego czynnika kappa-B

COVID-19 (ang. coronavirus disease 2019) - choroba wywołana zakażeniem koronawirusem SARS-CoV-2

CRP (ang. C-reactive protein) - białko C-reaktywne

CYFRA 21-1 – marker nowotworowy

DAMPs (ang. damage-associated molecular patterns) - wzorce molekularne związane z uszkodzeniami

DAPI (ang. 4',6-diamidino-2-phenylindole) – barwnik uwidaczniający jądra komórkowe

DCFH-DA (ang. dichlorodihydrofluorescein diacetate) - sonda uwidaczniająca reaktywne formy tlenu

DNA (ang. deoxyribonucleic acid) - kwas deoksyrybonukleinowy

EBM-2 (ang. endothelial cell growth basal medium 2) - medium do hodowli komórek śródbłonkowych

eDNA (ang. extracellular DNA) - DNA zewnątrzkomórkowe

EDTA (ang. ethylenediaminetetraacetic acid) - kwas etylenodiaminotetraoctowy

ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) - metoda immunoenzymosorpcyjna

ESR (ang. erythrocyte sedimentation rate) - szybkość opadania erytrocytów

Fas/FasL – ligand Fas/FasL

FBS (ang. fetal bovine serum) - płodowa surowica bydlęca

FGF (ang. fibroblast growth factor 21) - czynnik wzrostu fibroblastów 21

FITC (ang. fluorescein isothiocyanate) - izotiocyanian fluoresceiny

GAPDH (ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) - dehydrogenaza gliceraldehydu 3-fosforanowego

GDF-15 (ang. growth differentiation factor 15) - różnicujący czynnik wzrostu 15

GM-CSF (ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) - czynnik wzrostu kolonii granulocytarno-makrofagowych

hCMEC/D3 (ang. human cerebral microvascular endothelial cells) - ludzkie komórki śródbłonka naczyń mózgowych

HDL (ang. high-density lipoprotein) - lipoproteina o dużej gęstości

HEPES (ang. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) - kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazyneetanosulfonowy

HIV (ang. human immunodeficiency virus) - ludzki wirus niedoboru odporności

ICAM (ang. intercellular adhesion molecule) - cząsteczka adhezji międzykomórkowej

IFN- γ (ang. interferon gamma)

IKBKB (ang. inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta) - inhibitor podjednostki beta kinazy jądrowego czynnika kappa-B

IKBKG (ang. inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit gamma) - inhibitor podjednostki gamma kinazy jądrowego czynnika kappa-B

IL (ang. Interleukin) - Interleukina

LPA (ang. lysophosphatidic acid) - kwas lizofosfatydowy

LPS (ang. lipopolysaccharide) - lipopolisacharyd

LTA (ang. lipoteichoic acid) - kwas lipoteichoowy

MAPK (ang. mitogen-activated protein kinases) - kinazy białkowe aktywowane mitogenami

MD (ang. mitochondrial diseases) - choroby mitochondrialne

MOI (ang. multiplicity of infection) - mnogość infekcji, stosunek ilości drobnoustroju do ilości komórek

MPO (ang. myeloperoxidase) - mieloperoksydaza

NET (ang. neutrophil extracellular traps) - zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilowe

NFKBIA (ang. nuclear factor-kappa-B-inhibitor alpha) - inhibitor czynnika jądrowego-kappa-B alfa

NFKBIB (ang. nuclear factor-kappa-B-inhibitor beta) - inhibitor czynnika jądrowego-kappa-B beta

NFKBIE (ang. nuclear factor-kappa-B-inhibitor epsilon) - inhibitor czynnika jądrowego-kappa-B gamma

NF- κ B (ang. nuclear factor kappa B) - jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B

OIT - oddział intensywnej terapii

OUN - ośrodkowy układ nerwowy

OZT - ostre zapalenie trzustki

PAF (ang. platelet-activating factor) - czynnik aktywujący płytki

PAMPs (ang. pathogen-associated molecular patterns) - wzorce molekularne związane z patogenami

PBS (ang. phosphate buffered saline) - chlorek sodu buforowany fosforanami

pGSN (ang. plasma gelsolin) - gelsolina osoczowa

PI(4,5)P₂ (ang. phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) - fosfatydyloinozytol-4,5-bisfosforan

PI3K (ang. phosphoinositide 3-kinases) - kinaza-3 fosfoinozytydowa

PMA (ang. phorbol 12-myristate 13-acetate)

PsA (ang. psoriatic arthritis) - łuszczycowe zapalenie stawów

PVDF (ang. polyvinylidene fluoride) - polifluorek winylidenu

qRT-PCR (ang. quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction) - ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym

RDS (ang. respiratory distress syndrome) - zespół zaburzeń oddychania

Rhu-pGSN (ang. recombinant human plasma gelsolin) - rekombinowana ludzka gelsolina osoczowa

RNA (ang. ribonucleic acid) – kwas rybonukleinowy

ROS (ang. reactive oxygen species) - reaktywne formy tlenu

RPMI 1640 (ang. Roswell Park Memorial Institute) - medium komórkowe

S1 SARS-CoV-2 (ang. S1-subunit of Spike protein from SARS-CoV-2) - podjednostka S1 białka S pochodzącego z SARS-CoV-2

S1F (ang. sphingosine-1-phosphate) - sfingozyno-1-fosforan

SAE (ang. severe adverse event) - poważne działania niepożądane

SARS-CoV-2 (ang. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) - koronawirus 2 powodujący ciężki ostry zespół oddechowy

SELE (ang. selectin E) - selektyna E

SLE (ang. systemic lupus erythematosus) - toczeń rumienowaty układowy

SOFA (ang. sequential organ failure assessment score) - skala niewydolności narządów związana z sepsą

SR-B (ang. scavenger receptor class B) - receptor "scavengerowy" ("wymiatający") klasy B

TEER (ang. transendothelial electrical resistance) - przezśródbłonkowy opór elektryczny

TJ (ang. tight junctions) - ścisłe połączenia międzykomórkowe

TLR (ang. Toll-like receptor) - receptory Toll-podobne

TNF- α (ang. tumor necrosis factor alpha) - czynnik martwicy nowotworów

VCAM (ang. vascular cell adhesion protein) - białko adhezji komórkowej naczyń krwionośnych

VEGFR2 (ang. vascular endothelial growth factor receptor 2) - receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego 2

WB - Western Blot

WBC (ang. white blood cells) - białe krwinki

WHO (ang. World Health Organization) - Światowa Organizacja Zdrowia

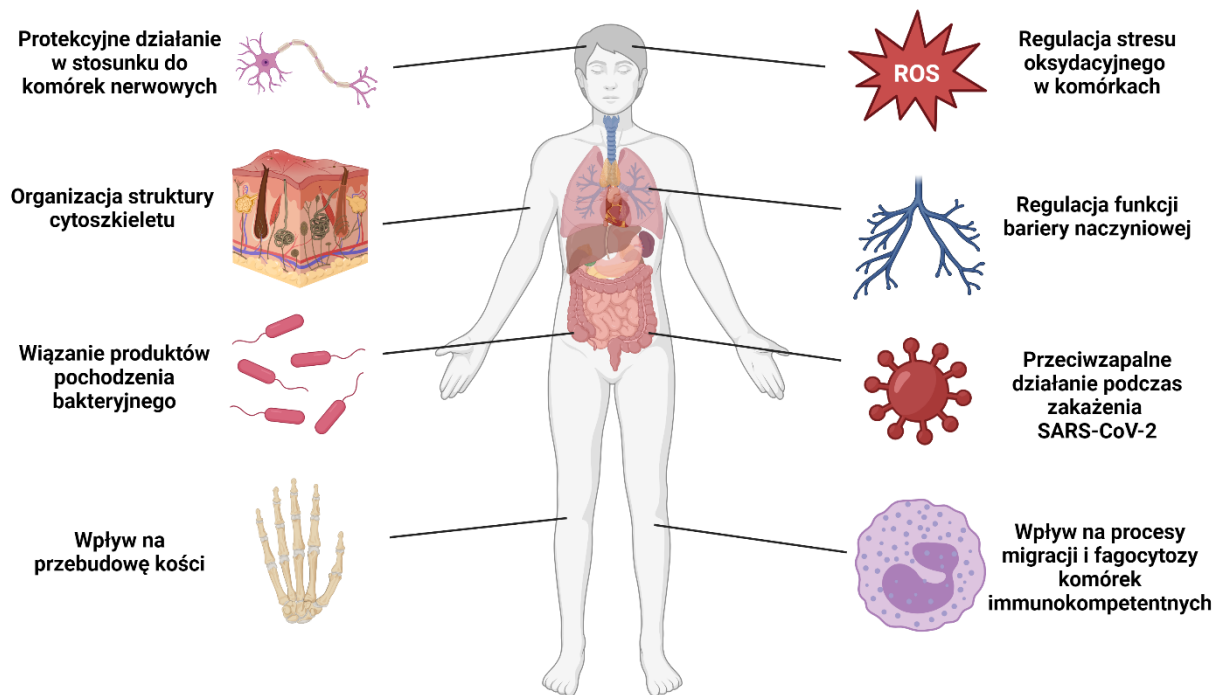
ZO-1 (ang. zonula occludens 1) - białko zonula occludens 1

3. Wprowadzenie

3.1. Gelsolina osoczowa

Gelsolina osoczowa (pGSN, ang. plasma gelsolin) to zewnątrzkomórkowa izoforma gelsoliny obecnej w większości ludzkich komórek, która po raz pierwszy została opisana przez Helen Yin i Thomasa Stossel'a w 1979 roku (1). Do tej pory poznano trzy izoformy gelsoliny: cytozolową, osoczową oraz gelsolinę-3, obecną w płynie mózgowo-rdzeniowym (2, 3). Pomimo różnych miejsc występowania oraz szerokiego spektrum pełnionych funkcji biologicznych, wszystkie izoformy tego białka kodowane są przez ten sam gen zlokalizowany na dziewiątym chromosomie (4). W warunkach fizjologicznych stężenie pGSN we krwi ludzkiej wynosi od 150 do 300 $\mu\text{g/mL}$ (3). Jest ona również obecna w różnych płynach ustrojowych, w tym w limfie i płynie stawowym (5, 6). Głównymi źródłami pGSN w krwioobiegu są mięśnie szkieletowe poprzecznie prążkowane, mięśnie gładkie i mięsień sercowy (7). pGSN ma masę 83 kDa i składa się z 6 domen (G1-G6). Są one zaangażowane w regulację formowania cytoszkieletu komórki poprzez wiązanie i cięcie filamentów aktynowych, oraz nukleację monomerów aktyny (8). Na poziomie struktury białka, pGSN charakteryzuje się unikalną, zlokalizowaną w N-terminalnej części, nieobecną w formie cytoplazmatycznej, sekwencją 24 aminokwasów, określaną jako „przedłużenie osoczowe” (ang. plasma extension). Ponadto, pGSN zawiera specyficzne wiązanie dwusiarczkowe między Cys188 a Cys201 w domenie G2 (9). Wiązanie to jest kluczowe, ponieważ zapewnia zwiększoną stabilność w środowisku zewnątrzkomórkowym. Molekularna konformacja gelsoliny jest regulowana przez Ca^{2+} i fosfatydyloinozytole, a zwłaszcza fosfatydyloinozytol-4,5-bisfosforan ($\text{PI}(4,5)\text{P}_2$). pGSN pełni funkcję buforu aktynowego we krwi, a ponadto moduluje również odpowiedź immunologiczną poprzez preferencyjne wiązanie związków pochodzących ze ściany komórkowej bakterii, tj. lipopolisacharydów (LPS) i kwasu lipotejchojowego (LTA), pochodzących odpowiednio z bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich (10, 11). Dzięki preferencyjnemu wiązaniu LPS i LTA, pGSN pośrednio zapobiega aktywacji receptorów Toll-podobnych (TLR, ang. Toll-like receptor) (10). Dodatkowo, pGSN wiąże się z szerokim spektrum związków bioaktywnych, w tym z kwasem lizofosfatydowym (LPA), sfingozyno-1-fosforanem (S1P) i czynnikiem aktywującym płytki krwi (PAF). Zwiększa to zakres jej właściwości przeciwzapalnych, sugerując istotną rolę w procesach takich jak gojenie ran, przebudowa tkanek, rozwój nowotworów, fagocytoza bakterii czy

angiogeneza (12, 13). Udział pGSN w różnych procesach życiowych w organizmie człowieka przedstawia **Rycina 1**.



Rycina 1. Różnorodne funkcje gelsoliny osoczowej w organizmie człowieka.

3.2. Hipogelsolinemia - potencjał diagnostyczny

Hipogelsolinemia, to stan charakteryzujący się obniżonym poziomem pGSN we krwi, który został zaobserwowany w różnych stanach chorobowych. Należą do nich urazy wielonarządowe, urazy mózgu i wątroby, zawał mięśnia sercowego, martwica tkanek, wstrząs septyczny oraz zakażenie wirusem SARS-CoV-2 (14-18). Stany te często charakteryzują się znacznie niższym stężeniem pGSN we krwi w porównaniu do stężenia obserwowanego u osób zdrowych. Wynika to z faktu wiązania pGSN z aktyną uwolnioną z uszkodzonych komórek, które następnie w kompleksie pGSN-aktyna są usuwane z krwioobiegu (8). Stężenie pGSN we krwi może służyć jako marker nasilenia procesów chorobowych. Na przykład, znaczny spadek ilości pGSN może sygnalizować zakres uszkodzenia tkanek lub podwyższone ryzyko dalszych powikłań (19-24). W przypadkach takich schorzeń, jak wstrząs septyczny, niski poziom pGSN może korelować z podwyższonym poziomom markerów zapalnych. Towarzyszące spadkowi pGSN, zmiany innych markerów w różnych stanach chorobowych podsumowano w **Tabeli 1**. Zmiany stężenia pGSN we krwi dostarczają istotnych informacji o bezpośrednim zagrożeniu życia pacjenta i złym rokowaniu. Spadek stężenia gelsoliny osoczowej we krwi przy

określonym typie uszkodzeń tkanek (np. zespół zaburzeń oddychania – ang. respiratory distress syndrome, RDS) wyprzedza, zmiany innych markerów chorobowych. Ta obserwacja wskazuje, że oznaczanie pGSN może być cennym markerem diagnostycznym, szczególnie u pacjentów z urazami wielonarządowymi czy zakażeniami inwazyjnymi. Jednakże potencjalna rola pGSN jako markera diagnostycznego jest mało poznana i wymaga dalszych badań.

Tabela 1. Jednostki chorobowe, w których dochodzi do hipogelsolinemii i zmian stężenia we krwi innych markerów chorobowych.

Jednostka chorobowa	Stężenie pGSN	Metoda detekcji	Inne badane markery	Ref.
Ostre zapalenie trzustki (OZT)	15-165 µg/mL vs. 130–240 µg/mL w osoczu zdrowych.	WB	Obniżony poziom sfingozyno-1-fosforanu i podwyższony poziom CRP, WBC, amylazy i lipazy koreluje z niskim poziomem pGSN we krwi pacjentów z OZT.	(25)
SARS-CoV-2	~40±5 µg/ml vs. ~70±5 µg/ml w osoczu zdrowych.	ELISA	Stężenia pGSN i IL-6 jako istotny czynnik prognostyczny łagodniejszej choroby i korzystnych wyników leczenia.	(18)
Przewlekła choroba ziarniniakowa (CGD)	52,5±16,3 µg/ml w kontroli vs. 33,2±8,3 µg/ml w surowicy pacjentów z CGD.	ELISA	Wzrost stężenia CRP.	(26)
Urosepsa	73,48±11,35 mg/L vs 289,41±39,72 mg/mL w grupie kontrolnej po 7 dniach infekcji, mierzona w ludzkiej surowicy.	ELISA	Znacząco podwyższony poziom PCT wśród pacjentów z urosepsą.	(27)
Rak głowy i szyi	81,03±38,14 µg/mL vs. 181,7±58,54	ELISA	Wyższy poziom krążącego CYFRA 21-1	(28)

	µg/mL w osoczu grupy kontrolnej.		i rozpuszczalnego Fas. Niższy poziom FasL.	
Łuszczycowe zapalenie stawów (PsA), łuszczyca	Spadek pGSN w osoczu pacjentów z PsA w porównaniu z grupą kontrolną i pacjentami z samą łuszczycą (p<0,0001). Punkt odcięcia dla pGSN wynosił 172,5 mg/L.	ELISA	Istotną ujemną korelację pGSN z markerami stanu zapalnego, takimi jak CRP i ESR (odpowiednio p<0,0001 i p=0,039). Istotną ujemną korelację między pGSN a aktywnością PsA (p<0,0001).	(29)
Toczeń rumieniowaty układowy (SLE)	176,02±74,9 µg/ml w porównaniu z grupą kontrolną 217,13±86,7 µg/ml; P=0,005, vs. 104,84±41,7 µg/ml; P=0,002 u pacjentów z zaostrzeniem SLE.	WB/ ELISA	Poziom pGSN skorelowany z poziomem cholesterolu HDL (r=0,316, P<0,001).	(30)
Ostra białaczka limfoblastyczna u dzieci	148,4±3,005 µg/mL vs 193,7±5,673 µg/mL w osoczu zdrowych.	ELISA	Korelacja spadku stężenia białka rdzeniowego agrecanu, alfa-2-HS-glikoproteiny, łańcucha A czynnika krzepnięcia XIII i pGSN.	(31)
Początkowa faza sepsy u pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML)	32±41 µg/ml vs. 176±37 µg/ml, p<0,001 w grupie kontrolnej.	Western Blot	Niskie stężenie pGSN we krwi pacjentów z AML i sepsą, skorelowane z wysokim wskaźnikiem SOFA.	(15)
Choroby mitochondrialne (MD)	233 µg/ml (zakres 34-960 µg/ml) vs. 432 µg/ml (zakres 213-830 µg/ml), w osoczu grupy kontrolnej.	ELISA	pGSN i GDF-15 preferencyjnie rozróżniały pacjentów z MD i bez MD w wieku poniżej 50 lat, podczas gdy FGF-21 najlepiej klasyfikował starszych pacjentów.	(32)

			pGSN poprawia dokładność diagnozy MD zapewnianą przez FGF-21 i GDF-15.	
Rak jelita grubego	97,19±47,91 µg/ml vs. 172,83±51,31 µg/m w osoczu zdrowych.	WB	Słaba ujemna korelacja między pGSN i CRP.	(33)
Niedrobnokomórkowy rak płuc	123,99±59,66 µg/ml vs. 172,83±51,31 µg/ml w osoczu zdrowych.	WB	Słaba ujemna korelacja między pGSN i CRP.	(33)

Wyjaśnione skróty: WB – Western Blot; ELISA - metoda immunoenzymosorpcyjna; CRP – białko C-reaktywne; WBC – białe krwinki; IL-6 – Interleukina 6; CYFRA 21-1 – marker nowotworowy; Fas/FasL – ligand Fas; ESR – szybkość opadania erytrocytów; HDL – lipoproteina o wysokiej gęstości; SOFA - skala niewydolności narządów związana z sepsą; GDF-15 – różnicujący czynnik wzrostu; FGF-21 – czynnik wzrostu fibroblastów 21

3.3. Wyzwania i perspektywy w zwalczaniu zakażeń grzybiczych

Zakażenia grzybicze stanowią ważne wyzwanie dla zdrowia publicznego z powodu ich rozpowszechnienia oraz rosnącej śmiertelności (34). Występowanie i rodzaje zakażeń grzybiczych mogą się różnić w zależności od regionu geograficznego, co wiąże się z różnicami w klimacie, stylu życia i dostępie do opieki zdrowotnej. Mogą one występować w różnych postaciach, od powierzchniowych infekcji skóry po ciężkie zakażenia systemowe. Powierzchniowe i skórne zakażenia są najczęściej spotykanymi typami infekcji grzybiczych, obejmują one grzybicę stóp, paznokci, łupież pstry oraz inne infekcje skóry i błon śluzowych (35). Są zazwyczaj mniej groźne, ale mogą powodować dyskomfort i komplikacje, jeśli nie zostaną właściwie leczone. Szacuje się, że blisko miliard ludzi na świecie cierpi z powodu powierzchniowych infekcji grzybiczych skóry, włosów i paznokci. Wysoka temperatura i wysoka wilgotność powietrza sprzyja pojawieniu się powierzchniowych zakażeń grzybiczych, stąd ich występowanie jest znacznie częstsze w rejonach tropikalnych (36). Głębokie zakażenia systemowe, takie jak kandydoza inwazyjna, aspergiloza czy kryptokokoza, stanowią poważne zagrożenie, szczególnie dla osób z osłabionym układem odpornościowym, w tym pacjentów oddziałów hematologicznych, intensywnej terapii, osób zakażonych ludzkim wirusem upośledzenia odporności (HIV) i z zespołem nabytego upośledzenia odporności (AIDS), po przeszczepach organów lub przyjmujących leki immunosupresyjne (37). Infekcje

te mogą prowadzić do poważnych powikłań skutkujących śmiercią. W przypadku niektórych inwazyjnych zakażeń grzybiczych śmiertelność może sięgać nawet 50% (38).

System immunologiczny odgrywa kluczową rolę w obronie przed zakażeniami grzybiczymi (39). Makrofagi, neutrofile i komórki dendrytyczne są pierwszą linią obrony zdolną do eliminacji komórek grzybów (40). Komórki T i komórki B są aktywowane, aby zapewnić długotrwałą odporność i pamięć immunologiczną (41). Zmiany w stężeniu pGSN we krwi mogą mieć wpływ na skuteczność odpowiedzi immunologicznej. Zaobserwowano, że pGSN stymuluje fagocytozę oraz migrację makrofagów *in vitro* (42, 43). Te procesy są istotne dla skutecznej odpowiedzi immunologicznej, umożliwiając szybką mobilizację komórek odpornościowych do miejsc infekcji i stymulację fagocytozy. Niskie stężenie pGSN (hipogelsolinemia), może osłabiać zdolność organizmu do zwalczania zakażeń, co podkreśla znaczenie badań nad rolą tego białka w kontekście odporności przeciwgrzybiczej.

Dodatkowym wyzwaniem w zwalczaniu zakażeń grzybiczych jest występowanie, szczególnie w środowiskach szpitalnych, grzybów lekoopornych, czyli takich, które wykazują oporność na jedną lub więcej klas leków przeciwgrzybiczych (44). Do najbardziej znanych należą *Candida auris* wśród drożdżaków, a wśród grzybów pleśniowych grzyby z rodzaju *Rhizopus*, *Mucor*, oraz *Lichtheimia* (dawniej *Absidia*), które wykazują oporność na większość leków przeciwgrzybiczych (45-47). Oporność często wynika z mutacji genetycznych, w wyniku których dochodzi do zmian celów terapeutycznych leków w komórkach grzybów (48). Dodatkowo, wiele gatunków grzybów, w tym *Candida*, tworzy biofilm, który jest znacznie trudniejszy do zwalczenia przy użyciu standardowych terapii (49). Wielolekooporność często prowadzi do wydłużenia czasu leczenia, większych kosztów i zwiększonej śmiertelności (50).

3.4. *Candida auris*

Candida auris jest przykładem patogenu, który łączy w sobie wysoką lekooporność ze zdolnością unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Te dwie cechy czynią go wyjątkowym wyzwaniem dla systemów opieki zdrowotnej na całym świecie. *C. auris* powoduje ciężkie infekcje inwazyjne, charakteryzujące się wskaźnikiem śmiertelności sięgającym nawet 60% (51). Pierwsze zakażenie tym patogenem zostało odnotowane w Japonii w 2009 roku, a od tego czasu pojawiło się wiele ognisk zakażeń na całym świecie (52). Kontrolowanie zakażeń *C. auris* stanowi wyzwanie, ponieważ mikroorganizm ten może być błędnie zidentyfikowany jako inny drożdżak przez powszechnie stosowane metody

identyfikacji. Jest on zdolny również do kolonizowania pacjentów przez długi czas, utrzymując się w środowisku szpitalnym, gdzie może rozprzestrzeniać się między pacjentami i personelem (53, 54).

Zdolność do unikania wrodzonej odpowiedzi immunologicznej i wysoki poziom oporności na leki przeciwgrzybicze sprawiają, że *C. auris* wyróżnia się spośród innych gatunków *Candida*, co czyni go szczególnie groźnym dla pacjentów z niedoborami odporności. Najnowsze badania podkreślają, że zdolność *C. auris* do unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza jest wynikiem mniejszej stymulacji komórek odpornościowych w porównaniu z *C. albicans* (55, 56), (*C. auris* wykazuje zdolność maskowania β -glukanów na powierzchni) co prowadzi do ograniczenia fagocytozy (zmniejszenia wewnątrzkomórkowego zabijania jego komórek) (57).

3.5. Zakażenia grzybicze w przebiegu COVID-19

SARS-CoV-2 to β -koronawirus, który zapoczątkował światową pandemię w 2019 roku, powszechnie określaną jako pandemia COVID-19 (58). Wirus ten głównie wywołuje zmiany zapalne płuc, charakteryzujące się zakrzepicą i zwiększoną przepuszczalnością naczyń płucnych, co może prowadzić do obrzęku i krwotoku (59). Oprócz wpływu na układ oddechowy, zakażenie SARS-CoV-2 może prowadzić do uszkodzenia innych narządów. Bezpośrednie działanie białka kolca wirusa (białko S, ang. Spike protein), odpowiedzialne za interakcję wirusa z komórkami gospodarza wraz z burzą cytokin wywołaną odpowiedzią zapalną, negatywnie wpływa na naczynia krwionośne, serce, nerki i mózg (60-63). Szerokie spektrum objawów klinicznych w przebiegu COVID-19 ma związek ze zwiększoną podatnością na oportunistyczne infekcje grzybicze (64).

Bardzo niebezpiecznymi powikłaniami u pacjentów z COVID-19 w ciężkim stanie klinicznym są inwazyjne infekcje grzybicze. Są one głównie powodowane przez gatunki należące do: *Candida*, *Aspergillus* oraz *Mucorales*. W związku z tym, infekcje te są klasyfikowane jako kandydoza związana z COVID-19 (CAC, ang. COVID-19-associated candidiasis), aspergiloza płucna związana z COVID-19 (CAPA, ang. COVID-19-associated pulmonary aspergillosis) oraz mukormykoza związana z COVID-19 (CAM, ang. COVID-19-associated mucormycosis) (65-67). Odnotowano dziesięciokrotny wzrost częstości występowania kandydemii u pacjentów z COVID-19 w porównaniu do pacjentów bez tego rozpoznania (68, 69). Najczęściej identyfikowanym drożdżakiem w tych przypadkach jest *Candida albicans*, stanowiący 44% wszystkich przypadków (70). Jednakże, w niektórych

regionach, *C. auris* był dominującym patogenem (71). W ogniskach kandydemii *C. auris* związanych z COVID-19 wskaźnik śmiertelności osiągnął nawet 83% (72).

Eskalację infekcji grzybiczych w trakcie pandemii COVID-19 można przypisać różnym czynnikom. Należą do nich immunosupresja w przebiegu COVID-19, przedłużony pobyt na Oddziałach Intensywnej Terapii (OIT), oraz interwencje medyczne, takie jak wentylacja mechaniczna i systemowa terapia kortykosteroidami (73). Te czynniki, w połączeniu z zaburzeniami odpowiedzi immunologicznej oraz bezpośrednim wpływem wirusa na układ odpornościowy, przy równoczesnej ekspozycji pacjentów na inwazyjne metody terapeutyczne, znacząco zwiększają ryzyko oportunistycznych infekcji grzybiczych.

Co więcej, w trakcie pandemii COVID-19 zaobserwowano wzrost częstości inwazyjnych infekcji grzybiczych w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (OUN), co często przypisuje się oddziaływaniu białka S wirusa SARS-CoV-2 (74-78). Białko to narusza integralność komórek śródbłonna, które formują barierę krew-mózg (BBB, ang. blood-brain barrier) poprzez różnorodne mechanizmy (79). Do tych mechanizmów należy indukcja stanu zapalnego, zaburzenia ekspresji białek odpowiedzialnych za międzykomórkowe połączenia ścisłe (TJ, ang. tight junctions) oraz bezpośrednie interakcje z komórkami śródbłonna tworzącymi BBB (75, 80). Zwiększona przepuszczalność BBB może ułatwiać patogenom grzybiczym inwazję i infekcję OUN, których śmiertelność wynosi nawet 50% (81-83). Dokładne mechanizmy, przez które białko S uszkadza BBB zostały opisane w pracy przeglądowej (**P.1**) stanowiącej część rozprawy doktorskiej.

W świetle powyższych informacji, nasuwa się konieczność poszukiwania skutecznych terapii przeciwzapalnych i przeciwgrzybiczych, które mogłyby mieć zastosowanie w terapii zakażeń grzybiczych występujących w przebiegu COVID-19. Jednym z potencjalnych kandydatów może być pGSN, dzięki jej zdolności do regulowania procesów zapalnych, może odgrywać kluczową rolę w łagodzeniu ciężkiego przebiegu COVID-19. Dodatkowo, jako czynnik stabilizujący strukturę cytoszkieletu, pGSN może zmniejszać uszkodzenia tkanek spowodowane burzą cytokinową. Zastosowanie pGSN jako terapii wspomagającej w leczeniu COVID-19 może być właściwą strategią, zwłaszcza w kontekście zwiększonego ryzyka infekcji grzybiczych i innych powikłań. Należy jednak pamiętać, że dalsze badania są konieczne, aby dokładnie określić celowość i bezpieczeństwo takiej potencjalnej metody terapeutycznej.

3.6. Możliwości wykorzystania gelsoliny osoczowej w praktyce klinicznej

pGSN, znana ze swoich właściwości immunomodulujących, wzbudza zainteresowanie jako potencjalny czynnik terapeutyczny w chorobach płuc o etiologii bakteryjnej i wirusowej. Dwa badania kliniczne z ostatnich lat opisane na stronie <https://clinicaltrials.gov/> wykazały korzyści terapii z użyciem rekombinowanej ludzkiej gelsoliny osoczowej (Rhu-pGSN, ang. recombinant human plasma gelsolin) u pacjentów z zapaleniem płuc.

3.6.1. Rhu-pGSN u pacjentów hospitalizowanych z pozaszpitalnym zapaleniem płuc

W badaniu oceniano bezpieczeństwo terapii różnymi dawkami Rhu-pGSN u pacjentów hospitalizowanych z pozaszpitalnym zapaleniem płuc (CAP, ang. community-acquired pneumonia) (23). Pacjenci z łagodnym CAP, przyjęci na oddziały szpitalne inne niż OIT, byli losowo przydzielani w stosunku 3:1 do grupy otrzymującej dodatkowo Rhu-pGSN lub placebo podawane dożylnie. Łącznie 33 uczestników otrzymywało leczenie Rhu-pGSN: 8 w formie jednorazowej dawki i 25 w formie wielokrotnych dawek. W formie jednorazowej dawki, pacjentom podano Rhu-pGSN w dawce 6 mg/kg masy ciała. W formie wielokrotnych dawek, Rhu-pGSN podawano codziennie w dawkach 6, 12 lub 24 mg/kg przez trzy kolejne dni. Działania niepożądane były ogólnie łagodne w obu grupach leczonych, bez względu na dawkę. Jedynym poważnym działaniem niepożądanym (SAE, ang. serious adverse event) w formie jednorazowej dawki było zapalenie płuc niezwiązane z lekiem u pacjenta otrzymującego Rhu-pGSN, który zmarł po wdrożeniu opieki paliatywnej. W formie wielokrotnych dawek, u jednego pacjenta z grupy placebo zanotowano dwa przypadki SAE, w tym zatorowość płucną, która doprowadziła do zgonu. Wśród 18 pacjentów, którym podawano Rhu-pGSN w formie wielokrotnych dawek nie odnotowano poważnych ani związanych z lekiem działań niepożądanych. Nudności i podwyższone ciśnienie krwi zgłaszano u dwóch pacjentów. Średni okres półtrwania Rhu-pGSN przekraczał 17 godzin we wszystkich schematach dawkowania, a poziomy powyżej stężenia fizjologicznego były utrzymywane przez cały 24-godzinny okres podawania białka w dwóch najwyższych dawkach w badanych grupach. Rhu-pGSN była ogólnie dobrze tolerowana przez pacjentów z łagodnym CAP hospitalizowanych poza OIT.

3.6.2. Rhu-pGSN w leczeniu ciężkiego zapalenia płuc wywołanego przez COVID-19

W tym randomizowanym badaniu wzięło udział 61 pacjentów z zapaleniem płuc wywołanym przez COVID-19, którzy wykazywali oznaki stanu zapalnego zgodnie z kryteriami WHO (84). Z tej grupy, 30 pacjentów otrzymało Rhu-pGSN w dawce 12 mg/kg, podawanej dożylnie trzykrotnie: na początku, a następnie po 12 i 36 godzinach. Główne kryteria oceny

w badaniu obejmowały przeżywalność do 14 dnia bez konieczności zastosowania wsparcia oddechowego, hemodynamicznego lub nerkowego oraz częstość występowania poważnych działań niepożądanych w ciągu 90 dni. Wyniki pokazały, że wskaźniki przeżycia bez dodatkowego wsparcia do 14 dnia były porównywalne między grupami, z 83,3% w grupie Rhu-pGSN i 87,1% w grupie placebo. Co ważne, grupa otrzymująca Rhu-pGSN doświadczyła mniej działań niepożądanych, głównie o charakterze płucnym, oraz miała niższy wskaźnik intubacji (10,0%) w porównaniu do grupy placebo (19,4%). Można stwierdzić, że wyniki leczenia były pozytywne w obu grupach. Dodanie Rhu-pGSN do standardowej terapii deksametazonem i remdesivirem nie przyniosło znaczącej korzyści w porównaniu z placebo. Niemniej jednak, stosowanie Rhu-pGSN wiązało się ze zmniejszoną częstością występowania poważnych działań niepożądanych i mniejszą potrzebą intubacji w porównaniu z placebo.

Podawanie Rhu-pGSN to obiecująca strategia terapeutyczna w leczeniu chorób płuc o etiologii bakteryjnej i wirusowej, zwłaszcza w przypadku zapalenia płuc wywołanego przez COVID-19. Dane z dwóch ostatnich badań klinicznych potwierdzają bezpieczeństwo stosowania Rhu-pGSN, jej dobrą tolerancję i minimalne działania niepożądane. Choć w badaniach dotyczących CAP i COVID-19 Rhu-pGSN nie wykazała znaczącej przewagi nad placebo w poprawie przeżywalności, zaobserwowano mniej działań niepożądanych i niższy wskaźnik intubacji. Te wyniki podkreślają potencjał Rhu-pGSN w modulowaniu odpowiedzi zapalnej i poprawie wyników leczenia, motywując do dalszych badań nad jej skutecznością w terapii różnych chorób.

4. Omówienie prac składających się na rozprawę doktorską

4.1. Cele pracy

Kluczową funkcją pGSN jest modulacja odpowiedzi immunologicznej i działanie przeciwzapalne. Białko to, wiąże i neutralizuje prozapalne cząsteczki, takie jak LPS i LTA, może także pośrednio hamować nadmierną aktywację układu odpornościowego. Z drugiej strony pGSN stymuluje fagocytozę bakterii w mysich makrofagach, co wskazuje na jej bezpośredni wpływ na komórki immunokompetentne. W chorobach, w których dochodzi do rozwoju zapalenia prowadzącego do uszkodzenia tkanek, właściwości pGSN mogą odgrywać kluczową rolę w modulacji swoistej odpowiedzi immunologicznej, łagodzeniu objawów i ograniczaniu dalszych uszkodzeń.

Ostatnie lata przyniosły globalny wzrost zakażeń grzybiczych, z wyjątkowo niepokojącym wzrostem infekcji spowodowanych przez *C. auris*. W obliczu tych wyzwań, głębsze zrozumienie mechanizmów obronnych organizmu, w tym funkcji pGSN, jest niezmiernie istotne. Badania nad pGSN oferują nową perspektywę dla opracowania metod profilaktycznych i terapeutycznych przeciwko trudnym do leczenia zakażeniom grzybiczym.

Pandemia COVID-19, wywołana przez wirus SARS-CoV-2, zmusza do zintensyfikowania badań nad mechanizmami odpowiedzi immunologicznej oraz procesami zapalnymi, szczególnie w kontekście obserwowanego wzrostu zakażeń grzybiczych wśród pacjentów z COVID-19. W sytuacji, gdy COVID-19 wywołuje silny stan zapalny i powoduje uszkodzenia tkanek, potencjalna rola pGSN jako regulatora odpowiedzi immunologicznej nabiera nowego wymiaru. Badania nad wpływem pGSN na procesy zapalne indukowane przez wirus SARS-CoV-2 mogą nie tylko przyczynić się do głębszego zrozumienia patofizjologii COVID-19, ale również zidentyfikować nowe cele terapeutyczne, otwierając drogę do opracowania skuteczniejszych strategii leczenia.

Celem niniejszej pracy było zbadanie funkcji, jaką pełni pGSN w kontekście nieswoistej odpowiedzi immunologicznej podczas zakażeń grzybiczych. W świetle pandemii COVID-19 i związanego z nią silnego, ogólnoustrojowego procesu zapalnego oraz zauważalnego wzrostu zakażeń grzybiczych w obrębie OUN u pacjentów z COVID-19, zdecydowano o poszerzeniu zakresu badań w ramach realizacji projektu Preludium bis 1 (NCN/1/PR/20/002/1122). Nowy kierunek obejmował ocenę roli pGSN jako potencjalnego czynnika przeciwzapalnego

w odpowiedzi na uszkodzenie komórek endotelialnych tworzących barierę krew-mózg wywołane przez białko S1 pochodzące z SARS-CoV-2.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje, sformułowane zostały następujące szczegółowe cele badań:

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 śródbłonna poddanych działaniu mediatorów zapalnych.
3. Ocena przeciwzapalnego działania pGSN z wykorzystaniem modeli 2D oraz 3D bariery krew-mózg w odpowiedzi na działanie białka S pochodzącego z SARS-CoV-2.

4.2. Materiały i metody badawcze

Szczegółowy opis metodyki badań w zastosowanych modelach eksperymentalnych znajduje się w niżej wymienionych pracach oryginalnych włączonych do rozprawy:

Publikacja nr 2 (P.2) – Suprewicz, Ł., Skłodowski, K., Walewska, A., Deptuła, P., Sadzyńska, A., Eljaszewicz, A., Moniuszko, M., Janmey, P.A., Bucki, R. Plasma Gelsolin Enhances Phagocytosis of *Candida auris* by Human Neutrophils through Scavenger Receptor Class B. *Microbiology Spectrum*, 2023: 11, 2, 13 pp. DOI: 10.1128/spectrum.04082-22

Publikacja nr 3 (P.3) – Suprewicz, Ł., Tran, K.A., Piktel, E., Fiedoruk, K., Janmey, P.A., Galie, P.A., Bucki, R. Recombinant human plasma gelsolin reverses increased permeability of the blood–brain barrier induced by the spike protein of the SARS-CoV-2 virus. *Journal of Neuroinflammation*, 2022: 19, 16 pp. DOI: 10.1186/s12974-022-02642-4

4.2.1. Rekombinowana ludzka gelsolina osoczowa (Rhu-pGSN)

Rhu-pGSN użyta w badaniach, wyprodukowana z wykorzystaniem bakterii *Escherichia coli* została udostępniona przez firmę BioAegis Therapeutics (North Brunswick, NJ, USA).

4.2.2. Pobranie krwi i izolacja neutrofilów

Krew pobierano od zdrowych ochotników do próbek zawierających kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), za zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, zgodnie z uchwałą numer APK.002.234.2021. Izolację neutrofilów przeprowadzano za pomocą wirowania w gradiencie gęstości, korzystając z preparatu PolymorphPrep (Progen, Heidelberg, Niemcy). Po wyizolowaniu, komórki zliczano przy pomocy hemocytometru, a następnie zawieszono w medium RPMI 1640, które było wolne od antymikotyków oraz surowicy (FBS, ang. fetal bovine serum). Komórki były następnie inkubowane w temperaturze 37°C w atmosferze z 5% zawartością CO₂.

W eksperymentach opisanych w **P.2**, neutrofile najpierw inkubowano w medium pozbawionym surowicy, co miało na celu wyeliminowanie ewentualnego wpływu pGSN znajdującej się w surowicy krwi na wyniki badań. Następnie, komórki poddawano preinkubacji z pGSN, po której dodawano do ich zawiesiny komórki *C. auris* lub cząsteczki zymosanu. W podobnym układzie doświadczalnym, pGSN była dodawana równocześnie z komórkami grzybów lub cząsteczkami zymosanu, co pozwalało na bezpośrednie porównanie efektu preinkubacji z pGSN w stosunku do jednoczesnego dodania tych składników.

4.2.3. Szczep *Candida auris*

Do badań w **P.2** wykorzystano szczep *Candida auris* 21092, pozyskany z DSMZ (Braunschweig, Niemcy). Przed posiewem na agar Sabouraud z dodatkiem dekstrozy i chloramfenikolu, szczep ten przechowywano w temperaturze -80°C w pożywce z dodatkiem glicerolu. Dla zapewnienia optymalnych warunków wzrostu, szczep rutynowo inkubowano w temperaturze 30°C. Liczbę komórek drożdży oszacowano za pomocą hemocytometru. Komórki *Candida*, znajdujące się w fazie logarytmicznego wzrostu, zawieszono w medium RPMI 1640, analogicznie do procedury z neutrofilami, a następnie rozcieńczono je do gęstości wymaganej dla poszczególnych eksperymentów.

4.2.4. Hodowla komórek śródbłonna bariery krew-mózg

Do badań przeprowadzonych w **P.3** wykorzystano ludzkie komórki śródbłonna naczyń mózgowych (hCMEC/D3, CLU512-A, Cedarlane Laboratories), między 25 a 35 pasażem. Komórki te hodowano w medium przeznaczonym do hodowli komórek endotelialnych EBM-2 (ang. endothelial cell growth basal medium), z dodatkiem bydlęcej surowicy płodowej (5% FBS), hydrokortyzonu, kwasu askorbinowego, antybiotyków (penicyliny, streptomycyny i amfoterycyny B), skoncentrowanego roztworu lipidów, czynnika wzrostu fibroblastów oraz buforu HEPES (pH = 7,4). Do hodowli wykorzystano płytki pokryte kolagenem typu I o stężeniu 0,1 mg/mL. Komórki inkubowano w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂. Medium komórkowe wymieniano co 2–3 dni, aby zapewnić optymalne warunki wzrostu komórek.

W badaniach przeprowadzonych w **P.3**, monowarstwy komórek śródbłonna inkubowano z pGSN, podjednostką S1 białka S pochodzącego z SARS-CoV-2, oraz w układzie z jednoczesnym dodaniem obu białek. W ramach tych eksperymentów, podjednostkę S1 rozpuszczono w PBS i dodawano do hodowli komórkowych w ilości 1:100. Aby zapewnić jednolitość stężeń czynników wzrostu we wszystkich grupach eksperymentalnych, do kontroli, gdzie nie dodawano żadnych substancji, wprowadzono równą objętość PBS. Podobnie postępowano podczas dodawania pGSN, co gwarantowało spójność warunków eksperymentalnych.

4.2.5. Mikroskopia konfokalna

Próbki utrwalano za pomocą 3,7% roztworu para formaldehydu przez 20 minut, a następnie przeprowadzano ich permeabilizację przy użyciu 0,2% Tritonu X-100. Oba etapy postępowania przeprowadzano w temperaturze pokojowej i trwały łącznie 30 minut. Aby

zablokować niespecyficzne miejsca wiązania, używano 3% roztworu albuminy bydlęcej (BSA) i inkubowano próbki przez 30 minut w temperaturze 37°C. Dalej, próbki inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi przez czas od 1 do 48 godzin w temperaturze 4°C. Po inkubacji z przeciwciałami, próbki przepłukiwano PBS i poddawano inkubacji z przeciwciałem drugorzędowym przez godzinę oraz z DAPI w stężeniu 1 µg/mL przez 15 minut w temperaturze pokojowej, zapewniając przy tym ochronę przed światłem. Obrazy następnie rejestrowano za pomocą mikroskopu konfokalnego.

4.2.6. Ocena fagocytozy, NETozy i wewnątrzkomórkowej przeżywalności grzybów

Przy użyciu testu fagocytozy badano zdolność ludzkich neutrofilów do pochłaniania cząstek zymosanu-pHrodo (pHrodo – to barwnik, który jest źródłem fluorescencji po przejściu do wnętrza neutrofilów). Do komórek dodawano 5 mg cząstek zymosanu w medium RPMI 1640 na 2-godziną inkubację w 37°C i 5% CO₂ na platformie IncuCyte SX1 (Sartorius AG), która posłużyła do późniejszej analizy wyników.

W kolejnym eksperymencie, neutrofile wysiewano na szkiełkach nakrywkowych, wcześniej sfunkcjonalizowanych poli-L-lizyną. Używano zabarwione (barwnik - Calcofluor White, CFW) komórki *C. auris* przy MOI (stosunku patogen: komórki) 1 i 5. Po zakażeniu, komórki utrwalano, permeabilizowano, blokowano i barwiono na obecność aktyny. Przy użyciu mikroskopii konfokalnej analizowano ilość neutrofilów zaangażowanych w fagocytozę komórek grzybiczych (takich, które pochłonęły lub przylegały do co najmniej jednej komórki patogenu) oraz indeks fagocytozy (ilość grzybów pochłoniętych na 100 neutrofilów).

W celu oceny wewnątrzkomórkowej przeżywalności grzybów, neutrofile odpowiednio stymulowano pGSN, zakażano *C. auris*, a następnie poddawano procesowi sonikacji i ilościowo wysiewano na agarze Sabouraud celem oceny wzrostu grzybów.

Formowanie zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NET) oceniano przez wybarwienie mieloperoksydazy (MPO) w stymulowanych neutrofilach. Badania te przeprowadzano na szkiełkach pokrytych poli-L-lizyną i analizowano za pomocą mikroskopii konfokalnej.

W równoległym eksperymencie oceniano wpływ pGSN na uwalnianie DNA pozakomórkowego (eDNA) podczas zakażenia *C. auris*. Neutrofile zakażano jak powyżej, z dodatkiem barwnika Cytotox red barwiącego eDNA. Wyniki analizowano przy użyciu platformy IncuCyte SX1.

4.2.7. Ocena sekrecji cytokin i chemokin oraz produkcji reaktywnych form tlenu

Ocenę sekrecji Interleukiny-2 (IL-2), IL-6, IL-8, interferonu gamma (IFN- γ), czynnika martwicy nowotworów (TNF- α) oraz czynnika wzrostu kolonii granulocytarno-makrofagowych (GM-CSF) przeprowadzono przy użyciu zestawu Bio-Plex Pro human cytokine assay (Bio-Rad Laboratories). Neutrofile oraz komórki śródbłonna hodowano w 24-dołkowych płytkach. Po zakończeniu inkubacji z odpowiednimi związkami, nadsącz zbierano i odwirowywano, aby usunąć pozostałe komórki, a następnie przeprowadzano analizę sekrecji cytokin i chemokin przy użyciu systemu Bio-Plex 200 (Bio-Rad).

Aby zbadać produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) przez neutrofile, komórki inkubowano z sondą DCFH-DA (Dichlorodihydrofluorescein diacetate) w roztworze PBS przez 10 minut w ciemności. Następnie komórki przemywano PBS i wysiewano na 96-dołkową płytkę hodowlaną. Neutrofile stymulowano zgodnie z wcześniejszymi procedurami, dodając do eksperymentu także próbkę kontrolną z PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate). Fluorescencję przy długości fali 488 nm (ekscytacja) i 535 nm (emisja) mierzono za pomocą czytnika płytek Varioskan Lux (Thermofisher).

4.2.8. Ocena ekspresji białek metodą Western Blot

Neutrofile oraz komórki śródbłonna hodowano w 6-dołkowych płytkach i stymulowano zgodnie z opisanymi wcześniej procedurami. Po odpowiednim czasie inkubacji, komórki płukano PBS, trypsynizowano i zbierano do probówek celem odwirowania. Osad komórkowy ekstrahowano buforem lizującym z dodatkiem inhibitora proteaz, inkubowano na lodzie przez 20 minut i odwirowywano przez 20 minut w 4°C (14000 obrotów na minutę). Stężenie białek w nadsączu mierzono za pomocą testu Bradforda. Białka poddawano elektroforezie, a następnie przenoszono na membrany z polifluorku winylidenu (PVDF). Membrany blokowano w buforze blokującym, inkubowano przez około 18 godzin w 4°C z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi, po czym inkubowano z drugorzędowymi przeciwciałami koniugowanymi z IRDye 800CW przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, w ciemności. Membrany wizualizowano przy użyciu systemu Odyssey LiCor, a intensywności białek analizowano, porównując próbki traktowane do kontroli znormalizowanych do β -aktyny.

4.2.9. Analiza ekspresji genów

Neutrofile oraz komórki śródbłonna stymulowano jak powyżej, a następnie poddawano ekstrakcji RNA, syntezie cDNA i qRT-PCR z użyciem zestawów specyficznych dla szlaków

sygnałowych, z kontrolą GAPDH, a ekspresję genów analizowano jako ilość względna, wyrażona w Log_2FC .

4.2.10. Model 3D bariery krew-mózg w przepływie oraz ocena przepuszczalności

Wytworzenie naczynka mikroprzepływowego (ang. microfluidic device), jak i przygotowanie modelu 3D bariery krew-mózg zostały szczegółowo opisane w **P.3**.

Do oceny przepuszczalności utworzonej bariery krew-mózg, każdorazowo, pojedyncze naczynie perfundowane dekstranem-FITC o masie cząsteczkowej 4-kDa, badano przy użyciu odwróconego mikroskopu epifluorescencyjnego (Zeiss AxioStar 10). Obrazy rejestrowano co 10 sekund i analizowano za pomocą ImageJ do określenia współczynnika przepuszczalności, wyliczanego przez korelację stężenia dekstranu z intensywnością fluorescencji po dwóch stronach naczynia.

Pomiary transendotelialnego oporu elektrycznego (TEER) przeprowadzano przy użyciu adaptera oscyloskopu USB Stingray DS1M12. To urządzenie, pełniące funkcję zarówno generatora sygnałów, jak i oscyloskopu, wykorzystywało oprogramowanie DS1M12 EasyScope II do ustawienia napięcia wyjściowego i pomiaru impedancji śródbłonna.

4.2.11. Ocena migracji

Test gojenia rany (ang. wound healing assay) używano, aby ocenić wpływ pGSN i S1 na migrację komórek tworzących BBB. Komórki hCMEC/D3 hodowano w 96-dołkowych płytkach pokrytych kolagenem do uzyskania jednolitej monowarstwy, a następnie wykonywano liniowe zarysowanie przy użyciu IncuCyte® WoundMaker. Następnie obrazy przetwarzano, definiując maskę zarysowania i maskę konfluencji komórek za pomocą oprogramowania IncuCyte® Cell Migration Analysis.

4.2.12. Analiza statystyczna

W **P.2** i **P.3** dane ilościowe wyrażono jako średnia arytmetyczna \pm błąd standardowy średniej arytmetycznej. Analizę istotności statystycznej wykonywano przy użyciu niesparowanego, dwustronnego testu-t Studenta lub jednostronnej analizie wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Tukey. Użyte testy, parametry statystyczne, w tym dokładna liczba powtórzeń i istotność statystyczna, podane są na rycinach i w legendach do rycin w pracach oryginalnych włączonych do rozprawy.

4.3. Wyniki badań

Szczegółowy opis uzyskanych wyników znajduje się w niżej wymienionych pracach oryginalnych włączonych do rozprawy:

Publikacja nr 2 (P.2) – Suprewicz, Ł., Skłodowski, K., Walewska, A., Deptuła, P., Sadzyńska, A., Eljaszewicz, A., Moniuszko, M., Janmey, P.A., Bucki, R. Plasma Gelsolin Enhances Phagocytosis of *Candida auris* by Human Neutrophils through Scavenger Receptor Class B. *Microbiology Spectrum*, 2023: 11, 2, 13 pp. DOI: 10.1128/spectrum.04082-22

Publikacja nr 3 (P.3) – Suprewicz, Ł., Tran, K.A., Piktel, E., Fiedoruk, K., Janmey, P.A., Galie, P.A., Bucki, R. Recombinant human plasma gelsolin reverses increased permeability of the blood–brain barrier induced by the spike protein of the SARS-CoV-2 virus. *Journal of Neuroinflammation*, 2022: 19, 16 pp. DOI: 10.1186/s12974-022-02642-4

4.3.1. pGSN nasila fagocytozę i wewnątrzkomórkowe zabijanie komórek *C. auris* przez ludzkie neutrofile.

W **P.2** badano zdolność pGSN do nasilania nieswoistej odpowiedzi immunologicznej w ludzkich neutrofilach w przebiegu zakażeń grzybiczych. Neutrofile dzięki zdolności do fagocytozy odgrywają kluczową rolę w obronie przed infekcjami bakteryjnymi i grzybiczymi. Oceniano, czy pGSN potęguje fagocytozę cząsteczek zymosanu w ludzkich neutrofilach. Początkowo neutrofile pozbawiano surowicy, a następnie eksponowano na pGSN przed dodaniem lub równocześnie z dodaniem zymosanu. Wyniki wykazały, że preinkubacja z pGSN zwiększa fagocytozę, ale dodanie go jednocześnie z zymosanem nie poprawia absorpcji, co sugeruje, że efekty immunomodulacyjne pGSN wymagają uprzedniego aktywowania neutrofilów (**Fig. 1 a i b, P.2**).

Następnie zbadano wpływ pGSN na zdolności neutrofilów do fagocytozy *C. auris*, patogenu znanego ze zdolności do unikania odpowiedzi immunologicznej. Używając ludzkiej albuminy jako kontroli i różnych ilości grzybów wykazano, że preinkubacja neutrofilów z pGSN znacząco poprawia ich efektywność fagocytarną wobec *C. auris*. Było to potwierdzone przez wzrost liczby neutrofilów zaangażowanych w fagocytozę (**Fig. 1 c i d, P.2**) oraz wyższy indeks fagocytozy (**Fig. 1 e i f, P.2**), co podkreśla znaczenie pGSN w wzmacnianiu wrodzonej odpowiedzi immunologicznej przeciwko temu patogenowi. Dodatkowo, zaobserwowano znaczący wzrost wewnątrzkomórkowego zabijania komórek *Candida* (**Fig. 1 g i h, P.2**).

4.3.2. pGSN hamuje wydzielanie NETów przez neutrofile

Odrębnym mechanizmem nieswoistej odpowiedzi immunologicznej jest NEToza, czyli proces, w którym neutrofile narażone na szkodliwe substancje, uwalniają zawartość swojej cytoplazmy do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Chociaż proces ten jest kluczowy dla zwalczania infekcji, nadmierne tworzenie NETów może prowadzić do uszkodzenia naczyń krwionośnych i zwiększenia stanu zapalnego poprzez nadmierne wydzielanie cytokin i reaktywnych form tlenu (ROS).

W celu zbadania wpływu pGSN na wydzielanie NETów, neutrofile pozbawiono surowicy i inkubowano z pGSN, albo poddawano działaniu pGSN jednocześnie z komórkami *C. auris*. Preinkubacja z pGSN znacząco zmniejszyła uwalnianie eDNA do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (**Fig. 2 a i b, P.2**) oraz formowanie się NETów (**Fig. 2 c i d, P.2**) podczas ekspozycji na *C. auris*. Hamowanie NETozy i produkcji ROS (**Fig. 2 e, P.2**) wskazuje na immunomodulujące działanie pGSN w stosunku do neutrofilów, a nie bezpośrednio przeciwko *C. auris*. pGSN hamowało również aktywność indukowaną przez PMA, co sugeruje jej silne działanie przeciwzapalne. Analiza Western Blot potwierdziła, że preinkubacja z pGSN przed zakażeniem znacząco hamowała ekspresję kluczowych białek zaangażowanych w proces tworzenia NETów, co dodatkowo podkreśla jego ochronną rolę przed nadmierną reakcją zapalną (**Fig. 3, P.2**).

4.3.3. pGSN zmniejsza proces zapalny wywołany przez *C. auris*.

Ostra reakcja zapalna występuje zwykle bezpośrednio po pojawieniu się infekcji, prowadząc do uwalniania mediatorów zapalnych, takich jak cytokiny oraz chemokiny, co napędza rekrutację komórek odpornościowych do miejsca zapalenia. Jednak, nadmierny lub przewlekły stan zapalny może spowodować poważne uszkodzenia tkanek lub sepsę. W tym badaniu oceniano wpływ pGSN na reakcję zapalną w ludzkich neutrofilach podczas infekcji *C. auris*. Wykazano, że preinkubacja neutrofilów z pGSN przed zakażeniem *C. auris* znacząco obniża wydzielanie IL-4, IL-6 i TNF- α , a także zwiększa poziom przeciwzapalnej IL-10 (**Fig. 4, P.2**). Wyniki te wskazują na immunomodulacyjne właściwości pGSN, które mogą hamować nadmierną odpowiedź zapalną, ograniczając ryzyko powikłań.

4.3.4. Receptory klasy B typu „scavenger” jako cel dla pGSN na ludzkich neutrofilach.

Do tej pory mechanizm molekularny, dzięki któremu pGSN pobudza fagocytozę nie był znany. W celu zidentyfikowania potencjalnych genów zaangażowanych w stymulację fagocytozy przez pGSN, przeanalizowano ekspresję genów biorących udział w tym procesie.

Po dodaniu pGSN, najbardziej znaczący wzrost ekspresji zaobserwowano w genach należących do rodziny receptorów scavengerowych klasy B (SR-B), szczególnie CD36 i SCARB1 (**Fig. 5 a, P.2**). SR-B to grupa glikoprotein transbłonowych składająca się z trzech przedstawicieli: SR-B1 (SCARB1), SR-B2 (CD36) i SR-B3 (SCARB2). Te glikoproteiny wiążą i internalizują szeroki zakres ligandów. Obecne na powierzchni neutrofilów i makrofagów, SR-B odgrywają rolę w odporności wrodzonej, wchodząc w interakcje z wzorcami molekularnymi związanymi z patogenami (PAMPs, ang. pathogen-associated molecular patterns) lub wzorcami molekularnymi związanymi z uszkodzeniami (DAMPs, ang. damage-associated molecular patterns).

Aby potwierdzić, że stymulacja fagocytozy przez pGSN zależy od zwiększenia ekspresji SR-B, użyto specyficznych antagonistów: sulfosukcynimidylu oleinianu (SSO) dla CD36 oraz blokera transportu lipidów-1 (BLT-1) dla SR-B1. Inhibitory te dodano do neutrofilów w trakcie preinkubacji z pGSN na 2 godziny. Po inkubacji inhibitory oraz pGSN usunięto, a następnie do komórek dodano medium z komórkami *C. auris* przy MOI 1 na kolejne 2 godziny. Obecność inhibitorów SR-B znacząco zmniejszyła korzystny wpływ pGSN na działanie neutrofilów, w tym na liczbę neutrofilów zaangażowanych w proces fagocytozy (**Fig. 5 b i c, P.2**) oraz indeks fagocytozy (**Fig. 5 d i e, P.2**). Inhibitor SSO (CD36) całkowicie zahamował efekt pGSN na efektywność wewnątrzkomórkowego zabijania grzybów, podczas gdy efekt BLT-1 (SR-B1) był mniejszy (**Fig. 5 f i g, P.2**). Te wyniki sugerują, że pGSN zwiększa fagocytozę *C. auris* przez ludzkie neutrofile poprzez stymulowanie ekspresji SR-B.

4.3.5. pGSN hamuje wzrost przepuszczalności BBB indukowany przez białko S1 SARS-CoV-2.

Główną cechą bariery krew-mózg (BBB) jest jej wysokoselektywna przepuszczalność, która chroni tkanki mózgu przed działaniem szkodliwych substancji pochodzących z krwi obwodowej. Wykazano, że podjednostka S1 białka S pochodzącego z SARS-CoV-2 zwiększa przepuszczalność BBB zarówno w modelu 2D, jak i 3D (**Fig. 1, 2 i 3, P.3**). Przeprowadzono testy przepuszczalności, aby określić, czy pGSN może zahamować ten niekorzystny efekt w obecności podjednostki S1. Użyto 4-kDa FITC-dekstran, aby skoncentrować się na charakterystyce para-komórkowego przechodzenia substancji przez połączenia komórkowe i wykluczyć inne formy aktywnego transportu, np. transcytozę. Dodatkowo, zmierzono transendotelialny opór elektryczny (TEER). Badania przepuszczalności, wykazały, że dodanie pGSN istotnie zmniejsza wzrost przepuszczalności indukowanej białkiem S1, w modelu 2D (**Fig. 1 b i c, P.3**). W modelu 3D, poza zaobserwowaniem zmniejszenia przepuszczalności,

wykazano również zachowanie ekspresji białka ZO-1, tworzącego łączy międzykomórkowe (Fig. 3 a, b i d, P.3).

Dodatkowo, badania TEER potwierdziły ochronne działanie pGSN na integralność BBB (Fig. 3 c, P.3). SARS-CoV-2 S1 spowodował znaczący spadek TEER, podczas gdy dodanie pGSN przywracało TEER do wartości kontrolnych.

Pomiary przepuszczalności i TEER sugerują, że pGSN wywiera 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. Przechodzenie małych, dodatnio naładowanych znaczników molekularnych (4kDa-Dextran) przez BBB wskazuje na uszkodzone połączenia międzykomórkowe jako powód zwiększenia przepuszczalności po działaniu białka S1.

4.3.6. pGSN odwraca hamowanie migracji komórek hCMEC/D3 wywołane przez białko S1.

Migracja komórek śródbłonna jest istotna dla angiogenezy oraz naprawy uszkodzonej sieci naczyniowej. Przeprowadzono test gojenia rany, aby zbadać wpływ białka S1 na migrację komórek hCMEC/D3 oraz potencjalną rolę pGSN w modyfikacji tego efektu (Fig. 4 a, P.3). Monitorowanie migracji komórek do uszkodzonego obszaru konfluentnej hodowli (wykonanego zarysowania) wykazało, że pGSN samodzielnie nie wpływa na migrację komórek hCMEC/D3. Dodanie białka S1 spowolniło migrację komórek w porównaniu z warunkami kontrolnymi, a dodanie pGSN istotnie odwróciło ten efekt w stosunku do samego S1. Dodatkowo, analiza ekspresji VEGFR2 w lizatach komórek hCMEC/D3 wykazała, 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.

4.3.7. pGSN redukuje sekrecję cytokin prozapalnych wywołaną przez białko S1 SARS-CoV-2 na wczesnym etapie stymulacji komórek.

Dysfunkcja śródbłonna w przebiegu COVID-19 jest częściowo spowodowana przez wywołaną przez białko S burzę cytokinową - kaskadę uwalniania prozapalnych mediatorów. W tym badaniu oceniono czy pGSN może zmniejszyć wydzielanie cytokin przez komórki śródbłonna, indukowane przez białko S1, po 6 i 24 godzinach inkubacji (Fig. 5, P.3). Dodanie samej pGSN do monowarstwy hCMEC/D3 nie spowodowało znaczących zmian w wydzielaniu

cytokin po 6 i 24 godzinach. Największe hamowanie wydzielania odnotowano dla IL-8 i TNF- α , po 6 godzinach stymulacji białkiem S1 i pGSN (**Fig. 5 c i d, P.3**). Nie zaobserwowano istotnej zmiany w wydzielaniu IFN- γ i GM-CSF indukowanym przez S1, podczas gdy tylko niewielki spadek zauważono dla IL-6 po dodaniu pGSN. Po 6 godzinach, jednoczesne dodanie białka S1 i pGSN, nieznacznie zwiększyło wydzielanie IL-2 w porównaniu do samego S1 (**Fig. 5 a, P.3**). pGSN nie miała już takiego hamującego efektu po 24 godzinach wspólnej inkubacji z S1. pGSN jest szczególnie skuteczna wobec hamowania wydzielania IL-8 i TNF- α indukowanego przez S1, 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 (**Fig. 1 i 3, P.3**).

4.3.8. pGSN zapobiega inhibicji ekspresji białek tworzących ścisłe połączenia międzykomórkowe wywoływanej przez białko S1 SARS-CoV-2.

Białka ZO-1, okludyny i kładyny, są białkami tworzącymi ścisłe połączenia międzykomórkowe (TJs) i są kluczowe dla utrzymania integralności BBB. Infekcja SARS-CoV-2 zakłóca funkcję BBB przez degradację tych białek. Badanie ekspresji tych białek w komórkach hCMEC/D3 po ekspozycji na podjednostkę S1 wirusa wykazało, że pGSN może odwracać negatywny wpływ S1 na TJs. Podjednostka S1 zmniejszała ekspresję ZO-1 o 25%, okludyny o 20% i kładyny 5 o 16% (**Fig. 6 a i b, P.3**). Dodanie pGSN przywróciło ekspresję tych białek do poziomów zbliżonych do kontrolnych, sugerując, że pGSN może chronić BBB przed uszkodzeniami wywołanymi przez SARS-CoV-2 poprzez stabilizację TJs.

4.3.9. pGSN ogranicza aktywację NF- κ B wyzwalaną przez białko S1 w komórkach śródbłonna.

Przeprowadzono badania ekspresji genów, aby zrozumieć możliwy mechanizm lub szlaki sygnałowe pobudzone przez podjednostkę S1 SARS-CoV-2, na które mogłoby działać pGSN.

Dodanie pGSN z S1 obniżyło ekspresję genów zaangażowanych w sygnalizację *PI3K*. Znaczące obniżenie ekspresji genów z rodziny *AKT* zostało zanotowane, gdy pGSN było podawane z S1. Inhibicja genów zaangażowanych w sygnalizację *MAPK* również została zaobserwowana podczas dodawania pGSN. Dla genów szlaku *NF- κ B*, zauważono redukcję ekspresji *CHUK*, *IKBKB* i *IKBKG* do poziomu kontrolnego oraz obniżenie ekspresji mRNA *NFKB1*, *NFKB2*, *NFKBIA*, *NFKBIB* i *NFKBIE* (**Fig. 7 a, P.3**).

W wyniku prozapalnej odpowiedzi wywołanej przez aktywację *NF-κB*, zaobserwowano wzrost ekspresji *ICAM1*, *VCAM1* i *SELE*, który został stłumiony przez pGSN (**Fig. 7 a, P.1**). Na figurze **7 b, P.3** przedstawiono schemat szlaku sygnałowego, w który zaangażowane są *PI3K*, *AKT*, *MAPK* i *NF-κB*. *AKT* pozostaje w nieaktywnej konformacji w cytozolu, dopóki interakcja z PIP3 nie aktywuje go i nie przemieści do błony komórkowej. *PI3K* jest niezbędne do aktywacji *AKT* przez katalizowanie fosforylacji PI(4,5)P₂ do PIP₃. pGSN wiąże się z PI(4,5)P₂, co potencjalnie hamuje aktywację szlaków zależnych od *AKT*, *MAPK* i *NF-κB*.

Wyniki badań sugerują ochronną rolę pGSN wobec śródbłónka naczyniowego poprzez hamowanie ekspresji genów szlaków sygnałowych zaangażowanych w indukcję zapalenia, co prowadzi do uszkodzenia śródbłónka mózgu i utraty jego funkcji jako bariery naczyniowej w infekcji SARS-CoV-2.

4.4. Wnioski

Z przeprowadzonych badań wynika, że:

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- κ B, zmniejszenie degradacji białek tworzących ścisłe połączenia międzykomórkowe oraz stymulację migracji komórek.

4.5. Piśmiennictwo

1. Yin HL, Stossel TP. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature*. 1979;281(5732):583-6.
2. Kulakowska A, Drozdowski W, Sadzynski A, Bucki R, Janmey P. Gelsolin concentration in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis and other neurological disorders. *European Journal of Neurology*. 2008;15(6):584-8.
3. Smith DB, Janmey PA, Herbert T-J, Lind SE. Quantitative measurement of plasma gelsolin and its incorporation into fibrin clots. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1987;110(2):189-95.
4. Kwiatkowski D, Westbrook C, Bruns G, Morton C. Localization of gelsolin proximal to ABL on chromosome 9. *American journal of human genetics*. 1988;42(4):565.
5. Jordan JR, Moore EE, Damle SS, Eckels P, Johnson JL, Roach JP, et al. Gelsolin is depleted in post-shock mesenteric lymph. *Journal of Surgical Research*. 2007;143(1):130-5.
6. Jagadish T, Pottiez G, Fox HS, Ciborowski P. Plasma gelsolin accumulates in macrophage nodules in brains of simian immunodeficiency virus infected rhesus macaques. *Journal of neurovirology*. 2012;18:113-9.
7. Kwiatkowski D, Mehl R, Izumo S, Nadal-Ginard B, Yin H. Muscle is the major source of plasma gelsolin. *Journal of Biological Chemistry*. 1988;263(17):8239-43.
8. Chaponnier C, Janmey PA, Yin HL. The actin filament-severing domain of plasma gelsolin. *The Journal of cell biology*. 1986;103(4):1473-81.
9. Wen D, Corina K, Chow EP, Miller S, Janmey PA, Pepinsky RB. The plasma and cytoplasmic forms of human gelsolin differ in disulfide structure. *Biochemistry*. 1996;35(30):9700-9.
10. Bucki R, Byfield FJ, Kulakowska A, McCormick ME, Drozdowski W, Namiot Z, et al. Extracellular gelsolin binds lipoteichoic acid and modulates cellular response to proinflammatory bacterial wall components. *J Immunol*. 2008;181(7):4936-44.
11. Bucki R, Georges PC, Espinassous Q, Funaki M, Pastore JJ, Chaby R, et al. Inactivation of endotoxin by human plasma gelsolin. *Biochemistry*. 2005;44(28):9590-7.
12. Osborn TM, Dahlgren C, Hartwig JH, Stossel TP. Modifications of cellular responses to lysophosphatidic acid and platelet-activating factor by plasma gelsolin. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2007;292(4):C1323-C30.
13. Bucki R, Kulakowska A, Byfield FJ, Zendzian-Piotrowska M, Baranowski M, Marzec M, et al. Plasma gelsolin modulates cellular response to sphingosine 1-phosphate. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2010;299(6):C1516-C23.
14. Suhler E, Lin W, Yin HL, Lee WM. Decreased plasma gelsolin concentrations in acute liver failure, myocardial infarction, septic shock, and myonecrosis. *Crit Care Med*. 1997;25(4):594-8.
15. Wątek M, Wnorowska U, Wollny T, Durnaś B, Wolak P, Kościółek-Zgódka S, et al. Hypogelsolinemia in Patients Diagnosed with Acute Myeloid Leukemia at Initial Stage of Sepsis. *Med Sci Monit*. 2019;25:1452-8.
16. DiNubile MJ, Levinson SL, Stossel TP, Lawrenz MB, Warawa JM, editors. Recombinant Human Plasma Gelsolin Improves Survival and Attenuates Lung Injury in a Murine Model of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *Open Forum Infectious Diseases*; 2020: Oxford University Press US.
17. Dahl B, Schiødt FV, Ott P, Gvozdenovic R, Yin HL, Lee WM. Plasma gelsolin is reduced in trauma patients. *Shock*. 1999;12(2):102-4.
18. Asare-Werehene M, McGuinty M, Vranjkovic A, Galipeau Y, Cowan J, Cameron B, et al. Longitudinal profiles of plasma gelsolin, cytokines and antibody expression predict COVID-19 severity and hospitalization outcomes. *Frontiers in immunology*. 2022;13:1011084.

19. Lee P-S, Sampath K, Karumanchi SA, Tamez H, Bhan I, Isakova T, et al. Plasma gelsolin and circulating actin correlate with hemodialysis mortality. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2009;20(5):1140.
20. Lee P-S, Drager LR, Stossel TP, Moore FD, Rogers SO. Relationship of plasma gelsolin levels to outcomes in critically ill surgical patients. *Annals of surgery*. 2006;243(3):399.
21. Mounzer KC, Moncure M, Smith YR, DiNUBILE MJ. Relationship of admission plasma gelsolin levels to clinical outcomes in patients after major trauma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;160(5):1673-81.
22. Pan J-W, He L-N, Xiao F, Shen J, Zhan R-Y. Plasma gelsolin levels and outcomes after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Critical Care*. 2013;17(4):1-10.
23. Self WH, Wunderink RG, DiNubile MJ, Stossel TP, Levinson SL, Williams DJ, et al. Low admission plasma gelsolin concentrations identify community-acquired pneumonia patients at high risk for severe outcomes. *Clinical Infectious Diseases*. 2019;69(7):1218-25.
24. Zhao D-Q, Wang K, Zhang H-D, Li Y-J. Significant reduction of plasma gelsolin levels in patients with intracerebral hemorrhage. *Clinica Chimica Acta*. 2013;415:202-6.
25. Wollny T, Wątek M, Wnorowska U, Piktel E, Gózdź S, Kurek K, et al. Hypogelsolinemia and Decrease in Blood Plasma Sphingosine-1-Phosphate in Patients Diagnosed with Severe Acute Pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 2021.
26. Audley J, Gliniewicz EF, Zarembek KA, Hong HS, Wald G, Kuhns DB, et al. Low Plasma Gelsolin Concentrations in Chronic Granulomatous Disease. *Inflammation*. 2021;44(1):270-7.
27. Cui N, Yu Z, Chen Z, Chen N. Research on the Correlation of Serum PCT and Plasma GSN Levels with the Prognosis of Urosepsis Patients. *Pak J Med Sci*. 2020;36(5):1011-4.
28. Chiu CT, Wang PW, Asare-Werehene M, Tsang BK, Shieh DB. Circulating Plasma Gelsolin: A Predictor of Favorable Clinical Outcomes in Head and Neck Cancer and Sensitive Biomarker for Early Disease Diagnosis Combined with Soluble Fas Ligand. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6).
29. Esawy MM, Makram WK, Albalat W, Shabana MA. Plasma gelsolin levels in patients with psoriatic arthritis: a possible novel marker. *Clin Rheumatol*. 2020;39(6):1881-8.
30. Parra S, Heras M, Herrero P, Amigó N, Garcés E, Girona J, et al. Gelsolin: a new biomarker of disease activity in SLE patients associated with HDL-c. *Rheumatology (Oxford)*. 2020;59(3):650-61.
31. Calderon-Rodríguez SI, Sanabria-Salas MC, Umaña-Perez A. A comparative proteomic study of plasma in Colombian childhood acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*. 2019;14(8):e0221509.
32. Peñas A, Fernández-De la Torre M, Laine-Menéndez S, Lora D, Illescas M, García-Bartolomé A, et al. Plasma Gelsolin Reinforces the Diagnostic Value of FGF-21 and GDF-15 for Mitochondrial Disorders. *Int J Mol Sci*. 2021;22(12).
33. Wollny T, Suprewicz Ł, Smok-Kalwat J, Antczak G, Piktel E, Gózdź S, et al. Monitoring inflammation in patients diagnosed with non-small cell lung and colorectal cancer using blood levels of C-reactive protein, procalcitonin, and plasma gelsolin. *Medical Studies/Studia Medyczne*. 2023;39(2):103-13.
34. Reddy GKK, Padmavathi AR, Nancharaiah Y. Fungal infections: Pathogenesis, antifungals and alternate treatment approaches. *Current Research in Microbial Sciences*. 2022;3:100137.
35. Kaushik N, Pujalte GG, Reese ST. Superficial fungal infections. Primary care: clinics in office practice. 2015;42(4):501-16.
36. Hazarika D, Jahan N, Sharma A. Changing trend of superficial mycoses with increasing nondermatophyte mold infection: a clinicomycological study at a tertiary referral center in Assam. *Indian journal of dermatology*. 2019;64(4):261.

37. von Lilienfeld-Toal M, Wagener J, Einsele H, Cornely OA, Kurzai O. Invasive fungal infection: new treatments to meet new challenges. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2019;116(16):271.
38. Firacative C. Invasive fungal disease in humans: are we aware of the real impact? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2020;115.
39. Burgess TB, Condliffe AM, Elks PM. A fun-guide to innate immune responses to fungal infections. *Journal of Fungi*. 2022;8(8):805.
40. Drummond RA, Gaffen SL, Hise AG, Brown GD. Innate defense against fungal pathogens. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015;5(6).
41. Wüthrich M, Deepe Jr GS, Klein B. Adaptive immunity to fungi. *Annual review of immunology*. 2012;30:115-48.
42. Yang Z, Chiou TT, Stossel TP, Kobzik L. Plasma gelsolin improves lung host defense against pneumonia by enhancing macrophage NOS3 function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;309(1):L11-6.
43. Piktel E, Wnorowska U, Cieśluk M, Deptuła P, Prasad SV, Król G, et al. Recombinant Human Plasma Gelsolin Stimulates Phagocytosis while Diminishing Excessive Inflammatory Responses in Mice with. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7).
44. Arastehfar A, Gabaldón T, Garcia-Rubio R, Jenks JD, Hoenigl M, Salzer HJ, et al. Drug-resistant fungi: an emerging challenge threatening our limited antifungal armamentarium. *Antibiotics*. 2020;9(12):877.
45. Ademe M, Girma F. *Candida auris*: From multidrug resistance to pan-resistant strains. *Infection and drug resistance*. 2020:1287-94.
46. Beer KD, Farnon EC, Jain S, Jamerson C, Lineberger S, Miller J, et al. Multidrug-resistant *Aspergillus fumigatus* carrying mutations linked to environmental fungicide exposure—three states, 2010–2017. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2018;67(38):1064.
47. Zafar H, Altamirano S, Ballou ER, Nielsen K. A titanic drug resistance threat in *Cryptococcus neoformans*. *Current opinion in microbiology*. 2019;52:158-64.
48. Naik B, Ahmed SM, Laha S, Das SP. Genetic susceptibility to fungal infections and links to human ancestry. *Frontiers in genetics*. 2021;12:709315.
49. Horton MV, Nett JE. *Candida auris* infection and biofilm formation: going beyond the surface. *Current clinical microbiology reports*. 2020;7:51-6.
50. Dadgostar P. Antimicrobial resistance: implications and costs. *Infection and drug resistance*. 2019:3903-10.
51. Chowdhary A, Prakash A, Sharma C, Kordalewska M, Kumar A, Sarma S, et al. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009–17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(4):891-9.
52. Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiology and immunology*. 2009;53(1):41-4.
53. Piedrahita CT, Cadnum JL, Jencson AL, Shaikh AA, Ghannoum MA, Donskey CJ. Environmental surfaces in healthcare facilities are a potential source for transmission of *Candida auris* and other *Candida* species. *infection control & hospital epidemiology*. 2017;38(9):1107-9.
54. Sherry L, Ramage G, Kean R, Borman A, Johnson EM, Richardson MD, et al. Biofilm-forming capability of highly virulent, multidrug-resistant *Candida auris*. *Emerging infectious diseases*. 2017;23(2):328.
55. Johnson CJ, Davis JM, Huttenlocher A, Kernien JF, Nett JE. Emerging fungal pathogen *Candida auris* evades neutrophil attack. *MBio*. 2018;9(4):e01403-18.

56. Forgács L, Borman AM, Prépost E, Tóth Z, Kardos G, Kovács R, et al. Comparison of in vivo pathogenicity of four *Candida auris* clades in a neutropenic bloodstream infection murine model. *Emerging microbes & infections*. 2020;9(1):1160-9.
57. Wang Y, Zou Y, Chen X, Li H, Yin Z, Zhang B, et al. Innate immune responses against the fungal pathogen *Candida auris*. *Nature communications*. 2022;13(1):1-20.
58. Liu Y-C, Kuo R-L, Shih S-R. COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. *Biomedical journal*. 2020;43(4):328-33.
59. Cascella M, Rajnik M, Aleem A, Dulebohn SC, Di Napoli R. Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). *Statpearls [internet]*. 2022.
60. Robles JP, Zamora M, Adan-Castro E, Siqueiros-Marquez L, de la Escalera GM, Clapp C. The spike protein of SARS-CoV-2 induces endothelial inflammation through integrin $\alpha 5\beta 1$ and NF- κ B signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2022;298(3).
61. Avolio E, Carrabba M, Milligan R, Kavanagh Williamson M, Beltrami AP, Gupta K, et al. The SARS-CoV-2 Spike protein disrupts human cardiac pericytes function through CD147 receptor-mediated signalling: a potential non-infective mechanism of COVID-19 microvascular disease. *Clinical Science*. 2021;135(24):2667-89.
62. Soleimani M. Acute kidney injury in SARS-CoV-2 infection: direct effect of virus on kidney proximal tubule cells. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(9):3275.
63. DeOre BJ, Tran KA, Andrews AM, Ramirez SH, Galie PA. SARS-CoV-2 Spike Protein Disrupts Blood–Brain Barrier Integrity via RhoA Activation. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2021;16(4):722-8.
64. Hoenigl M, Seidel D, Sprute R, Cunha C, Oliverio M, Goldman GH, et al. COVID-19-associated fungal infections. *Nature microbiology*. 2022;7(8):1127-40.
65. Tsai C-S, Lee SS-J, Chen W-C, Tseng C-H, Lee N-Y, Chen P-L, et al. COVID-19-associated candidiasis and the emerging concern of *Candida auris* infections. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2023;56(4):672-9.
66. Ravani SA, Agrawal GA, Leuva PA, Modi PH, Amin KD. Rise of the phoenix: Mucormycosis in COVID-19 times. *Indian journal of ophthalmology*. 2021;69(6):1563.
67. Arastehfar A, Carvalho A, van de Veerdonk FL, Jenks JD, Koehler P, Krause R, et al. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA)—from immunology to treatment. *Journal of Fungi*. 2020;6(2):91.
68. Kayaaslan B, Eser F, Kaya Kalem A, Bilgic Z, Asilturk D, Hasanoglu I, et al. Characteristics of candidemia in COVID-19 patients; increased incidence, earlier occurrence and higher mortality rates compared to non-COVID-19 patients. *Mycoses*. 2021;64(9):1083-91.
69. Riche CV, Cassol R, Pasqualotto AC. Is the frequency of candidemia increasing in COVID-19 patients receiving corticosteroids? *Journal of Fungi*. 2020;6(4):286.
70. Seagle EE, Jackson BR, Lockhart SR, Georgacopoulos O, Nunnally NS, Roland J, et al. The landscape of candidemia during the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. *Clinical Infectious Diseases*. 2022;74(5):802-11.
71. Arastehfar A, Carvalho A, Nguyen MH, Hedayati MT, Netea MG, Perlin DS, et al. COVID-19-associated candidiasis (CAC): an underestimated complication in the absence of immunological predispositions? *Journal of Fungi*. 2020;6(4):211.
72. Villanueva-Lozano H, Treviño-Rangel RdJ, González GM, Ramírez-Elizondo MT, Lara-Medrano R, Aleman-Bocanegra MC, et al. Outbreak of *Candida auris* infection in a COVID-19 hospital in Mexico. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021;27(5):813-6.
73. Prakash H, Singh S, Rudramurthy SM, Singh P, Mehta N, Shaw D, et al. An aeromycological analysis of Mucormycetes in indoor and outdoor environments of northern India. *Medical mycology*. 2020;58(1):118-23.

74. Patel M, Panchal J, Desai C, Shah J, Prajapati B, Patel S, et al. Emergence of cerebral mucormycosis in the Post-COVID Period: A detailed analysis of risk factors, clinical progression, and management of this opportunistic fungal infection. *Cureus*. 2022;14(11).
75. Krasemann S, Haferkamp U, Pfefferle S, Woo MS, Heinrich F, Schweizer M, et al. The blood-brain barrier is dysregulated in COVID-19 and serves as a CNS entry route for SARS-CoV-2. *Stem cell reports*. 2022;17(2):307-20.
76. Aghamali M, Kazemi A, Asgharzadeh M, Kafil HS. COVID-19, HIV, and Cryptococcal Meningitis Coinfections with Abnormal Laboratory Findings. *Case Reports in Pulmonology*. 2023;2023.
77. Kim H, Kim S, Ahn MY, Oh DH, Choi J-P, Yang E. Case Report: Cryptococcal Meningitis in a Previously Immunocompetent Patient with Coronavirus Disease 2019. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2024:tpmd230457-tpmd.
78. Ghanem H, Sivasubramanian G. *Cryptococcus neoformans* meningoencephalitis in an immunocompetent patient after COVID-19 infection. *Case Reports in Infectious Diseases*. 2021;2021.
79. Buzhdygan TP, DeOre BJ, Baldwin-Leclair A, Bullock TA, McGary HM, Khan JA, et al. The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function in 2D static and 3D microfluidic in-vitro models of the human blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 2020;146:105131.
80. Reynolds JL, Mahajan SD. SARS-COV2 alters blood brain barrier integrity contributing to neuro-inflammation. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2021;16:4-6.
81. Santiago-Tirado FH, Onken MD, Cooper JA, Klein RS, Doering TL. Trojan horse transit contributes to blood-brain barrier crossing of a eukaryotic pathogen. *MBio*. 2017;8(1):10.1128/mbio.02183-16.
82. Shi M, Mody CH. Fungal infection in the brain: what we learned from intravital imaging. *Frontiers in Immunology*. 2016;7:292.
83. Lytvyn KY, Shostakovych-Koretskaya LR, Doroshenko AA, Andreeva TI. Prognosis of fungal infection of central nervous system in HIV-infected patients: a retrospective study of 77 patients in Ukraine. *HIV & AIDS Review International Journal of HIV-Related Problems*. 2019;18(2):92-9.
84. DiNubile MJ, Parra S, Salomó AC, Levinson SL, editors. Adjunctive Recombinant Human Plasma Gelsolin for Severe COVID-19 Pneumonia. *Open Forum Infectious Diseases*; 2022.

5. Publikacja nr 1 (P.1)



REVIEW ARTICLE

Neurologia i Neurochirurgia Polska
Polish Journal of Neurology and Neurosurgery
2023, Volume 57, no. 1, pages: 14–25
DOI: 10.5603/PJNNS.a2023.0014
Copyright © 2023 Polish Neurological Society
ISSN: 0028-3843, e-ISSN: 1897-4260

LEADING TOPIC

Leading Topic Editor: Alina Kułakowska, MD, PhD, Department of Neurology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

Blood-brain barrier function in response to SARS-CoV-2 and its spike protein

Łukasz Suprewicz¹, Krzysztof Fiedoruk¹, Agata Czarnowska², Marcin Sadowski³,
Agnieszka Strzelecka⁴, Peter A. Galie⁵, Paul A. Janmey⁶, Alina Kułakowska², Robert Bucki¹

¹Department of Medical Microbiology and Nanobiomedical Engineering, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

²Department of Neurology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

³Institute of Medical Sciences, Collegium Medicum, Jan Kochanowski University of Kielce, Kielce, Poland

⁴Institute of Health Science, Collegium Medicum, Jan Kochanowski University of Kielce, Kielce, Poland

⁵Department of Biomedical Engineering, Rowan University, Glassboro, NJ, United States

⁶Department of Physiology and Institute for Medicine and Engineering, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, United States

ABSTRACT

The typical manifestation of coronavirus 2 (CoV-2) infection is a severe acute respiratory syndrome (SARS) accompanied by pneumonia (COVID-19). However, SARS-CoV-2 can also affect the brain, causing chronic neurological symptoms, variously known as long, post, post-acute, or persistent COVID-19 condition, and affecting up to 40% of patients. The symptoms (fatigue, dizziness, headache, sleep disorders, malaise, disturbances of memory and mood) usually are mild and resolve spontaneously. However, some patients develop acute and fatal complications, including stroke or encephalopathy. Damage to the brain vessels mediated by the coronavirus spike protein (S-protein) and overactive immune responses have been identified as leading causes of this condition. However, the molecular mechanism by which the virus affects the brain still needs to be fully delineated. In this review article, we focus on interactions between host molecules and S-protein as the mechanism allowing the transit of SARS-CoV-2 through the blood-brain barrier to reach the brain structures. In addition, we discuss the impact of S-protein mutations and the involvement of other cellular factors conditioning the pathophysiology of SARS-CoV-2 infection. Finally, we review current and future COVID-19 treatment options.

Key words: SARS-CoV-2, spike protein, blood-brain barrier, encephalopathy, stroke, cytokine storm, neuroinflammation
(*Neurol Neurochir Pol* 2023; 57 (1): 14–25)

Introduction

SARS-CoV-2 mainly causes inflammatory lung damage associated with thrombosis and increased pulmonary vascular permeability leading to haemorrhage and oedema [1]. In addition, the cytokine storm during the inflammatory cascade and the direct action of the SARS-CoV-2-derived spike protein affect other organs, including the central nervous system [2–4]. Compelling reports indicate that COVID-19 patients develop neurological symptoms during acute infection. They can also develop a chronic condition, long-COVID or PACS

(Post-Acute COVID Syndrome), characterised by fatigue and neuropsychiatric symptoms [5–8]. More than 40% of COVID-19 patients exhibit neurological, potentially lethal, symptoms during SARS-CoV-2, increasing the need to understand the underlying molecular mechanisms and to develop effective countermeasures [9–11].

Neuroinflammation, which typically accompanies central nervous system (CNS) damage, can be mediated directly by the viral invasion of CNS cells or indirectly by mediators that govern the development of systemic inflammation [3, 12]. Briefly, direct action of the SARS-CoV-2 spike protein

Address for correspondence: Robert Bucki, Department of Medical Microbiology and Nanobiomedical Engineering, Medical University of Białystok, Mickiewiczza 2C St., 15–222 Białystok, Poland; e-mail: buckirobert@gmail.com

Received: 30.01.2023 Accepted: 15.02.2023 Early publication date: 22.02.2023

This article is available in open access under Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.

(S1-protein), which circulates in the blood after being cleaved by the proteases during the viral invasion, and pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) released by host immunocompetent cells in response to it, impede the blood-brain barrier (BBB) integrity, resulting in viral entry through the endothelium followed by infection of astrocytes [2, 3–15]. Symptoms can range from mild headache, nausea, impaired consciousness or reduced cognition to severe, potentially lethal conditions including encephalopathy, delirium, and acute disseminated encephalomyelitis [9–11]. Multicentre analyses have revealed that stroke (60%+) and encephalopathy (up to 42%) account for most neurological complications associated with SARS-CoV-2 infection. Encephalitis and Guillain-Barré syndrome are considerably less frequent, with incidence rates of 13% and 9%, respectively [11, 16]. Younger patients are more susceptible to ischaemic stroke associated with recurrent vascular occlusion and greater morbidity for COVID-19 patients than influenza patients. Among all neurological symptoms of SARS-CoV-2, patients with stroke and inflammatory syndromes had the worst prognosis [17, 18]. In the majority of cases, neuroimaging reveals ischaemia with large vessel occlusion, perfusion abnormalities, and haemorrhage in locations not typically associated with hypertension. In addition, post mortem analyses of COVID-19 patients have identified a link between microvascular disease and microhaemorrhages [22, 23].

In conclusion, all of these neurological complications may result directly or indirectly from an impairment of the blood-brain barrier (BBB) caused by SARS-CoV-2 infection.

Role of blood-brain barrier in maintaining central nervous system homeostasis

The blood-brain barrier is a specialised system of brain microvascular endothelial cells that guards the brain from circulating toxins, nourishes brain tissues, and filters harmful compounds from the brain to the bloodstream [19]. The proper functioning of the central nervous system is ensured by close interaction between the brain endothelium and other neurovascular/glial components such as astrocytes, pericytes, neurons, and basement membranes [20, 21]. Passage through the BBB is strictly regulated by physical (intercellular tight and adherens junctions) and metabolic (enzymes, transporters etc.) barriers [22, 23]. Notably, there is a functional difference between the brain endothelial cells' abluminal and luminal membrane surfaces due to the differential expression of specific transporters, secretory bodies, and the release of enzymes locally [24]. Due to its restricted permeability, the BBB is a major obstacle for delivering therapeutic agents into the CNS [25]. Leakage or disruption of the BBB plays a crucial role in the pathogenesis of numerous brain diseases such as Alzheimer's Disease, multiple sclerosis, ischaemia, Parkinson's Disease, and PACS/neuro-COVID-19 [26–30].

Interaction of SARS-CoV-2 with host cells

The crown-like (corona) appearance of the virion is attributable to the spike (S) protein, which is assembled in homotrimer form and inserted in multiple copies into the host membrane. In SARS-CoV-2, the S-protein is cleaved by furin into the S1 and S2 subunits during their biosynthesis within the infected cells. In many other coronaviruses, the S-protein is only cleaved when they reach the target cells. Thus, the S-protein on the mature virion consists of non-covalently linked S1 and S2 subunits. The former subunit binds the cell receptor — angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), while the S2 subunit anchors the S-protein to the membrane. ACE2 engagement by the S1-protein triggers conformational changes in both subunits (S1 and S2) that lead to the formation of a fusion pore by bringing the viral and cellular membranes together [31]. As shown in Figure 1, for SARS-CoV-2, this process exposes the S2 site, followed by its subsequent cleavage by a transmembrane protease, serine 2 (TMPRSS2), resulting in bringing the virus closer to the cell surface and ultimately fusion of the S2 subunit to the membrane. Importantly, the S1 subunit is released from the ACE2 receptor to the bloodstream, where it has been detected in unvaccinated and infected patients, leading to inflammation triggered by direct and indirect action of the S-protein throughout the body [15].

Other cell attachment factors/co-receptors for SARS-CoV-2

ACE2 is the primary receptor responsible for the entry and expansion of the SARS-CoV-2 virus in human cells. Nevertheless, several reports have indicated that ACE2 alone cannot ensure SARS-CoV-2's entry into cells, and additional co-receptors or attachment factors have been proposed for this process [32, 33]. Blood-brain barrier endothelial cells express several of these factors, linking SARS-CoV-2 with neurological symptoms. Due to the substantial genetic relatedness between SARS-CoV-2 and other coronaviruses, particularly SARS-CoV-1, specific targets by which the virus interacts with human cells have been described (Fig. 2) [34].

Extracellular vimentin

A link between extracellular vimentin and SARS-CoV-2 infection has been established by several studies [33, 35–38]. Vimentin (Vim) is a type III intermediate filament-forming protein and an essential cytoskeleton element. In addition, Vim exists in the extracellular environment and on the surface of various cells regardless of its expression due to its secretion by immune cells triggered by inflammation [44] and by endothelial cells in tumours [39]. Recent studies have shown that Vim directly interacts with S-protein, and that blocking Vim on the cell surface significantly reduces the entry

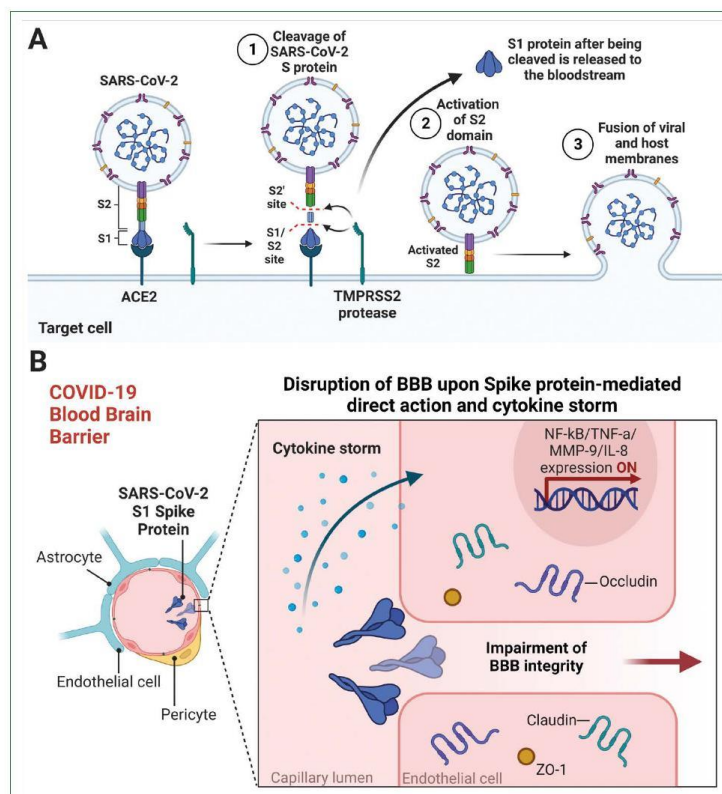


Figure 1. ACE2- and TMPRSS2-mediated SARS-CoV-2 cell entry indicates a possible explanation for presence of S1 protein in free form in circulation (A). Scheme shows SARS-CoV-2 Spike S1 protein-driven disruption of blood-brain barrier. Direct action of S-protein and cytokine storm causes tight junctional complex rupture and enhances autocrine downstream proinflammatory signalling in endothelial cells (B). Illustration created in Biorender

of SARS-CoV-2 into host cells [33]. Specifically, antibodies targeting the vimentin C-terminal domain block entry of the pseudovirus containing S-protein by up to 80% in cells expressing extracellular vimentin and ACE2 [33] *in vitro*, and anti-vimentin antibodies show potential therapeutic value *in vivo* [40]. Similarly, an inhibitory effect on viral uptake has been recorded for other vimentin-blocking compounds [36]. Moreover, limiting the concentration of vimentin in the blood suppresses SARS-CoV-2 replication and, in turn, virus-triggered inflammation [33, 38].

Neuropilin-1

Neuropilin-1 (NRP1) is another putative attachment protein or co-receptor for SARS-CoV-2 since its selective inhibitors or anti-NRP1 antibodies reduce the virus entry to host cells [41]. NRP1 physiologically has the ability to bind all of the furin-cleaved proteins and acts as an inhibitor for

neuronal demyelination and a suppressor of inflammatory signalling that preserves BBB integrity [41].

Heparan sulfate

Heparan sulfate (HS), a polysaccharide attached to various cell surfaces or extracellular matrix proteins, is another compound associated with SARS-CoV-2 uptake by host cells. HS participates in several biological processes, including cell adhesion, signalling, and angiogenesis [42]. Interestingly, the S-protein interacts with cellular HS through a domain adjacent to its receptor-binding domain (RBD) [43]. Furthermore, HS inhibitors, such as heparin derivatives and mitoxantrone, may directly block the interaction between HS and S1 protein, inhibiting the uptake of both pseudotyped and authentic SARS-CoV-2 [44]. Similar effects have been observed for sunitinib and BNTX, drugs that indirectly inhibit HS-mediated viral entry by rearrangement of the actin network [49].

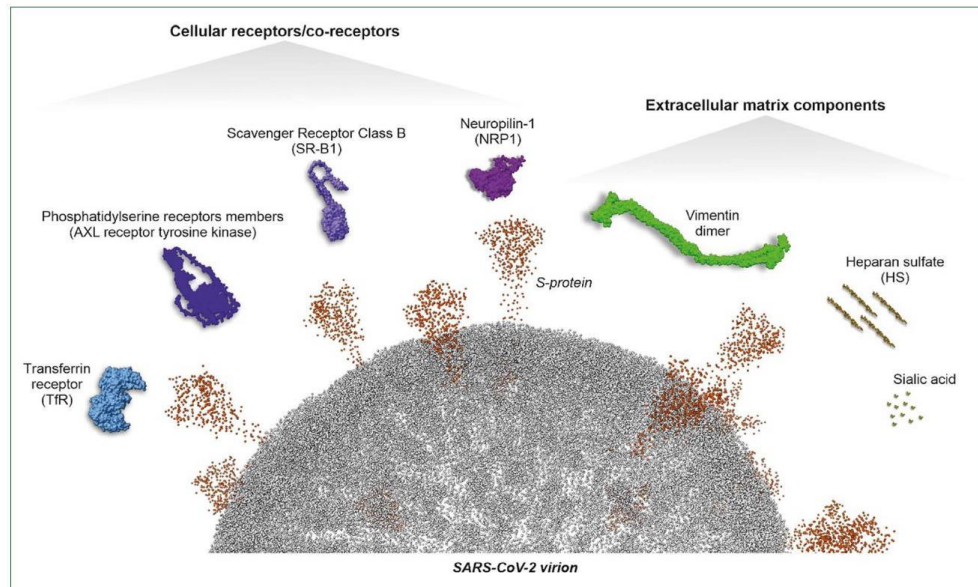


Figure 2. Host molecules interacting with S-protein of SARS-CoV-2. Visualisation performed using ChimeraX v.1.4 software [98] with proportional dimensions, based on 3D model of SARS-CoV-2 virion [99] and 3D models of proteins predicted using AlphaFold v2.2.2 tool [100] as well as heparan sulfate (octamer) and sialic acid molecules

Sialic acid

Sialic acids on the surface of BBB-forming endothelial cells play a vital role in the transport kinetics between the blood and the brain, hence appearing to be naturally associated with the invasion of CNS by SARS-CoV-2. Indeed, the direct binding of S-protein to sialic acid has been observed with electron microscopy and *in silico* studies [45]. However, due to conflicting conclusions, the role of sialic acid in the process of SARS-CoV-2 penetration is not clearly defined [46, 47]. For instance, ACE2 glycosylation inhibition studies with neuraminidase indicate that sialic acids on the ACE2 receptor prevent ACE2/spike protein interaction [46]. On the other hand, it has been reported that gangliosides could serve as ligands for the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein, thus improving viral uptake [47].

Scavenger receptor class B, type I

Scavenger Receptor Class B, Type I (SR-B1) on immune cells is involved in processes of the innate immune response. On the BBB, SR-B1 acts as a major high-density lipoprotein (HDL) receptor that modulates reverse sterol transport. Since the S1-subunit attaches to cholesterol and possibly HDL components, improving viral uptake *in vitro*, SR-B1 may be implicated in this process. For example, the SARS-CoV-2 infection of the cells overexpressing SR-B1 has been shown to be enhanced, while the viral uptake

in SR-B1 knockout cells is reduced [48]. Similarly, in a study with cholesterol-poor synthetic biological HDL targeting SR-B1, 80% inhibition of SARS-CoV-2 pseudovirus uptake was observed [49].

Phosphatidylserine receptors

Phosphatidylserine (PS) receptors (PSR) namely TIM (TIM-1 and TIM-4), and TAM (AXL) have been reported as factors that enhance SARS-CoV-2's attachment to cells, promote uptake of virions, and boost ACE2-dependent infection of SARS-CoV-2. Wang et al. indicated that AXL interacts directly with the N-terminal domain of the SARS-CoV-2 S-protein [50]. But contradicting that, Bohan et al. stated that AXL does not bind to S-protein but rather to PS, which is abundant on the surface of the SARS-CoV-2 virion [51]. Furthermore, bemcentinib, an AXL inhibitor, significantly inhibited SARS-CoV-2 viral uptake into Vero 6 cells.

Transferrin receptor

Transferrin receptor (TfR) is highly expressed in brain capillary endothelial cells, but not the peripheral endothelium. TfR is responsible for the transport of iron into the brain parenchyma to maintain iron homeostasis, which is crucial for proper brain function, e.g. metabolism and neural conductivity. TfR is another protein involved in viral uptake by direct interaction with Spike S1 RBD. An anti-TfR antibody shows

a potent inhibitory effect on SARS-CoV-2 infection in mice [52]. *In vitro* studies have indicated that low doses of ferritin II reduce the uptake of different variants of concern (VOCs) of SARS-CoV-2 [53].

Blood-brain barrier and SARS-CoV-2

Given the unique properties of the BBB, viruses such as SARS-CoV-2 are unable to enter the CNS easily. However, numerous case reports of patients with neurological complications indicate that nearly 60% of all COVID-19 patients have had disrupted BBB, resulting in increased permeability [54]. Post-mortem histopathological examinations indicate the presence of SARS-CoV-2 in different types of glial and endothelial cells within the brain [55]. Due to the large number of co-receptors/attachment factors other than ACE2 that may play a role in viral invasion, the mechanisms utilised by SARS-CoV-2 to enter the brain and cause neurological disorders still need to be fully understood.

So far, two major routes for virus entry into the CNS have been identified: retrograde neuronal transport, and hematogenous transmission including immune cells as vectors in a mechanism known as the 'Trojan horse'. The neuroinvasive route involves direct or indirect contact with the oral mucosa and eyes, and also implicates the olfactory, vagus, and trigeminal nerves as the primary cranial nerves involved in viral entry into the CNS [61]. Other mechanisms involve the indirect action of S-protein and the cascade of events associated with cytotoxicity and systemic inflammatory responses (the cytokine storm) that lead to the deterioration of the BBB. However, this review focuses on the hematogenous route, which involves the brain endothelium more profoundly.

Direct interaction of SARS-Cov-2 with BBB

Although initial *in vitro* studies have shown that SARS-CoV-2 is incapable of infection and replication in endothelial cells, numerous post mortem reports of patients who died from COVID-19 have demonstrated the presence of virus particles within the brain vasculature, pericytes, and neurons [55, 56]. These inconsistencies indicate that BBB infection is more complex and requires further examination. As mentioned previously, SARS-CoV-2 can infect endothelial cells by interacting with ACE2 on their surface [14]. However, the degree of infection is substantially less pronounced than in the primary target lung cells of SARS-CoV-2 — type II pneumocytes. On the other hand, overexpression of ACE2 in the endothelium of the cerebral circulation occurs in patients with hypertension and dementia and positively correlates with the severity of neurological symptoms [2, 57]. In addition, the S-protein may interact directly with the BBB, and S1, S1RBD, and S2 subunits exhibit pro-inflammatory effects, resulting in increased BBB permeability via damage to tight junctions (TJs) but not adherens junctions (AJs) [2, 58].

Trojan horse

One of the hallmarks of virus-induced neuropathogenesis is the breakdown of the BBB, which leads to uncontrolled infiltration of the virus-infected immune cells into the CNS via the 'Trojan horse' mechanism [59]. Using monocytes and macrophages as vectors, the viruses exploit the physiological process of CNS infiltration by immune response cells passing through the BBB. This process of permeation through endothelial cells, known as extravasation, consists of a series of consecutive steps, i.e. tethering, rolling, adhesion, and transmigration/diapedesis [60]. During this process, immune cells interact with adhesion molecules (ICAM, VCAM, E-Selectin) on the surface of the endothelium. Expression of these adhesion molecules is increased during SARS-CoV-2 infection, further contributing to the severity of neurological symptoms [58, 61]. Once the infected cells enter the CNS, the released virions can further infect glial cells, especially astrocytes and pericytes, whose impaired function further disrupts BBB homeostasis, leading to the loss of its function.

Adsorptive transcytosis

Direct passage of the virus across the BBB via interaction with receptors and co-receptors that facilitate infection, as well as the use of immune response cells as transporters, is not the only mechanism exploited by SARS-CoV-2 in order to penetrate endothelial barriers. Rhea et al. showed that iodine-labelled S-protein from SARS-CoV-2 can cross endothelial barriers through adsorptive transcytosis [3]. During this process, glycopeptides, i.e. spike protein with a positive charge circulating in the bloodstream, interact with endothelial cells' negatively charged surface [62]. Subsequently, the interaction causes invagination of the cell membrane and vesicle formation. Vesicles containing S-protein can now enter the intercellular space and may interact with the parenchyma side of the BBB.

Cytokine storm

In severe cases, COVID-19 is accompanied by a systemic inflammatory response, referred to as a cytokine storm, contributing to the disease's lethality. Patients with a poor prognosis frequently have elevated serum levels of cytokines and chemokines, mainly IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, and TNF- α [63].

These pro-inflammatory mediators exhibit a positive feedback-like effect that stimulates neighbouring cells to produce even more cytokines, thereby promoting the infiltration of other immune response cells into the site of infection. In addition, S-protein can interact with Toll-like receptors 2 and 4 (TLR2, TLR4) and, in turn, activate signalling pathways involving PI3K, AKT, MAPK, and NF- κ B [64, 65]. Subsequently, translocation of NF- κ B into the cell nucleus results in increased production of pro-inflammatory cytokines, as well as adhesion factors such as ICAM, VCAM, and E-Selectin. As the aforementioned cytokines exert either direct or indirect effects that increase vascular permeability, the severity of inflammation

correlates closely with BBB damage. For example, IL-1 β indirectly increases the expression of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), which breaks down TJ proteins (ZO-1, occludin, and claudin-5) [66]. Similarly, IL-6, IL-8, IL-12, and TNF- α lead to BBB breakdown [67]. Moreover, S-protein stimulates the production of VEGF, one of the most potent inducers of vascular permeability [68, 69]. The increased vascular permeability significantly contributes to virus entry into the CNS and glial cell infection, resulting in neurological disorders.

TJ disruption through cytoskeleton and glycocalyx involvement

Tight junctions, i.e. close cell-cell connections formed by complexes of proteins, i.e. cytoplasmic scaffolding: ZO-1, -2, -3, and transmembrane proteins: occludins, and claudins, play a critical role in maintaining BBB homeostasis by restricting paracellular permeability [19]. These junctional complexes require the involvement of actin cytoskeleton rearrangement in processes associated with the formation and maturation of cell-cell contacts. Recently, RhoA activation has been associated with SARS-CoV-2-mediated barrier breakdown, indicating that the signalling mechanism involves cytoskeletal components. RhoA is a key regulator of endothelial cytoskeleton and TJ complex dynamics; its activation has been shown to disrupt vascular integrity. SARS-CoV-2 S1 protein triggered activation of RhoA in a 3D microfluidic model of the BBB. The use of C3 transferase, a RhoA inhibitor, mitigated the negative effect of S1 on BBB permeability and TJ degradation [4].

Another study has implicated the interaction between hyaluronic acid (HA) and CD44 in the endothelial barrier breakdown during COVID-19 [70]. This work analysed circulating glycosaminoglycans levels and their degradative enzymes' activities among SARS-CoV-2-infected patients [70], and found that the glycocalyx was severely damaged, which corresponded with disease outcome. Moreover, the circulating HA fragments and hyaluronidase level strongly correlated with organ failure assessment scores and hyperinflammation. In conclusion, the authors suggested that HA fragments are released into blood circulation due to COVID-19-mediated dysregulation of HA biosynthesis and degradation, which leads to direct endothelial barrier disruption in a ROCK- and CD44-dependent manner, indicating a role for HA in the vascular pathology of COVID-19.

Coagulopathy

Since the beginning of the COVID-19 pandemic, numerous reports have indicated an increased incidence of thrombotic events in patients with SARS-CoV-2. The syndrome of life-threatening clotting complications has been named COVID-19-associated coagulopathy (CAC) [71]. Cohort studies have shown that the incidence of ischaemic stroke as a complication of thrombotic events oscillated around 2% [72, 73]. In most cases, elevated levels of fibrinogen, D-dimers, C-reactive protein, and P-selectin are recorded in the plasma of patients with CAC [74].

Endothelial cells have an antithrombotic system that determines platelet aggregation (NO, prostacyclin) and coagulation (TPFI, EPCR, thrombomodulin). In addition, the heparan sulfate in the glycocalyx layer exhibits anticoagulant activity [75]. During SARS-CoV-2 infection, there is a state of hyperactivation of the immune response, which results in activation of the complement system, increased release of neutrophil extracellular traps, and overproduction of cytokines, chemokines, and reactive oxygen species [76].

This cascade of events results in an imbalance between fibrinolysis and coagulation. Furthermore, due to damage to the glycocalyx and a reduction in the production of thrombomodulin, nitric oxide, and prostacyclins, the anti-thrombotic fibrinolytic activity of the endothelium decreases. Additionally, an increase in free fibrin, tissue factors, and P-selectin is noted, which is associated with an increase in the prothrombotic activity of the endothelium. Thrombin, fibrinogen, and plasminogen levels increase in CAC and directly or indirectly damage the endothelial barrier. Thrombin increases BBB permeability by indirectly damaging TJ-forming proteins through phosphorylation of MMPs and TJs and upregulation of VEGF by Src kinase [77]. Fibrinogen at pathologically high levels destroys the junctions between actin filaments and TJ, which widens intercellular junctions, impairing endothelial integrity [78]. Ventricular administration of tissue plasminogen activator results in dose-dependent increased BBB permeability, suggesting plasminogen's direct involvement in endothelial injury [79].

ACE2, which is the master receptor for SARS-CoV-2, has a dual function, i.e. it regulates the renin-angiotensin-aldosterone system as well as the kallikrein-kinin system. Kinins are peptides with the ability to increase vascular permeability. An occupied ACE2 receptor during SARS-CoV-2 infection can cause dysregulation of kinin degradation, resulting in what has been called a 'kinin storm', leading to increased vascular permeability, inflammation, and ultimately organ damage, including to the brain [80].

Lung hypoxia increases BBB permeability

COVID-19 is a predominantly pulmonary disease that causes infection of the alveoli, impairing their function, and patients with SARS-CoV-2 are chronically hypoxic due to pathological changes in the lungs. Many studies have described so-called 'happy hypoxia' in SARS-CoV-2 infected patients, i.e. hypoxemia without signs of shortness of breath, which leads to chronic mild hypoxia (CMH) [81].

Hypoxia, encephalitis, and stroke are the leading long-term causes of neurocognitive symptoms in COVID-19 patients [88]. Multiple mechanisms of chronic hypoxia can result in BBB impairment. Hypoxia can induce cell death in endothelial and glial cells via the apoptosis pathway by activating hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) [89]. In addition, CMH has been shown to cause a temporary vascular leak in brain blood vessels, along with microglial activation and infiltration around

damaged vessels. CMH-induced increased endothelial permeability exerts a regional preference, with considerably higher prevalence within the brainstem and olfactory bulb compared to the cerebellum and cerebral cortex [82]. These regions have also been reported to have the most significant levels of angiogenic development, with a peak in VEGF production that may additionally influence hypoxic-induced BBB disruption. Furthermore, *in vitro* coculture models of endothelial cells and astrocytes have shown that hypoxia causes a decrease in ZO-1 expression, which correlates with the rearrangement of activated filaments resulting in increased permeability to molecular tracers [83].

Mutations and their impact on severity of neurological complications

The high transmissibility and genetic diversity of SARS-CoV-2 have led to the emergence of mutated virus strains, some of which have been termed 'variants of concern' (VOCs) due to their increased infectiousness. VOC strains have critical point mutations within spike proteins that affect the virus's ability to survive in harsh conditions and evade the host's immune response. The most dangerous VOCs hold several common mutations.

For example, the D614G and P681R/H mutations in the S-protein increase the transmission and infectivity of the virus due to the increased affinity of the S1 subunit to the ACE receptor [84]. Remarkably, certain VOCs with a higher virulence can eliminate from circulation less pathogenic variants. Such displaced variants are then referred to as de-escalated variants if they meet at least one of the following criteria: (i) the variant is no longer circulating; (ii) although the strain has circulated for a long time in the population, it has no impact on the epidemiological situation; or (iii) the variant does not have specific, more virulent, properties based on scientific evidence.

SARS-CoV-2 is still evolving, and the emergence of more pathogenic mutants in the future is possible. For this reason, freshly discovered variants are closely monitored and listed as Variants of Interest (VOI) or Variants under Monitoring (VUM). A summary of the most common mutations, along with their impact on transmissibility and induction of the immune response, is set out in Table 1.

Recently, Taquet et al., in a massive two-year cohort study including almost 1.3 million patients, analysed risk trajectories of neurological and psychiatric outcomes after SARS-CoV-2 infection [85]. They compared the risk for adverse effects within CNS in cohorts (a minimum of 39,845 patients per group) of patients diagnosed with different VOCs of SARS-CoV-2, e.g. alpha (B.1.1.7), delta (B.1.617.2), and omicron (B.1.1.529) comparing them to control cohorts, before the emergence of those VOCs. Only minor changes were observed for the alpha variant in the six-month hazard risk of neurological and psychiatric events. In contrast, patients infected with the delta variant were at a significantly higher risk of anxiety, insomnia, cognitive disorders, seizures, and ischaemic stroke

incidents, but at a lower risk of dementia. Mortality among patients diagnosed with the delta strain was also higher. The omicron variant caused an increased risk of dementia, as well as mood, nerve, and plexus disorders. However, the death rate was significantly lower than among patients before the emergence of omicron.

Unfortunately, despite extensive research into the pathogenicity and molecular mechanisms of SARS-CoV-2 infection, little is known about the direct impact of mutations in the S-protein on the integrity of the BBB. Most *in vitro* BBB studies are concerned with the effects of spike protein subunits derived from the Wild Wuhan strain of SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 treatment

Since the beginning of the COVID-19 pandemic, concerted efforts by researchers worldwide have led to the development of therapies, some using previously developed broad-spectrum drugs, and some that have been newly developed and are specifically placed to treat SARS-CoV-2. Implementing vaccination against COVID-19, using, among others, innovative mRNA vaccine technology, has been a great success, which significantly reduced severe adverse events (SAE), the frequency of hospitalisations, and consequently, mortality [86, 87].

Vaccination — current status

As of January 2023, nearly 5.6 billion people, 69.1% of the world's population, have received at least one dose of a COVID-19 vaccine. 13.19 billion doses have been administered globally, and 2.2 million are administered daily. Almost 26% of people in low-income countries have received at least one dose. In Poland, over 57.8 million doses have been administered so far, and 22.6 million people are considered fully vaccinated, with at least two doses administered [88]. There are several types of vaccines against SARS-CoV-2 [89]. mRNA-based vaccines use mRNAs developed in the laboratory that are encapsulated in liposome lipid envelopes that enable entry into human cells, where they stimulate ribosomes to produce viral S-protein or its fragment, which further triggers antibody production by plasmacytes conditioning a specific immune response. Other vaccines trigger an immune response using weakened, modified, or inactivated viruses. Viral vector vaccines contain a modified version of a vector virus that includes fragments of SARS-CoV-2 but cannot cause infection. In contrast, protein subunit vaccines contain the spike protein fragment but without vector virus. Additionally, protein subunit vaccines contain an adjuvant that modulates immune system responses in the future when the human body meets viral particles during infection again. Due to the high ability of SARS-CoV-2 to mutate, vaccine manufacturers regularly update their formulations to maintain a high level of effectiveness in preventing COVID-19, which requires repeated booster doses.

Table 1. Summary of key emerging mutated variants of SARS-CoV-2 and its impact on immune response and severity of infection compared to Wild Wuhan strain of SARS-CoV-2. Its current status, according to World Health Organisation, is denoted as either VOC (Variant of Concern), VUM (Variant under Monitoring), VOM (Variant of Interest), or DEV (De-escalated Variants). Table created according to current (as of January 2023) reports of WHO (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>)

WHO label and lineage	WHO status	Spike mutations of interest	First detection date and place	Transmissibility	Impact on immunity	Severity
Alpha B.1.1.7	DEV	N501Y, D614G, P681H	September 2020, United Kingdom	↑	Comparable	↑
Beta B.1.351	DEV	K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V	September 2020, South Africa	↑	↑	↑
Gamma P.1	DEV	K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y	December 2020, Brazil	↑	↑	↑
Delta B.1.617.2	DEV	L452R, T478K, D614G, P681R	December 2020, India	↑	↑	↑
Omicron BA.1	DEV	A67V, Δ69-70, T95I, G142D, Δ143-145, N211I, Δ212, ins215EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	November 2021, South Africa and Botswana	↑	↑	↓
Omicron BA.2	VOC	142D, N211I, Δ212, V213G, G339D, S371F, S373P, S375F, T376A, D405N, R408S, K417N, N440K, S477N, T478K, E484A, Q493R, Q498R, N501Y, Y505H, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, Q954H, N969K	November 2021, South Africa	↑	↑	↓
Omicron BA.3	DEV	A67V, Δ69-70, Δ143-145, N211I, Δ212, G339D, S371F, S373P, S375F, D405N, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, Q498R, N501Y, Y505H, D614G, H655Y, N679K, P681H, D796Y, Q954H, N969K	November 2021, South Africa	No evidence	No evidence	No evidence
Omicron BA.4	VOC	As BA.2 + L452R, F486V, R493Q	January 2022, South Africa	No evidence	↑	No evidence
Omicron BA.5	VOC	As BA.2 + L452R, F486V, R493Q	February 2022, South Africa	No evidence	↑	Unclear
Omicron BA.2.75	VOI	W152R, F157L, I210V, G257S, D339H, G446S, N460K, Q493	May 2022, India	No evidence	↑	No evidence
Omicron XBB	VOI	As in BA.2.75 + N460K, F490S	Unclear	No evidence	↑	No evidence
Omicron BA.2.3.20	VUM	K444R, L452M, N460K	Unclear	No evidence	No evidence	No evidence
Omicron XBC	VUM	N440K, F486P	Unclear	No evidence	No evidence	No evidence

Antiviral drugs

Despite the high vaccination prevalence in all age groups, many people have yet to receive a full dose. In addition, among people with impaired immunity, such as the elderly or those undergoing hematological treatment, the response to vaccination has been insufficient. Therefore, it became necessary to look for antiviral therapies. Several drugs have been found useful and approved by global organisations that control the approval of medicines for COVID-19 treatment. Examples of such antiviral drugs used in treating SARS-CoV-2 are remdesivir, molnupiravir, nirmatrelvir, and ritonavir.

Remdesivir is approved for COVID-19 treatment in adults and pediatric patients who are at least 28 days of age and weigh at least 3 kilograms. Remdesivir is used both in clinical practice and at home by people diagnosed with mild to moderate SARS-CoV-2 at high risk for severe disease progression. Remdesivir is a nucleoside analogue that inhibits RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of different coronaviruses. Incorporation by RdRp results in highly limited RNA synthesis [90].

Molnupiravir, like remdesivir, is a nucleoside analogue with a broad antiviral spectrum. It also inhibits the replication of other coronaviruses, i.e. SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, and MERS, as well as viruses from different families, RSB, HCV, and Ebola [91].

Nirmatrelvir and ritonavir are used in concurrent therapy because of their synergistic effect [92]. Nirmatrelvir is an oral protease inhibitor active against m^{PRO}, a viral protease involved in the replication process.

Ritonavir is a cytochrome p450 (CYP) 3A4 inhibitor that enhances the pharmacokinetics of protease inhibitors. Coadministration is required to increase nirmatrelvir concentration to the therapeutic range. Molnupiravir, nirmatrelvir, and ritonavir, unlike remdesivir, have yet to receive authorisation from the US Food and Drug Administration (FDA). However, the FDA granted Emergency Use Authorisation (EUA) status for these formulations in late 2021.

Monoclonal antibodies

SARS-CoV-2 targeting monoclonal antibodies (mAbs) are artificial antibodies that target specific epitopes within S-protein that act as neutralising agents limiting viral entry. Bebtelovimab and tixagevimab co-packaged with cilgavimab are SARS-CoV-2-targeting mAbs authorised for use through a EUA [93, 94]. However, the COVID-19 Treatment Guidelines Panel recommends against using anti-SARS-CoV-2 mAbs to treat SARS-CoV-2 because the currently dominant Omicron variant is unlikely to be susceptible to mAbs, given its high variability within the S-protein sequence.

Immunomodulatory agents

Unlike previously mentioned compounds, immune modulators are therapeutic agents that do not target virus-infected cells but instead activate, suppress or boost immune responses. During SARS-CoV-2, immune modulators are especially useful during the cytokine storm due to their ability to suppress

hyperinflammation. Several immunomodulatory drugs have been authorised to treat COVID-19, including anakinra, baricitinib, and tocilizumab.

Anakinra is an IL-1 receptor agonist used to treat hospitalised adults with SARS-CoV-2 requiring supplemental oxygen [95]. Baricitinib is a Janus kinase (JAK) inhibitor, preventing downstream activation of signalling pathways leading to the secretion of various interleukins, interferons, and growth factors [96]. Baricitinib treats COVID-19 in pediatric patients requiring oxygen supplementation, mechanical ventilation, or extracorporeal membrane oxygen (ECMO). Tocilizumab inhibits IL-6 action by competitive blockage of its receptor IL6-R, which inhibits downstream signal transduction that leads to infiltration of immune cells, e.g. B and T cells [97]. Tocilizumab has found use among pediatric patients requiring mechanical ventilation and ECMO, with concomitant administration of corticosteroids.

Conclusions

SARS-CoV-2 remains a substantial threat to global health and the global economy. Neurological and psychiatric disorders involve disruption of blood-brain barrier integrity, and their longitudinal effects are unknown. Despite the introduction of effective vaccines, continued research toward a deeper understanding of the intricate and complex processes involved in the pathophysiology of SARS-CoV-2 infections is still needed due to its high genetic variability and evolutionary dynamics. In particular, understanding the effects of S-protein from different VOCs on the integrity of the BBB is essential if we are to recognise the neurological consequences of COVID-19. Equally important is the education of medical professionals and patients about the aetiology, prevention, treatment, and mechanism of action of SARS-CoV-2.

Conflicts of interest: None.

Funding: This work was supported by the National Science Centre, Poland, under Preludium 21 Grant UMO-2022/45/N/NZ6/01454 (to L.S.), Medical University of Białystok SUB/1/DN/22/006/1122 (to K.F.) and the Polish National Agency for Academic Exchange PPN/STA/2021/1/00003/U/00001 (scientific internship at Rowan University, NJ, USA to L.S.).

References

1. Cascella M, Rajnik M, Aleem A, et al. Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). Statpearls [Internet]; 2022.
2. Buzhdygan TP, DeOre BJ, Baldwin-Leclair A, et al. The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function in 2D static and 3D microfluidic in vitro models of the human blood-brain barrier. bioRxiv. 2020, doi: 10.1101/2020.06.15.150912, indexed in Pubmed: 32587958.
3. Rhea EM, Logsdon AF, Hansen KM, et al. The S1 protein of SARS-CoV-2 crosses the blood-brain barrier in mice. Nat Neurosci. 2021; 24(3): 368–378, doi: 10.1038/s41593-020-00771-8, indexed in Pubmed: 33328624.

4. DeOre BJ, Tran KA, Andrews AM, et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Disrupts Blood-Brain Barrier Integrity via RhoA Activation. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2021; 16(4): 722–728, doi: 10.1007/s11481-021-10029-0, indexed in Pubmed: 34687399.
5. Raveendran AV, Jayadevan R, Sashidharan S, et al. Long COVID: An overview. *Diabetes Metab Syndr.* 2021; 15(3): 869–875, doi: 10.1016/j.dsx.2021.04.007, indexed in Pubmed: 33892403.
6. Aiyegbusi OL, Hughes SE, Turner G, et al. TLC Study Group, TLC Study Group. Symptoms, complications and management of long COVID: a review. *J R Soc Med.* 2021; 114(9): 428–442, doi: 10.1177/01410768211032850, indexed in Pubmed: 34265229.
7. González-Herazo MA, Silva-Muñoz DC, Guevara-Martínez PA, et al. Post-COVID 19 Neurological Syndrome: a fresh challenge in neurological management. *Neurol Neurochir Pol.* 2021; 55(4): 413–414, doi: 10.5603/PJNNS.a2021.0052, indexed in Pubmed: 34346051.
8. Hirschfeld AS, Hirschfeld AS. Autoimmune mediated hyperkinetic movement disorders in SARS-CoV-2 infection – a systematic review. *Neurol Neurochir Pol.* 2021; 55(6): 549–558, doi: 10.5603/PJNNS.a2021.0069, indexed in Pubmed: 34637137.
9. Xiong W, Mu J, Guo J, et al. New onset neurologic events in people with COVID-19 in 3 regions in China. *Neurology.* 2020; 95(11): e1479–e1487, doi: 10.1212/WNL.00000000000010034, indexed in Pubmed: 32554771.
10. Ellul MA, Benjamin L, Singh B, et al. Neurological associations of COVID-19. *Lancet Neurol.* 2020; 19(9): 767–783, doi: 10.1016/S1474-4422(20)30221-0, indexed in Pubmed: 32622375.
11. Varatharaj A, Thomas N, Ellul MA, et al. CoroNerve Study Group, CoroNerve Study Group. Neurological and neuropsychiatric complications of COVID-19 in 153 patients: a UK-wide surveillance study. *Lancet Psychiatry.* 2020; 7(10): 875–882, doi: 10.1016/S2215-0366(20)30287-X, indexed in Pubmed: 32593341.
12. Amruta N, Chastain WH, Paz M, et al. SARS-CoV-2 mediated neuroinflammation and the impact of COVID-19 in neurological disorders. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2021; 58: 1–15, doi: 10.1016/j.cytogfr.2021.02.002, indexed in Pubmed: 33674185.
13. Andrews MG, Mukhtar T, Eze UC, et al. Tropism of SARS-CoV-2 for Developing Human Cortical Astrocytes. *bioRxiv.* 2021, doi: 10.1101/2021.01.17.427024, indexed in Pubmed: 33469577.
14. Liu F, Han K, Blair R, et al. SARS-CoV-2 Infects Endothelial Cells and . *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 11: 701278, doi: 10.3389/fcimb.2021.701278, indexed in Pubmed: 34307198.
15. Letarov AV, Babenko VV, Kulikov EE, et al. Free SARS-CoV-2 Spike Protein S1 Particles May Play a Role in the Pathogenesis of COVID-19 Infection. *Biochemistry (Mosc).* 2021; 86(3): 257–261, doi: 10.1134/S0006297921030032, indexed in Pubmed: 33838638.
16. Meppiel E, Peiffer-Smadja N, Maury A, et al. contributors to the NeuroCOVID registry, contributors to the NeuroCOVID registry. Neurologic manifestations associated with COVID-19: a multicentre registry. *Clin Microbiol Infect.* 2021; 27(3): 458–466, doi: 10.1016/j.cmi.2020.11.005, indexed in Pubmed: 33189873.
17. Nannoni S, de Groot R, Bell S, et al. Stroke in COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Int J Stroke.* 2021; 16(2): 137–149, doi: 10.1177/1747493020972922, indexed in Pubmed: 33103610.
18. Merkle AE, Parikh NS, Mir S, et al. Risk of Ischemic Stroke in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) vs Patients With Influenza. *JAMA Neurol.* 2020 [Epub ahead of print]; 77(11): 1–7, doi: 10.1001/jamaneurol.2020.2730, indexed in Pubmed: 32614385.
19. Daneman R, Prat A, Daneman R, et al. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; 7(1): a020412, doi: 10.1101/cshperspect.a020412, indexed in Pubmed: 25561720.
20. Banerjee S, Bhat MA, Banerjee S, et al. Neuron-glia interactions in blood-brain barrier formation. *Annu Rev Neurosci.* 2007; 30: 235–258, doi: 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094345, indexed in Pubmed: 17506642.
21. Cabezas R, Avila M, Gonzalez J, et al. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci.* 2014; 8: 211, doi: 10.3389/fncel.2014.00211, indexed in Pubmed: 25136294.
22. Stamatovic SM, Johnson AM, Keep RF, et al. Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction. *Tissue Barriers.* 2016; 4(1): e1154641, doi: 10.1080/21688370.2016.1154641, indexed in Pubmed: 27141427.
23. Ghosh C, Puvenna V, Gonzalez-Martinez J, et al. Blood-brain barrier P450 enzymes and multidrug transporters in drug resistance: a synergistic role in neurological diseases. *Curr Drug Metab.* 2011; 12(8): 742–749, doi: 10.2174/138920011798357051, indexed in Pubmed: 21568937.
24. Cornford EM, Hyman S, Cornford EM, et al. Localization of brain endothelial luminal and abluminal transporters with immunogold electron microscopy. *NeuroRx.* 2005; 2(1): 27–43, doi: 10.1602/neuroRx.2.1.27, indexed in Pubmed: 15717055.
25. Dong X, Dong X. Current Strategies for Brain Drug Delivery. *Theranostics.* 2018; 8(6): 1481–1493, doi: 10.7150/thno.21254, indexed in Pubmed: 29556336.
26. Al-Bachari S, Naish JH, Parker GJM, et al. Blood-Brain Barrier Leakage Is Increased in Parkinson's Disease. *Front Physiol.* 2020; 11: 593026, doi: 10.3389/fphys.2020.593026, indexed in Pubmed: 33414722.
27. Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV, et al. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol.* 2018; 14(3): 133–150, doi: 10.1038/nrneurol.2017.188, indexed in Pubmed: 29377008.
28. Balasa R, Barcotean L, Mosora O, et al. Reviewing the Significance of Blood-Brain Barrier Disruption in Multiple Sclerosis Pathology and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(16), doi: 10.3390/ijms22168370, indexed in Pubmed: 34445097.
29. Finsterer J, Scorza FA, Scorza CA, et al. Neuro-COVID due to response against the virus. *Neurol Neurochir Pol.* 2022; 56(1): 103–104, doi: 10.5603/PJNNS.a2021.0089, indexed in Pubmed: 34939661.
30. Bratosiewicz-Wąsik J, Bratosiewicz-Wąsik J. Neuro-COVID-19: an insidious virus in action. *Neurol Neurochir Pol.* 2022; 56(1): 48–60, doi: 10.5603/PJNNS.a2021.0072, indexed in Pubmed: 34642927.
31. Jackson CB, Farzan M, Chen B, et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022; 23(1): 3–20, doi: 10.1038/s41580-021-00418-x, indexed in Pubmed: 34611326.
32. van Eijk LE, Binkhorst M, Bourgonje AR, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J Pathol.* 2020; 251(3): 228–248, doi: 10.1002/path.5471, indexed in Pubmed: 32418199.
33. Suprewicz Ł, Swoger M, Gupta S, et al. Extracellular vimentin as a target against SARS-CoV-2 host cell invasion. *bioRxiv.* 2021; 18(6): e2105640, doi: 10.1101/2021.01.08.425793, indexed in Pubmed: 33442680.
34. Wang H, Li X, Li T, et al. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020; 39(9): 1629–1635, doi: 10.1007/s10096-020-03899-4, indexed in Pubmed: 32333222.
35. Lalioti V, González-Sanz S, Lois-Bermejo I, et al. Cell surface detection of vimentin, ACE2 and SARS-CoV-2 Spike proteins reveals selective colocalization at primary cilia. *Sci Rep.* 2022; 12(1): 7063, doi: 10.1038/s41598-022-11248-y, indexed in Pubmed: 35487944.

36. Li Z, Wu J, Zhou Ji, et al. A Vimentin-Targeting Oral Compound with Host-Directed Antiviral and Anti-Inflammatory Actions Addresses Multiple Features of COVID-19 and Related Diseases. *mBio*. 2021; 12(5): e0254221, doi: 10.1128/mBio.02542-21, indexed in Pubmed: 34634931.
37. Amraei R, Xia C, Olejnik J, et al. Extracellular vimentin is an attachment factor that facilitates SARS-CoV-2 entry into human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022; 119(6), doi: 10.1073/pnas.2113874119, indexed in Pubmed: 35078919.
38. Kim H-M, Wang M, Kim S, et al. Hong S-T. Removal of Extracellular Vimentin in Blood Confers Resistance to Viral Infection; 2022.
39. van Beijnum JR, Huijbers EJM, van Loon K, et al. Extracellular vimentin mimics VEGF and is a target for anti-angiogenic immunotherapy. *Nat Commun*. 2022; 13(1): 2842, doi: 10.1038/s41467-022-30063-7, indexed in Pubmed: 35606362.
40. Prasenohadi P, Burhan E, Dhunny S, et al. Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study on hzVSF-v13, a Novel Anti-Vimentin Monoclonal Antibody Drug as Add-on Standard of Care in the Management of Patients with Moderate to Severe COVID-19. *J Clin Med*. 2022; 11(11), doi: 10.3390/jcm11112961, indexed in Pubmed: 35683351.
41. Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science*. 2020; 370(6518): 856–860, doi: 10.1126/science.abd2985, indexed in Pubmed: 33082293.
42. Zhang Qi, Chen CZ, Swaroop M, et al. Heparan sulfate assists SARS-CoV-2 in cell entry and can be targeted by approved drugs. *bioRxiv*. 2020; 6(1): 80, doi: 10.1101/2020.07.14.202549, indexed in Pubmed: 32699847.
43. Kearns FL, Sandoval DR, Casalino L, et al. Spike-heparan sulfate interactions in SARS-CoV-2 infection. *Curr Opin Struct Biol*. 2022; 76: 102439, doi: 10.1016/j.sbi.2022.102439, indexed in Pubmed: 35926454.
44. Zhang Qi, Radvak P, Lee J, et al. Mitoxantrone modulates a heparan sulfate-spike complex to inhibit SARS-CoV-2 infection. *Sci Rep*. 2022; 12(1): 6294, doi: 10.1038/s41598-022-10293-x, indexed in Pubmed: 35440680.
45. Tortorici MA, Walls AC, Lang Y, et al. Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. *Nat Struct Mol Biol*. 2019; 26(6): 481–489, doi: 10.1038/s41594-019-0233-y, indexed in Pubmed: 31160783.
46. Gong Y, Qin S, Dai L, et al. The glycosylation in SARS-CoV-2 and its receptor ACE2. *Signal Transduct Target Ther*. 2021; 6(1): 396, doi: 10.1038/s41392-021-00809-8, indexed in Pubmed: 34782609.
47. Li B, Wang L, Ge H, et al. Identification of Potential Binding Sites of Sialic Acids on the RBD Domain of SARS-CoV-2 Spike Protein. *Front Chem*. 2021; 9: 659764, doi: 10.3389/fchem.2021.659764, indexed in Pubmed: 34368076.
48. Wei C, Wan L, Yan Q, et al. HDL-scavenger receptor B type 1 facilitates SARS-CoV-2 entry. *Nat Metab*. 2020; 2(12): 1391–1400, doi: 10.1038/s42255-020-00324-0, indexed in Pubmed: 33244168.
49. Henrich S, McMahon K, Palacio N, et al. Targeting Scavenger Receptor Type B-1 (SR-B1) and Cholesterol Inhibits Entry of SARS-CoV-2 Pseudovirus in Cell Culture. . doi: 10.1101/2020.12.14.420133.
50. Wang S, Qiu Z, Hou Y, et al. AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells. *Cell Res*. 2021; 31(2): 126–140, doi: 10.1038/s41422-020-00460-y, indexed in Pubmed: 33420426.
51. Bohan D, Van Ert H, Ruggio N, et al. Phosphatidylserine receptors enhance SARS-CoV-2 infection. *PLoS Pathog*. 2021; 17(11): e1009743, doi: 10.1371/journal.ppat.1009743, indexed in Pubmed: 34797899.
52. Tang X, Yang M, Duan Z, et al. Transferrin receptor is another receptor for SARS-CoV-2 entry. . doi: 10.1101/2020.10.23.350348.
53. Sokolov A, Isakova-Sivak I, Grudinina N, et al. Ferritin II Efficiently Inhibits SARS-CoV-2 Replication in Vero Cells. *Viruses*. 2022; 14(2), doi: 10.3390/v14020317, indexed in Pubmed: 35215911.
54. Bellon M, Schwebelin C, Lambeng N, et al. Cerebrospinal Fluid Features in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Positive Patients. *Clin Infect Dis*. 2021; 73(9): e3102–e3105, doi: 10.1093/cid/ciaa1165, indexed in Pubmed: 32770235.
55. Matschke J, Lütgehetmann M, Hagel C, et al. Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series. *Lancet Neurol*. 2020; 19(11): 919–929, doi: 10.1016/S1474-4422(20)30308-2, indexed in Pubmed: 33031735.
56. Constant O, Barthelemy J, Bolloré K, et al. SARS-CoV-2 Poorly Replicates in Cells of the Human Blood-Brain Barrier Without Associated Deleterious Effects. *Front Immunol*. 2021; 12: 697329, doi: 10.3389/fimmu.2021.697329, indexed in Pubmed: 34386007.
57. Numbers K, Brodaty H. The effects of the COVID-19 pandemic on people with dementia. *Nat Rev Neurol*. 2021; 17(2): 69–70, doi: 10.1038/s41582-020-00450-z, indexed in Pubmed: 33408384.
58. Suprewicz Ł, Tran KA, Piktel E, et al. Recombinant human plasma gelsolin reverses increased permeability of the blood-brain barrier induced by the spike protein of the SARS-CoV-2 virus. *J Neuroinflammation*. 2022; 19(1): 282, doi: 10.1186/s12974-022-02642-4, indexed in Pubmed: 36434734.
59. Percivalle E, Sammartino JC, Cassaniti I, et al. Macrophages and Monocytes: „Trojan Horses” in COVID-19. *Viruses*. 2021; 13(11), doi: 10.3390/v13112178, indexed in Pubmed: 34834984.
60. Filippi MD. Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route. *Adv Immunol*. 2016; 129: 25–53, doi: 10.1016/b.sai.2015.09.001, indexed in Pubmed: 26791857.
61. Tong M, Jiang Yu, Xia Da, et al. Elevated Expression of Serum Endothelial Cell Adhesion Molecules in COVID-19 Patients. *J Infect Dis*. 2020; 222(6): 894–898, doi: 10.1093/infdis/jiaa349, indexed in Pubmed: 32582936.
62. Hervé F, Ghinea N, Scherrmann JM. CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J*. 2008; 10(3): 455–472, doi: 10.1208/s12248-008-9055-2, indexed in Pubmed: 18726697.
63. Soy M, Keser G, Atagündüz P, et al. Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. *Clin Rheumatol*. 2020; 39(7): 2085–2094, doi: 10.1007/s10067-020-05190-5, indexed in Pubmed: 32474885.
64. Khan S, Shafiei MS, Longoria C, et al. SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF-κB pathway. *bioRxiv*. 2021; 10, doi: 10.1101/2021.03.16.435700, indexed in Pubmed: 33758854.
65. Zhao Y, Kuang M, Li J, et al. SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR41. *Cell Res*. 2021; 31(7): 818–820, doi: 10.1038/s41422-021-00495-9, indexed in Pubmed: 33742149.
66. Yang F, Zhao K, Zhang X, et al. ATP Induces Disruption of Tight Junction Proteins via IL-1 Beta-Dependent MMP-9 Activation of Human Blood-Brain Barrier. *Neural Plast*. 2016; 2016: 8928530, doi: 10.1155/2016/8928530, indexed in Pubmed: 27795859.
67. Huang X, Hussain B, Chang J. Peripheral inflammation and blood-brain barrier disruption: effects and mechanisms. *CNS Neurosci Ther*. 2021; 27(1): 36–47, doi: 10.1111/cns.13569, indexed in Pubmed: 33381913.
68. Miao Z, Dong Y, Fang W, et al. VEGF increases paracellular permeability in brain endothelial cells via upregulation of EphA2. *Anat Rec*

- (Hoboken). 2014; 297(5): 964–972, doi: [10.1002/ar.22878](https://doi.org/10.1002/ar.22878), indexed in Pubmed: 24458982.
69. Veerabathiran R, Ragunath B, Kaviarasan V, et al. Identification of selected genes associated with the SARS-CoV-2: a therapeutic approach and disease severity. *Bull Natl Res Cent.* 2021; 45(1): 79, doi: [10.1186/s42269-021-00540-y](https://doi.org/10.1186/s42269-021-00540-y), indexed in Pubmed: 33907373.
 70. Queisser KA, Mellema RA, Middleton EA, et al. COVID-19 generates hyaluronan fragments that directly induce endothelial barrier dysfunction. *JCI Insight.* 2021; 6(17), doi: [10.1172/jci.insight.147472](https://doi.org/10.1172/jci.insight.147472), indexed in Pubmed: 34314391.
 71. Franchini M, Marano G, Cruciani M, et al. COVID-19-associated coagulopathy. *Diagnosis.* 2020; 7(4): 357–363, doi: [10.1515/dx-2020-0078](https://doi.org/10.1515/dx-2020-0078).
 72. Lodigiani C, Iapichino G, Carenzo L, et al. Humanitas COVID-19 Task Force. Venous and arterial thromboembolic complications in COVID-19 patients admitted to an academic hospital in Milan, Italy. *Thromb Res.* 2020; 191: 9–14, doi: [10.1016/j.thromres.2020.04.024](https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.04.024), indexed in Pubmed: 32353746.
 73. Klok FA, Kruijff M, Meer Nv, et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thrombosis Research.* 2020; 191: 145–147, doi: [10.1016/j.thromres.2020.04.013](https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.04.013).
 74. Han H, Yang L, Liu R, et al. Prominent changes in blood coagulation of patients with SARS-CoV-2 infection. *Clin Chem Lab Med.* 2020; 58(7): 1116–1120, doi: [10.1515/oclm-2020-0188](https://doi.org/10.1515/oclm-2020-0188), indexed in Pubmed: 32172226.
 75. van Hinsbergh VWM. Endothelium—role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol.* 2012; 34(1): 93–106, doi: [10.1007/s00281-011-0285-5](https://doi.org/10.1007/s00281-011-0285-5), indexed in Pubmed: 21845431.
 76. Behzadifard M, Soleimani M. NETosis and SARS-COV-2 infection related thrombosis: a narrative review. *Thromb J.* 2022; 20(1): 13, doi: [10.1186/s12959-022-00375-1](https://doi.org/10.1186/s12959-022-00375-1), indexed in Pubmed: 35354492.
 77. Liu DZ, Ander BP, Xu H, et al. Blood-brain barrier breakdown and repair by Src after thrombin-induced injury. *Ann Neurol.* 2010; 67(4): 526–533, doi: [10.1002/ana.21924](https://doi.org/10.1002/ana.21924), indexed in Pubmed: 20437588.
 78. Tyagi N, Roberts AM, Dean WL, et al. Fibrinogen induces endothelial cell permeability. *Mol Cell Biochem.* 2008; 307(1-2): 13–22, doi: [10.1007/s11010-007-9579-2](https://doi.org/10.1007/s11010-007-9579-2), indexed in Pubmed: 17849175.
 79. Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, et al. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest.* 2003; 112(10): 1533–1540, doi: [10.1172/JCI19212](https://doi.org/10.1172/JCI19212), indexed in Pubmed: 14617754.
 80. McCarthy CG, Wilczynski S, Wenceslau CF, et al. A new storm on the horizon in COVID-19: Bradykinin-induced vascular complications. *Vascu Pharmacol.* 2021; 137: 106826, doi: [10.1016/j.vph.2020.106826](https://doi.org/10.1016/j.vph.2020.106826), indexed in Pubmed: 33358968.
 81. Couzin-Frankel J. The mystery of the pandemic's 'happy hypoxia'. *Science.* 2020; 368(6490): 455–456, doi: [10.1126/science.368.6490.455](https://doi.org/10.1126/science.368.6490.455), indexed in Pubmed: 32355007.
 82. Meinhardt J, Radke J, Dittmayer C, et al. Olfactory transnucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci.* 2021; 24(2): 168–175, doi: [10.1038/s41593-020-00758-5](https://doi.org/10.1038/s41593-020-00758-5), indexed in Pubmed: 33257876.
 83. Mark KS, Davis TP. Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282(4): H1485–H1494, doi: [10.1152/ajpheart.00645.2001](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00645.2001), indexed in Pubmed: 11893586.
 84. Khatri R, Siddiqui G, Sadhu S, et al. Intrinsic D614G and P681R/H mutations in SARS-CoV-2 VoCs Alpha, Delta, Omicron and viruses with D614G plus key signature mutations in spike protein alters fusogenicity and infectivity. *Med Microbiol Immunol.* 2023; 212(1): 103–122, doi: [10.1007/s00430-022-00760-7](https://doi.org/10.1007/s00430-022-00760-7), indexed in Pubmed: 36583790.
 85. Taquet M, Sillett R, Zhu L, et al. Neurological and psychiatric risk trajectories after SARS-CoV-2 infection: an analysis of 2-year retrospective cohort studies including 1 284 437 patients. *Lancet Psychiatry.* 2022; 9(10): 815–827, doi: [10.1016/S2215-0366\(22\)00260-7](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(22)00260-7), indexed in Pubmed: 35987197.
 86. Graña C, Ghosn L, Evrenoglou T, et al. Efficacy and safety of COVID-19 vaccines. *Cochrane Database Syst Rev.* 2022; 12(12): CD015477, doi: [10.1002/14651858.CD015477](https://doi.org/10.1002/14651858.CD015477), indexed in Pubmed: 36473651.
 87. Nojszewska M, Kalinowska A, Adamczyk-Sowa M, et al. COVID-19 mRNA vaccines (Pfizer-BioNTech and Moderna) in patients with multiple sclerosis: a statement by a working group convened by the Section of Multiple Sclerosis and Neuroimmunology of the Polish Neurological Society. *Neurol Neurochir Pol.* 2021; 55(1): 8–11, doi: [10.5603/PJNNS.a2021.0016](https://doi.org/10.5603/PJNNS.a2021.0016), indexed in Pubmed: 33555604.
 88. Ritchie H, Mathieu E, Rodés-Guirao L, et al. Coronavirus pandemic (COVID-19). Our world in data; 2020.
 89. Mascellino MT, Di Timoteo F, De Angelis M, et al. Overview of the Main Anti-SARS-CoV-2 Vaccines: Mechanism of Action, Efficacy and Safety. *Infect Drug Resist.* 2021; 14: 3459–3476, doi: [10.2147/IDR.S315727](https://doi.org/10.2147/IDR.S315727), indexed in Pubmed: 34511939.
 90. Kokic G, Hillen HS, Tegunov D, et al. Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir. *Nat Commun.* 2021; 12(1): 279, doi: [10.1038/s41467-020-20542-0](https://doi.org/10.1038/s41467-020-20542-0), indexed in Pubmed: 33436624.
 91. Jayk Bernal A, Gomes da Silva MM, Musungaie DB, et al. MOVE-OUT Study Group. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *N Engl J Med.* 2022; 386(6): 509–520, doi: [10.1056/NEJMoa2116044](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2116044), indexed in Pubmed: 34914868.
 92. Hung YP, Lee JC, Chiu CW, et al. Oral Nirmatrelvir/Ritonavir Therapy for COVID-19: The Dawn in the Dark? *Antibiotics (Basel).* 2022; 11(2), doi: [10.3390/antibiotics11020220](https://doi.org/10.3390/antibiotics11020220), indexed in Pubmed: 35203821.
 93. Westendorf K, Žentelis S, Wang L, et al. LY-CoV1404 (bebtelovimab) potently neutralizes SARS-CoV-2 variants. *bioRxiv.* 2022; 39(7): 110812, doi: [10.1101/2021.04.30.442182](https://doi.org/10.1101/2021.04.30.442182), indexed in Pubmed: 33972947.
 94. Levin MJ, Ustianowski A, De Wit S, et al. PROVENT Study Group. Intramuscular AZD7442 (Tixagevimab-Cilgavimab) for Prevention of Covid-19. *N Engl J Med.* 2022; 386(23): 2188–2200, doi: [10.1056/NEJMoa2116620](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2116620), indexed in Pubmed: 35443106.
 95. Pasin L, Cavalli G, Navalesi P, et al. Anakinra for patients with COVID-19: a meta-analysis of non-randomized cohort studies. *Eur J Intern Med.* 2021; 86: 34–40, doi: [10.1016/j.ejim.2021.01.016](https://doi.org/10.1016/j.ejim.2021.01.016), indexed in Pubmed: 33581979.
 96. Zhang X, Zhang Y, Qiao W, et al. Baricitinib, a drug with potential effect to prevent SARS-CoV-2 from entering target cells and control cytokine storm induced by COVID-19. *Int Immunopharmacol.* 2020; 86: 106749, doi: [10.1016/j.intimp.2020.106749](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106749), indexed in Pubmed: 32645632.
 97. Samaee H, Mohsenzadegan M, Ala S, et al. Tocilizumab for treatment patients with COVID-19: Recommended medication for novel disease. *Int Immunopharmacol.* 2020; 89(Pt A): 107018, doi: [10.1016/j.intimp.2020.107018](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107018), indexed in Pubmed: 33045577.
 98. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004; 25(13): 1605–1612, doi: [10.1002/jcc.20084](https://doi.org/10.1002/jcc.20084), indexed in Pubmed: 15264254.
 99. Yu A, Pak AJ, He P, et al. A Multiscale Coarse-grained Model of the SARS-CoV-2 Virion. *bioRxiv.* 2020; 120(6): 1097–1104, doi: [10.1101/2020.10.02.323915](https://doi.org/10.1101/2020.10.02.323915), indexed in Pubmed: 33024966.
 100. Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021; 596(7873): 583–589, doi: [10.1038/s41586-021-03819-2](https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2), indexed in Pubmed: 34265844.

6. Publikacja nr 2 (P.2)



RESEARCH ARTICLE



Plasma Gelsolin Enhances Phagocytosis of *Candida auris* by Human Neutrophils through Scavenger Receptor Class B

Łukasz Suprewicz,^a Karol Skłodowski,^a Alicja Walewska,^b Piotr Deptuła,^a Alicja Sadzyńska,^c Andrzej Eljaszewicz,^b Marcin Moniuszko,^b Paul A. Janmey,^{d,e}  Robert Bucki^a

^aDepartment of Medical Microbiology and Biomedical Engineering, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

^bDepartment of Regenerative Medicine and Immune Regulation, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

^cProf. Edward F. Szczepanik State Vocational University—Suwałki, Suwałki, Poland

^dDepartment of Physiology, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA

^eInstitute for Medicine and Engineering, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA

ABSTRACT In addition to its role as an actin-depolymerizing factor in the blood, plasma gelsolin (pGSN) binds bacterial molecules and stimulates the phagocytosis of bacteria by macrophages. Here, using an *in vitro* system, we assessed whether pGSN could also stimulate phagocytosis of the fungal pathogen *Candida auris* by human neutrophils. The extraordinary ability of *C. auris* to evade immune responses makes it particularly challenging to eradicate in immunocompromised patients. We demonstrate that pGSN significantly enhances *C. auris* uptake and intracellular killing. Stimulation of phagocytosis was accompanied by decreased neutrophil extracellular trap (NET) formation and reduced secretion of proinflammatory cytokines. Gene expression studies revealed pGSN-dependent upregulation of scavenger receptor class B (SR-B). Inhibition of SR-B using sulfosuccinimidyl oleate (SSO) and block lipid transport-1 (BLT-1) decreased the ability of pGSN to enhance phagocytosis, indicating that pGSN potentiates the immune response through an SR-B-dependent pathway. These results suggest that the response of the host's immune system during *C. auris* infection may be enhanced by the administration of recombinant pGSN.

IMPORTANCE The incidence of life-threatening multidrug-resistant *Candida auris* infections is rapidly growing, causing substantial economic costs due to outbreaks in hospital wards. Primary and secondary immunodeficiencies in susceptible individuals, such as those with leukemia, solid organ transplants, diabetes, and ongoing chemotherapy, often correlate with decreased plasma gelsolin concentration (hypogelsolinemia) and impairment of innate immune responses due to severe leukopenia. Immunocompromised patients are predisposed to superficial and invasive fungal infections. Morbidity caused by *C. auris* among immunocompromised patients can be as great as 60%. In the era of ever-growing fungal resistance in an aging society, it is critical to seek novel immunotherapies that may help combat these infections. The results reported here suggest the possibility of using pGSN as an immunomodulator of the immune response by neutrophils during *C. auris* infection.

KEYWORDS *Candida auris*, inflammation, neutrophils, phagocytosis, plasma gelsolin

Plasma gelsolin (pGSN) is an extracellular isoform of the protein gelsolin expressed in most human cells, classified as a Ca²⁺/phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-regulated actin-binding protein (ABP) (1). pGSN, apart from being the primary component of the actin scavenger system in the blood, is a protein with pleiotropic functions that can bind products of bacterial origin, such as lipopolysaccharide (LPS) and lipoteichoic acid (LTA) (2, 3). Under physiological conditions, the concentration of pGSN in human blood varies between 150 and 300 μg/mL (4, 5). Hypogelsolinemia, a decreased plasma

Editor Joshua J. Obar, Geisel School of Medicine at Dartmouth

Copyright © 2023 Suprewicz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Robert Bucki, buckirobert@gmail.com.

The authors declare no conflict of interest.

Received 7 October 2022

Accepted 30 January 2023

Published 21 February 2023

gelsolin concentration, is noted when circulating pGSN is consumed in severe infectious and noninfectious conditions, such as sepsis and septic shock, major trauma, and tissue injury (6–9). Importantly, hypogelsolinemia correlates with poor clinical outcomes (10). Recent reports indicate that pGSN stimulates phagocytosis in mice with sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* infection (11). pGSN was reported to be a key factor modulating host immune responses due to the preferential binding of microbially derived endotoxins, resulting in the prevention of toll-like receptor (TLR) activation (2, 3). However, little is known about the mechanisms and ability of pGSN to stimulate innate immune responses independent of direct binding to microbial products. In our work, we show that the immunomodulatory properties of pGSN depend in part on the stimulation of scavenger receptor class B (SR-B) expression on the surface of human neutrophils. SR-B is a group of transmembrane glycoproteins comprised of three members, SR-B1 (SCARB1), SR-B2 (CD36), and SR-B3 (SCARB2), known to bind and internalize a broad variety of ligands (12). SR-B expressed in neutrophils and macrophages plays a role in innate immunity by binding pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or damage-associated molecular patterns (DAMPs) and internalizing pathogens (13).

Candida auris is an emerging multidrug-resistant yeast that causes severe invasive infections with a mortality rate of up to 60% (14). It was first discovered in Japan in 2009, and since then, individual cases or outbreaks have been reported from over 20 countries on six continents (15, 16). Controlling *C. auris* is challenging since it is resistant to multiple classes of antifungals, can be misidentified as other yeasts by commonly available identification methods, and is able to colonize patients, perhaps indefinitely, and persist in the health care environment, where it can spread between patients (17, 18). The transmissibility, ability to evade innate immune responses, and high levels of antifungal resistance characteristic of *C. auris* set it apart from most other *Candida* species (19, 20). In the past decade, fungal infections have become a severe medical concern in hemato-oncology, transplantology, geriatric, pulmonology, and intensive care unit hospital wards (21, 22). Statistically, the incidence of life-threatening fungal infections is steadily growing, generating substantial economic costs (23). Among the most important reasons for this increase are an aging society, a growing number of chronic medical conditions affecting patients, and selection for drug-resistant pathogens (24). Primary and secondary immunodeficiencies in susceptible individuals, such as those with leukemia, solid organ transplants, diabetes, and ongoing chemotherapy, are considered the main risk factors that predispose them to superficial and invasive fungal infections, resulting in high morbidity and mortality (25). In contrast to antibiotics, the number of agents with potent antifungal activity is significantly limited, and those approved for clinical use are often very toxic or insufficiently effective, which motivates research and development of agents with novel and alternative mechanisms of action (26).

In this study, we examine the role of pGSN in the innate immune response of human neutrophils during *C. auris* infection *in vitro*. We evaluated the phagocytic efficacy of neutrophils using various yeast inocula. In addition, we assessed the formation of extracellular neutrophil traps (NETs) and the secretion of inflammatory mediators. Finally, the expression of genes involved in phagocytosis was screened to determine the mechanism of action of pGSN in the immune response, which was further confirmed with antagonists of selected targets.

RESULTS

Plasma gelsolin improves the phagocytic efficacy of human neutrophils. Neutrophils are the first line of defense against both bacterial and fungal infections. Phagocytosis, a nonspecific cellular process for ingesting and eliminating particles larger than 0.5 μm in diameter, including microorganisms such as fungi, is a primary mechanism exploited by neutrophils in innate defense (27). To assess whether and how pGSN stimulates phagocytosis, we performed an uptake assay of zymosan particles by human neutrophils (Fig. 1a and b). To accomplish this, neutrophils were serum starved for 1 h to prevent the potential effect of pGSN present in the blood serum and then were preincubated with

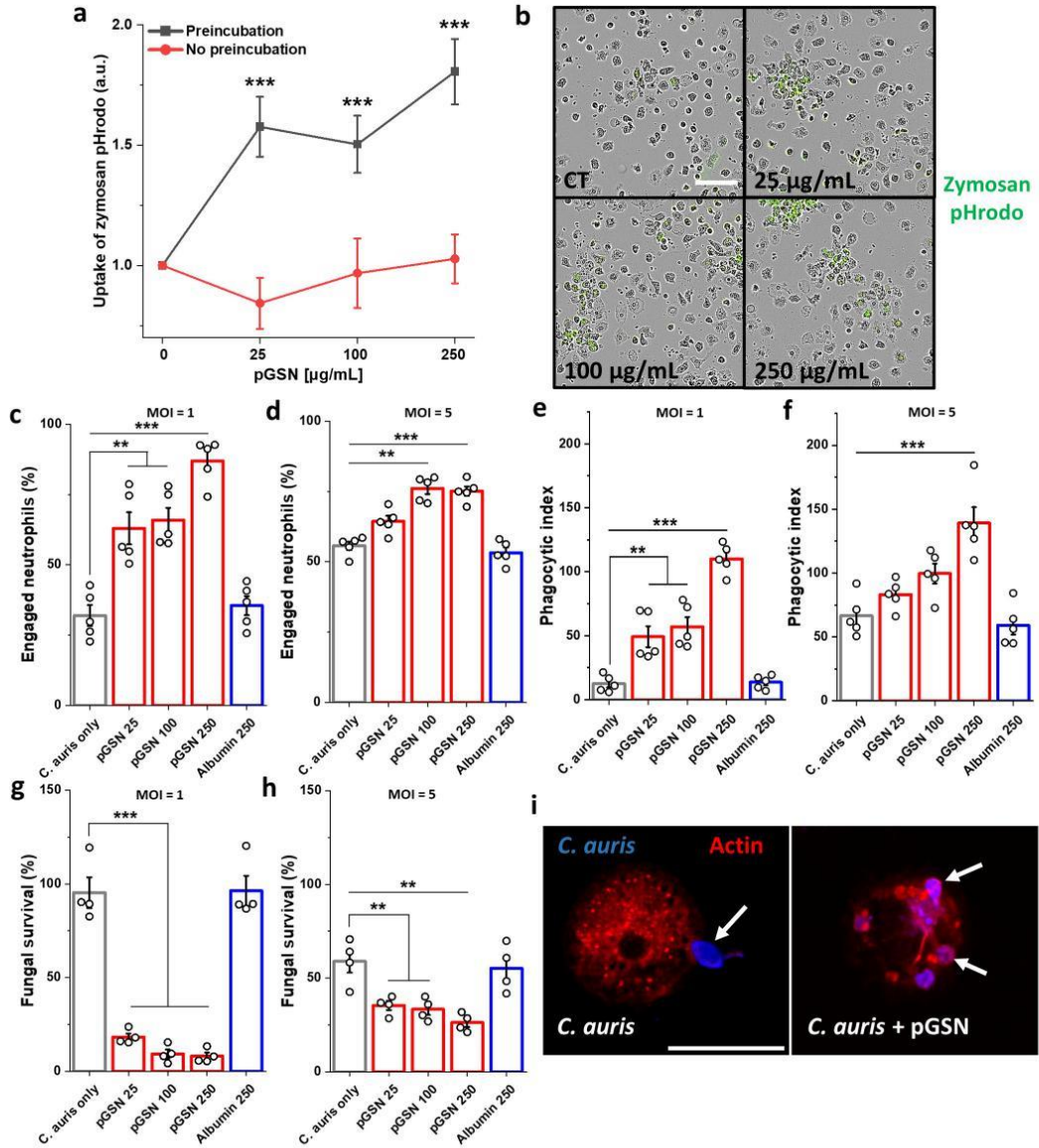


FIG 1 Plasma gelsolin enhances uptake and intracellular killing of *C. auris* cells by human neutrophils. (a) Live cell imaging data of the uptake of zymosan pHrodo particles after 2 h by human neutrophils that were serum starved for 1 h and either preincubated with pGSN for 1 h or had pGSN simultaneously added with the zymosan particles ($n = 4$). Results were normalized to the untreated control (0), set as 1. (b) Representative images of the uptake of zymosan particles (green) by pGSN-pretreated neutrophils; bar, $\sim 100 \mu\text{m}$. (c to f) Percentage uptake and phagocytic index for pGSN-preincubated human neutrophils ingesting *C. auris* cells ($n = 5$) at MOIs of 1 (c and e) and 5 (d and f). Neutrophils taking up at least one fungal cell were manually tracked to allow a quantitative analysis of percentage uptake during the 2-h coincubation period (c and d). The number of fungal cells ingested (phagocytic index) by the neutrophils was manually counted after 2 h of coincubation (e and f). The survival of *C. auris* cells after infection of pGSN-pretreated (1 h) human neutrophils (1 h serum starved) at MOIs of 1 (g) and 5 (h) for 2 h was evaluated by plating dilutions of samples on Sabouraud agar ($n = 4$). (i) Images of neutrophils that were serum starved, pretreated or not with pGSN, cocultured with Calcofluor white (blue)-stained *C. auris* cells for 2 h, fixed, and immunolabeled for actin with Texas red phalloidin (red). White arrows indicate *C. auris* cells. Bar, $\sim 15 \mu\text{m}$. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Significance was determined by Student's *t* test (a) or one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's test (c to h). Human albumin was used as a negative control.

pGSN (1 h). Alternatively, pGSN was added simultaneously with zymosan molecules (2 h). As previously reported (11), pGSN stimulates phagocytosis when preincubated with cells for 1 h before their exposure to zymosan, but we did not observe an increase in zymosan uptake when pGSN was added simultaneously with the particles, suggesting that its immunomodulatory effects require priming of the neutrophils.

In the next stage of the study, neutrophils were serum starved for 1 h, preincubated with pGSN (1 h), and infected with *C. auris* (2 h) to assess whether pGSN would also stimulate phagocytosis in this setting. Evasion of the immune response is characteristic of *C. auris*, and its severity is strain dependent (19, 28, 29). To rule out a nonspecific protein effect of pGSN, we used human albumin as a control. Previous reports indicated that the amount of *C. auris* in infected tissues remained high regardless of the inoculum used (28). For this reason, we used fungal loads at a multiplicity of infection (MOI; yeasts to neutrophils) of 1 and 5 to assess whether pGSN would improve neutrophil phagocytic efficiency irrespective of the inoculum. We observed a significant increase in the phagocytic efficacy of the human neutrophils during *C. auris* infection upon pGSN preincubation. The number of neutrophils involved in phagocytosis, i.e., those with at least one fungal cell in their cytoplasm or adherent to them, increased significantly upon preincubation with pGSN (Fig. 1c and d). Similarly, we observed an increase in the phagocytosis index after preincubation with pGSN, which was very low under the control conditions (Fig. 1e and f), confirming the previously reported evasion of innate immunity by *C. auris*. We also observed a substantial increase in *C. auris* eradication after the addition of pGSN (Fig. 1g and h).

Inhibition of NETotic death of human neutrophils. When exposed to harmful substances, neutrophils can secrete the contents of their cytoplasm in the process of NETosis, a distinct form of active cell death characterized by releasing decondensed chromatin and granular contents into the extracellular space (30). Despite its essential role in fighting infection, NETosis can be a double-edged sword. Excessive formation of neutrophil extracellular traps (NETs) can lead to vascular damage and increased inflammation due to cytokine and reactive oxygen species (ROS) oversecretion (31).

To evaluate how pGSN influences the formation of NETs, neutrophils were serum starved (1 h) and preincubated with pGSN (1 h); alternatively, pGSN was added simultaneously with *C. auris* cells (2 h) at an MOI of 5. We observed a significant decrease in extracellular DNA release from human neutrophils upon the addition of pGSN (Fig. 2a and b). Additionally, fluorescence staining of myeloperoxidase (MPO) during *C. auris* infection was performed (Fig. 2c). A decrease in the number of neutrophils forming NETs and production of ROS was observed when neutrophils were preincubated with pGSN and then infected with *C. auris* cells. The fact that inhibition of NET formation required preincubation of the neutrophils with pGSN before the addition of *C. auris* cells (Fig. 2a) suggests that the target of pGSN is the neutrophil rather than *C. auris* or the exosomes it produces (32). Moreover, we also observed that pGSN inhibited the action of PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), suggesting a robust anti-inflammatory effect of pGSN (Fig. 2d and e). To further confirm these findings, Western blotting was performed to determine the expression of key proteins involved in NET formation (Fig. 3a) (33). We observed a significant increase in the expression of Cit-H3, PAD4, NE, TLR4, and NOX2 caused by the *C. auris* strain used in our study. The increase in expression of those proteins was significantly inhibited when neutrophils were preincubated with pGSN prior to infection (Fig. 3b).

Plasma gelsolin attenuates inflammation caused by *C. auris*. Acute inflammation usually occurs immediately after infection, which will cause the secretion of soluble mediators like cytokines, acute-phase proteins, and chemokines to promote the migration of immune cells to the area of inflammation (34). Although the inflammatory response is a vital process, its prolongation can lead to severe tissue injury, septic shock, and death (35). To evaluate whether pGSN might diminish enhanced inflammatory response in human neutrophils during *C. auris* infection, secretion of inflammatory mediators was assessed. As shown in Fig. 4, we observed an increase in the secretion of interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) by neutrophils under the influence of *C. auris*.

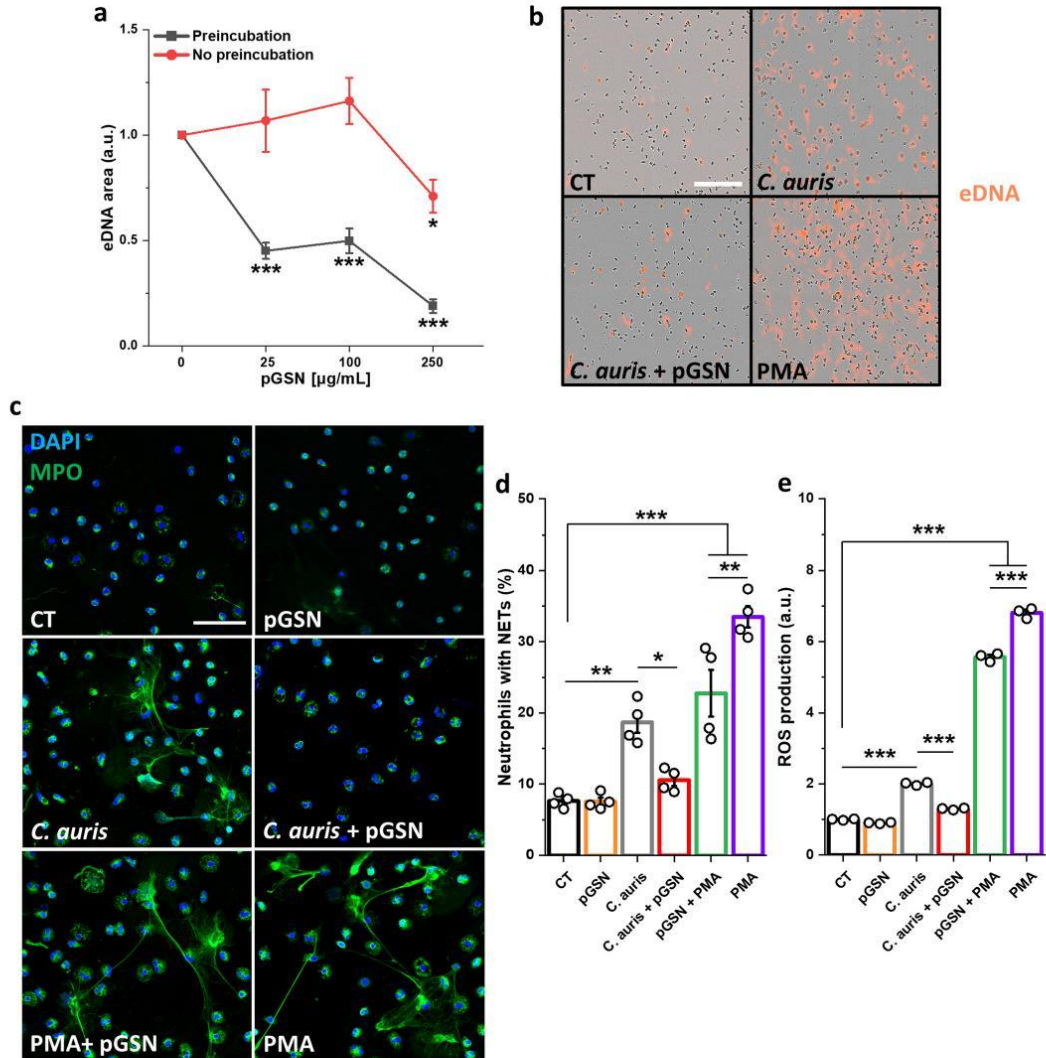


FIG 2 Plasma gelsolin prevents NETotic death of human neutrophils upon *C. auris* infection. (a) Live cell imaging data of extracellular DNA release (eDNA) by human neutrophils that were either preincubated with pGSN for 1 h or had pGSN simultaneously added to them with the *C. auris* cells at an MOI of 5 for 2 h ($n = 4$). (b) Representative images of pGSN-pretreated neutrophils releasing eDNA (orange) upon *C. auris* infection. Bar, $\sim 250 \mu\text{m}$. (c) Images of NETs released by human neutrophils that were pretreated as previously described; myeloperoxidase (MPO) is shown in green, while blue indicates DNA stained with DAPI. Bar, $\sim 50 \mu\text{m}$. (d) Percentage of NETs ($n = 4$) and (e) release of the reactive oxygen species ($n = 3$) from human neutrophils (pGSN pretreated, as previously) upon *C. auris* infection at an MOI of 5. Data are presented as the mean \pm SEM. Results were normalized to the untreated control (0 or CT), set as 1 (a and e). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Significance was determined by Student's t test (a) or one-way ANOVA with Tukey's test (d and e). PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) was used as a positive control.

When neutrophils before infection were preincubated with pGSN, a significant decrease in IL-4, IL-6, and TNF- α secretion was observed. Consistent with its immunomodulatory function, pGSN caused an increase in anti-inflammatory IL-10.

Scavenger receptor class B is a target for pGSN on human neutrophils. The mechanism by which pGSN stimulates phagocytosis in human neutrophils is unknown.

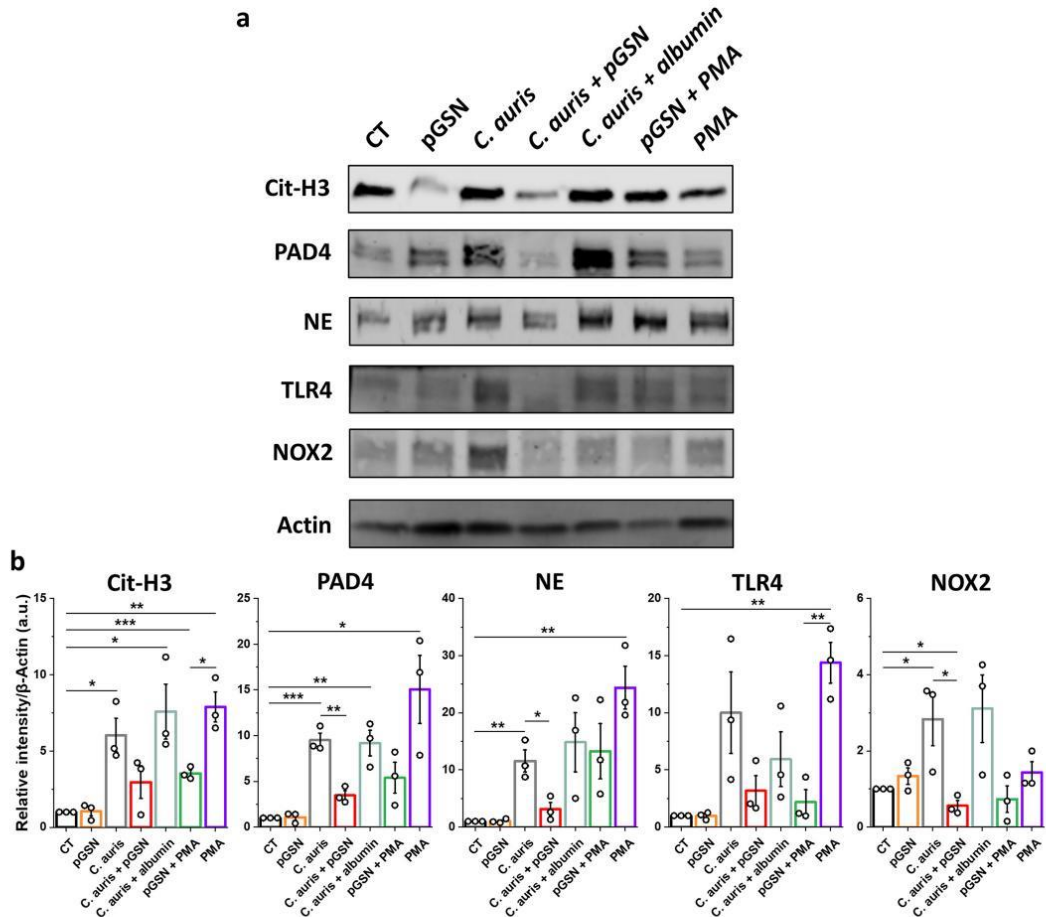


FIG 3 Plasma gelsolin inhibits the expression of proteins involved in NET formation. (a) Immunoblot analysis for the indicated proteins using lysates from human neutrophils that were serum starved for 1 h, then preincubated with pGSN at 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 1 h, washed, and finally infected with live *C. auris* yeast cells (MOI = 5) for 2 h. Data are expressed as the mean \pm SEM and represent three independent experiments. Results were normalized to the expression of the β -actin and are presented relative to those of the negative control (CT), set as 1. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Significance was determined by Student's t test (b). PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) and human albumin were used as the positive and negative controls, respectively.

To shed light on the potential genes involved in the stimulation of phagocytosis by pGSN, we evaluated the expression of genes involved in this process. As shown in Fig. 5a, upon pGSN addition, the most significant increase was observed among genes from the scavenger receptor class B (SR-B) family, CD36 and SCARB1. Enhanced expression of CD36 was also confirmed using flow cytometry, as shown in Fig. S1 in the supplemental material. SR-B on immune cells is involved in processes of the innate immune response (13). To confirm that enhanced pGSN-mediated phagocytosis depends on increased SR-B expression, we inhibited these receptors using their antagonists, sulfosuccinimidyl oleate (SSO; CD36 inhibitor) and block lipid transport-1 (BLT-1; SR-B1 inhibitor) (36, 37). These inhibitors were added to neutrophils at the serum starvation stage and the preincubation with pGSN stage for 2 h. After incubation, the inhibitors and pGSN were washed off, and a medium with or without *C. auris* cells at an MOI of 1 was then

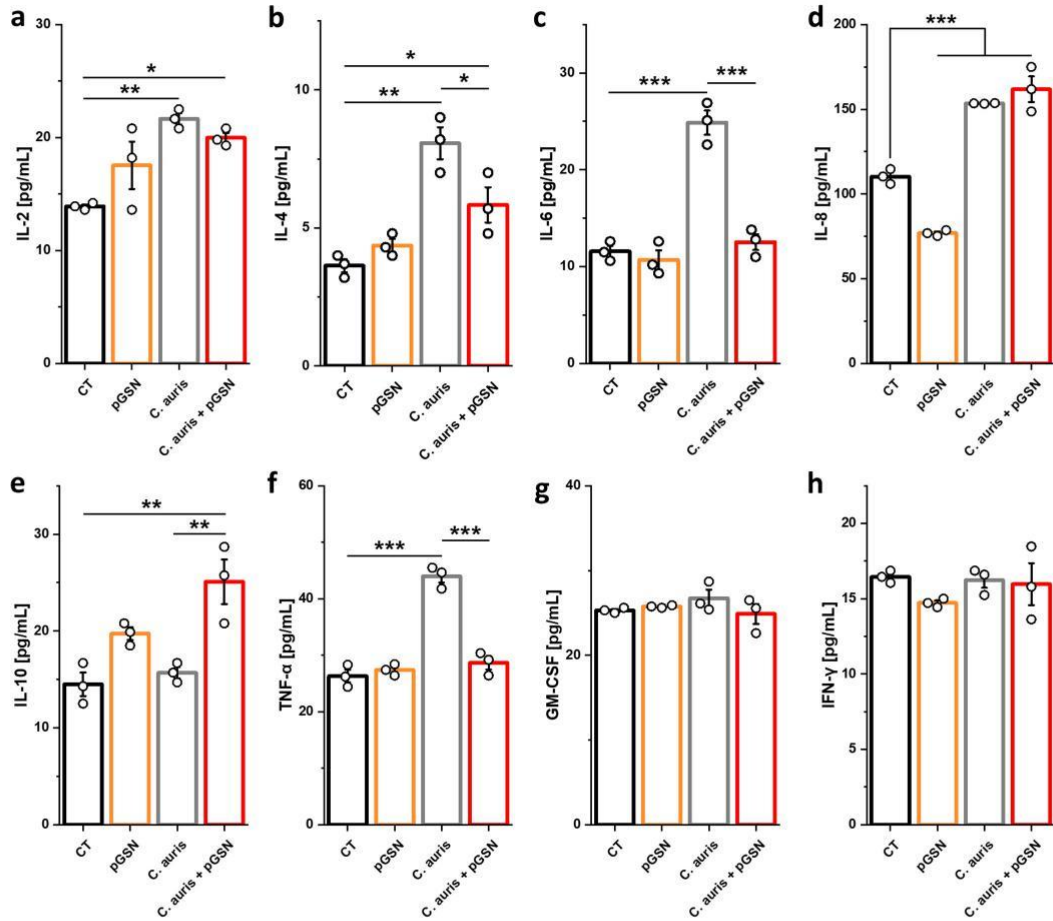


FIG 4 Plasma gelsolin triggers an anti-inflammatory phenotype in human neutrophils during *C. auris* infection. Production of IL-2 (a), IL-4 (b), IL-6 (c), IL-8 (d), IL-10 (e), TNF- α (f), GM-CSF (g), and IFN- γ (h), as determined by magnetic bead-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in the culture supernatants of human neutrophils that were serum starved for 1 h, preincubated with pGSN at 250 μ g/mL for 1 h, washed, and infected with live *C. auris* yeast cells (MOI = 5) for 2 h ($n = 3$). Data are expressed as the mean \pm SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Significance was determined by one-way ANOVA with Tukey's test.

added to the cells for 2 h. As shown in Fig. 5b to g, the SR-B inhibitors significantly decreased the beneficial effect of pGSN on all the aspects of neutrophil action, i.e., the number of engaged neutrophils (Fig. 5b and c), phagocytic index (Fig. 5d and e), and fungal survival (Fig. 5f to g). The SSO inhibitor entirely reversed the effects of pGSN on yeast survival; when SR-B was blocked during preincubation with pGSN, the fungal killing did not differ from untreated conditions (Fig. 5f). These results suggest that increased phagocytosis of *C. auris* by human neutrophils is mediated by pGSN's ability to stimulate SR-B expression.

DISCUSSION

Here, we investigated the immunomodulatory effects of pGSN on the neutrophil's immune response to the rapidly emerging multidrug-resistant fungal pathogen *C. auris*, causing infections characterized by high mortality rates and high transmissibility in the

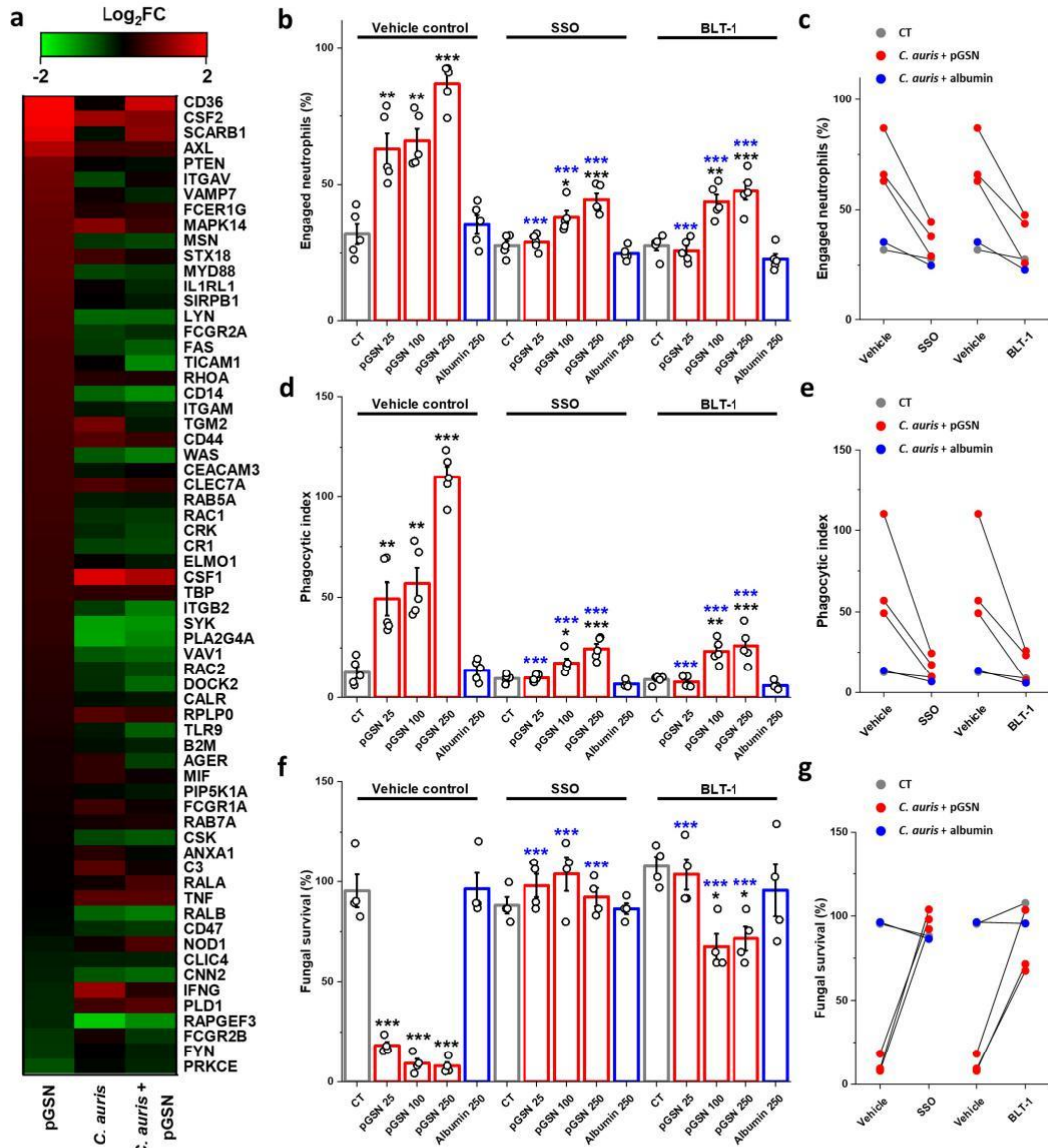


FIG 5 Plasma gelsolin enhances phagocytosis of *C. auris* through stimulation of the scavenger receptor class B type I (SR-BI). (a) Heat map of changes in gene expression of selected phagocytosis-related genes upon incubation with pGSN, *C. auris* cells, and preincubation with pGSN followed by addition of the yeast ($n = 3$). Results are presented as the \log_2 fold change (\log_2FC). (b to g) Effect of scavenger receptor class B type I (SR-BI) inhibitors SSO at $200 \mu M$ and BLT-1 at $1 \mu M$ compared to the vehicle control on fungal uptake ($n = 5$) (b and c), the phagocytic index ($n = 5$) (d and e), and yeast survival ($n = 4$) (f and g). Human neutrophils were preincubated with the indicated SR-BI inhibitors during serum starvation for 1 h; then, pGSN was added for 1 h, the cells were carefully washed, and *C. auris* was introduced to the neutrophils at an MOI of 1 for 2 h. (c, e, and g) Trend of the effect of SR-BI inhibitors compared to vehicle controls on fungal uptake, the phagocytic index, and fungal survival. Data are expressed as the mean \pm SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Significance was determined by one-way ANOVA with Tukey's test. The black asterisk refers to the comparison with the untreated condition within each group (vehicle or SSO- or BLT-1-treated cells), while the blue asterisk refers to the significance compared to the corresponding concentration in the vehicle control. Human albumin was used as a negative control.

hospital environment. Stimulation of human neutrophils with pGSN resulted in significantly increased phagocytosis efficiency and reduced the yeasts' intracellular survival. Additionally, neutrophils preincubated with pGSN displayed a reduced ability to form NETs and to produce reactive oxygen species when activated with *C. auris* cells. Overall, a reduced proinflammatory response as a result of pGSN action was observed. The pGSN-enhanced ability of neutrophils to phagocytize fungi depends on SR-B, whose enhanced gene expression was observed upon pGSN stimulation and confirmed using specific inhibitors of these receptors. Since the innate immune response is a remarkably complex process, and immunocompromised patients often struggle with neutropenia, the number of circulating neutrophils may determine the efficiency of potential future administration of recombinant pGSN.

Recent studies indicate that *C. auris* cells can interact differently with immune cells depending on the strain, host cells, inoculum size, and incubation time. In their work, Wang et al. compared the ability to induce an immune response in a mouse model of infection with *C. auris* BJCA001 (clade I) and *Candida albicans* SC5314, pointing to *C. auris* as being less able to stimulate the immune system (28). Approximately 30% of bone marrow-derived macrophages (BMDMs) and nearly 0% of neutrophils were involved in phagocytosis of *C. auris* after 1 h of incubation at an MOI of 1. They also reported a low phagocytosis index and high fungal outgrowth after 6 and 24 h. Moreover, they recorded a slight increase in proinflammatory factors secreted by BMDMs, using an MOI of 5 and 6 h of incubation. Significantly fewer neutrophils were involved in phagocytosis in the work of Wang et al. Likely, the difference between the strains used in their study and those in our work and the mouse origin of the cells account for these differences. *N*-mannan, highly expressed in *C. auris* cells, masks exposure of the β -glucan, allowing fungal cells to evade innate immunity by restricting the access of dectin-1 to β -glucan. In human neutrophils, mannan-neutrophil interaction involves membrane receptors for mannose-linked proteins, which can behave as a major pathogen-associated molecular pattern (PAMP) to induce a cytokine response similarly as on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (38, 39). Despite this, the results are broadly consistent with our observations. Bruno et al. studied the immune response by host PBMCs mainly under the influence of clade I *C. auris* cells (29). They observed fungal macrophage uptake exceeding 50% after just 1 h of incubation, with an MOI of 3. Similarly, as in our work, they observed an increase in proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) under the influence of *C. auris*. In addition, they found that the increased production of cytokines depends on CLR complement receptors, which are not expressed on human neutrophils, suggesting the involvement of other signaling pathways in the induction of inflammatory processes, such as complement component C3, the increased expression of which was observed in our study, after the addition of *C. auris* cells (40). Despite using a different strain of *C. auris* and PBMCs, the number of cells involved in phagocytosis and the inflammatory response was similar to that demonstrated in our work. Johnson et al. showed in their work that *C. auris* B11203 (clade II), compared to *C. albicans*, avoids the immune response of human neutrophils and in the zebrafish model (19). Similarly, as in our study, *C. auris* at an MOI of 1 involved a small percentage of neutrophils, not limiting fungal outgrowth. At a 5-fold lower inoculum, *C. auris* did not affect the increased production of NETs, which seem to be inoculum dependent, with similar levels of reactive oxygen species production for the first 3 h of incubation.

Although pGSN has been studied for a relatively long time, the mechanism exploited by the protein to stimulate phagocytosis is not understood. In a mouse model of primary pneumococcal pneumonia, recombinant human pGSN (rhu-pGSN) caused enhanced bacterial clearance, reduced acute inflammation, and improved survival. *In vitro*, rhu-pGSN rapidly improved lung macrophage uptake and killing of bacteria (*Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Francisella tularensis*) (41). pGSN triggers bactericidal functions in lung macrophages by activating the phosphorylation of macrophage nitric oxide synthase type III (NOS3). rhu-pGSN failed to enhance bacterial killing by NOS3-lacking macrophages

in vitro or bacterial clearance in NOS3-knockout mice *in vivo*. In other studies, preincubation of macrophages with pGSN prior to adding *P. aeruginosa* cells resulted in a dose-dependent increase in the level of phagocytosing cells (11). This effect, similar to the observation in our study, was not so prominently observed when macrophages were treated simultaneously with both pGSN and bacteria. In our work, we observed that enhanced expression of SR-B after pGSN treatment caused significant improvement in phagocytic uptake and the killing of *C. auris* cells by human neutrophils. Recent studies demonstrated that SR-B receptors mediate the host defense against *Cryptococcus neoformans* and *C. albicans* in human macrophages by direct binding to cell wall β -glucan. The accelerated mortality rate in CD36-deficient mice correlated with the higher number of yeast cells in the spleen and liver during *C. neoformans* infection (13). Macrophages lacking CD36 demonstrate reduced internalization of *S. aureus* and its component lipoteichoic acid (LTA), accompanied by a marked defect in TNF- α and IL-12 production. As a result, CD36-knockout mice fail to efficiently clear *S. aureus in vivo*, resulting in profound bacteremia (42). TLR4 and TLR9 ligands can bind to SR-B1, which acts as a scavenger, facilitating the TLR ligands' bioavailability and consequently limiting the immune response (43). CD36 downregulation decreases the phagocytic ability of macrophages in the peritoneum of women with endometriosis (44). SR-B1-deficient mice struggle with enhanced production of proinflammatory cytokines, autoimmunity, and impairment in phagocytic killing (45). However, some SR-B1 ligands, such as serum amyloid A (SAA), glycated or oxidized Apo A-I, or dysfunctional HDLs, have been shown to promote inflammation (46–48). Thus, SR-B1 plays a dual role in inflammation and may represent a novel target for designing new immunotherapies. Collectively, these data demonstrate that the SR-B are nonredundant components of an evolutionarily conserved pathway for fungal recognition and innate immunity necessary for controlling fungal infections, both *in vitro* and *in vivo*.

In our study, we show for the first time that pGSN exhibits an immunomodulatory role in the response of human neutrophils during fungal infections and that the anti-inflammatory effects and enhancement of phagocytosis depend on pGSN-mediated SR-B upregulation. These results suggest that pGSN might serve as a single or adjuvant therapy in immunocompromised patients struggling with fungal infections, due to its immunomodulatory effect on human neutrophils, demonstrated by increased phagocytosis, with a simultaneous attenuation of the inflammatory response.

MATERIALS AND METHODS

Plasma gelsolin. The recombinant human plasma gelsolin used in our study was expressed in *E. coli* cells and provided by BioAegis Therapeutics (North Brunswick, USA).

Fungal preparations. This study used a strain first isolated in Japan (clade II), *Candida auris* 21092 (DSMZ, Braunschweig, Germany). The strain was obtained from glycerol stocks stored at -80°C , plated on Sabouraud dextrose with chloramphenicol agar (Lab-Agar; Biomaxima, Lublin, Poland), and routinely grown at 30°C . Hemocytometer counts were used to estimate the number of yeast cells. Exponentially growing *Candida* cells were suspended and diluted at the required cell number in cell culture media for coculture with human neutrophils.

Neutrophil isolation and culture. Blood was collected from healthy donors under the approval of the Bioethics Committee at the Medical University of Białystok (APK.002.234.2021). Neutrophils were isolated by density gradient centrifugation using PolymorphPrep (Progen, Heidelberg, Germany). Cells were further counted on a hemocytometer and suspended in antimycotic and serum-free RPMI 1640 medium (ATCC, Manassas, USA) to prevent the possible influence of plasma gelsolin remaining in fetal bovine serum (FBS). Cells were incubated at 37°C with 5% CO_2 .

Uptake of zymosan pHrodo particles. A phagocytosis assay was used to determine the impact of preincubation and the simultaneous addition of pGSN on pHrodo zymosan bioparticle (Sartorius AG, Göttingen, Germany) uptake by human neutrophils. Neutrophils (4×10^4 cells/well in a 96-well plate) were serum starved for 1 h and either preincubated with pGSN or left in a serum-free medium for 1 h. Then, the cells were carefully washed with phosphate-buffered saline (PBS), and 5 μg of zymosan particles dissolved in RPMI 1640 medium were added to the neutrophils without pGSN (preincubation) and with pGSN (no preincubation) for 2 h of incubation in the IncuCyte SX1 platform, housed inside a cell incubator at 37°C and 5% CO_2 . Two images per well from four replicates were taken using $20\times$ magnification. The number of internalized zymosan particles was analyzed using the IncuCyte basic software. The results were compared to the untreated control, normalized to 1.0, and presented as a fold change in the uptake of zymosan particles.

Neutrophil engagement and phagocytosis. Briefly, live, calcofluor white (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)-stained (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 30 min; room temperature [RT]) *C. auris* cells at MOIs of 1 and 5 were

added for 2 h to 1×10^5 neutrophils seeded onto 0.01% poly-L-lysine (Sigma-Aldrich)-treated sterilized glass coverslips. Before adding yeasts, neutrophils were serum starved (1 h), preincubated with pGSN (1 h), and washed with PBS. After 2 h of infection, the coverslips were washed with PBS and fixed in 3.7% paraformaldehyde (PFA) for 15 min at RT. After permeabilization (0.1% Triton X-100; 10 min; RT) and blocking (0.1% bovine serum albumin; 30 min; RT), the cells were washed and stained with phalloidin-Texas red (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) at a dilution of 1:40 for 1 h, at RT, in the dark. The coverslips were mounted with antifade fluorescence mounting medium (Abcam, Cambridge, UK) and examined by confocal microscopy. The results are presented as the engaged cells (the percentage of cells uptaking or adherent to fungal cells) and phagocytic index (the total number of fungal cells taken up per 100 cells). Data were obtained from 5 separate experiments by analyzing at least 500 neutrophils per coverslip.

Fungal survival assay. Serum-starved (1 h) neutrophils (1×10^6 cells/well in a 24-well plate) were preincubated with pGSN (1 h), washed, and then infected with *C. auris* cells at MOIs of 1 and 5 for 2 h. The cultures were collected using cell scrapers and transferred to Eppendorf tubes. The neutrophils were lysed by sonication for 10 min. Serial dilutions were plated on Sabouraud agar for yeast outgrowth assessment and left for 48 h of incubation at 30°C.

NETosis assay. To assess the formation of neutrophil extracellular traps (NETs), 1×10^5 cells were seeded onto 0.01% poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) functionalized sterilized glass coverslips. Neutrophils were serum starved (1 h), preincubated with pGSN (1 h), and infected with *C. auris* (MOI = 5) for 2 h at 37°C and 5% CO₂. A condition with neutrophils treated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA) at 100 nM was also included. After incubation, the cells were washed with PBS, fixed in 3.7% PFA, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and blocked in 0.1% bovine serum albumin, as mentioned above. Next, the cells were stained with mouse anti-myeloperoxidase (MPO) antibody (catalog number MA1-80878; Sigma-Aldrich) at a dilution of 1:500 for 1 h at RT. The cells were stained with a secondary anti-mouse antibody conjugated with Alexa Fluor 488 dye (catalog number ab150113; Abcam, Cambridge, UK) at a dilution of 1:1,000 for 1 h at RT, in the dark. The cell nuclei were counterstained with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole). The coverslips were mounted with antifade fluorescence mounting medium (Abcam) and examined by confocal microscopy. The number of cells producing NETs was manually counted. Five images per coverslip were taken randomly and analyzed ($n = 4$).

In a parallel experiment, the impact of preincubation and the simultaneous addition of pGSN during *C. auris* infection (MOI = 5) on extracellular DNA (eDNA) release was determined using the IncuCyte instrument (Sartorius). Briefly, neutrophils (4×10^4 cells/well in a 96-well plate) were prepared and infected, as previously mentioned. Simultaneously to the addition of fungal cells, Cytotox red dye (Sartorius) at a final concentration of 250 nM was introduced to the neutrophils and left for 2 h of incubation at 37°C and 5% CO₂. Two images per well were taken from four technical replicates using 20× magnification, and then the eDNA area was analyzed using the IncuCyte basic software. The results were compared to the untreated control, normalized to 1.0, and presented as a fold change in the eDNA area.

Reactive oxygen species production. To assess the generation of reactive oxygen species (ROS), neutrophils were stained with DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate; Sigma-Aldrich) in PBS for 10 min in the dark, washed with PBS, and plated at 2×10^5 cells/well in a 96-well plate. The cells were serum starved for 1 h and preincubated with pGSN for 1 h; *C. auris* cells at an MOI of 5 were then introduced for 2 h. A PMA (100 nM) control was also included. The fluorescence (488/535 nm) was recorded on the Varioskan Lux microplate reader (Thermo Fisher Scientific). The background fluorescence was determined for each condition and subtracted from the total fluorescence values before data analysis. The results were compared to the untreated control, normalized to 1.0, and presented as a fold change in the ROS production.

Quantification of cytokine and chemokine secretion. Secretion of IL-2, IL-6, IL-8, gamma interferon (IFN-γ), TNF-α, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) was assessed using the Bio-Plex Pro human cytokine assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Neutrophil cells (1×10^6 /well) were cultured on 24-well culture plates. The cells were serum starved (1 h), preincubated with pGSN (1 h), and/or infected with *C. auris* yeast at an MOI of 5. Then, supernatants were collected, centrifuged to eliminate residual cells, and subjected to cytokine secretion assessment on the Bio-Plex 200 system (Bio-Rad).

Western blot analysis. Human neutrophils were serum starved, preincubated with pGSN, and infected with *C. auris* at an MOI of 5, as previously mentioned. The whole-cell lysate from 1×10^7 neutrophils was prepared using radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer, supplemented with protease inhibitors (Sigma-Aldrich). The Bradford assay (Bio-Rad) was performed to determine the protein concentration. Lysates were subjected to electrophoresis using 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) at a concentration of 10 μg protein per lane. After SDS-PAGE separation, proteins were blotted onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. Next, the membranes were submerged in methanol and blocked for 1 h in 5% nonfat dry milk in TBS-T (150 mM NaCl, 50 mM Tris base, 0.05% Tween 20, pH = 7.4). The blocked protein blots were incubated with rabbit anti-NOX2/gp91phox (dilution, 1:300; catalog number BS-3889R; Thermo Fisher), anti-neutrophil elastase (dilution, 1:1,000; catalog number ab21595; Abcam), anti-TLR4 (dilution, 1:1,000; catalog number ab13556; Abcam), and mouse anti-PAD4 (dilution, 1:2,000; catalog number ab128086; Abcam), anti-Cit H3 (dilution, 1:1,000; catalog number ab10799; Abcam), and anti-β-actin (dilution, 1:5,000; catalog number A5441; Sigma-Aldrich), in TBS-T at 4°C overnight, followed by incubation with goat anti-rabbit IRDye 800CW IgG (catalog number ab216773; Abcam) and goat anti-mouse IRDye 800CW IgG (catalog number 926-32210; LiCor Biosciences, Lincoln, USA) secondary antibody in TBS-T (dilution, 1:10,000) at room temperature for 1 h, in the dark. The protein blots were visualized using the Odyssey imaging system (LiCor Biosciences). Band intensities were quantified using Image

Studio Acquisition software. Data are presented as the relative band intensity of the protein of interest compared to the untreated samples and normalized to β -actin.

Expression of phagocytosis-related genes. Total RNA was extracted using the universal RNA purification kit (catalog number E3598-02; EURx, Gdansk, Poland) from 1×10^7 neutrophils per well seeded in 6-well cell culture plates. Cells were serum starved (1 h), preincubated with pGSN (1 h), and infected or not with *C. auris* yeast at an MOI of 5 for 2 h. The cells were scratched, transferred to Eppendorf tubes, and centrifuged, and the supernatant was discarded. The concentration and purity of the isolated RNA were evaluated using a Qubit 4 fluorometer (Thermo Fisher Scientific). cDNA was synthesized using the iScript cDNA synthesis kit (catalog number 1708891; Bio-Rad). Reverse transcription-quantitative PCR (qRT-PCR) was performed with 20 ng of cDNA in a 20- μ L reaction mixture containing SsoAdvanced universal SYBR green supermix (catalog number 1725274; Bio-Rad) using phagocytosis PrimePCR plates (catalog number 10047255; Bio-Rad) on the CFX Connect real-time PCR detection system (Bio-Rad) with the following amplification program: 2 min at 95°C, followed by 40 cycles of 5 s at 95°C and 30 s at 60°C. GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was used as an internal control. The gene expression levels were reported as the relative quantity, expressed using the comparative cycle threshold (C_t) method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), and presented as $\log_2 FC$. The raw C_t values from the qPCR experiment are presented in Data Set S1 in the supplemental material.

SR-B inhibition assay. To determine whether SR-B antagonists inhibit the stimulation of phagocytosis and fungal killing in human neutrophils triggered by pGSN, we used sulfosuccinimidyl oleate (SSO; catalog number ab145039; Abcam) at 200 μ M and block lipid transport-1 (BLT-1; catalog number SML0059; Sigma-Aldrich) at 1 μ M. Briefly, inhibitors were introduced for a total of 2 h to the cells during serum starvation (1 h) and pGSN preincubation (1 h) and then carefully washed with PBS and infected with *C. auris* at an MOI of 1. Assessment of the fungal uptake, phagocytic index, and fungal survival was performed as mentioned above.

Statistical analysis. The statistical parameters, including the exact number of replicates and statistical significance, are reported in the figures and figure legends. The statistical tests were performed using OriginPro 2021 software (build 9.8.0.200; OriginLab Corporation, Northampton, USA). Specific statistical tests are indicated in the figure legends.

Data availability. All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper. Additional data related to this paper may be requested from the authors.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, XLSX file, 0.02 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 2, PDF file, 0.3 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Science Center, Poland, under Preludium bis 1 grant UMO-2019/35/O/NZ6/02807 (to R.B.) and by the Medical University of Białystok (SUB/1/DN/22/008/1122 to Ł.S.).

REFERENCES

- Piktel E, Levental J, Durmaš B, Janmey PA, Bucki R. 2018. Plasma gelsolin: indicator of inflammation and its potential as a diagnostic tool and therapeutic target. *Int J Mol Sci* 19:2516. <https://doi.org/10.3390/ijms19092516>.
- Bucki R, Byfield FJ, Kulakowska A, McCormick ME, Drozdowski W, Namiot Z, Hartung T, Janmey PA. 2008. Extracellular gelsolin binds lipoteichoic acid and modulates cellular response to proinflammatory bacterial wall components. *J Immunol* 181:4936–4944. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.7.4936>.
- Cheng Y, Hu X, Liu C, Chen M, Wang J, Wang M, Gao F, Han J, Zhang C, Sun D, Min R. 2017. Gelsolin inhibits the inflammatory process induced by LPS. *Cell Physiol Biochem* 41:205–212. <https://doi.org/10.1159/000456043>.
- Peng X, Zhang X, Wang L, Zhu Q, Luo J, Wang W, Wang X. 2011. Gelsolin in cerebrospinal fluid as a potential biomarker of epilepsy. *Neurochem Res* 36:2250–2258. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0549-4>.
- Bucki R, Kulakowska A, Byfield FJ, Zenzian-Piotrowska M, Baranowski M, Marzec M, Winer JP, Ciccarelli NJ, Górski J, Drozdowski W, Bittman R, Janmey PA. 2010. Plasma gelsolin modulates cellular response to sphingosine 1-phosphate. *Am J Physiol Cell Physiol* 299:C1516–C1523. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00051.2010>.
- Suhler E, Lin W, Yin HL, Lee WM. 1997. Decreased plasma gelsolin concentrations in acute liver failure, myocardial infarction, septic shock, and myonecrosis. *Crit Care Med* 25:594–598. <https://doi.org/10.1097/00003246-199704000-00007>.
- Wątek M, Wnorowska U, Wollny T, Durmaš B, Wolak P, Kościółek-Zgódka S, Pasiarski M, Gózdź S, Bucki R. 2019. Hypogelsolinemia in patients diagnosed with acute myeloid leukemia at initial stage of sepsis. *Med Sci Monit* 25:1452–1458. <https://doi.org/10.12659/MSM.911904>.
- DiNubile MJ, Levinson SL, Stosel TP, Lawrenz MB, Warawa JM. 2020. Recombinant human plasma gelsolin improves survival and attenuates lung injury in a murine model of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Open Forum Infect Dis* 7:ofaa236. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa236>.
- Dahl B, Schiødt FV, Ott P, Gvozdenovic R, Yin HL, Lee WM. 1999. Plasma gelsolin is reduced in trauma patients. *Shock* 12:102–104. <https://doi.org/10.1097/00024382-199908000-00002>.
- Mounzer KC, Moncure M, Smith YR, Dinubile MJ. 1999. Relationship of admission plasma gelsolin levels to clinical outcomes in patients after major trauma. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1673–1681. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.5.9807137>.
- Piktel E, Wnorowska U, Cieśluk M, Deptuła P, Prasad SV, Król G, Durmaš B, Namiot A, Markiewicz KH, Niemirowicz-Laskowska K, Wilczewska AZ, Janmey PA, Reszczyński J, Bucki R. 2020. Recombinant human plasma gelsolin stimulates phagocytosis while diminishing excessive inflammatory responses in mice with *Pseudomonas aeruginosa* sepsis. *Int J Mol Sci* 21:2551. <https://doi.org/10.3390/ijms21072551>.
- Zani I, Stephen S, Mughal N, Russell D, Homer-Vanniasinkam S, Wheatcroft S, Ponnambalam S. 2015. Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells* 4:178–201. <https://doi.org/10.3390/cells4020178>.
- Means TK, Mylonakis E, Tampakakis E, Colvin RA, Seung E, Puckett L, Tai MF, Stewart CR, Pukkila-Worley R, Hickman SE, Moore KJ, Calderwood SB,

- Hacohen N, Luster AD, El Khoury J. 2009. Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36. *J Exp Med* 206:637–653. <https://doi.org/10.1084/jem.20082109>.
14. Chowdhary A, Prakash A, Sharma C, Kordalewska M, Kumar A, Sarma S, Tarai B, Singh A, Upadhyaya G, Upadhyay S, Yadav P, Singh PK, Khillan V, Sachdeva N, Perlin DS, Meis JF. 2018. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009–17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. *J Antimicrob Chemother* 73:891–899. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx480>.
 15. Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. 2009. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol* 53:41–44. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00083.x>.
 16. Chakrabarti A, Sood P. 2021. On the emergence, spread and resistance of *Candida auris*: host, pathogen and environmental tipping points. *J Medical Microbiology* 70:001318. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001318>.
 17. Piedrahita CT, Cadnum JL, Jenson AL, Shaikh AA, Ghannoum MA, Donskey CJ. 2017. Environmental surfaces in healthcare facilities are a potential source for transmission of *Candida auris* and other *Candida* species. *Infect Control Hosp Epidemiol* 38:1107–1109. <https://doi.org/10.1017/ice.2017.127>.
 18. Sherry L, Ramage G, Kean R, Borman A, Johnson EM, Richardson MD, Rautema-Richardson R. 2017. Biofilm-forming capability of highly virulent, multidrug-resistant *Candida auris*. *Emerg Infect Dis* 23:328–331. <https://doi.org/10.3201/eid2302.161320>.
 19. Johnson CJ, Davis JM, Huttenlocher A, Kernien JF, Nett JE. 2018. Emerging fungal pathogen *Candida auris* evades neutrophil attack. *mBio* 9:e01403-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01403-18>.
 20. Forgács L, Borman AM, Prépost E, Tóth Z, Kardos G, Kovács R, Szekely A, Nagy F, Kovacs I, Majoros L. 2020. Comparison of in vivo pathogenicity of four *Candida auris* clades in a neutropenic bloodstream infection murine model. *Emerg Microbes Infect* 9:1160–1169. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1771218>.
 21. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. 2012. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 4:165r13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>.
 22. Min K, Neiman AM, Konopka JB. 2020. Fungal pathogens: shape-shifting invaders. *Trends Microbiol* 28:922–933. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.001>.
 23. Rayens E, Norris KA. 2022. Prevalence and healthcare burden of fungal infections in the United States, 2018. *Open Forum Infect Dis* 9:ofab593. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab593>.
 24. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. 2017. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *J Fungi (Basel)* 3:57. <https://doi.org/10.3390/jof3040057>.
 25. Xia J, Wang Z, Li T, Lu F, Sheng D, Huang W. 2022. Immunosuppressed patients with clinically diagnosed invasive fungal infections: the fungal species distribution, antifungal sensitivity and associated risk factors in a tertiary hospital of Anhui Province. *Infect Drug Resist* 15:321–333. <https://doi.org/10.2147/IDR.S351260>.
 26. Wall G, Lopez-Ribot JL. 2020. Current antimycotics, new prospects, and future approaches to antifungal therapy. *Antibiotics (Basel)* 9:445. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080445>.
 27. Kraus RF, Gruber MA. 2021. Neutrophils—from bone marrow to first-line defense of the innate immune system. *Front Immunol* 12:767175. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.767175>.
 28. Wang Y, Zou Y, Chen X, Li H, Yin Z, Zhang B, Xu Y, Zhang Y, Zhang R, Huang X, Yang W, Xu C, Jiang T, Tang Q, Zhou Z, Ji Y, Liu Y, Hu L, Zhou J, Zhou Y, Zhao J, Liu N, Huang G, Chang H, Fang W, Chen C, Zhou D. 2022. Innate immune responses against the fungal pathogen *Candida auris*. *Nat Commun* 13:3553. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31201-x>.
 29. Bruno M, Kersten S, Bain JM, Jaeger M, Rosati D, Kruppa MD, Lowman DW, Rice PJ, Graves B, Ma Z, Jiao YN, Chowdhary A, Renieris G, van de Veerdonk FL, Kullberg B-J, Giamarellos-Bourboulis EJ, Hoischen A, Gow NAR, Brown AJP, Meis JF, Williams DL, Netea MG. 2020. Transcriptional and functional insights into the host immune response against the emerging fungal pathogen *Candida auris*. *Nat Microbiol* 5:1516–1531. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0780-3>.
 30. Vorobjeva N, Chernyak B. 2020. NETosis: molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *Biochemistry (Mosc)* 85:1178–1190. <https://doi.org/10.1134/S0006297920100065>.
 31. Kaplan MJ, Radic M. 2012. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* 189:2689–2695. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201719>.
 32. Zamith-Miranda D, Heyman HM, Couvillion SP, Cordero RJB, Rodrigues ML, Nimrichter L, Casadevall A, Amatuze RF, Alves LR, Nakayasu ES, Nosanchuk JD. 2021. Comparative molecular and immunoregulatory analysis of extracellular vesicles from *Candida albicans* and *Candida auris*. *mSystems* 6:e00822-21. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00822-21>.
 33. Li T, Zhang Z, Li X, Dong G, Zhang M, Xu Z, Yang J. 2020. Neutrophil extracellular traps: signaling properties and disease relevance. *Mediators Inflamm* 2020:9254087. <https://doi.org/10.1155/2020/9254087>.
 34. Fioranelli M, Rocca MG, Flavin D, Cota L. 2021. Regulation of inflammatory reaction in health and disease. *Int J Mol Sci* 22:5277. <https://doi.org/10.3390/ijms22105277>.
 35. Hannoodde S, Nasuruddin DN. 2021. Acute inflammatory response. *In StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island, FL.
 36. Kuda O, Pietka TA, Demianova Z, Kudova E, Cvacka J, Kopecky J, Abumrad NA. 2013. Sulfo-N-succinimidyl oleate (SSO) inhibits fatty acid uptake and signaling for intracellular calcium via binding CD36 lysine 164: SSO also inhibits oxidized low density lipoprotein uptake by macrophages. *J Biol Chem* 288:15547–15555. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.473298>.
 37. Raldúa D, Babin PJ. 2007. BLT-1, a specific inhibitor of the HDL receptor SR-BI, induces a copper-dependent phenotype during zebrafish development. *Toxicol Lett* 175:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.08.007>.
 38. Wright CD, Bowie JU, Nelson RD. 1984. Influence of yeast mannan on release of myeloperoxidase by human neutrophils: determination of structural features of mannan required for formation of myeloperoxidase-mannan-neutrophil complexes. *Infect Immun* 43:467–471. <https://doi.org/10.1128/iai.43.2.467-471.1984>.
 39. Yadav B, Mora-Montes HM, Wagener J, Cunningham I, West L, Haynes K, Brown AJP, Gow NAR. 2020. Differences in fungal immune recognition by monocytes and macrophages. *Cell Surf* 6:100042. <https://doi.org/10.1016/j.tcsu.2020.100042>.
 40. Tsoni SV, Kerrigan AM, Marakalala MJ, Srinivasan N, Duffield M, Taylor PR, Botto M, Steele C, Brown GD. 2009. Complement C3 plays an essential role in the control of opportunistic fungal infections. *Infect Immun* 77:3679–3685. <https://doi.org/10.1128/IAI.00233-09>.
 41. Yang Z, Chiou TT-Y, Stosel TP, Kobzik L. 2015. Plasma gelsolin improves lung host defense against pneumonia by enhancing macrophage NOD2 function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309:L11–L16. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00094.2015>.
 42. Stuart LM, Deng J, Silver JM, Takahashi K, Tseng AA, Hennessy EJ, Ezekowitz RA, Moore KJ. 2005. Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol* 170:477–485. <https://doi.org/10.1083/jcb.200501113>.
 43. Vasquez M, Fioravanti J, Aranda F, Paredes V, Gomar C, Ardaiz N, Fernandez-Ruiz V, Méndez M, Nistal-Villan E, Larrea E, Gao Q, Gonzalez-Aseguiolaza G, Prieto J, Berraondo P. 2016. Interferon alpha bioactivity critically depends on scavenger receptor class B type I function. *Oncoimmunology* 5:e1196309. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1196309>.
 44. Chuang P-C, Wu M-H, Shoji Y, Tsai S-J. 2009. Downregulation of CD36 results in reduced phagocytic ability of peritoneal macrophages of women with endometriosis. *J Pathol* 219:232–241. <https://doi.org/10.1002/path.2588>.
 45. Gowdy KM, Madenspacher JH, Azzam KM, Gabor KA, Janardhan KS, Aloor JJ, Fessler MB. 2015. Key role for scavenger receptor B-1 in the integrative physiology of host defense during bacterial pneumonia. *Mucosal Immunol* 8:559–571. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.88>.
 46. Baranova IN, Vishnyakova TG, Bocharov AV, Kurlander R, Chen Z, Kimmel ML, Remaley AT, Csako G, Thomas F, Eggerman TL, Patterson AP. 2005. Serum amyloid A binding to CLA-1 (CD36 and LIMP2 analog-1) mediates serum amyloid A protein-induced activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 280:8031–8040. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405009200>.
 47. Nobecourt E, Davies MJ, Brown BE, Curtiss LK, Bonnet DJ, Charlton F, Januszewski AS, Jenkins AJ, Barter PJ, Rye K-A. 2007. The impact of glycation on apolipoprotein A-I structure and its ability to activate lecithin: cholesterol acyltransferase. *Diabetologia* 50:643–653. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0574-z>.
 48. Shao B, Cavigliolo G, Brot N, Oda MN, Heinecke JW. 2008. Methionine oxidation impairs reverse cholesterol transport by apolipoprotein A-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:12224–12229. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802025105>.

7. Publikacja nr 3 (P.3)

Suprewicz et al.
Journal of Neuroinflammation (2022) 19:282
<https://doi.org/10.1186/s12974-022-02642-4>

Journal of Neuroinflammation

RESEARCH

Open Access



Recombinant human plasma gelsolin reverses increased permeability of the blood–brain barrier induced by the spike protein of the SARS-CoV-2 virus

Łukasz Suprewicz¹, Kiet A. Tran², Ewelina Piktel¹, Krzysztof Fiedoruk¹, Paul A. Janmey³, Peter A. Galie² and Robert Bucki^{1*}

Abstract

Background: Plasma gelsolin (pGSN) is an important part of the blood actin buffer that prevents negative consequences of possible F-actin deposition in the microcirculation and has various functions during host immune response. Recent reports reveal that severe COVID-19 correlates with reduced levels of pGSN. Therefore, using an in vitro system, we investigated whether pGSN could attenuate increased permeability of the blood–brain barrier (BBB) during its exposure to the portion of the SARS-CoV-2 spike protein containing the receptor binding domain (S1 subunit).

Materials and methods: Two- and three-dimensional models of the human BBB were constructed using the human cerebral microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 and exposed to physiologically relevant shear stress to mimic perfusion in the central nervous system (CNS). Trans-endothelial electrical resistance (TEER) as well as immunostaining and Western blotting of tight junction (TJ) proteins assessed barrier integrity in the presence of the SARS-CoV-2 spike protein and pGSN. The IncuCyte Live Imaging system evaluated the motility of the endothelial cells. Magnetic bead-based ELISA was used to determine cytokine secretion. Additionally, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) revealed gene expression of proteins from signaling pathways that are associated with the immune response.

Results: pGSN reversed S1-induced BBB permeability in both 2D and 3D BBB models in the presence of shear stress. BBB models exposed to pGSN also exhibited attenuated pro-inflammatory signaling pathways (PI3K, AKT, MAPK, NF- κ B), reduced cytokine secretion (IL-6, IL-8, TNF- α), and increased expression of proteins that form intercellular TJ (ZO-1, occludin, claudin-5).

Conclusion: Due to its anti-inflammatory and protective effects on the brain endothelium, pGSN has the potential to be an alternative therapeutic target for patients with severe SARS-CoV-2 infection, especially those suffering neurological complications of COVID-19.

Keywords: Plasma gelsolin (pGSN), COVID-19, SARS-CoV-2, Blood–brain barrier, Microfluidics, Tissue engineering

Background

SARS-CoV-2 is a β -coronavirus that mainly causes inflammatory lung pathology associated with thrombosis and increased pulmonary vascular permeability leading to edema and hemorrhage [1]. However, both the

*Correspondence: buckirobert@gmail.com

¹ Department of Medical Microbiology and Nanobiomedical Engineering, Medical University of Białystok, Mickiewicza 2C, 15-222 Białystok, Poland
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

cytokine storm during the inflammatory cascade and the spike protein of the virus itself affect other organs, including the brain vasculature [2–5]. Early reports indicate that patients develop a chronic condition characterized by fatigue and neuropsychiatric symptoms, termed long-COVID, now more often called post-acute COVID syndrome (PACS) [6–11]. The most prevalent neurological manifestations of SARS-CoV-2 infection that usually resolve over time in mild cases are headache, anosmia, and dysgeusia [12–15]. However, numerous studies point to other severe complications, such as impaired consciousness, cerebrovascular events, encephalopathy, acute disseminated encephalomyelitis, Guillain-Barré syndrome, strokes, delirium, dementia-like syndrome, and psychiatric disorders, including psychosis, catatonia, and mania [16–18]. Multicenter analyses demonstrated that encephalopathy (up to 42%) and cerebrovascular events (up to 62%) account for most of the COVID-19-associated neurological complications, with inflammatory syndromes, i.e., encephalitis (up to 13%) and Guillain-Barré (up to 9%) considerably less frequent [18, 19]. The occurrence of ischemic stroke is moderately high. It most frequently occurs in younger patients, with more recurring vascular occlusion and higher morbidity than described in patients without COVID-19 and those with influenza. Stroke and inflammatory syndromes seem to have the poorest prognosis for patients of all coronavirus-mediated neurological symptoms [20, 21]. The most common findings detected using neuroimaging include leukoencephalopathy, ischemia with large vessel occlusion, encephalitis, hemorrhage in locations not typical for hypertension, and abnormalities in perfusion [22–25]. Microhemorrhages were associated with microvascular disease in post-mortem studies of COVID-19 patients [26, 27]. Those neurological complications accompanying SARS-CoV-2 infection relate directly or indirectly to the preceding impairment of the endothelial barrier, which allows the viral S-protein to pass through the blood–brain barrier and damage of glial cells. Given the range of neurological complications associated with COVID-19, understanding the complex pathogenesis and molecular mechanisms is essential for providing countermeasures for the treatment of SARS-CoV-2 (SARS-2) infections.

The mechanisms by which the coronavirus affects brain vasculature, allowing the virus to cross the blood–brain barrier (BBB) and cause neurological disorders, are not fully understood. Due to the significant genetic similarity between SARS-CoV-2 and other viruses in this group, particularly SARS-CoV-1, specific targets have been identified by which the virus interacts with human cells [28, 29]. So far, it has been demonstrated that the entry and multiplication of the SARS-CoV-2 virus in human

cells is initiated by its interaction with receptors located on the cell surface, particularly angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) [30, 31]. Some studies indicate that the interaction of viral proteins with the ACE2 receptor alone is not sufficient to ensure optimal viral entry into cells, and this process may be augmented by other factors/potential targets, such as surface vimentin, heparan sulfate, neuropilins, and sialic acids [32–35]. Recently, RhoA activation has been associated with SARS-CoV-2-mediated barrier breakdown, indicating that the signaling mechanism involves cytoskeletal components [36]. SARS-CoV-2 may also induce the formation of tunneling nanotubes and uses this route to infect cells [37]. The interaction of SARS-CoV-2 Spike protein with Toll-like receptors (TLR-2, TLR-4) is reported to induce a pro-inflammatory response contributing to hyperinflammation [38–40].

Gelsolin is a calcium and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-regulated protein with the ability to cap and sever actin filaments, and low levels of plasma gelsolin, one of the two main isoforms of the protein, are present in patients with severe COVID-19 [41, 42]. Under physiological conditions, the concentration of pGSN in human blood is 150–300 µg/mL, and it is also present in several other body fluids such as lymph, cerebrospinal fluid, and synovial fluid [43–45]. Decreased plasma gelsolin concentration described in critically ill patients and those requiring immediate medical attention, e.g., patients with acute trauma, multi-organ injuries, as well as in the course of brain and liver injury, myocardial infarction and necrosis, septic shock, and SARS-CoV-2 infection correlates with poor clinical outcome [46–49]. The severity of a decrease in pGSN concentration in the blood (hypogelsolinemia) correlates with the course of the disease, higher mortality rates, and the length of stay in intensive care units among patients after major trauma [50]. Recently, the administration of recombinant human plasma gelsolin (pGSN) has been associated with full recovery of an intubated patient with acute COVID-19 pneumonia [51]. Fewer patients with COVID-19 pneumonia required intubation and had severe adverse events (SAEs) when treated with pGSN compared to the control group in a recent blinded, randomized study [52]. Considering the pleiotropic effects of human plasma gelsolin and its contribution to a patient's recovery from acute Covid-19, pGSN repletion by administration of recombinant protein may also counteract SARS-CoV-2-mediated inflammation, including inflammation within the brain vasculature.

Here, we aimed to evaluate the ability of human recombinant plasma gelsolin to mitigate blood–brain barrier disruption in the presence of the SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit (S1). To test the functional outcome of

simultaneous addition of S1 and pGSN, we used 2D and 3D in vitro models of the BBB consisting of human cerebral microvascular endothelial cells (hCMEC/D3). We determined the effect of the pGSN on S1-mediated disrupted barrier integrity by measuring the permeability to low molecular weight dextran and transendothelial electrical resistance. In addition to the functional conditions, we evaluated the levels of inflammatory mediators, tight junction proteins, gene expression of signaling pathways, and the motility of endothelial cells. Overall, these studies assess the therapeutic potential of pGSN in protecting the neurological symptoms of COVID-19.

Materials and methods

Recombinant human plasma gelsolin

Recombinant human plasma gelsolin (pGSN) used in our study was produced in *E. coli* and provided by BioAegis Therapeutics (North Brunswick, USA).

Cell culture

Immortalized human cerebral microvascular endothelial cells (#CLU512-A, Cedarlane Laboratories) were used between passage 25 and 35. Cells were cultured in EBM-2 medium (#CC-3156, Lonza) containing 5% FBS (#P30-8500, PAN Biotech), 1.4 μM hydrocortisone (#H0135, Sigma), 10 mM HEPES pH 7.4 (#15630-080, Life Technologies), 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid (#A4544, Sigma), 1% antibiotic antimycotic solution (#A5955, Sigma), 1% chemically defined lipid concentrate (#11905031, Life Technologies), and 1 ng/mL basic fibroblast growth factor (#F0291, Sigma). Cells were grown on collagen type I (0.1 mg/mL, #3443-100-01, R&D Systems)-coated plates at 37 °C with 5% CO₂, 95% fresh air, and saturated humidity. Cells were seeded at $3 \times 10^4/\text{cm}^2$, trypsinized (T4174, Sigma), and replated when approximately 80–90% confluency was reached. The cell culture medium was changed every 2–3 days.

BBB permeability and TEER testing using a 2D model

To mimic 2D blood–brain barrier functions under static conditions, cells were seeded at a density of 10^4 cells per transwell insert (#3470, Corning) coated with collagen I (pore size 0.4 μm , diameter 0.33 cm^2) in 200 μL of complete growth medium. Basolateral chambers were filled with 500 μL of complete growth medium. The medium was changed every 3 days. After the confluent monolayer was formed, cells were washed, and when required, monolayers were incubated with 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pGSN, 10 nM SARS-CoV-2 subunit S1 (#230-01101-100, RayBiotech) and the combination of 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pGSN + 10 nM S1 for 6 h. In all experiments, spike protein S1 subunit was suspended in PBS at 1000 nM concentration and added to cells at a 1 to

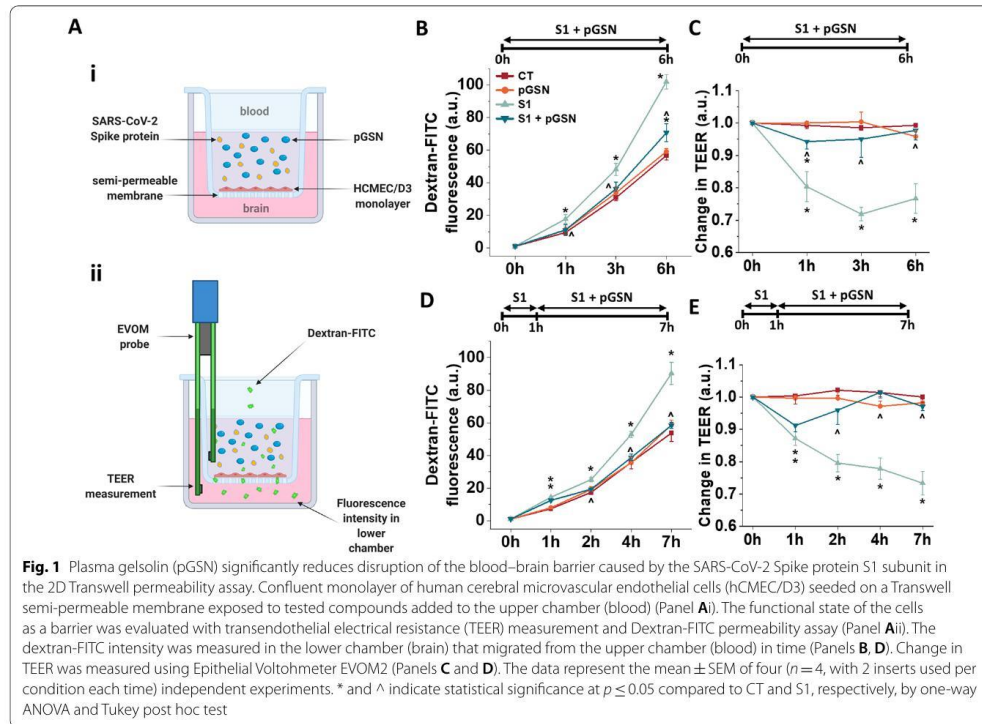
100 ratio. To keep the concentration of growth factors at the same level, an equal volume of PBS was added to untreated conditions. The same situation occurred when adding pGSN at a concentration of 10 mg/mL (40x). The schematic representation of the 2D BBB setting is presented in Fig. 1A.

To determine monolayer permeability, a fluorescent molecular tracer assay was performed. To do so, 4-kDa dextran-FITC (#46944, Sigma) was added to the apical chamber to the final concentration of 1 mg/mL, fluorescence in the basolateral chambers was recorded before addition (t_0) of agents and 0.5, 1, 3, and 6 h later using a Varioskan Lux microplate reader (ThermoFisher). Percent permeability was calculated as the relative fluorescence of medium in the pGSN, S1, and pGSN + S1 treated vs. untreated cells.

Additionally, to evaluate the functional performance of an intact barrier in vitro, the transendothelial electrical resistance (TEER) was measured using an EVOM voltohmmeter (World Precision Instruments) equipped with an STX-2 chopstick electrode. TEER was measured before adding the agents and 0.5, 1, 3, and 6 h later. Transwell® inserts without cells but coated with rat tail collagen type I, containing EBM-2 medium, were measured and set as blank (approximately 90 Ω). Barrier resistance readings (Ω) were obtained for each well individually and, after subtracting the resistance of the blank, were multiplied by the membrane area (0.33 cm^2) to calculate $\Omega \cdot \text{cm}^2$. To normalize the data, resistance at $t=0$ of every single well was set as 1.0. Values treated with pGSN, S1, and pGSN + S1 were normalized to the untreated culture as a control.

Microfabrication

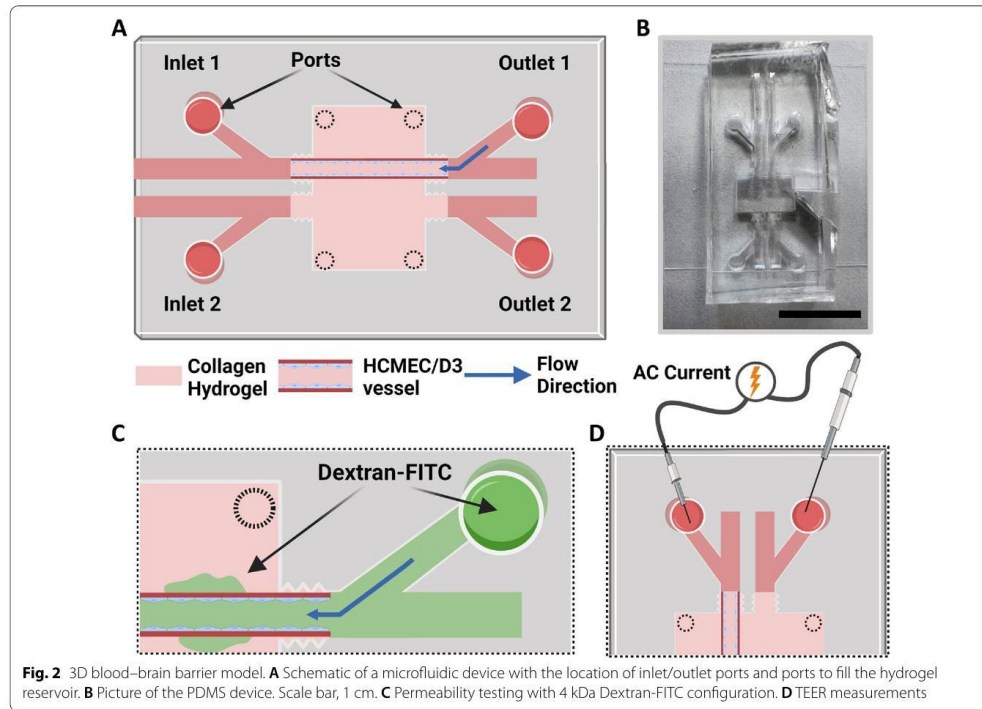
Fabrication of the microfluidic device was completed using a previously described method [53]. Briefly, SU-8 2025 epoxy-based photoresist (MicroChem) was poured on top of a 3-in. silicon wafer at 95 °C and left overnight. A photomask was applied over the wafer before exposure with a 200-W UV lamp for 2 h. Propylene glycol methyl ether acetate (PGMEA) (MicroChem) was used to dissolve the unpolymerized photoresist, and polydimethylsiloxane (PDMS, # 2065622, Ellsworth) was used to create negative molds from the silicon master. Similarly, positive stamps made of PDMS were cast to create the microfluidic channels on glass coverslips. Before gel fabrication, the hydrogel reservoir was filled with 5 M sulfuric acid (#258105, Sigma) for 90 min, washed several times with distilled water, and then filled with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ collagen type I and sterilized with UV light. The schematic design of the microfluidic device is shown in Fig. 2A, B.



Blood–brain barrier—a 3D model

Each device was filled with 60 μ L hydrogel consisting of 6 μ L 10xPBS (#5493, Sigma), 6 μ L 0.1 M NaOH (#BA0981118, POCh SA), 18 μ L distilled water, and 30 μ L 10 mg/mL collagen type I. This formulation yielded a gel consisting of 5 mg/mL collagen. All components were held on ice until mixing, then injected into the hydrogel reservoir of the device. Two 180-mm-diameter acupuncture needles, freshly coated with sterile 0.1% bovine serum albumin (BSA, #A8412, Sigma), were inserted into the needle guides of the device, and the devices were transferred to 37 $^{\circ}$ C for 10 min to facilitate polymerization. PBS was then pipetted on the ports of the reservoir to prevent the drying of the hydrogel. After 2 h of incubation, the needles were carefully pulled from the hydrogel to create cylindrical voids mimicking the geometry of human vessels (growth area \sim 2 cm^2). Human cerebral microvascular endothelial cells (hCMEC/D3) were injected into one of the channels at a density of 10 million cells per mL and left for 10 min incubation before an additional

10-min incubation in an inverted position to facilitate full coverage of the cylindrical void. Cell seeded devices were placed in a well of 6-well culture plates containing 7 mL complete growth medium. In the next step, channels were exposed to shear stress by attaching a 20-mL plastic syringe (BD) containing complete EBM-2 secured to a GenieTouch linear syringe pump (Kent Scientific) to the input port for the cell-seeded channel. The syringe pump was set to deliver a 2.4 μ L/min volumetric flow rate, which was designed to exert approximately 0.7 dyn/cm^2 of shear stress on the endothelium within the channel. Vessels were perfused for four days. After 4 days, when hCMEC/D3 monolayer exerts fully developed barrier functions, 20 mL syringes with EBM-2 were substituted with media containing EBM-2 for control conditions, 10 nM S1, and 250 μ g/mL pGSN + 10 nM S1 in 5 mL plastic syringes. Flow with these agents was applied in the same conditions for an additional four hours. After 4 h, channels were removed from their testing condition and either assessed for permeability or fixed for immunofluorescence staining.



Permeability testing in 3D model

Channels were placed on the stage of an inverted epifluorescence microscope (Zeiss AxioStar 10). The devices were perfused with 4-kDa FITC-dextran at a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate. Images were taken at 10-s intervals and then analyzed using ImageJ. Quantification of the permeability coefficient was determined using a method described in a previous study [54]. Briefly, the coefficient was determined by correlating dextran concentration to the fluorescence intensity and inputting the measurements into the following equation:

$$P = \frac{dI}{dt} \frac{r}{2I_0}$$

(P —permeability coefficient, dI/dt —change in fluorescence intensity in a region of interest outside the lumen, r —the channel radius, and I_0 —the maximum intensity in the lumen during the duration of the test).

TEER measurements (3D)

Impedance was measured using a Stingray DS1M12 USB oscilloscope adapter (USB Instruments). The instrument

combines the functions of a signal generator and an oscilloscope. Using the DS1M12 EasyScope II software, the output voltage was set to a sine wave with 220 mV amplitude, with electrodes inserted into the input ports of the device so that the measured current passed across the endothelium. The leads of input A measured the voltage across a 460 Ω reference resistor in series with the applied voltage to verify the scope output. The charges of input B were positioned as an ammeter across the reference resistor to indicate the current passing between electrodes. The output voltage frequency was swept from 15 Hz to 15.6 kHz, with intermediate values of 50 Hz, 105 Hz, 558 Hz, and 3.906 kHz, to assure that the impedance followed a characteristic frequency dependence for cell monolayer measurements. The impedance, Z , was characterized by calculating the ratio of amplitudes between the applied voltage and measured current and the phase shift between the two waveforms for each frequency. Impedance was defined as: $Z = V/I$ (V —the voltage magnitude, I —the current magnitude). TEER values were determined as the difference in impedance at 15 Hz,

where the capacitance of the electrodes dominates the overall impedance, and at 15.6 kHz, where the resistance of the culture medium is the primary component of the impedance. These values were then subtracted from the impedance difference measured between the inlet and outlet of the device. Measurements in an acellular device were used as a blank and further subtracted from cellularized conditions.

Confocal microscopy

Devices were fixed in 3.7% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. After fixation, the hydrogels were cut from the device hydrogel reservoir and placed in a 100 μ L centrifuge tube. Cells within the hydrogel were permeabilized by adding 0.2% Triton X-100 for 30 min at room temperature. The hydrogels were blocked in 3% BSA for 30 min at 37 °C. Hydrogels were then incubated for 48 h at 4 °C with 1:200 anti-ZO-1. After thorough washing, the hydrogels were incubated with 1:1000 of the secondary antibody for one hour and 1 mg/mL DAPI for 15 min at 37 °C in the dark. Images were acquired on an Eclipse Ti-E inverted microscope with an integrated C2 β laser scanning confocal system. Detailed list of used antibodies can be found in Additional file 1: Table S1.

Migration assay

A scratching assay was implemented to determine the impact of pGSN and S1 on the migration of blood–brain barrier-forming cells. Briefly, hCMEC/D3 cells were cultured in 96-well collagen-coated plates until a confluent monolayer was formed, and homogeneous linear scratches were made using the IncuCyte[®] WoundMaker (Sartorius AG). PGSN, S1, and pGSN + S1 were added directly to wells, capturing images for 72 h. After that, the images were processed by defining a scratching mask and a cell confluence mask using the IncuCyte[®] Cell Migration Analysis Software.

Magnetic bead-based ELISA

Secretion of IL-2, IL-6, IL-8, INF- γ , TNF- α , and GM-CSF was assessed using the Bio-Plex Pro Human Cytokine Assay (Bio-Rad). hCMEC/D3 cells were cultured on 6-well collagen-coated plates until full confluency was reached. PGSN, S1, and pGSN + S1 were then introduced, and the supernatant was collected after 6 and 24 h of incubation. Results were compared to untreated control, normalized to 1.0, and presented as a fold change in cytokine secretion.

Western blotting

hCMEC/D3 confluent monolayers seeded in 6-well collagen-coated plates were treated in static conditions with pGSN, S1, and pGSN + S1 for 24 h and briefly

rinsed with PBS, detached with trypsin, transferred to Eppendorf tubes, and centrifuged. The supernatant was discarded, and the whole-cell lysate was prepared using RIPA lysis buffer (#89901, ThermoFisher) with Pierce Protease Inhibitor (#A32963, ThermoFisher) added freshly before use. Cells were lysed for 20 min on ice and centrifuged at 14,000 rpm for 20 min at 4 °C. Next, supernatants were transferred to fresh tubes and the Bradford (#5000006, Bio-Rad) assay was performed to determine protein concentration. Lysates were subjected to electrophoresis using 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide (SDS-PAGE) at a 15 μ g per lane concentration. After SDS-PAGE separation, proteins were blotted onto polyvinylidene fluoride membranes. Next, the membranes were submerged in methanol, then blocked for 1 h in 5% nonfat dry milk in TBS-T (150 mM NaCl, 50 mM Tris base, 0.05% Tween 20, pH = 7.4). Blocked protein blots were incubated with rabbit anti-occludin (1:200), mouse anti-claudin 5 (1:500), mouse anti-VE cadherin (1:500), rabbit anti-ZO-1 (1:200), mouse anti- β -catenin (1:300), rabbit anti-VEGFR2 (1:500), and mouse anti- β -actin (1:5000), in TBS-T at 4 °C overnight, followed by incubation with goat anti-rabbit IRDye 800CW IgG and goat anti-mouse IRDye 800CW IgG secondary antibody in TBS-T (1:20,000) at room temperature for 1 h, in the dark. Protein blots were visualized with the Odyssey LiCor Imaging System (LiCor Biosciences). Band intensities were quantified using Image Studio Acquisition Software. Data are presented as relative intensity of protein of interest bands in pGSN, S1, or pGSN + S1-treated samples compared to the untreated samples and normalized to β -actin. Detailed list of used antibodies can be found in Additional file 1: Table S1.

qRT-PCR

Confluent cell monolayers were treated with pGSN, S1, and pGSN + S1 for 6 h and briefly rinsed with PBS. Total RNA was extracted using the Universal RNA Purification Kit (#E3598-02, EurX). The concentration and purity of isolated RNA were evaluated using a Qubit 4 fluorometer (ThermoFisher). cDNA was synthesized with 100 ng of RNA in a 20- μ L reaction mix using the iScript[™] cDNA Synthesis Kit (#1708891, Bio-Rad). qRT-PCR was performed with 20 ng of cDNA in a 20- μ L reaction containing SsoAdvanced Universal SYBR[®] Green Supermix (#1725274, Bio-rad) using VEGF signaling and activation PrimePCR plates (#10025756, Bio-Rad) on CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). GAPDH was used as an internal control. Gene expression levels were reported as relative quantity, expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$, and are presented as Log_2FC .

Statistical analysis

Quantitative data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were evaluated using the one-way ANOVA with Tukey's post hoc test, with $p \leq 0.05$ considered statistically significant.

Results

pGSN inhibits SARS-CoV-2 S1-induced increase in permeability of BBB in the 2D model

The main feature of the blood–brain barrier is the presence of endothelial tight junctions that produce highly selective permeability of the barrier. The S1 subunit of the SARS-CoV-2 spike causes disruption of these tight junctions and a subsequent barrier breakdown. We performed permeability assays to determine whether pGSN could mitigate tight junction disassembly in the presence of the S1 subunit. 4-kDa FITC-dextran was used to focus on paracellular passage via cellular junctions and exclude other forms of active transport, e.g., transcytosis (Fig. 1A). Data presented in Fig. 1B and D show the mean change of fluorescence in arbitrary units (a.u.) \pm SEM. To better visualize changes in permeability, the fluorescence of untreated hCMEC/D3 cells at each time point (1, 3, and 6 h) was normalized to 100%. We did not observe a statistically significant change in permeability of the BBB upon the addition of pGSN (250 μ g/mL), which is approximately 20 times more than the pGSN concentration in a cell growth medium with 5% serum. At 1 h, 10 nM SARS-CoV-2 S1 increased permeability by 188%. When 250 μ g/mL pGSN was added at the same time as 10 nM S1 subunit, the permeability change dropped to 117%, which is statistically indistinguishable from the control value. After 3 h, 10 nM SARS-CoV-2 S1 gives a rise to 157%, while 250 μ g/mL pGSN + 10 nM of S1 limited this effect to 118%, a 39% decrease in permeability compared to spike protein S1 subunit alone. At 6 h, 10 nM S1 induced 180% permeability, 250 μ g/mL pGSN + 10 nM of S1 induced 124%, a 55% less than S1. To test whether gelsolin could reverse a permeability change already initiated by S1, endothelial cells were preincubated for 1 h with protein S1 before pGSN addition. As shown in Fig. 1D, the addition of pGSN stopped further deterioration of the BBB caused by spike protein and returned permeability levels to those of the control after 1, 3, and 6 h. Thrombin, an inducer of endothelial permeability, was used as a positive control to evaluate experimental settings, while human albumin was used as a negative control (Additional file 1: Fig. S1). Thrombin, as expected, caused a significant increase in blood–brain barrier vascular permeability comparable to S1 during the initial phase of stimulation (up to 3 h). However, after 6 h, vascular permeability was lower than with S1, probably because of the short half-life of thrombin. Human

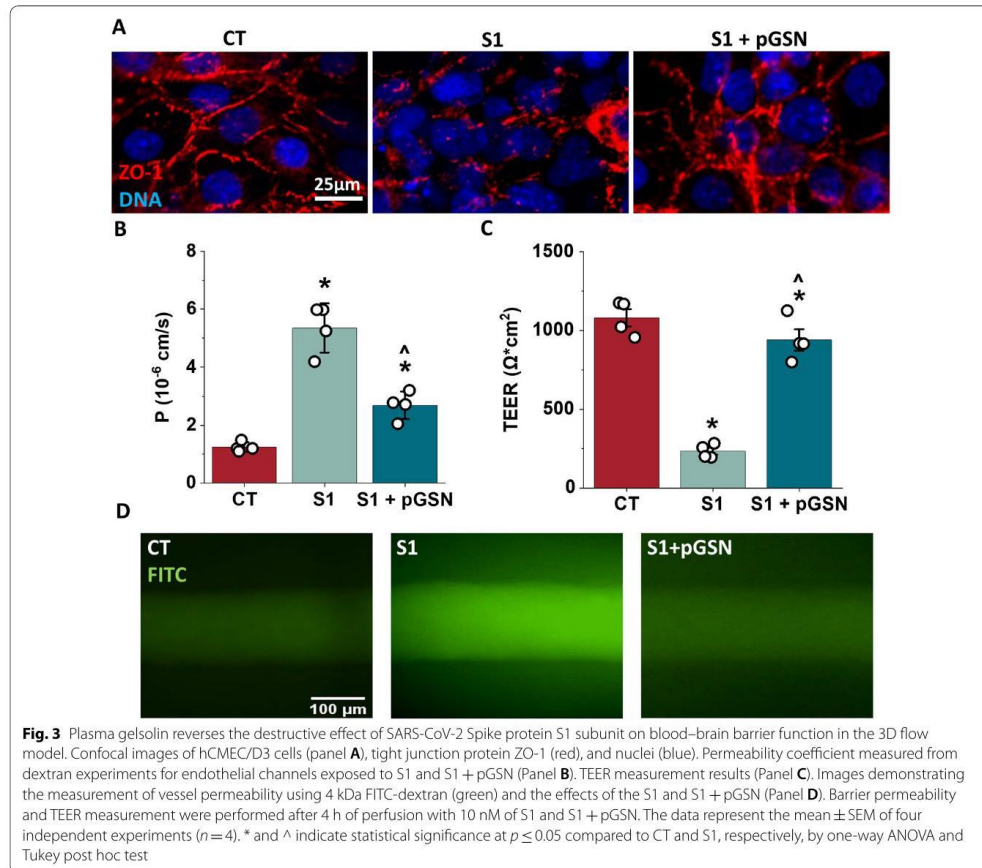
albumin did not inhibit thrombin or S1 protein, nor did it alter endothelial permeability in the condition without additional stimulation.

To provide further evidence of the protective effects of pGSN on the BBB, transendothelial electrical resistance (TEER) measurements were performed. TEER values assess the functional status of brain endothelium; higher resistance denotes decreased permeability, while lower resistance indicates compromised permeability. Baseline TEER values of approx. 30 Ω ·cm² were required prior to the onset of testing, and all measurements were normalized to this initial measurement (TEER at 0 h = 1.0). As shown in the untreated control conditions (Fig. 1C), TEER values were constant throughout the entire experiment. Similarly, 250 μ g/mL pGSN samples did not vary significantly from the control. 10 nM SARS-CoV-2 S1 significantly reduced the resistance at all time points, while the addition of 250 μ g/mL pGSN mitigated the reduction in TEER measurements. When added 1 h after S1, pGSN not only stopped the decreased resistance caused by S1, but returned TEER values to their control levels within 3 h (Fig. 1E).

The permeability and TEER measurements suggest that pGSN exerts a protective effect on blood–brain barrier integrity by reversing the increased permeability caused by SARS-CoV-2 S1 in static conditions. The use of small, positively charged molecular tracers points to the broken intercellular junctional proteins as a part of S1 protein entry for the central nervous system [55]. Since pGSN was found to promote TJ formation within brain vasculature, this pGSN ability might be delaying or repairing barrier disruption.

pGSN prevents blood–brain barrier disruption caused by SARS-CoV-2 S1 protein in the 3D model

A three-dimensional microfluidic model of BBB was used to determine to verify that pGSN protects the barrier in the presence of the S1 subunit in a microenvironment that better mimics *in vivo* vasculature (Fig. 2A, B). Moreover, the 3D model can also incorporate crucial components of *in vivo* vasculature, including the application of shear stress. The 3D BBB model was perfused for 4 days with 0.7 dyn/cm². Subsequently, vessels were perfused for four hours in the same fluid shear stress conditions (0.7 dyn/cm²) with cell culture medium, 10 nM SARS-CoV-2 S1, or 10 nM SARS-CoV-2 S1 + 250 μ g/mL pGSN. Permeability of the BBB in the 3D model was performed using the molecular tracer assay and TEER measurements (Fig. 2C, D). Additionally, after 4 h perfusions, vessels were immunostained to examine zonula occludens-1 (ZO-1), an indicator of barrier breakdown, acting as a scaffold in the tight junction complex. In Fig. 3A, ZO-1 forms a sharp pattern localized at the cell–cell contact



area in untreated conditions. Perfusion with 10 nM of SARS-CoV-2 S1 protein disrupts ZO-1 localization, potentially contributing to impaired barrier permeability. Simultaneous perfusion with 10 nM SARS-CoV-2 with 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pGSN protects ZO-1 protein from disruption, with a pattern resembling a branching network of sealing strands, similar to untreated control. Assessment of barrier permeability with 4 kDa Dextran-FITC (Fig. 3B) indicated over a threefold increase in the permeability coefficient following exposure to 10 nM SARS-CoV-2 S1, while the addition of 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pGSN reduced by nearly twofold leakage of BBB caused by S1. Images of the vessels following dextran perfusion validated the permeability measurements; untreated vessels exhibited a sharp fluorescence gradient at the vessel wall, and S1-treated

vessels showed substantial drainage, inhibited during simultaneous addition of pGSN (Fig. 3D). TEER measurements show a fivefold decrease in electrical resistance after perfusion with 10 nM of SARS-CoV-2, while TEER with S1 + pGSN was higher by fourfold than with S1 subunit alone. Overall, findings in the 3D model support the results of the 2D studies demonstrating a protective effect of pGSN during SARS-CoV-2 S1 subunit-mediated barrier breakdown.

Inhibition of hCMEC/D3 cell migration caused by S1 protein is reversed by pGSN

The migration of endothelial cells is a crucial process during angiogenesis and vasculogenesis as well as in a damaged vasculature to restore vessel integrity.

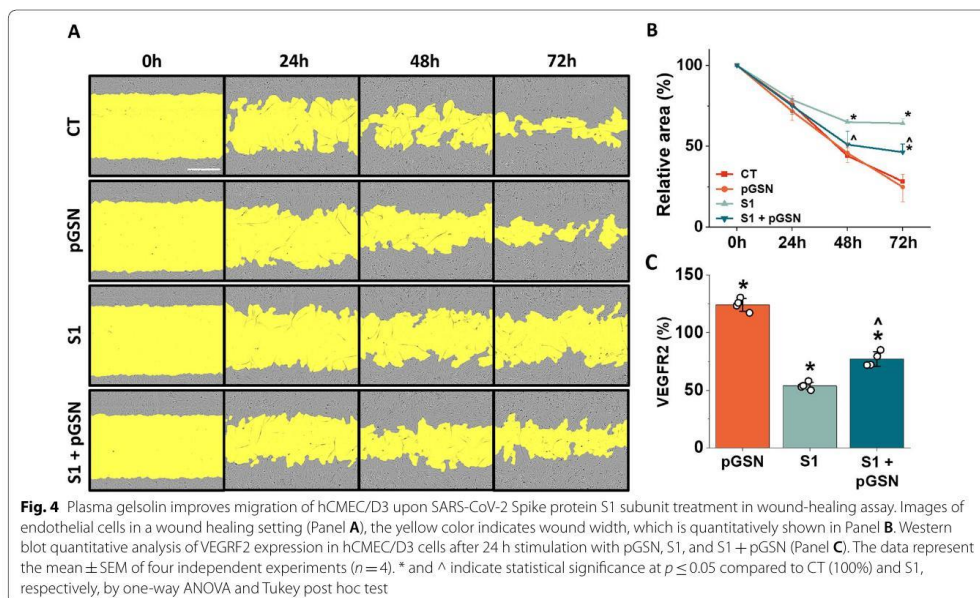
A wound-healing assay was performed to determine whether SARS-CoV-2 S1 restricts migratory properties within brain vasculature and whether pGSN alters the effect. Wound scratch closure was monitored for 72 h (Fig. 4A). Due to the variable size of the initial scratch, the wound area at time 0 was normalized to 100%, and data were presented as a change from the relative initial wound area. As shown in Fig. 4B, pGSN at 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ alone does not affect the migration of the hCMEC/D3 cells during the entire experiment. At 24 h, neither 10 nM SARS-CoV-2 S1 protein nor pGSN significantly changed cell migration. After 48 h, 10 nM SARS-CoV-2 S1 wound size was 21% greater than in untreated conditions, while the addition of pGSN at 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reduced wound area by 14% compared to S1 alone. At 72 h, with 10 nM SARS-CoV-2 S1 protein, wound size was 36% bigger than CT, while wound area after addition of 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pGSN was smaller by 18% than with SARS-CoV-2 S1 alone.

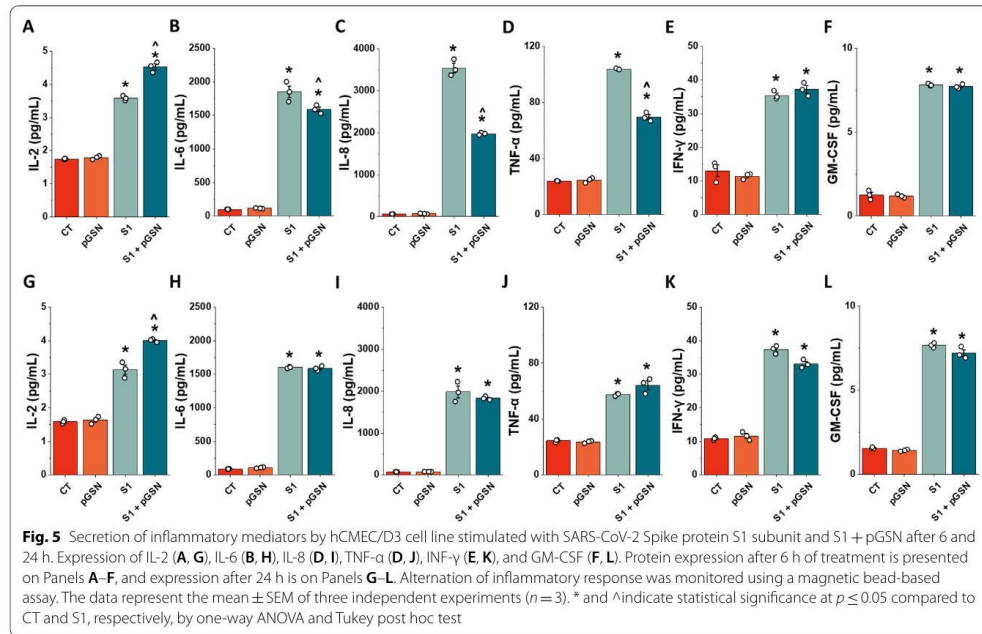
To determine the possible mechanism of preventive pGSN effect when simultaneously added with SARS-CoV-2 S1 protein, lysates of 24 h treated hCMEC/D3 cells were evaluated for VEGFR2 expression using the Western Blot technique. VEGFR2 is a mediator of intracellular signaling involved in cell survival, proliferation, migration, cytoskeleton rearrangement, and vascular permeability. As shown in Fig. 4C with 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pGSN,

VEGFR2 expression was recorded at 124%, and with 10 nM SARS-CoV-2 S1 at 50%. The addition of pGSN to S1 restored VEGFR2 expression to 76%, which was 26% higher than S1 alone. We cannot exclude the possibility of direct stimulation of VEGFR2 by pGSN, which may enhance brain endothelial cell migration. However, it seems more likely that the known anti-inflammatory effect of pGSN may indirectly influence the S1-mediated inhibition of hCMEC/D3 migration, contributing to the formation of the tight junction proteins that limit increased monolayer permeability.

pGSN reduces pro-inflammatory cytokine secretion caused by SARS-CoV-2 S1 protein in the initial phase of cells stimulation

Endothelial dysfunction during COVID-19 is in part caused by a spike protein-induced cytokine storm that involves a cascade release of pro-inflammatory mediators. We performed a magnetic bead-based assay to assess whether plasma gelsolin can reduce S1-induced cytokine secretion from the endothelial cells. Figure 5 represents IL-2, IL-6, IL-8, INF- γ , TNF- α , and GM-CSF secretion upon pGSN, S1, and S1 + pGSN stimulation at 6 and 24 h. The addition of 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pGSN to the hCMEC/D3 confluent monolayer did not lead to significant changes in cytokine secretion after 6 and 24 h.

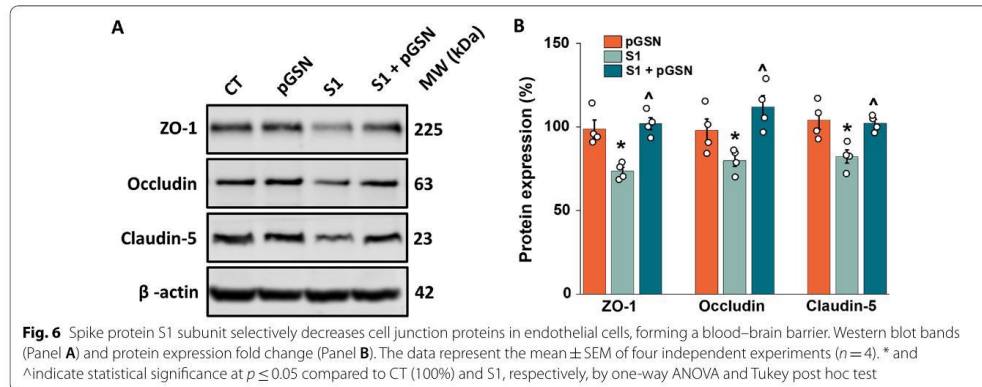




The reductions with pGSN treatment compared to S1 alone are modest after 6 h for most cytokines except for IL-8 and TNF- α as shown in Fig. 5. We did not observe a relevant change in S1-induced secretion of IFN- γ and GM-CSF, while only a slight decrease was noted for IL-6 upon addition of pGSN. At 6 h (Fig. 5A–F), simultaneous addition of 10 nM SARS-CoV-2 S1 and 250 μ g/mL pGSN increased by 0.53 fold IL-2 secretion compared to S1 alone. Furthermore, a decrease of 10 nM SARS-CoV-2 S1-induced secretion was noted in IL-6 by 2.59 fold, IL-8 by nearly 25 fold, and TNF- α by 1.42 fold. After 24 h of stimulation (Fig. 5G–L), the addition of gelsolin did not significantly alter cytokine secretion. However, the decrease by 1.96 fold change for IL-8 is worth noticing. Our cytokine secretion assessment data indicate a protective, anti-inflammatory role of plasma gelsolin against SARS-CoV-2 S1-exposed brain endothelium. Plasma gelsolin is particularly effective towards S1-induced IL-8 and TNF- α secretion, both cytokines with a potent ability to impair endothelial permeability that has been widely associated with poor clinical outcomes for patients with COVID-19 [56, 57]. The results are consistent with previous findings suggesting a role for pGSN in regulating cerebral vascular permeability [58].

Downregulation of tight junction-forming proteins caused by SARS-CoV-2 S1 protein is inhibited by pGSN

The main role of the blood–brain barrier is to selectively impede the passage of molecules into the central nervous system through intercellular bonds mainly formed by tight junctions (TJs) and adherens junctions (AJs). These restrictions on the transport across the blood–brain barrier protect the CNS from harmful substances and maintain brain homeostasis. The main TJ forming proteins ZO-1, occludin, and claudins are among the most confining sealing elements formed between brain endothelial cells throughout the organism. In SARS-CoV-2 infection, the endothelium is disrupted by the degradation of junctional proteins that maintain vascular integrity. To test whether pGSN might reverse that trend, TJ and AJ protein expression was evaluated in hCMEC/D3 monolayer upon exposure to 10 nM SARS-CoV-2 S1 for 24 h (Fig. 6). Our findings support previous studies showing the effect of spike proteins on the downregulation of TJs protein expression (Fig. 6A, B) [2, 55]. However, we did not observe alterations in the expression of the AJ forming proteins VE-Cadherin and β -catenin (data not shown), which points to a certain selectivity of spike protein S1 subunit towards proteins involved in the formation of tight junctions. 10 nM SARS-CoV-2 S1 subunit caused



a decrease in expression of ZO-1 by 25%, occludin by 20%, and claudin 5 by 16%. In the case of SARS-CoV-2 S1 protein at 10 nM with concurrent addition of 250 μ g/mL pGSN, TJ protein expression did not differ compared to the untreated control, an increase in expression relative to S1 for ZO-1 by 26%, occludin by 31% and claudin 5 by 17% was observed. The results demonstrate that the proteins forming tight junctions may serve as molecular targets for SARS-CoV-2 S1 in brain vasculature, and plasma gelsolin may inhibit these proteins' turnover. Moreover, the action of S1 towards TJs appears to be specific due to the lack of downregulation of AJ expression.

pGSN inhibits activation of NF- κ B triggered by S1-protein in endothelial cells

Gene expression studies were conducted to understand the possible mechanism or signaling pathways targeted by the SARS-CoV-2 S1 subunit that pGSN might target. 10 nM SARS-CoV-2 S1 protein and its combination with 250 μ g/mL pGSN were added to hCMEC/D3 cells for 6 h in quadruplicates. All samples passed QC standards for gene expression and hybridization. Genes that had at least 125% ($\pm 25\%$) change in expression and statistical significance at $p \leq 0.05$ were selected. Changes in gene expression are presented as Log₂ of Fold Change (Log₂FC). Our data strongly support previous reports pointing to the PI3K/AKT/MAPK/NF- κ B-dependent activation of endothelial cells caused by the S1 subunit of SARS-CoV-2 [40, 59, 60].

As shown in Fig. 7A, the simultaneous addition of 250 μ g/mL pGSN and 10 nM S1 protein reduced expression of genes involved in PI3K signaling, namely phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit Alpha, Beta and Delta (PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD) by 1.13, 0.41 and 0.84 Log₂FC, respectively.

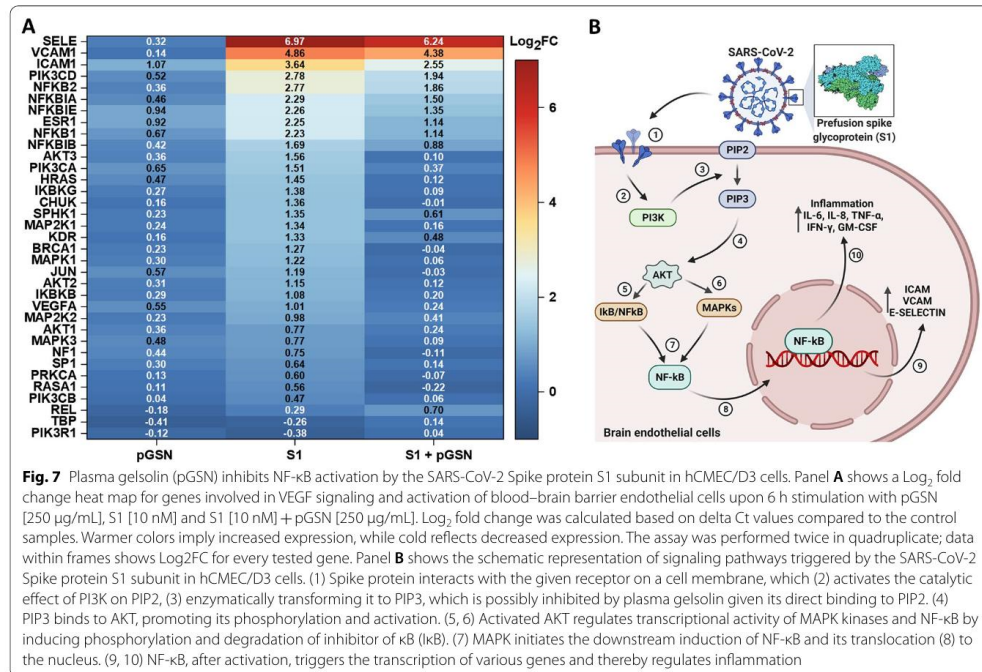
Significant downregulation of gene expression was recorded for the AKT family when pGSN was administered with S1. RAC alpha serine/threonine-protein kinase 1, 2 and 3 (AKT1, AKT2, AKT3) were downregulated by 0.53, 1.04 and 1.46 Log₂FC, respectively. Noteworthy, gene expression of all AKT family genes after pGSN treatment did not differ significantly from basal gene expression in an untreated condition.

Inhibition of genes involved in MAPK signaling was also seen during the addition of pGSN. Mitogen-activated protein kinase 1 and 3 (MAPK1, MAPK3), as well as mitogen-activated protein kinase 1 and 2 (MAP2K1 and MAP2K2), were downregulated by 1.16, 0.68, 1.18 and 0.56 Log₂FC, respectively. From MAPK genes, only MAP2K2 after addition of pGSN differed significantly from gene expression in untreated conditions.

For genes of the NF- κ B pathway, we noted a reduction in the expression of inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha, beta, and gamma (CHUK, IKBKB, and IKBKG) to the level of untreated control by 1.36, 0.88 and 1.39 Log₂FC, respectively. Moreover, we noted downregulation in mRNA expression of nuclear factor Kappa B Subunit 1 and 2 (NFKB1, NFKB2) by 1.09 and 0.91 Log₂FC, respectively. Nuclear factor-kappa-B-inhibitors alpha, beta, and epsilon (NFKBIA, NFKBIB, and NFKBIE) were downregulated by 0.79, 0.81 and 0.91 Log₂FC, respectively.

As a result of the pro-inflammatory response triggered by NF- κ B activation, we encountered upregulation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1), vascular adhesion molecule 1 (VCAM1), and E-selectin (SELE), that was suppressed by pGSN by 1.09, 0.48 and 0.58 Log₂FC, respectively.

The cascade of PI3K/AKT/MAPK/NF- κ B signaling pathways is schematically presented in Fig. 7B. AKT



resides in an inactive conformation in the cytosol until interaction with phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP₃) activates and translocates it to the plasma membrane [61]. PI3K is necessary for AKT activation by catalyzing the phosphorylation of the endogenous phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) into PIP₃ [62]. Plasma gelsolin binds to PIP₂, which potentially inhibits activation of the downstream AKT-dependent MAPK and NF-κB pathways [44].

Our results strongly suggest a protective role of plasma gelsolin towards the vascular endothelium through inhibition of gene expression of signaling pathways involved in the induction of inflammation, resulting in damage to the brain endothelium and loss of its function as a vascular barrier in SARS-CoV-2 infection.

Discussion

Identifying the role of pGSN in the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection is motivated by reports that pGSN depletion correlates with the severity of COVID-19 [41, 42]. Here, we have shown that pGSN protects brain endothelial cells from loss of barrier function caused by the SARS-CoV-2 Spike protein. Our study has two main

limitations. First, the use of the spike protein by itself does not capture any potential effects that plasma gelsolin may have in the complex interaction between the virus and the cell surface. The second limitation is the 2D and 3D models of the BBB that we explore to study BBB functions. With its benefits in dissecting the function of endothelial cells, we have to be aware that the physiological BBB is more complex, and the endothelial cells are accompanied by glial cells and pericytes, which are also essential for the BBB functionality.

Our observations agree with several previous reports indicating a direct effect of SARS-CoV-2 or its components on the permeability of the endothelial cell monolayer [2, 3, 5, 63, 64]. As would be expected, increased release of pro-inflammatory cytokines and disrupted TJ are the main causes of S1 protein-induced BBB leakage [2, 5, 65]. Recently, one study proposed a protective effect of pGSN on the expression of the tight junction protein (ZO-1) in the epithelial cells of the choroidal plexus [66]. These results also bolster our findings by indicating that pGSN can modulate tight junctions during inflammation. Moreover, our study is the first work to date to investigate the anti-inflammatory effects of human pGSN using

a 3D microfluidic model of BBB, revealing that TJ structure and function negatively affected by the spike protein may regain their physiological function upon pGSN addition. There is no available data regarding possible direct interaction between pGSN and S1 protein. However, our preliminary dot-blot analysis excluded such interaction (data not shown), suggesting that the protective effect on endothelial cells depends on the immunomodulatory properties of pGSN. Our results indicate that pGSN exerts pleiotropic effects on the BBB and is associated with several different cell signaling pathways. The complex action of pGSN and interaction with molecular mechanisms includes the wound-healing process associated with the ability of pGSN to accelerate cell migration [67, 68], as well as anti-inflammatory and antioxidant properties that may limit the exaggerated inflammatory response of endothelial cells forming the blood–brain barrier. Since the ability of the S1 protein to inhibit cell migration was also reversed by pGSN, we suggest that this property of pGSN was at least partly due to its ability to induce VEGFR2 expression. However, there is a report indicating an increased expression of VEGFA, a factor that promotes endothelial cell migration, in acute lung injury caused by SARS-CoV-2 infection [69], which is also consistent with our gene expression data. In view of this report, it is not clear how the increased expression of VEGFR2 is responsible for the observed protective effect of gelsolin on endothelial cells. We observed a significant increase in the secretion of pro-inflammatory cytokines characteristic of SARS-CoV-2 infection and S-protein action [70]. These pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , INF- γ) were reported to exert inhibitory effects on endothelial cell proliferation and migration in vitro [71–74]. Moreover, IL-6 also reduces the action of VEGFA [75]. pGSN, when co-administered with S1, caused a decrease in the secretion of pro-inflammatory mediators, which might suggest that the pGSN, by its immunomodulatory effect, indirectly limits the S1-mediated inhibition of endothelial cell migration.

Induction and modulation of downstream SARS-CoV-2 signaling in the presence of pGSN creates the primary modulation of the innate and acquired immune response, which in turn reduces the pro-inflammatory response induced by S1. Among them are phosphoinositide 3-kinase (PI3K), mitogen-activated protein kinase (MAPK), protein kinase B (Akt), and nuclear factor-kappa B (NF- κ B), and mammalian target of rapamycin (mTOR) [59, 60, 76–78]. In our study, pGSN, when simultaneously administered with SARS-CoV-2 S1 protein, caused significant inhibition of the PI3K/AKT downstream signaling, possibly through direct binding with PIP2, a phospholipid crucial for AKT activation. Plasma gelsolin is recognized as a biomarker of

inflammation that can inhibit inflammatory responses by directly binding to products of bacterial origin, e.g., lipopolysaccharide and lipoteichoic acid [79–81]. To date, our current finding is the only report demonstrating an anti-inflammatory effect of plasma gelsolin, unrelated to its ability to bind pro-inflammatory mediators before their stimulation of a signaling pathways such as these mediated by activation of TLRs.

Conclusions

pGSN significantly reduced the permeability of vessels forming the blood–brain barrier in 2D and 3D models. By impeding NF- κ B-dependent signaling pathways, pGSN decreased the secretion of early pro-inflammatory cytokines (IL-6, L-8, TNF- α). In addition, pGSN promoted hCMEC/D3 cell migration in a wound-healing assay and inhibited the S1-induced breakdown of tight junction-forming proteins (ZO-1, Occludin, Claudin-5). Therefore, we propose that the administration of recombinant plasma gelsolin could serve as a promising tool to develop a new therapeutic strategy against SARS-CoV-2-mediated inflammation, especially those associated with BBB disruption. In conclusion, our results demonstrate that pGSN protects the blood–brain barrier changes occurring in response to SARS-CoV-2 Spike protein S1. pGSN may provide novel insights and strategies for the therapy of patients suffering from SARS-CoV-2 infection, especially in subjects with neurological manifestations.

Abbreviations

pGSN: Plasma gelsolin; SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; BBB: Blood–brain barrier; COVID-19: Coronavirus disease; HCMEC: Human cerebral microvascular endothelial cells; TEER: Trans-endothelial electrical resistance; TJ and AJ: Tight and adhesive junctions; ACE2: Angiotensin converting enzyme 2; PDMS: Polydimethylsiloxane.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02642-4>.

Additional file 1: Table S1. List of primary antibodies used for immunofluorescence studies and Western blotting experiments. **Figure S1.** Thrombin [5U] and human albumin [10 nM] was used as a positive and negative control, respectively, for Dextran-FITC permeability of the BBB. The fluorescence intensity of Dextran-FITC was measured in the lower chamber. The data represent the mean \pm SEM of four independent experiments (N=4, two inserts per condition each time). * and ^ indicate statistical significance at $p \leq 0.05$ compared to CT and S1, respectively by one-way ANOVA and Tukey post hoc test. **Figure S2.** Western blot bands (Panel A) and VE-cadherin and β -catenin expression fold change (Panel B). The data represent the mean \pm SEM of four independent experiments (N=4). * and ^ indicate statistical significance at $p \leq 0.05$ compared to CT and S1, respectively by one-way ANOVA and Tukey post hoc test. **Figure S3.** Log₂FC of gene expression from Fig. 7A. Statistical significance at $p \leq 0.05$ was assessed by one-way ANOVA and Tukey post hoc test. **Figure S4.** Raw images of Western blot.

Acknowledgements

Not applicable.

Author contributions

ŁS, PAG, and RB conceptualized the project. ŁS, KAT, and EP performed the experiments and analyzed the data. RB and PAG provided essential research resources. ŁS and KF performed molecular biology experiments. ŁS, PAJ, PAG, and RB wrote the paper with input from all authors. RB, PAJ, and PAG supervised the study. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the National Science Center, Poland, under Preludium bis 1 Grant UMO-2019/35/O/NZ6/02807 (to R.B.), the Polish National Agency for Academic Exchange PPN/STA/2021/1/00003/U/00001 (scientific internship at Rowan University, NJ, USA to Ł.S.) and the Medical University of Białystok SUB/1/DN/21/005/1122 (to Ł.S.).

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during this study are available from the corresponding authors on reasonable request.

Declarations**Ethics approval and consent to participate**

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that there were no commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author details

¹Department of Medical Microbiology and Nanobiomedical Engineering, Medical University of Białystok, Mickiewicza 2C, 15-222 Białystok, Poland. ²Department of Biomedical Engineering, Rowan University, Glassboro, NJ 08028, USA. ³Department of Physiology and Institute for Medicine and Engineering, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA.

Received: 13 June 2022 Accepted: 11 November 2022

Published online: 24 November 2022

References

- Cascella M, Rajnik M, Alem A, Dulebohn SC, Di Napoli R. Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). *Statpearls*. 2022.
- Buzhdygan TP, DeOre BJ, Baldwin-Leclair A, Bullock TA, McGary HM, Khan JA, et al. The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function in 2D static and 3D microfluidic in-vitro models of the human blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 2020;146: 105131.
- Rhea EM, Logsdon AF, Hansen KM, Williams LM, Reed MJ, Baumann KK, et al. The S1 protein of SARS-CoV-2 crosses the blood-brain barrier in mice. *Nat Neurosci*. 2021;24(3):368–78.
- Kim ES, Jeon M-T, Kim K-S, Lee S, Kim S, Kim D-G. Spike proteins of SARS-CoV-2 induce pathological changes in molecular delivery and metabolic function in the brain endothelial cells. *Viruses*. 2021;13(10).
- DeOre BJ, Tran KA, Andrews AM, Ramirez SH, Galle PA. SARS-CoV-2 spike protein disrupts blood-brain barrier integrity via RhoA activation. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2021;16(4):722–8.
- Raveendran A, Jayadevan R, Sashidharan S. Long COVID: an overview. *Diabetes Metab Syndr*. 2021;15(3):869–75.
- Aiyegbusi OL, Hughes SE, Turner G, Rivera SC, McMullan C, Chandan JS, et al. Symptoms, complications and management of long COVID: a review. *J R Soc Med*. 2021;114(9):428–42.
- Borch L, Holm M, Knudsen M, Ellermann-Eriksen S, Hagstroem S. Long COVID symptoms and duration in SARS-CoV-2 positive children—a nationwide cohort study. *European journal of pediatrics*. 2022;1–11.
- Hayes LD, Ingram J, Sculthorpe NF. More than 100 persistent symptoms of SARS-CoV-2 (Long COVID): a scoping review. *Frontiers in Medicine*. 2021;2028.
- Tabacof L, Tosto-Mancuso J, Wood J, Cortes M, Kontorovich A, McCarthy D, et al. Post-acute COVID-19 syndrome negatively impacts health and wellbeing despite less severe acute infection. *MedRxiv*. 2020.
- Huang Y, Pinto MD, Borelli JL, Mehrabadi MA, Abrihim H, Dutt N, et al. COVID symptoms, symptom clusters, and predictors for becoming a long-hauler: looking for clarity in the haze of the pandemic. *MedRxiv*. 2021.
- Boscolo-Rizzo P, Borsetto D, Fabbri C, Spinato G, Frezza D, Menegaldo A, et al. Evolution of altered sense of smell or taste in patients with mildly symptomatic COVID-19. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2020;146(8):729–32.
- Zubair AS, McAlpine LS, Gardin T, Farhadian S, Kuruville DE, Spudich S. Neuropathogenesis and neurologic manifestations of the coronaviruses in the age of coronavirus disease 2019: a review. *JAMA Neurol*. 2020;77(8):1018–27.
- de Erausquin GA, Snyder H, Carrillo M, Hosseini AA, Brugh TA, Shahdri S. The chronic neuropsychiatric sequelae of COVID-19: The need for a prospective study of viral impact on brain functioning. *Alzheimers Dement*. 2021;17(6):1056–65.
- Giacomelli A, Pezzati L, Conti F, Bernacchia D, Siano M, Oreni L, et al. Self-reported olfactory and taste disorders in patients with severe acute respiratory coronavirus 2 infection: a cross-sectional study. *Clin Infect Dis*. 2020;71(15):889–90.
- Xiong W, Mu J, Guo J, Lu L, Liu D, Luo J, et al. New onset neurologic events in people with COVID-19 in 3 regions in China. *Neurology*. 2020;95(11):e1479–87.
- Ellul MA, Benjamin L, Singh B, Lant S, Michael BD, Easton A, et al. Neurological associations of COVID-19. *Lancet Neurol*. 2020;19(9):767–83.
- Varatharaj A, Thomas N, Ellul MA, Davies NW, Pollak TA, Tenorio EL, et al. Neurological and neuropsychiatric complications of COVID-19 in 153 patients: a UK-wide surveillance study. *Lancet Psychiatry*. 2020;7(10):875–82.
- Meppiel E, Peiffer-Smadja N, Maury A, Bekri I, Delorme C, Desestret V, et al. Neurologic manifestations associated with COVID-19: a multicentre registry. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27(3):458–66.
- Nannoni S, de Groot R, Bell S, Markus HS. Stroke in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Int J Stroke*. 2021;16(2):137–49.
- Merkler AE, Parikh NS, Mir S, Gupta A, Kamel H, Lin E, et al. Risk of ischemic stroke in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) vs patients with influenza. *JAMA Neurol*. 2020;77(11):1366–72.
- Radmanesh A, Derman A, Lui YW, Raz E, Loh JP, Hagiwara M, et al. COVID-19-associated diffuse leukoencephalopathy and microhemorrhages. *Radiology*. 2020;297(1):E223–7.
- Cetiner M, Çakmakçı G, Bardakçı MA, Akdağ G, Kabay SC. COVID-19 positive stroke patient with large vessel occlusion in the epidemic. *Cureus*. 2021;13(11).
- Leasure AC, Khan YM, Iyer R, Elkind MS, Sansing LH, Falcone GJ, et al. Intracerebral hemorrhage in patients with COVID-19: an analysis from the COVID-19 cardiovascular disease registry. *Stroke*. 2021;52(7):e321–3.
- Balcom EF, Nath A, Power C. Acute and chronic neurological disorders in COVID-19: potential mechanisms of disease. *Brain*. 2021;144(12):3576–88.
- Dixon L, McNamara C, Gaur P, Mallon D, Coughlan C, Tona F, et al. Cerebral microhaemorrhage in COVID-19: a critical illness related phenomenon? *Stroke Vasc Neurol*. 2020;5(4): e000652.
- Fitsiori A, Pugin D, Thieffry C, Lalive P, Vargas MI. Unusual microbleeds in brain MRI of COVID-19 patients. *J Neuroimaging*. 2020.
- Wang H, Li X, Li T, Zhang S, Wang L, Wu X, et al. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(9):1629–35.
- Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta (BBA) Mol Basis Dis*. 2020;1866(10): 165878.
- Bourgonje AR, Abdulle AE, Timens W, Hillebrands JL, Navis GJ, Gordijn SJ, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J Pathol*. 2020;251(3):228–48.

31. Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med.* 2020;46(4):586–90.
32. Suprewicz Ł, Swoger M, Gupta S, Piktel E, Byfield FJ, Iwamoto DV, et al. Extracellular vimentin as a target against SARS-CoV-2 host cell invasion. *Small.* 2022;18(6):2105640.
33. Daly JL, Simonetti B, Klein K, Chen K-E, Williamson MK, Antón-Plágaro C, et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science.* 2020;370(6518):861–5.
34. Clausen TM, Sandoval DR, Spliid CB, Pihl J, Perrett HR, Painter CD, et al. SARS-CoV-2 infection depends on cellular heparan sulfate and ACE2. *Cell.* 2020;183(4):1043–57. e15.
35. Tortorici MA, Walls AC, Lang Y, Wang C, Li Z, Koerhuis D, et al. Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. *Nat Struct Mol Biol.* 2019;26(6):481–9.
36. DeOre BJ, Partya PP, Fan F, Galie PA. CD44 mediates shear stress mechanotransduction in an in vitro blood-brain barrier model through small GTPases RhoA and Rac1. *FASEB J.* 2022;36(5): e22278.
37. Pepe A, Pietropaoli S, Vos M, Barba-Spaeth G, Zurzolo C. Tunneling nanotubes provide a route for SARS-CoV-2 spreading. *Sci Adv.* 2022;8(29):eabo0171.
38. Shirato K, Kizaki T. SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit induces pro-inflammatory responses via toll-like receptor 4 signaling in murine and human macrophages. *Heliyon.* 2021;7(2): e06187.
39. Zhao Y, Kuang M, Li J, Zhu L, Jia Z, Guo X, et al. SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR4. *Cell Res.* 2021;31(7):818–20.
40. Khan S, Shafiei MS, Longoria C, Schoggins JW, Savani RC, Zaki H. SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF- κ B pathway. *Elife.* 2021;10.
41. Messner CB, Demichev V, Wendisch D, Michalick L, White M, Freiwald A, et al. Ultra-high-throughput clinical proteomics reveals classifiers of COVID-19 infection. *Cell Syst.* 2020;11(1):1–24 e4.
42. Overmyer KA, Shishkova E, Miller IJ, Balnis J, Bernstein MN, Peters-Clarke TM, et al. Large-scale multi-omic analysis of COVID-19 severity. *Cell Syst.* 2021;12(1):23–40. e7.
43. Peng X, Zhang X, Wang L, Zhu Q, Luo J, Wang W, et al. Gelsolin in cerebrospinal fluid as a potential biomarker of epilepsy. *Neurochem Res.* 2011;36(12):2250–8.
44. Buczi R, Kulakowska A, Byfield FJ, Zendzian-Piotrowska M, Baranowski M, Marzec M, et al. Plasma gelsolin modulates cellular response to sphingosine 1-phosphate. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;299(6):C1516–23.
45. Osborn TM, Verdrengh M, Stosel TP, Tarkowski A, Bokarewa M. Decreased levels of the gelsolin plasma isoform in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(5):1–9.
46. Xu JF, Liu WG, Dong XQ, Yang SB, Fan J. Change in plasma gelsolin level after traumatic brain injury. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012;72(2):491–6.
47. Rithidech KN, Reungpatthanaphong P, Tungjai M, Jangiam W, Honikel L, Whorton EB. Persistent depletion of plasma gelsolin (pGSN) after exposure of mice to heavy silicon ions. *Life Sci Space Res (Amst).* 2018;17:83–90.
48. Dahl B, Schiødt FV, Ott P, Gvozdenovic R, Yin HL, Lee WM. Plasma gelsolin is reduced in trauma patients. *Shock.* 1999;12(2):102–4.
49. Suhler E, Lin W, Yin HL, Lee WM. Decreased plasma gelsolin concentrations in acute liver failure, myocardial infarction, septic shock, and myonecrosis. *Crit Care Med.* 1997;25(4):594–8.
50. Mounzer KC, Moncure M, Smith YR, DiNUBILE MJ. Relationship of admission plasma gelsolin levels to clinical outcomes in patients after major trauma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(5):1673–81.
51. Catteduew JV, DiNubile MJ. Recombinant human plasma gelsolin (rh-pGSN) in a patient hospitalized with critical COVID-19 pneumonia. *Clin Infect Pract.* 2021;12: 100088.
52. DiNubile MJ, Parra S, Salomó AC, Levinson SL, editors. Adjunctive recombinant human plasma gelsolin for severe COVID-19 pneumonia. *Open Forum Infectious Diseases.* 2022.
53. Galie PA, Nguyen DH, Choi CK, Cohen DM, Janney PA, Chen CS. Fluid shear stress threshold regulates angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(22):7968–73.
54. Partya PP, Godsey GA, Galie JR, Kosciuk MC, Acharya NK, Nagele RG, et al. Mechanical stress regulates transport in a compliant 3D model of the blood-brain barrier. *Biomaterials.* 2017;115:30–9.
55. Raghavan S, Kenchappa DB, Leo MD. SARS-CoV-2 spike protein induces degradation of junctional proteins that maintain endothelial barrier integrity. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8: 687783.
56. Tang Y, Liu J, Zhang D, Xu Z, Ji J, Wen C. Cytokine storm in COVID-19: the current evidence and treatment strategies. *Front Immunol.* 2020;11:1708.
57. Hojyo S, Uchida M, Tanaka K, Hasebe R, Tanaka Y, Murakami M, et al. How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. *Inflamm Regen.* 2020;40:37.
58. Le HT, Hirko AC, Thinschmidt JS, Grant M, Li Z, Peris J, et al. The protective effects of plasma gelsolin on stroke outcome in rats. *Exp Transl Stroke Med.* 2011;3(1):1–9.
59. Kircheis R, Haasbach E, Lueftenecker D, Heyken WT, Ocker M, Planz O. NF- κ B pathway as a potential target for treatment of critical stage COVID-19 patients. *Front Immunol.* 2020;11: 598444.
60. Goel S, Saheb Sharif-Askari F, Saheb Sharif Askari N, Madkhana B, Alwaa AM, Mahboub B, et al. SARS-CoV-2 switches “on” MAPK and NF κ B signaling via the reduction of nuclear DUSP1 and DUSP5 expression. *Front Pharmacol.* 2021;12: 631879.
61. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(9): a011189.
62. Salamon RS, Backer JM. Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate: tool of choice for class I PI 3-kinases. *BioEssays.* 2013;35(7):602–11.
63. Reynolds J, Mahajan SD. SARS-COV2 alters blood brain barrier integrity contributing to neuro-inflammation. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2021;16(1):4–6.
64. Krasemann S, Haferkamp U, Pfefferle S, Woo MS, Heinrich F, Schweizer M, et al. The blood-brain barrier is dysregulated in COVID-19 and serves as a CNS entry route for SARS-CoV-2. *Stem Cell Rep.* 2022.
65. Corpetti C, Del Re A, Seguella L, Palencia I, Rurgo S, De Conno B, et al. Cannabidiol inhibits SARS-Cov-2 spike (S) protein-induced cytotoxicity and inflammation through a PPAR γ -dependent TLR4/NLRP3/Caspase-1 signaling suppression in Caco-2 cell line. *Phytother Res.* 2021;35(12):6893–903.
66. International BR. Retracted: gelsolin restores α B-induced alterations in choroid plexus epithelium. *BioMed Res Int.* 2021;2021.
67. Vaid B, Chopra BS, Raut S, Sagar A, Badmalia MD, Khatri N. Antioxidant and wound healing property of gelsolin in 3T3-L1 cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020.
68. Wittmann J, Dieckow J, Schröder H, Hampel U, Garreis F, Jacobi C, et al. Plasma gelsolin promotes re-epithelialization. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–10.
69. Turkia M. COVID-19, vascular endothelial growth factor (VEGF) and iodide. *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and iodide (June 3, 2020).* 2020.
70. Saleki K, Banazadeh M, Miri NS, Azadmehr A. Triangle of cytokine storm, central nervous system involvement, and viral infection in COVID-19: the role of sFasL and neuropilin-1. *Rev Neurosci.* 2022;33(2):147–60.
71. Fräter-Schröder M, Risau W, Hallmann R, Gautschi P, Böhlen P. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 1987;84(15):5277–81.
72. Friesel R, Komoriya A, Maciag T. Inhibition of endothelial cell proliferation by gamma-interferon. *J Cell Biol.* 1987;104(3):689–96.
73. Gerol M, Curry L, McCarroll L, Doctrow S, RayChaudhury A. Growth regulation of cultured endothelial cells by inflammatory cytokines: mitogenic, anti-proliferative and cytotoxic effects. *Comp Biochem Physiol C: Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1998;120(3):397–404.
74. Wik JA, Phung D, Kolan S, Haraldsen G, Skålhegg BS, Hol FJ. Inflammatory activation of endothelial cells increases glycolysis and oxygen consumption despite inhibiting cell proliferation. *FEBS Open Bio.* 2021;11(6):1719–30.
75. Zegeye MM, Andersson B, Sirsjö A, Ljungberg LU. IL-6 trans-signaling impairs sprouting angiogenesis by inhibiting migration, proliferation and tube formation of human endothelial cells. *Cells.* 2020;9(6):1414.
76. Robles JP, Zamora M, Adan-Castro E, Siqueiros-Marquez L, de la Escalera GM, Clapp C. The spike protein of SARS-CoV-2 induces endothelial inflammation through integrin α 5 β 1 and NF- κ B signaling. *J Biol Chem.* 2022;298(3).
77. Fattahi S, Khalifehzadeh-Esfahani Z, Mohammad-Rezaei M, Mafi S, Jafarina M. PI3K/Akt/mTOR pathway: a potential target for anti-SARS-CoV-2 therapy. *Immunol Res.* 2022:1–7.

78. Santamaria S. Targeting the PI3K/AKT pathway: a potential new weapon in the global fight against SARS-CoV-2? *Int J Biol Sci.* 2021;17(11):2770.
79. Cheng Y, Hu X, Liu C, Chen M, Wang J, Wang M, et al. Gelsolin inhibits the inflammatory process induced by LPS. *Cell Physiol Biochem.* 2017;41(1):205–12.
80. Bucki R, Byfield FJ, Kulakowska A, McCormick ME, Drozdowski W, Namiot Z, et al. Extracellular gelsolin binds lipoteichoic acid and modulates cellular response to proinflammatory bacterial wall components. *J Immunol.* 2008;181(7):4936–44.
81. DiNubile MJ. Plasma gelsolin as a biomarker of inflammation. Cham: Springer; 2008. p. 1–2.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



8. Streszczenie w języku polskim

W obliczu globalnego wzrostu zakażeń grzybiczych, szczególnie tych spowodowanych przez szczep *Candida auris*, który charakteryzuje się wysoką lekoopornością i zdolnością do unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza, a także w kontekście pandemii COVID-19, podczas, której odnotowano wzrost zakażeń grzybiczych, istnieje pilna potrzeba opracowania nowych, skutecznych terapii. pGSN, dzięki swoim właściwościom immunomodulującym i przeciwzapalnym, może odgrywać kluczową rolę w ograniczaniu uszkodzeń tkanek spowodowanych przez nadmierną odpowiedź immunologiczną, typową dla ciężkich przypadków COVID-19 oraz infekcji *C. auris*.

Cele badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej obejmowały ocenę wpływu pGSN na wrodzoną odpowiedź immunologiczną. Określono mechanizm jej działania na poziomie molekularnym oraz analizę efektów przeciwzapalnych w stosunku do neutrofilów i komórek śródbłonna. Poddano także ocenie protekcyjne działanie pGSN w stosunku do komórek śródbłonna tworzących barierę krew-mózg w modelu hodowli 3D w przepływie poddanej działaniu białka S1 pochodzącego z SARS-CoV-2.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazały po raz pierwszy, że pGSN wykazuje działanie immunomodulujące poprzez stymulację ekspresji receptorów „scavengerowych” typu I klasy B (SR-B) na powierzchni ludzkich neutrofilów, co skutkuje stymulacją fagocytozy. Dodatkowo zaobserwowano, że pGSN zmniejsza stan zapalny, hamując wydzielanie cytokin i chemokin o działaniu prozapalnym, ograniczając wytwarzanie zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych, a także zmniejszając zwiększoną przepuszczalność bariery krew-mózg, wywołaną przez białko S1. Te obserwacje wskazują na nowy molekularny mechanizm działania pGSN i podkreślają jej potencjalne znaczenie w opracowaniu nowych metod terapii zakażeń.

9. Streszczenie w języku angielskim

In the face of a global increase in fungal infections, particularly those caused by the *Candida auris* strain, which is characterized by multidrug resistance and the ability to evade the host's immune response, as well as in the context of the COVID-19 pandemic, where an increase in the occurrence of fungal infections was noted, there is an urgent need to develop new, effective therapies. pGSN, due to its immunomodulating and anti-inflammatory properties, may play a key role in limiting tissue damage caused by excessive immune response, typical for severe cases of COVID-19 and *C. auris* infections.

The research objectives as part of the doctoral dissertation included assessing the impact of pGSN on the innate immune response, determining the mechanism of action at the molecular level, and analyzing the anti-inflammatory effects in relation to neutrophils and endothelial cells. Additionally, the protective action of pGSN on endothelial cells forming the blood-brain barrier was evaluated in an innovative 3D culture flow model exposed to the S1 subunit of the SARS-CoV-2 protein.

The results of the conducted research indicated for the first time that pGSN exhibits an immunomodulating action by stimulating the expression of type I class B "scavenger" receptors (SR-B) on the surface of human neutrophils, which results in the stimulation of phagocytosis. Additionally, it was observed that pGSN alleviates inflammation by suppressing the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines, limiting the overproduction of neutrophil extracellular traps, and reducing the increased permeability of the blood-brain barrier caused by the S1 protein. These findings reveal a new molecular mechanism of action of pGSN and underscore its potential role as a therapeutic target in treating inflammatory states and infections.

10. Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacji:

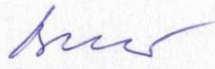
„Blood-brain barrier function in response to SARS-CoV-2 and its spike protein” autorów: Suprewicz, Ł., Fiedoruk, K., Czarnowska, A., Sadowski, M., Strzelecka, A., Galie, P.A., Janmey, P.A., Kułakowska, A., Bucki, R. opublikowanej w *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 2023: 57, 1, s. 14-25.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału w przygotowaniu publikacji
doktorant – mgr Łukasz Suprewicz	Współtworzenie koncepcji pracy, zebranie i przegląd literatury, graficzna prezentacja danych, redakcja manuskryptu
Dr hab. Krzysztof Fiedoruk	Pozyskanie źródła finansowania, oraz pomoc w redakcji manuskryptu
Dr Agata Czarnowska	Nadzór merytoryczny w przygotowaniu manuskryptu
Dr hab. Marcin Sadowski	Redakcja manuskryptu
Dr Agnieszka Strzelecka	Redakcja manuskryptu
Dr Peter Galie	Nadzór merytoryczny w przygotowaniu manuskryptu
Prof. Paul A. Janmey	Nadzór merytoryczny w przygotowaniu manuskryptu
Prof. dr hab. Alina Kułakowska	Nadzór merytoryczny w przygotowaniu manuskryptu
Prof. dr hab. Robert Bucki	Współtworzenie koncepcji oraz nadzór merytoryczny w przygotowaniu manuskryptu

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej mgr Łukasza Suprewicza.


Podpis kandydata

Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.


Podpis promotora

Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacji:

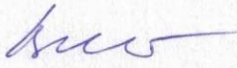
„Phagocytosis of *Candida auris* by Human Neutrophils through Scavenger Receptor Class B”
autorów: Suprewicz, Ł., Skłodowski, K., Walewska, A., Deptuła, P., Sadzyńska, A.,
Eljaszewicz, A., Moniuszko, M., Janmey, P.A., Bucki, R. opublikowanej w *Microbiology
Spectrum*, 2023: 11, 2, 13 pp.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału w przygotowaniu publikacji
doktorant – mgr Łukasz Suprewicz	Współtworzenie koncepcji pracy, zebranie i przegląd literatury, przeprowadzenie części eksperymentalnej, analiza, interpretacja i graficzna prezentacja danych, redakcja manuskryptu
mgr Karol Skłodowski	Przeprowadzenie eksperymentów z wykorzystaniem technik mikrobiologicznych
mgr Alicja Walewska	Przeprowadzenie eksperymentów z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej oraz cytometrii przepływowej
Dr inż. Piotr Deptuła	Przeprowadzenie eksperymentów z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej
Dr Alicja Sadzyńska	Przeprowadzenie eksperymentów z wykorzystaniem technik biologii molekularnej
Dr hab. Andrzej Eljaszewicz	Przeprowadzenie eksperymentów z wykorzystaniem cytometrii przepływowej
Prof. dr hab. Marcin Moniuszko	Konceptualizacja badań oraz nadzór merytoryczny w przygotowaniu manuskryptu
Prof. Paul A. Janmey	Konceptualizacja badań, analiza wyników oraz nadzór merytoryczny w przygotowaniu manuskryptu
Prof. dr hab. Robert Bucki	Konceptualizacja badań, pozyskanie źródła finansowania, analiza i dyskusja wyników oraz nadzór merytoryczny w przygotowaniu manuskryptu

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej mgr Łukasza Suprewicza.


Podpis kandydata

Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

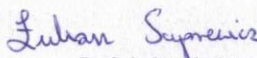

Podpis promotora

Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacji:

„Recombinant human plasma gelsolin reverses increased permeability of the blood–brain barrier induced by the spike protein of the SARS-CoV-2 virus” autorów: Suprewicz, Ł., Tran, K.A., Piktel, E., Fiedoruk, K., Janmey, P.A., Galie, P.A., Bucki, R. opublikowanej w *Journal of Neuroinflammation*, 2022: 19, 16 pp.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału w przygotowaniu publikacji
doktorant – mgr Łukasz Suprewicz	Współtworzenie koncepcji pracy, zebranie i przegląd literatury, przeprowadzenie części eksperymentalnej, analiza, interpretacja i graficzna prezentacja danych, redakcja manuskryptu
Dr Kiet A. Tran	Przeprowadzenie eksperymentów i analiza danych
Dr hab. Ewelina Piktel	Przeprowadzenie eksperymentów i analiza danych
Dr hab. Krzysztof Fiedoruk	Przeprowadzenie i analiza eksperymentów z wykorzystaniem technik biologii molekularnej
Prof. Paul A. Janmey	Konceptualizacja badań, nadzór merytoryczny w przygotowaniu manuskryptu
Dr Peter Galie	Konceptualizacja badań, zapewnienie niezbędnych odczynników/sprzętów laboratoryjnych, nadzór merytoryczny w przygotowaniu manuskryptu
Prof. dr hab. Robert Bucki	Konceptualizacja badań, pozyskanie źródła finansowania, analiza i dyskusja wyników oraz nadzór merytoryczny w przygotowaniu manuskryptu

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej mgr Łukasza Suprewicza.


Podpis kandydata

Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.


Podpis promotora

11. Oświadczenia współautorów rozprawy doktorskiej

Prof. dr hab. Robert Bucki
imię i nazwisko współautora

Białystok,
miejsowość, data
03-06-2024

**Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
i Inżynierii Nanobiomedycznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku**
nazwa jednostki

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „*Plasma Gelsolin Enhances Phagocytosis of Candida auris by Human Neutrophils through Scavenger Receptor Class B*” autorów: Suprewicz, Ł., Skłodowski, K., Walewska, A., Deptuła, P., Sadyńska, A., Eljaszewicz, A., Moniuszko, M., Janmey, P.A., **Bucki, R.** opublikowanej w czasopiśmie *Microbiology Spectrum*,

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Suprewicza pt. „*Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych*” polegał na udziale w konceptualizacji badań, pozyskaniu źródła finansowania, analizie i dyskusji wyników oraz nadzorze merytorycznym w przygotowaniu manuskryptu.

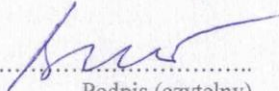
2. „*Recombinant human plasma gelsolin reverses increased permeability of the blood-brain barrier induced by the spike protein of the SARS-CoV-2 virus*” autorów: Suprewicz, Ł., Tran, K.A., Piktel, E., Fiedoruk, K., Janmey, P.A., Galie, P.A., **Bucki, R.** opublikowanej w czasopiśmie *Journal of Neuroinflammation*,

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Suprewicza pt. „*Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych*” polegał na udziale w konceptualizacji badań, pozyskaniu źródła finansowania, analizie i dyskusji wyników oraz nadzorze merytorycznym w przygotowaniu manuskryptu.

3. „*Blood-brain barrier function in response to SARS-CoV-2 and its spike protein*” autorów: Suprewicz, Ł., Fiedoruk, K., Czarnowska, A., Sadowski, M., Strzelecka, A., Galie, P.A., Janmey, P.A., Kułakowska, A., **Bucki, R.** opublikowanej w czasopiśmie *Neurologia i Neurochirurgia Polska*,

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Suprewicza pt. „*Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych*” polegał na współtworzeniu koncepcji pracy przeglądowej oraz na nadzorze merytorycznym w przygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Łukasza Suprewicza publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.


.....
Podpis (czytelny)

dr hab. Ewelina Piktel

imię i nazwisko współautora

Białystok, 08.03.2024

miejsce, data

Samodzielna Pracownia Nanomedycyny

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

nazwa jednostki

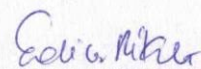
Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „*Recombinant human plasma gelsolin reverses increased permeability of the blood–brain barrier induced by the spike protein of the SARS-CoV-2 virus*”
autorów: Suprewicz, Ł., Tran, K.A., **Piktel, E.**, Fiedoruk, K., Janmey, P.A., Galie, P.A., Bucki, R. opublikowanej w czasopiśmie Journal of Neuroinflammation,

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Suprewicza pt. „*Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych*” polegał na udziale w przeprowadzeniu eksperymentów i analizie wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Łukasza Suprewicza publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



.....
Podpis (czytelny)

Prof. dr hab. Marcin Moniuszko
imię i nazwisko współautora

Białystok, 16.02.24w.
miejsowość, data

**Zakład Medycyny Regeneracyjnej
i Immunoregulacji**
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
nazwa jednostki

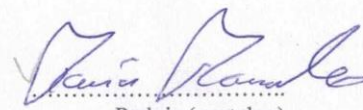
Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „*Plasma Gelsolin Enhances Phagocytosis of Candida auris by Human Neutrophils through Scavenger Receptor Class B*” autorów: Suprewicz, Ł., Skłodowski, K., Walewska, A., Deptuła, P., Sadzyńska, A., Eljaszewicz, A., **Moniuszko, M.**, Janmey, P.A., Bucki, R. opublikowanej w czasopiśmie Microbiology Spectrum,

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Suprewicza pt. „*Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych*” polegał na udziale w konceptualizacji badań oraz nadzorze merytorycznym w przygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Łukasza Suprewicza publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.


Podpis (czytelny)

Paul A. Janmey, Ph.D.
name of co-author

Philadelphia, March 5, 2024
place, date

**Institute for Medicine and Engineering
University of Pennsylvania**

Statement

I declare that my participation in the preparation of the publication:

1. „*Plasma Gelsolin Enhances Phagocytosis of Candida auris by Human Neutrophils through Scavenger Receptor Class B*” by the authors Suprewicz, Ł., Skłodowski, K., Walewska, A., Deptuła, P., Sadzyńska, A., Eljaszewicz, A., Moniuszko, M., **Janmey, P.A.**, Bucki, R. published in Microbiology Spectrum,

included in the doctoral dissertation of Mr. Łukasz Suprewicz, M.Sc., entitled „*Immunoprotective features of human plasma gelsolin in fungal infections*” consisted of participation in the conceptualization of the study, discussion of the results, and supervision in the preparation of the manuscript.

2. „*Recombinant human plasma gelsolin reverses increased permeability of the blood-brain barrier induced by the spike protein of the SARS-CoV-2 virus*” by the authors Suprewicz, Ł., Tran, K.A., Piktel, E., Fiedoruk, K., **Janmey, P.A.**, Galie, P.A., Bucki, R. published in Journal of Neuroinflammation,

included in the doctoral dissertation of Mr. Łukasz Suprewicz, M.Sc., entitled „*Immunoprotective features of human plasma gelsolin in fungal infections*” consisted of participation in the conceptualization of the study and supervision in the preparation of the manuscript.

3. „*Blood-brain barrier function in response to SARS-CoV-2 and its spike protein*” autorów Suprewicz, Ł., Fiedoruk, K., Czarnowska, A., Sadowski, M., Strzelecka, A., Galie, P.A., **Janmey, P.A.**, Kułakowska, A., Bucki, R. published in Neurologia i Neurochirurgia Polska,

included in the doctoral dissertation of Mr. Łukasz Suprewicz, M.Sc., entitled „*Immunoprotective features of human plasma gelsolin in fungal infections*” consisted of substantive supervision in the preparation of the manuscript.

At the same time, I consent to the use of the publication by Łukasz Suprewicz, M.Sc., in the proceedings for the granting of a doctoral degree in medical and health sciences in the discipline of medical science.


.....
Signature

Peter A. Galie, Ph.D.
name of co-author

Glassboro, March 7, 2024
place, date

**Department of Biomedical Engineering
Rowan University
Glassboro, USA**

Statement

I declare that my participation in the preparation of the publication:

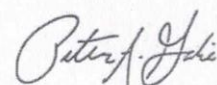
1. „*Recombinant human plasma gelsolin reverses increased permeability of the blood-brain barrier induced by the spike protein of the SARS-CoV-2 virus*” by the authors Suprewicz, Ł., Tran, K.A., Piktel, E., Fiedoruk, K., Janmey, P.A., **Galie, P.A.**, Bucki, R. published in *Journal of Neuroinflammation*,

included in the doctoral dissertation of Mr. Łukasz Suprewicz, M.Sc., entitled „*Immunoprotective features of human plasma gelsolin in fungal infections*” consisted of participation in the conceptualization of the study, providing of the essential research resources, and supervision in the preparation of the manuscript.

2. „*Blood-brain barrier function in response to SARS-CoV-2 and its spike protein*” autorów Suprewicz, Ł., Fiedoruk, K., Czarnowska, A., Sadowski, M., Strzelecka, A., **Galie, P.A.**, Janmey, P.A., Kułakowska, A., Bucki, R. published in *Neurologia i Neurochirurgia Polska*,

included in the doctoral dissertation of Mr. Łukasz Suprewicz, M.Sc., entitled „*Immunoprotective features of human plasma gelsolin in fungal infections*” consisted of substantive supervision in the preparation of the manuscript.

At the same time, I consent to the use of the publication by Łukasz Suprewicz, M.Sc., in the proceedings for the granting of a doctoral degree in medical and health sciences in the discipline of medical science.



.....
Signature

Kiet A. Tran, Ph.D.
name of co-author

Glassboro, March 21, 2024
place, date

**Department of Biomedical Engineering
Rowan University
Glassboro, USA**

Statement

I declare that my participation in the preparation of the publication:

1. „*Recombinant human plasma gelsolin reverses increased permeability of the blood–brain barrier induced by the spike protein of the SARS-CoV-2 virus*” by the authors Suprewicz, Ł., **Tran, K.A.**, Piktel, E., Fiedoruk, K., Janmey, P.A., Galie, P.A., Bucki R. published in *Journal of Neuroinflammation*,

included in the doctoral dissertation of Mr. Łukasz Suprewicz, M.Sc., entitled „*Immunoprotective features of human plasma gelsolin in fungal infections*” consisted of participation in the execution of experiments and analysis of data.

At the same time, I consent to the use of the publication by Łukasz Suprewicz, M.Sc., in the proceedings for the granting of a doctoral degree in medical and health sciences in the discipline of medical science.

Kiet A. Tran
.....
Signature

dr hab. Krzysztof Fiedoruk
imię i nazwisko współautora

Białystok, 02.02.2024
miejsowość, data

**Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
i Inżynierii Nanobiomedycznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku**
nazwa jednostki

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

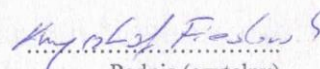
1. „*Recombinant human plasma gelsolin reverses increased permeability of the blood-brain barrier induced by the spike protein of the SARS-CoV-2 virus*”
autorów: Suprewicz, Ł., Tran, K.A., Piktel, E., **Fiedoruk, K.**, Janmey, P.A., Galie, P.A., Bucki, R. opublikowanej w czasopiśmie Journal of Neuroinflammation,

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Suprewicza pt. „*Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych*” polegał na udziale w przeprowadzeniu i analizie eksperymentów z wykorzystaniem technik biologii molekularnej.

2. „*Blood-brain barrier function in response to SARS-CoV-2 and its spike protein*”
autorów: Suprewicz, Ł., **Fiedoruk, K.**, Czarnowska, A., Sadowski, M., Strzelecka, A., Galie, P.A., Janmey, P.A., Kułakowska, A., Bucki, R. opublikowanej w czasopiśmie Neurologia i Neurochirurgia Polska,

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Suprewicza pt. „*Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych*” polegał na pozyskaniu źródła finansowania, oraz na pomocy w redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Łukasza Suprewicza publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.


Podpis (czytelny)

Dr hab. Andrzej Eljaszewicz
imię i nazwisko współautora

Białystok, 16. 02. 2014.
miejsowość, data

Centrum Medycyny Regeneracyjnej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
nazwa jednostki

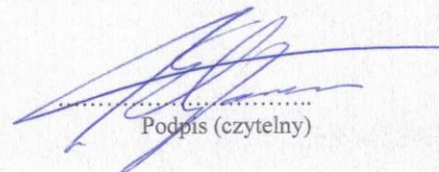
Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „*Plasma Gelsolin Enhances Phagocytosis of Candida auris by Human Neutrophils through Scavenger Receptor Class B*” autorów: Suprewicz, Ł., Skłodowski, K., Walewska, A., Deptuła, P., Sadzyńska, A., **Eljaszewicz, A.**, Moniuszko, M., Janmey, P.A., Bucki, R. opublikowanej w czasopiśmie *Microbiology Spectrum*,

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Suprewicza pt. „*Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych*” polegał na udziale w przeprowadzeniu eksperymentów z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Łukasza Suprewicza publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



.....
Podpis (czytelny)

Prof. dr hab. Alina Kułakowska

imię i nazwisko współautora

Białystok,

miejsowość, data

Białystok, 28/03/24

**Klinika Neurologii i Oddział Udarowy
Uniwersytecki Szpital Kliniczny
w Białymstoku**

nazwa jednostki

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „*Blood-brain barrier function in response to SARS-CoV-2 and its spike protein*”
autorów: Suprewicz, Ł., Fiedoruk, K., Czarnowska, A., Sadowski, M., Strzelecka, A.,
Galie, P.A., Janmey, P.A., **Kułakowska, A.**, Bucki, R. opublikowanej w czasopiśmie
Neurologia i Neurochirurgia Polska,

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Suprewicza pt.
„*Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych*”
polegał na nadzorze merytorycznym w przygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Łukasza Suprewicza publikacji w
postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w
dyscyplinie nauki medyczne.

A. Kułakowska

Podpis (czytelny)

Dr inż. Piotr Deptuła
imię i nazwisko współautora

Białystok, 02.02.2024 r.
miejsowość, data

Samodzielna Pracownia Nanomedycyny
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
nazwa jednostki

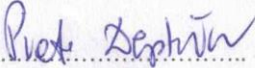
Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „*Plasma Gelsolin Enhances Phagocytosis of Candida auris by Human Neutrophils through Scavenger Receptor Class B*” autorów: Suprewicz, Ł., Skłodowski, K., Walewska, A., **Deptuła, P.**, Sadzyńska, A., Eljaszewicz, A., Moniuszko, M., Janmey, P.A., Bucki, R. opublikowanej w czasopiśmie Microbiology Spectrum,

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Suprewicza pt. „*Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych*” polegał na udziale w przeprowadzeniu eksperymentów z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Łukasza Suprewicza publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.


.....
Podpis (czytelny)

Dr hab. Marcin Sadowski
imię i nazwisko współautora

Kielce, 09.03.2024.
miejsowość, data

**Instytut Nauk Medycznych
Uniwersytet Jana Kochanowskiego
w Kielcach**
nazwa jednostki

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „*Blood-brain barrier function in response to SARS-CoV-2 and its spike protein*” autorów: Suprewicz, L., Fiedoruk, K., Czarnowska, A., **Sadowski, M.**, Strzelecka, A., Galie, P.A., Janney, P.A., Kułakowska, A., Bucki, R. opublikowanej w czasopiśmie Neurologia i Neurochirurgia Polska,

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Suprewicza pt. „*Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych*” polegał na udziale w redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Łukasza Suprewicza publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

**Marcin
Sadowski** Elektronicznie
podpisany przez
Marcin Sadowski
Data: 2024.03.09
11:14:29 +01'00'
.....
Podpis (czytelny)

Dr Agata Czarnowska
imię i nazwisko współautora

Klinika Neurologii i Oddział Udarowy
Uniwersytecki Szpital Kliniczny
w Białymstoku
nazwa jednostki

Białystok, 25.03.2024
miejsowość, data

UNIwersytecki Szpital Kliniczny
w Białymstoku
KLINIKA NEUROLOGII
ul. M. Skłodowskiej-Curie 24A, 15-276 Białystok
tel. 85 746 83 26 fax 85 746 85 08
REGON 14289810

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „*Blood-brain barrier function in response to SARS-CoV-2 and its spike protein*”
autorów: Suprewicz, Ł., Fiedoruk, K., **Czarnowska, A.**, Sadowski, M., Strzelecka, A.,
Galie, P.A., Janmey, P.A., Kułakowska, A., Bucki, R. opublikowanej w czasopiśmie
Neurologia i Neurochirurgia Polska,

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Suprewicza pt.
„*Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych*”
polegał na nadzorze merytorycznym w przygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Łukasza Suprewicza publikacji w
postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w
dyscyplinie nauki medyczne.

Agata Czarnowska
.....
Podpis (czytelny)

Dr n. o zdr. Agnieszka Strzelecka
imię i nazwisko współautora

Kielce, 10.03.2024
miejsowość, data

**Instytut Nauk o Zdrowiu
Collegium Medicum
Uniwersytet Jana Kochanowskiego
w Kielcach**
nazwa jednostki

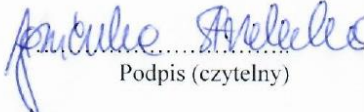
Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *„Blood-brain barrier function in response to SARS-CoV-2 and its spike protein”*
autorów: Suprewicz, L., Fiedoruk, K., Czarnowska, A., Sadowski, M., **Strzelecka, A.**,
Galie, P.A., Janmey, P.A., Kułakowska, A., Bucki, R. opublikowanej w czasopiśmie
Neurologia i Neurochirurgia Polska,

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Suprewicza pt.
„Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych”
polegał na udziale w redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Łukasza Suprewicza publikacji w
postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w
dyscyplinie nauki medyczne.


Podpis (czytelny)

Dr Alicja Sadzyńska
imię i nazwisko współautora

Suwałki, 25.03.2024 r.
miejsowość, data

Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa
im. prof. Edwarda F. Szczepanika w Suwałkach
nazwa jednostki

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „*Plasma Gelsolin Enhances Phagocytosis of Candida auris by Human Neutrophils through Scavenger Receptor Class B*” autorów: Suprewicz, Ł., Skłodowski, K., Walewska, A., Deptuła, P., **Sadzyńska, A.**, Eljaszewicz, A., Moniuszko, M., Janmey, P.A., Bucki, R. opublikowanej w czasopiśmie *Microbiology Spectrum*,

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Suprewicza pt. „*Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych*” polegał na udziale w przeprowadzeniu eksperymentów z wykorzystaniem technik biologii molekularnej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Łukasza Suprewicza publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Alicja Korneluk-Sadzyńska
Podpis (czytelny)

Mgr Karol Skłodowski
imię i nazwisko współautora

Białystok, **02.02.2024**,
miejsowość, data

**Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
i Inżynierii Nanobiomedycznej**
nazwa jednostki

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „*Plasma Gelsolin Enhances Phagocytosis of Candida auris by Human Neutrophils through Scavenger Receptor Class B*” autorów: Suprewicz, Ł., **Skłodowski, K.**, Walewska, A., Deptuła, P., Sadzyńska, A., Eljaszewicz, A., Moniuszko, M., Janmey, P.A., Bucki, R. opublikowanej w czasopiśmie Microbiology Spectrum,

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Suprewicza pt. „*Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych*” polegał na udziale w przeprowadzeniu eksperymentów z wykorzystaniem technik mikrobiologicznych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Łukasza Suprewicza publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Karol Skłodowski.....
Podpis (czytelny)

Mgr Alicja Walewska
imię i nazwisko współautora

Białystok, 14.02.2024 r.
miejsowość, data

Centrum Medycyny Regeneracyjnej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
nazwa jednostki

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „*Plasma Gelsolin Enhances Phagocytosis of Candida auris by Human Neutrophils through Scavenger Receptor Class B*” autorów: Suprewicz, Ł., Skłodowski, K., **Walewska, A.**, Deptuła, P., Sadzyńska, A., Eljaszewicz, A., Moniuszko, M., Janmey, P.A., Bucki, R. opublikowanej w czasopiśmie *Microbiology Spectrum*,

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Suprewicza pt. „*Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych*” polegał na udziale w przeprowadzeniu eksperymentów z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej oraz cytometrii przepływowej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Łukasza Suprewicza publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Alicja Walewska
Podpis (czytelny)

12. Uchwała Komisji Bioetycznej

**KOMISJA BIOETYCZNA
PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU**

ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. 85 748 54 07, fax 85 748 55 08
komisjabioetyczna@umb.edu.pl

Białystok, 29.04.2021 r.

Uchwała nr: APK.002.234.2021

Na podstawie art. 29 ust. 2 i 14 ustawy dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U z 2020, poz. 514 ze zm.), Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych” przez prof. dr hab. Roberta Buckiego wraz z zespołem badawczym z UMB.

Planowany okres realizacji od 29.04.2021 r. do 30.09.2024 r.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej przy UMB

prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka

Pouczenie:

1. Odwołanie od uchwały komisji bioetycznej wyrażającej opinię może wnieść:
 - 1) wnioskodawca;
 - 2) kierownik podmiotu, w którym eksperyment medyczny ma być przeprowadzony;
 - 3) komisja bioetyczna właściwa dla ośrodka, który ma uczestniczyć w wieloośrodkowym eksperymencie medycznym.
2. Odwołanie, o którym mowa w ust. 1, wnosi się za pośrednictwem komisji bioetycznej, która podjęła uchwałę, do Odwoławczej Komisji Bioetycznej w terminie 14 dni od dnia doręczenia uchwały wyrażającej opinię.

13. Dorobek naukowy

Łączna liczba wszystkich publikacji:	24
Łączna wartość Impact Factor wszystkich publikacji:	151,891
Łączna ilość punktów MEiN wszystkich publikacji:	3200
Index Hirsha:	8
Łączna liczba cytowani (Scopus):	251

13.1. Wykaz publikacji naukowych

13.1.1. Prace przeglądowe

1. **Suprewicz, Ł.**, Zakrzewska, M., Okła, S., Głuszek, K., Sadzyńska, A., Deptuła, P., Fiedoruk, K., and Bucki, R. (2024) Extracellular vimentin as a modulator of the immune response and an important player during infectious diseases. *Immunology and Cell Biology*

DOI: 10.1111/imcb.12721

IF= 4,0 MEiN= 140

2. **Suprewicz, Ł.**, Fiedoruk, K., Czarnowska, A., Sadowski, M., Strzelecka, A., Galie, P. A., Janmey, P. A., Kułakowska, A., and Bucki, R. (2023) Blood-brain barrier function in response to SARS-CoV-2 and its spike protein. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*

DOI: 10.5603/PJNNS.a2023.0014

IF= 2,9 MEiN= 140

3. Cieśluk, M., Deptuła, P., Piktel, E., Fiedoruk, K., **Suprewicz, Ł.**, Paprocka, P., Kot, P., Pogoda, K., and Bucki, R. (2020) Physics Comes to the Aid of Medicine—Clinically-Relevant Microorganisms through the Eyes of Atomic Force Microscope. *Pathogens* 9, 969

DOI: 10.3390/pathogens9110969

IF= 3,492 MEiN= 100

13.1.2. Prace oryginalne

1. **Suprewicz, Ł.**, Szczepański, A., Lenart, M., Piktel, E., Fiedoruk, K., Barreto-Duran, E., Kula-Pacurar, A., Savage, P. B., Milewska, A., and Bucki, R. (2023) Ceragenins exhibit antiviral activity against SARS-CoV-2 by increasing the expression and release of type I interferons upon activation of the host's immune response. *Antiviral Research*, 105676

DOI: 10.1016/j.antiviral.2023.105676

IF= 7,6 MEiN= 140

2. Bucki, R., Iwamoto, D. V., Shi, X., Kerr, K. E., Byfield, F. J., **Suprewicz, Ł.**, Skłodowski, K., Sutaria, J., Misiak, P., and Wilczewska, A. Z. (2023) Extracellular vimentin is sufficient to promote cell attachment, spreading, and motility by a mechanism involving N-acetyl glucosamine-containing structures. *Journal of Biological Chemistry* 299

DOI: 10.1016/j.jbc.2023.104963

IF= 4,8 MEiN= 100

3. Deptuła, P., Fiedoruk, K., Wasilewska, M., **Suprewicz, Ł.**, Cieśluk, M., Żeliszewska, P., Oćwieja, M., Adamczyk, Z., Pogoda, K., and Bucki, R. (2023) Physicochemical Nature of SARS-CoV-2 Spike Protein Binding to Human Vimentin. *ACS Applied Materials & Interfaces*

DOI: 10.1021/acsami.3c03347

IF= 9,5 MEiN= 200

4. **Suprewicz, Ł.**, Skłodowski, K., Walewska, A., Deptuła, P., Sadzyńska, A., Eljaszewicz, A., Moniuszko, M., Janmey, P. A., and Bucki, R. (2023) Plasma Gelsolin Enhances Phagocytosis of *Candida auris* by Human Neutrophils through Scavenger Receptor Class B. *Microbiology Spectrum* 11, e04082-04022

DOI: 10.1128/spectrum.04082-22

IF= 3,7 MEiN= 100

5. Wollny, T., **Suprewicz, Ł.**, Smok-Kalwat, J., Antczak, G., Piktel, E., Gózdź, S., Durnaś, B., and Bucki, R. (2023) Monitoring inflammation in patients diagnosed with non-small cell lung and colorectal cancer using blood levels of C-reactive protein, procalcitonin, and plasma gelsolin. *Medical Studies/Studia Medyczne* 39, 103-113

DOI: 10.5114/ms.2023.129100

IF= 0,4 MEiN= 100

6. Tran, K. A., DeOre, B. J., Ikejiani, D., Means, K., Paone, L. S., De Marchi, L., **Suprewicz, Ł.**, Koziol, K., Bouyer, J., and Byfield, F. J. (2023) Matching mechanical heterogeneity of the native spinal cord augments axon infiltration in 3D-printed scaffolds. *Biomaterials* 295, 122061

DOI: 10.1016/j.biomaterials.2023.122061

IF= 14,0 MEiN= 200

7. Skłodowski, K., **Suprewicz, Ł.**, Chmielewska-Deptuła, S. J., Kaliniak, S., Okła, S., Zakrzewska, M., Minarowski, Ł., Mróz, R., Daniluk, T., and Savage, P. B. (2023) Ceragenins exhibit bactericidal properties that are independent of the ionic strength in the environment mimicking cystic fibrosis sputum. *Frontiers in Microbiology*, 14

DOI: 10.1016/j.biomaterials.2023.122061

IF= 5,2 MEiN= 100

8. **Suprewicz, Ł.**, Tran, K. A., Piktel, E., Fiedoruk, K., Janmey, P. A., Galie, P. A., and Bucki, R. (2022) Recombinant human plasma gelsolin reverses increased permeability of the blood–brain barrier induced by the spike protein of the SARS-CoV-2 virus. *Journal of Neuroinflammation* 19, 1-16

DOI: 10.1186/s12974-022-02642-4

IF= 9,3 MEiN= 100

9. Wollny, T., Wnorowska, U., Piktel, E., **Suprewicz, Ł.**, Król, G., Głuszek, K., Gózdź, S., Kopczyński, J., and Bucki, R. (2022) Sphingosine-1-Phosphate-Triggered Expression of Cathelicidin LL-37 Promotes the Growth of Human Bladder Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 7443

DOI: 10.3390/ijms23137443

IF= 5,6 MEiN= 140

10. Pogoda, K., Byfield, F., Deptuła, P., Cieśluk, M., **Suprewicz, Ł.**, Skłodowski, K., Shivers, J. L., van Oosten, A., Cruz, K., and Tarasovets, E. (2022) Unique Role of Vimentin Networks in Compression Stiffening of Cells and Protection of Nuclei from Compressive Stress. *Nano Letters*

DOI: 10.1021/acs.nanolett.2c00736

IF= 10,8 MEiN= 200

11. **Suprewicz, Ł.**, Swoger, M., Gupta, S., Piktel, E., Byfield, F. J., Iwamoto, D. V., Germann, D., Reszeć, J., Marcińczyk, N., and Carroll, R. J. (2022) Extracellular Vimentin as a Target Against SARS-CoV-2 Host Cell Invasion. *Small* 18, 2105640

DOI: 10.1002/sml.202105640

IF= 13,3 MEiN= 200

12. Tran, K. A., Jin, Y., Bouyer, J., DeOre, B. J., **Suprewicz, Ł.**, Figel, A., Walens, H., Fischer, I., and Galie, P. A. (2022) Magnetic alignment of injectable hydrogel scaffolds for spinal cord injury repair. *Biomaterials Science* 10, 2237-2247

DOI: 10.1039/D1BM01590G

IF= 6,6 MEiN= 140

13. Prasad, S. V., Piktel, E., Depciuch, J., Maximenko, A., **Suprewicz, Ł.**, Daniluk, T., Spalek, J., Wnorowska, U., M Zielinski, P., and Parlinska-Wojtan, M. (2021) Targeting bacteria causing otitis media using nanosystems containing nonspherical gold nanoparticles and ceragenins. *Nanomedicine* 16, 2657-2678

DOI: 10.2217/nnm-2021-0370

IF= 6,096 MEiN= 100

14. Piktel, E., Oscilowska, I., **Suprewicz, Ł.**, Depciuch, J., Marcińczyk, N., Chabielska, E., Wolak, P., Głuszek, K., Klimek, J., and Zieliński, P. M. (2021) Peanut-shaped gold nanoparticles with shells of ceragenin CSA-131 display the ability to inhibit ovarian cancer growth in vitro and in a tumor xenograft model. *Cancers (Basel)* 13, 5424

DOI: 10.3390/cancers13215424

IF= 6,575 MEiN= 140

15. Piktel, E., **Suprewicz, Ł.**, Depciuch, J., Chmielewska, S., Skłodowski, K., Daniluk, T., Król, G., Kołat-Brodecka, P., Bijak, P., Pajor-Świerzy, A., Fiedoruk, K., Parlinska-Wojtan, M., and Bucki, R. (2021) Varied-shaped gold nanoparticles with nanogram killing efficiency as potential antimicrobial surface coatings for the medical devices. *Scientific Reports* 11, 12546

DOI: 10.1038/s41598-021-91847-3

IF= 4,997 MEiN= 140

16. Deptuła, P., **Suprewicz, Ł.**, Daniluk, T., Namiot, A., Chmielewska, S. J., Daniluk, U., Lebensztejn, D., and Bucki, R. (2021) Nanomechanical hallmarks of *Helicobacter pylori* infection in pediatric patients. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 5624

DOI: 10.3390/ijms22115624

IF= 6,208 MEiN= 140

17. Piktel, E., Ościłowska, I., **Suprewicz, Ł.**, Depciuch, J., Marcińczyk, N., Chabielska, E., Wolak, P., Wollny, T., Janion, M., Parlinska-Wojtan, M., and Bucki, R. (2021) ROS-Mediated Apoptosis and Autophagy in Ovarian Cancer Cells Treated with Peanut-Shaped Gold Nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* 16, 1993-2011

DOI: 10.2147/IJN.S277014

IF= 7,033 MEiN= 140

18. **Suprewicz, Ł.**, Tokajuk, G., Cieśluk, M., Deptuła, P., Sierpińska, T., Wolak, P., Wollny, T., Tokajuk, J., Głuszek, S., Piktel, E., and Bucki, R. (2020) Bacteria Residing at Root Canals Can Induce Cell Proliferation and Alter the Mechanical Properties of Gingival and Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 21

DOI: 10.3390/ijms21217914

IF= 5,924 MEiN= 140

19. Chmielewska, S. J., Skłodowski, K., Piktel, E., **Suprewicz, Ł.**, Fiedoruk, K., Daniluk, T., Wolak, P., Savage, P. B., and Bucki, R. (2020) NDM-1 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae are highly susceptible to ceragenins CSA-13, CSA-44, and CSA-131. *Infection and Drug Resistance* 13, 3277

DOI: 10.2147/IDR.S261579

IF= 4,003 MEiN= 100

20. Piktel, E., **Suprewicz, Ł.**, Depciuch, J., Cieśluk, M., Chmielewska, S., Durnaś, B., Król, G., Wollny, T., Deptuła, P., Kochanowicz, J., Kułakowska, A., Fiedoruk, K., Maximenko, A., Parlińska-Wojtan, M., and Bucki, R. (2020) Rod-shaped gold nanoparticles exert potent

candidacidal activity and decrease the adhesion of fungal cells. *Nanomedicine (Lond)* 15, 2733-2752

DOI: 10.2217/nnm-2020-0324

IF= 5,307 MEiN= 100

21. Wątek, M., Piktel, E., Barankiewicz, J., Sierlecka, E., Kościołek-Zgódka, S., Chabowska, A., **Suprewicz, Ł.**, Wolak, P., Durnaś, B., and Bucki, R. (2019) Decreased activity of blood acid sphingomyelinase in the course of multiple myeloma. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 6048

DOI: 10.3390/ijms20236048

IF= 4,556 MEiN= 140

13.2. Komunikaty zjazdowe – czynnie prezentowane prace jako pierwszy autor

1. **Suprewicz, Ł.**, Galie, P., Bucki, R. Citrullinated Vimentin Regulates Human Neutrophil Behavior in a 3D Microfluidic Vascular Model. European Intermediate Filament Meeting 2023, Noordwijkerhout, Holandia – plakat
2. **Suprewicz, Ł.**, Skłodowski, K., Zakrzewska, M., Fiedoruk, K., Bucki, R. Extracellular vimentin enhances phagocytosis of *Escherichia coli* and *Candida albicans* by human neutrophils. FEMS 2023, Hamburg, Niemcy – plakat
3. **Suprewicz, Ł.**, Piktel, E., Deptuła, P., Chmielewska, S., Skłodowski, K., Walewska, A., Książak, S., Wollny, T., Król, G., Bucki, R. Recombinant human plasma gelsolin significantly increases phagocytosis of *candida auris* cells by human neutrophils. 40TH Annual Meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases; ESPID 2022, Ateny, Grecja – prezentacja ustna
4. **Suprewicz, Ł.**, Walewska, A., Skłodowski, K., Gutowska, A. Antibiotic resistance patterns and the prevalence of macrolide – lincosamide – streptogramin B (MLSb) resistance in *Streptococcus agalactiae* clinical isolates. 14th Białystok International Medical Congress for Young Scientists 2019, Białystok, Polska – prezentacja ustna

5. **Suprewicz, Ł.**, Piktel, E., Chmielewska, S., Depciuch, J., Parlińska-Wojtan, M., Bucki, R. Gold nanoparticles with high activity against *Escherichia coli* strains causing urinary tract infections. 6th Lublin International Medical Congress for Students and Young Doctors 2019, Lublin, Polska – prezentacja ustna

13.3. Projekty badawcze

1. **2023-obecnie** kierownik w grantie PRELUDIUM 21 finansowanym ze środków Narodowego Centrum Nauki – „Zewnątrzkomórkowa wimentyna jako cząsteczka sygnałowa w patogenezie zapalenia i uszkodzenia centralnego układu nerwowego u pacjentów z COVID19” (2022/45/N/NZ6/01454)

2. **2020-obecnie** doktorant w grantie PRELUDIUM BIS-1 finansowanym ze środków Narodowego Centrum Nauki – „Immunoprotekcyjne właściwości ludzkiej gelsoliny osoczowej w zakażeniach grzybiczych” (NCN/1/PR/20/002/1122) – kierownik: prof. dr hab. Robert Bucki

3. **2019-2020** student stypendysta w grantie OPUS 16 finansowanym ze środków Narodowego Centrum Nauki – „Niesferyczne nanocząstki zawierające cerageniny jako innowacyjne podejście w rozwoju nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych, immunomodulujących i stymulujących regenerację tkanek” (NCN/1/OP/19/001/1122) – kierownik: prof. dr hab. Robert Bucki

4. **2021, 2022, 2023** kierownik projektu finansowanego przez Uniwersytet Medyczny w Białymstoku ze środków pochodzących z subwencji Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w części przeznaczonych na prowadzenie działalności naukowej – „Ocena nefroprotekcynowego działania rekombinowanej ludzkiej gelsoliny osoczowej w przebiegu SARS-CoV-2” (2021), „Rola zewnątrzkomórkowej wimentyny w procesie angiogenezy w obrębie mikrokrążenia mózgowego” (2022), „Molekularny mechanizm działania zewnątrzkomórkowej wimentyny w procesie fagocytozy” (2023).

13.4. Staż naukowy

01.07–01.10.2021 Staż naukowy w Zakładzie Inżynierii Biomedycznej, Rowan University (Glassboro, NJ, USA). Kierownik Zakładu oraz opiekun w ośrodku goszczącym - dr Peter A. Galie. Staż naukowy finansowany był przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej w ramach grantu Preludium bis 1 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Zadanie badawcze - Ocena wpływu gelsoliny osoczowej na właściwości śródbłonna naczyniowego przy zastosowaniu hodowli komórkowej 3D.

13.5. Wykaz innych aktywności naukowych

1. 2023- Nominowany członek Sigma Xi - Honorowe Towarzystwo Badań Naukowych (Sigma Xi, The Scientific Research Honor Society)
2. 2023- Członek Amerykańskiego Towarzystwa Mikrobiologicznego (American Society for Microbiology)
3. 2018-2020 Koło Naukowe przy Zakładzie Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej, tematyka badań: Ocena lekowrażliwości szczepów z gatunków *Streptococcus* i *Staphylococcus*.
4. 2017-2020 Koło Naukowe przy Zakładzie Klinicznej Biologii Molekularnej – przewodniczący, tematyka badań: Ocena ekspresji genów układu NRF2 – KEAP1 w niedrobnokomórkowym raku płuca.

13.6. Stypendia krajowe

2021-2024 Stypendium Naukowe Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku