

lek., mgr biotech. Anna Maria Truszevska

**Rola oraz wartość diagnostyczna pozakomórkowego DNA w toczniu
rumieniowatym układowym**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. n. med. Bartosz Foroniewicz

Klinika Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2021

II. Streszczenie w języku polskim

Wstęp. Toczeń rumieniowaty układowy (*systemic lupus erythematosus*, SLE) jest chorobą o podłożu autoimmunologicznym, charakteryzującą się szerokim spektrum objawów klinicznych. Pomimo wielu lat badań, patogeneza tocznia pozostaje niewyjaśniona. Uważa się obecnie, że do rozwoju SLE dochodzi na skutek działania bodźca środowiskowego u pacjentów z genetycznie uwarunkowaną podatnością. Wśród czynników zewnętrznych biorących udział w patogenezie choroby, infekcje np. wirusem Ebsteina-Barr (*Epstein-Barr virus*, EBV) wydają się mieć szczególne znaczenie. Zaobserwowano, że SLE związane jest z wysokim poziomem zewnątrzkomórkowego DNA krążącego w krwiobiegu, które określa się mianem pozakomórkowego DNA (*cell-free DNA*, cf-DNA). Rola cfDNA w patogenezie tocznia również pozostaje nieznana. Co ciekawe, w ostatnich latach zarówno wirus EBV, jak i cfDNA zostały powiązane z aktywnością nefropatii toczniowej. Celem niniejszego badania była ocena roli i wartości diagnostycznej cfDNA w SLE, analiza zależności pomiędzy cfDNA, wirusem EBV i chorobą nerek w toczniu układowym oraz ocena znaczenia klinicznego parametrów charakteryzujących profil cfDNA.

Metody. Próbkę krwi obwodowej pobrano od 43 pacjentów z SLE i 50 zdrowych ochotników. Jądrowa i mitochondrialna frakcja cfDNA oraz wewnątrzkomórkowe mitochondrialne DNA (mtDNA) zostało oznaczone metodą real-time PCR. Analiza długości fragmentów i analiza ilościowa całkowitego cfDNA w osoczu została przeprowadzona na aparacie Bioanalyzer. Jednorodność fragmentacji cfDNA określano za pomocą współczynnika fragmentacji. Ładunek wirusa EBV w leukocytach krwi obwodowej został oznaczony metodą real-time PCR.

Wyniki. Określono cztery parametry charakteryzujące profil cfDNA: współczynnik fragmentacji, stosunek wewnątrz- do zewnątrzkomórkowej ilości kopii mtDNA, stężenie cfDNA oraz obecność fragmentów 54-149 bp i 209-297 bp. Pacjenci z profilem cfDNA zbliżonym do zdrowej populacji mieli wyższy eGFR ($P = 0.009$) i częściej brak wskazań do biopsji nerek lub mieli mniej zaawansowaną nefropatię toczniową ($P = 0.037$). Pacjenci z odmiennym profilem cfDNA, charakteryzującym się wysokim stężeniem i współczynnikiem fragmentacji cfDNA, większą różnicą pomiędzy wewnątrz- i zewnątrzkomórkową ilością kopii mtDNA oraz obecnością fragmentów 54-149 bp i 209-297 bp, mieli niższy eGFR ($P = 0.005$) i częściej bardziej zaawansowane klasy nefropatii toczniowej lub byli po przeszczepieniu nerki z powodu niewydolności nerek w przebiegu nefropatii toczniowej ($P = 0.001$). Pacjenci z przewlekłą chorobą nerek (*chronic kidney*

disease, CKD) mieli wyższy ładunek EBV w porównaniu do pacjentów bez choroby nerek ($P=0.042$). Pacjenci w wysokim stężeniu cfDNA mieli wyższy ładunek EBV ($P=0.041$) i wyższy współczynnik fragmentacji cfDNA ($P<0.001$) w porównaniu do pacjentów z niskim stężeniem cfDNA. Pośród pacjentów z wysokim stężeniem cfDNA, ładunek wirusa EBV był wyższy w grupie pacjentów CKD(+) w porównaniu do pacjentów CKD(-) ($P=0.035$). Ładunek EBV dodatkowo korelował ze współczynnikiem fragmentacji u wszystkich pacjentów z SLE ($P=0.028$, $R^2=0.13$), a korelacja była silnej wyrażona w grupie pacjentów CKD (+) ($P<0.001$, $R^2=0.20$).

Wnioski. W badaniu wykazano, że profil cfDNA charakteryzujący się wysokim stężeniem i współczynnikiem fragmentacji cfDNA, większą różnicą pomiędzy wewnątrz- i zewnątrzkomórkową frakcją mtDNA oraz obecnością fragmentów 54-149 bp and 209-297 bp związany jest z większym uszkodzeniem nerek. Zatem określenie profilu cfDNA może być przydatne w odróżnieniu pacjentów z gorszym przebiegiem nefropatii toczniowej od pacjentów z łagodniejszą formą choroby nerek i lepszym rokowaniem i może w przyszłości stanowić metodę diagnostyczną LN. Stwierdzono także, że ładunek EBV w leukocytach pacjentów z SLE jest związany z niejednorodną fragmentacją i wysokim stężeniem cfDNA, a także obecnością przewlekłej choroby nerek. O ile nie można określić przyczynowości tej zależności, praca wskazuje nowy kierunek do dalszych badań nad udziałem wirusa EBV i cfDNA w patogenezie SLE i nefropatii toczniowej.

Anna Jurewska

Bartłomiej Francini