

**UNIwersytet Medyczny w Białymstoku**  
**I KLINIKA NEFROLOGII I**  
**TRANSPLANTOLOGII Z OŚRODKIEM DIALIZ**

15-540 Białystok ul. Żurawia 14, tel.: (085)8316458, e-mail: [bnaumnik@poczta.onet.pl](mailto:bnaumnik@poczta.onet.pl), [nefro@uskwb.pl](mailto:nefro@uskwb.pl)

---

Białystok, 07.07.2021

Opinia  
o dysertacji doktorskiej pt.

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

Autorstwa lek. mgr biotech. Anny Marii Truszeńskiej  
Praca wykonana pod kierunkiem dr hab. n. med. Bartosza Foroncowicza

Problem patogenezy toczenia rumieniowatego układowego (SLE), pomimo coraz szerszych możliwości diagnostycznych, pozostaje tematem aktualnym i otwartym. Toczeń jest chorobą autoimmunologiczną o bardzo zróżnicowanym spektrum objawów i złożonym patomechanizmie ich powstawania. Uważa się obecnie, że do jego rozwoju dochodzi na skutek działania bodźca środowiskowego u pacjentów (głównie młodych kobiet) z genetycznie uwarunkowaną podatnością. Czynniki zapoczątkowujące autoagresję z produkcją przeciwciał i powstawaniem kompleksów immunologicznych, nie są do tej pory precyzyjnie określone. Wśród wielu wymieniane są m.in. czynniki infekcyjne zarówno bakteryjne jak i wirusowe. Podstawą rozpoznania SLE są immunologiczne wykładniki w postaci przeciwciał przeciwjądrowych (ANA) i przeciwko dwuniciowemu DNA (dsDNA). Jednocześnie wiadomo, że anty dsDNA pełnią funkcję nośnika krążących cząsteczek DNA (cirDNA) do komórek dendrytycznych, mogących aktywować wrodzoną odpowiedź immunologiczną. Sama rola zewnątrzkomórkowego DNA w SLE wciąż pozostaje jednak niewyjaśniona, a wyniki dotychczasowych badań są niespójne. Jednym z kryteriów rozpoznania SLE są objawy uszkodzenia nerek. Nefropatia toczniowa może przybierać różne

formy – od kłębuszkowego zapalenia po uszkodzenie cewkowo-śródmiaższowe, a każdy rzut choroby u tego samego pacjenta może powodować różne rodzaje różnie nasilonych obrazów uszkodzenia nerek, stąd toczeń w nefrologii nazywany jest „kameleonem”. Niestety, jest jedną z częstszych przyczyn przewlekłej i schyłkowej niewydolności tego narządu będąc nierzadko przyczyną konieczności wdrożenia leczenia nerkozastępczego. Terapia tej choroby, oparta na lekach immunosupresyjnych, jest procesem wieloletnim i skomplikowanym, a odpowiedź na leczenie i uzyskanie remisji niejednokrotnie jest niepełna. Stąd tak ważne są odpowiednie i dobrze dobrane narzędzia diagnostyczne a także jasno określone czynniki rokownicze. Do chwili obecnej medycyna boryka się z dużym odsetkiem niepowodzeń terapeutycznych w SLE jak również szkodami wyrządzanymi przez długie leczenie immunosupresyjne.

Mając na uwadze ten wielopłaszczyznowy problem przedmiot podjętych przez Doktorantkę badań jest ciekawy i w pełni uzasadniony - zarówno z uwagi na aspekty poznawcze, jak i codzienną praktykę kliniczną.

Przedstawiona mi do recenzji monografia oparta jest na 3 publikacjach i wraz z piśmiennictwem liczy 57 strony druku. Opracowanie posiada typowy dla tego rodzaju dysertacji doktorskich układ. Listę publikacji poprzedzają syntetyczne *Streszczenia* w języku polskim i angielskim, *Wstęp* i *Wykaz skrótów*. Zasadniczą jej częścią jest przedstawienie założeń pracy, omówienie poszczególnych artykułów i ich kopie.

Kanwą rozprawy doktorskiej są trzy prace opublikowane w recenzowanych (przez co najmniej 2 niezależnych recenzentów), renomowanych czasopismach medycznych o zasięgu międzynarodowych: praca pogładowa z *Clin Exp Rheumatol* (2017) i dwie prace oryginalne z *Lupus* (2020 i 2021). We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Sumaryczny impact factor (na rok wydania) prac wynosi 7.7 punktów, punktacja MNiSW to 225 punktów. W pracach oryginalnych zaprezentowano wyniki projektu badawczego pt. „Znaczenie infekcji wirusem Epsteina-Barr w patogenezie toczenia rumieniowatego układowego” o numerze 2012/07/N/NZ6/02954 zrealizowanego pod kierownictwem Anny Truszeńskiej i finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu PRELUDIUM 4. Stwierdzam, iż zaprezentowany dorobek naukowy spełnia kryteria przewidziane odpowiednią ustawą wymagane na stopień doktora nauk medycznych.

We *Wstępie* Autorka przybliży znaczenie zewnątrzkomórkowego DNA (exDNA), jego frakcje i porządkuje nomenklaturę. Zwraca uwagę na pochodzenie jądrowe i mitochondrialne poszczególnych frakcji oraz formę ich występowania w osoczu – DNA zamknięte w ciałkach apoptotycznych, mikropęcherzykach, egzosomach, pozakomórkowych mitochondriach i pofragmentowanych komórkach. Dyskutuje znaczenie poszczególnych form dla autoreaktywnej odpowiedzi i słusznie podkreśla, że najbardziej immunogenne postaci DNA to te występujące w formie wolnej i zamknięte w egzosomach, mogą one bowiem prezentować autoantygeny. Proponuje więc, bardzo logicznie, właśnie te formy nazywać mianem *cel free* DNA (cfDNA) w odróżnieniu od dużo szerszego pojęcia krążącego DNA (*circulating*, cirDNA). Kolejno Doktorantka opisuje metody izolacji zewnątrzkomórkowego DNA odnosząc się jednocześnie do zaproponowanych i wykorzystanych w pracach badawczych zmian metodologicznych polegających na dodatkowej filtracji osocza przy użyciu filtrów strzykawkowych o średnicy porów 0.2  $\mu\text{m}$ . Etap ten pozbawia filtrowany materiał resztek komórkowych, organelli oraz dużych pęcherzyków pozakomórkowych i umożliwia przez to oznaczenie immunogennych form cfDNA.

Kolejny akapit poświęcony jest patofizjologii SLE i roli w niej czynnika wirusowego jakim jest ludzki herpeswirus Epsteina-Barr (*Epstein-Barr virus*; EBV). Doktorantka podkreśla, że pacjenci z SLE mają wyższe miano przeciwciał anti-EBV, wyższą ilość kopii wirusa w komórkach, jak również odmienną ekspresję genów wirusowych w porównaniu do zdrowej populacji. Na modelu mysim potwierdzono, że ekspresja wirusowego genu EBNA-1 (Epstein-Barr nuclear 7 antigen 1) może zapoczątkowywać krzyżową produkcję przeciwciał anti-dsDNA oraz że przeciwciała te posiadają duży potencjał patogenny - mają zdolność wiązania cząsteczek dsDNA w kłębuszkach nerkowych, odkładania się w nich i indukowania kłębuszkowego zapalenia nerek. To bardzo istotne fakty potwierdzające zasadność przeprowadzonych przez Autorkę badań.

W kolejnych akapitach Doktorantka wraca do roli zewnątrzkomórkowego DNA, jego stężenia, długości fragmentów i procesów jego degradacji. Zwraca uwagę na zasadnicze różnice w tym zakresie pomiędzy populacją zdrową i pacjentów chorych na SLE.

Z obowiązku recenzenta nadmienię, że czytelnikowi znacznie ułatwiło by przyswajanie treści, gdyby układ wstępu był nieco inny: najpierw przedstawiał patofizjologię SLE i czynniki

w nią uwikłane, a następnie treści związane z diagnostyką i jej metodologią. Ogólnie jednak *Wstęp* napisany jest zwięźle, logicznie i przystępnie. Jest dobrym wprowadzeniem czytelnika w pryncypia problematyki rozwiniętej w dalszej części dysertacji.

*Założenie i Cele pracy*, podane w sposób zwięzły, syntetyczny i logiczny, wypływają z rozważań zawartych we wstępie. Autorka wytycza cele badania w postaci czterech konkretnie postawionych pytań:

1. Czy zmiany ilościowe i jakościowe cfDNA są związane z przebiegiem klinicznym SLE, w szczególności z rozwojem nefropatii.

2. Które parametry charakteryzujące cfDNA mają znaczenie kliniczne i mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce SLE.

3. Czy istnieje związek pomiędzy infekcją wirusem EBV a zmianami ilościowymi i jakościowymi cfDNA.

4. Czy istnieje związek pomiędzy infekcją wirusem EBV a przebiegiem klinicznym SLE.

Opisane cele są kompatybilne z założeniami badawczymi przedstawionych w kolejności prac, stanowiących osnowę dysertacji doktorskiej.

#### **Publikacja 1**

**Anna Truszevska, Bartosz Foroniewicz, Leszek Pączek. The role and diagnostic value of cell-free DNA in systemic lupus erythematosus. Clin Exp Rheumatol. 2017; 35(2): 330-336.**

To praca poglądowa stanowiąca przegląd piśmiennictwa i podsumowująca dotychczasowe dane na temat cirDNA w toczniu układowym. Zebrano w niej wyniki ponad 30 lat badań nad cirDNA w SLE. Praca pozwala na szybkie zapoznanie się z dotychczasowym stanem wiedzy, dając jednocześnie łatwy wgląd w metodologię stosowaną przez różne grupy badawcze. Jest to szczególnie ważne, ponieważ na przestrzeni lat stosowano różne metody izolacji i detekcji cirDNA. W pracy podkreślono konieczność wprowadzenia standaryzacji badań oraz przedstawiono aktualne teorie związane z rolą cirDNA w toczniu układowym i opisano potencjalne możliwości zastosowania oznaczeń cirDNA w jego diagnostyce.

## Publikacja 2

Anna Truszevska, Agnieszka Wirkowska, Kamila Gala, Piotr Truszewski, Łucja Krzemień-Ojak, Agnieszka Perkowska-Ptasińska, Krzysztof Mucha, Leszek Pączek, Bartosz Foroniewicz. **Cell-free DNA profiling in patients with lupus nephritis. Lupus. 2020; 29(13): 1759-1772. doi: 10.1177/0961203320957717.**

W drugiej zespołowej pracy oryginalnej po raz pierwszy opisano szereg cech charakteryzujących cfDNA w toczniu układowym oraz wskazano na istotne zależności pomiędzy profilem cfDNA a nefropatią toczniową. Na podstawie porównania istotnych danych 43 pacjentów z SLE i 50 zdrowych ochotników Autorzy określili, które parametry mają znaczenie kliniczne oraz mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu SLE. Praca zawiera dwa cenne aspekty: kliniczny i metodologiczny. Aspekt kliniczny związany jest z wyróżnieniem na podstawie przeprowadzonych analiz czterech parametrów odróżniających cfDNA pacjentów z SLE od cfDNA zdrowych ochotników i jednocześnie powiązanych z przebiegiem klinicznym choroby. Do cech tych należy stężenie i stosunek ilości kopii mtDNA w komórkach do ilości kopii mtDNA w osoczu, jednorodność fragmentacji cfDNA oraz obecność nietypowych fragmentów 54-149 bp i 209-297 bp. Profil cfDNA zbliżony do zdrowej populacji zaobserwowano u 30% pacjentów z SLE, natomiast około 50% pacjentów charakteryzował odmienny profil cfDNA. Pacjenci ze „zdrowym” profilem cfDNA mieli lepszą funkcję nerek oraz częściej brak wskazań do biopsji nerek lub LN klasy II lub III. Pacjenci z „odmiennym” profilem cfDNA mieli natomiast gorszą funkcję nerek i bardziej zaawansowana nefropatię lub byli po przeszczepieniu nerki z powodu niewydolności nerek w przebiegu LN. Omawiane wyniki wskazują, że profil cfDNA może być związany z przebiegiem LN a profilowanie cfDNA może być w przyszłości przydatne w diagnostyce i monitorowaniu progresji tej choroby.

Aspekt metodologiczny wiąże się z opracowaniem protokołu badawczego pozwalającego uniknąć problemów związanych z izolacją i detekcją cfDNA, zapewniającego optymalną wydajność tych procesów. Co jednak najważniejsze może się on przyczynić do wystandaryzowania badań mogących znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej. W pracy zaprezentowano wyniki potwierdzające konieczność rozróżniania frakcji cfDNA od cf-nDNA i stosowania jednoznacznej nomenklatury w literaturze. W omawianym badaniu całkowite

cfDNA w osoczu oznaczono metodą elektroforezy automatycznej z użyciem chipów mikroprzepływowych, natomiast frakcję cf-nDNA metodą PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) w oparciu o amplifikację genu beta-globiny. U pacjentów z wysokim współczynnikiem fragmentacji, stężenie cfDNA było istotnie różne od stężenia cf-nDNA, a przy stężeniu cfDNA powyżej 13 ng/ml (około 44% pacjentów) wynik otrzymywany podczas reakcji PCR był zawsze niższy, z różnicą sięgającą nawet 88 ng/ml. Można zatem przypuszczać, że oznaczenia wykonane metodą real-time PCR nie odzwierciedlały całkowitej ilości cząsteczek DNA w osoczu u pacjentów z wysokim stężeniem i fragmentacją cfDNA. Jest to ważna obserwacja, ponieważ detekcja DNA w osoczu oparta jest obecnie głównie na metodzie real-time PCR.

### **Publikacja 3**

**Anna Truszevska, Agnieszka Wirkowska, Kamila Gala, Piotr Truszewski, Łucja Krzemień-Ojak, Krzysztof Mucha, Leszek Pączek, Bartosz Foroniewicz. EBV load is associated with cfDNA fragmentation and renal damage in SLE patients. Lupus. 2021; doi: 10.1177/09612033211010339.**

Trzecia praca oryginalna wskazuje na istotne związki pomiędzy stężeniem i fragmentacją cfDNA, ilością kopii wirusa EBV w leukocytach krwi obwodowej i chorobą nerek u pacjentów z SLE. W pracy ponownie podkreślono potencjalną wartość diagnostyczną oznaczeń fragmentacji cfDNA, jak również po raz pierwszy wskazano na silne powiązanie tego parametru z ilością kopii wirusa EBV w leukocytach krwi obwodowej

W grupie pacjentów z podwyższonym poziomem cfDNA powyżej 6 ng/ml obserwowano niższe wartości eGFR i bardziej zaawansowane klasy LN. Wśród pacjentów z wysokim stężeniem cfDNA, ładunek EBV w leukocytach był istotnie wyższy u pacjentów z uszkodzeniem nerek w porównaniu do pacjentów bez tej patologii. Ładunek wirusa EBV dodatkowo korelował ze współczynnikiem fragmentacji u wszystkich pacjentów z SLE, a zależność ta była mocniej wyrażona w grupie pacjentów z nefropatią toczniową. W pracy wskazano zatem nowy kierunek do dalszych badań nad patogenezą nefropatii toczniowej.

*Wnioski*, stanowią precyzyjne odpowiedzi na założone na początku monografii cele i stanowią jej spinającą klamrę. Doktorantka przedstawiła je w pięciu punktach, które

przytoczę *in extenso*:

1. Profil cfDNA jest związany z przebiegiem klinicznym toczenia układowego.
2. Pacjenci z profilem cfDNA zbliżonym do profilu cfDNA zdrowej populacji mają lepszą funkcję nerek i łagodniejszy obraz histopatologiczny LN.
3. 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.
4. Profilowanie cfDNA może w przyszłości stanowić metodę diagnostyczną LN.
5. Ładunek EBV w leukocytach jest związany z fragmentacją i stężeniem cfDNA, a także obecnością przewlekłej choroby nerek u pacjentów z SLE.

Wnioski są merytorycznie zwarte i wynikają z przeprowadzonych badań i analiz. Są precyzyjne i obiektywne. Poprzedzone zostały przez bardzo informatywne *Podsumowanie*.

Należy również podkreślić, że na końcu dysertacji zostały dołączone podpisane oświadczenia wszystkich współautorów publikacji o indywidualnym wkładzie i zgodzie na wykorzystanie powyższych prac w przewodzie doktorskim lek. mgr biotech. Anny Marii Truszeńskiej. Widnieje również kopia zgody Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym na przeprowadzenie badań.

Dla porządku dodam, że piśmiennictwo do *Wstępu* liczy 51 pozycji i w zdecydowanej większości pochodzi z kilku ostatnich lat. Monografia jest starannie opracowana i została poprawnie zacytowana.

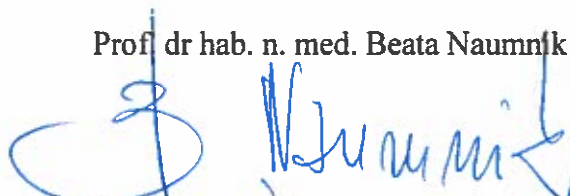
Moje podsumowanie dysertacji, którą miałam przyjemność recenzować jest jednoznaczne. Temat pracy, niezwykle aktualny i pożyteczny z punktu widzenia praktyki lekarskiej, jest bardzo dobrze wybrany. Jego realizację przeprowadzono bardzo starannie, z wykorzystaniem prawidłowego warsztatu badawczego i opublikowano w bardzo dobrych czasopismach.

Stąd mój jednoznaczny wniosek końcowy: praca pt. Rola oraz wartość diagnostyczna

pozakomórkowego DNA w toczeniu rumieniowatym układowym autorstwa lek. mgr biotech. Anny Marii Truszewskiej wykonana pod kierunkiem dr hab. n. med. Bartosza Foroncowicza spełnia wszystkie kryteria określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018r. poz. 595 z późn.zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1669 z późn.zm).

W związku z powyższym przedkładam Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lek. mgr biotech. Anny Marii Truszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na nowatorski charakter przeprowadzonych badań, bardzo trafne założenia oraz wnioski przekładające się bezpośrednio na praktykę kliniczną i wzbogacające możliwości diagnostyczne u chorych z SLE wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab. n. med. Beata Naumnik



Kierownik I Kliniki Nefrologii i Transplantologii z

Ośrodkiem Dializ Uniwersytetu Medycznego w

Białymstoku