

Gdańsk 03.09.2021

## **OCENA PRACY DOKTORSKIEJ**

**lek., mgr biotech. Anny Marii Truszewskiej**

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

Do oceny przedłożono rozprawę doktorską, stanowiącą cykl powiązanych tematycznie publikacji, w skład którego wchodzi jedna praca przeglądowa oraz dwie prace oryginalne o łącznym wskaźniku oddziaływania (IF) 7,7 oraz punktacji MEiN 225 pkt. Prace te umieszczono w liczącym 53 strony opisie rozprawy doktorskiej. Składa się on z: wykazu skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, założeń i celu pracy, kopii prac stanowiących rozprawę, podsumowania, wniosków, literatury i oświadczeń współautorów.

We wszystkich pracach pierwszym autorem jest doktorantka i jej wkład w powstawanie prac jest znaczący. W pracach oryginalnych zaprezentowano wyniki projektu badawczego pt. „Znaczenie infekcji wirusem Epsteina-Barr w patogenezie tocznia rumieniowatego układowego” o numerze 2012/07/N/NZ6/02954 zrealizowanego pod kierownictwem doktorantki i finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu PRELUDIUM 4.

Toczeń rumieniowaty układowy (SLE) jest chorobą o podłożu autoimmunologicznym, o wciąż nie w pełni wyjaśnionej patogenezie, charakteryzującą się szerokim spektrum objawów klinicznych. Generalnie uważa się, że genetycznie uwarunkowana podatność na bodźce środowiskowe odgrywa największą rolę. Impulsem zapoczątkowującym autoagresję może być między innymi infekcja. Wiele badań wskazuje na to, że ludzki herpeswirus Epsteina-Barr (EBV) jest zaangażowany w patogenezę SLE, a także innych chorób o podłożu autoimmunologicznym. 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. Opisano również zwiększoną ekspresję antygenów wirusa EBV w materiale biopsyjnym nerek pacjentów z nefropatią toczniową oraz związek pomiędzy infekcją EBV a ciężkością nefropatii.

SLE charakteryzuje się obecnością przeciwciał skierowanych przeciwko autoantygenom jądrowym. Przeciwciała anti-dsDNA są wysoce swoiste dla tocznia układowego i pełnią funkcję nośnika

cząsteczek krążącego DNA (*circulating DNA*, cirDNA) do komórek dendrytycznych, pozwalając na aktywację wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Rola cirDNA w SLE wciąż pozostaje jednak niewyjaśniona, a wyniki dotychczasowych badań są niespójne. Z uwagi na zdolność wirusa EBV do indukowania ekspresji interleukiny 8 w neutrofilach, można przypuszczać, że wirus EBV także może przyczyniać się do uwalniania cirDNA do krwiobiegu. Mitochondrialna frakcja cirDNA (cf-mtDNA) nie była dotychczas badana w SLE. Znaczenie tej frakcji może być jednak kluczowe dla poznania patogenezы SLE.

Biorąc pod uwagę złożoną i nie w pełni wyjaśnioną etiopatogenezę SLE i pojawiające się możliwości diagnostyczne podjęcie się badań mających na celu ustalenie roli i wartości diagnostycznej pozakomórkowego DNA (*cell-free DNA*, cfDNA) w SLE, oraz próba określenia zależności pomiędzy cfDNA, wirusem EBV w SLE jest w pełni uzasadnione.

We Wstępie Doktorantka szeroko i ze znajomością tematu oraz w oparciu o piśmiennictwo omawia dotychczasową wiedzę na temat diagnostyki SLE i powiązań pomiędzy etiopatogenezą SLE a infekcją EBV.

Opisuje wnikliwie frakcje zewnątrzkomórkowego DNA (*extracellular DNA*, exDNA) i zwraca uwagę na niejednorodną nomenklaturę, która prowadzi do pewnych rozbieżności w klasyfikacji poszczególnych frakcji exDNA. Najbardziej czynne immunologicznie jest DNA zamknięte w egzosomach. Uznanie budzi, że w badaniu, którego wyniki wchodzą w skład rozprawy doktorskiej, wprowadzono dodatkowy etap filtracji osocza - po takim filtrowaniu przygotowany materiał pozbawiony jest resztek komórkowych, organelli oraz dużych pęcherzyków pozakomórkowych, a wyizolowane cfDNA stanowi w większości niezwiązane z żadnymi strukturami (*free DNA*, fdNA) oraz DNA zamknięte w egzosomach. Taki podział jest szczególnie istotny w przypadku analizы mitochondrialnej frakcji DNA we krwi.

Doktorantka przyjęła hipotezę która zakłada, że cfDNA jest istotnym elementem w propagacji układowej reakcji zapalnej i rozwoju nefropatii toczniowej. W organizmie utrzymywany jest stan dynamicznej równowagi pomiędzy procesami uwalniania i usuwania cfDNA, a fizjologiczna ilość cfDNA nie indukuje odpowiedzi układu immunologicznego, natomiast zwiększona ilość cząsteczek cfDNA, uwalniana na przykład na skutek przewlekłego stanu zapalnego w tym np. infekcji wirusowej, może przekraczać wydolność układu immunologicznego i zaburzać tę równowagę. W badaniu przyjęto zatem hipotezę, która zakłada że zmiany w stężeniu i fragmentacji cfDNA mogą wynikać z

indukowanych przez wirusa modyfikacji procesów uwalniania cfDNA oraz aktywności wirusowych enzymów. Dodatkowo wirusowe białka mogą stymulować nieprawidłową odpowiedź patogennych przeciwciał anti-dsDNA, przyczyniając się w ten sposób do rozwoju nefropatii.

Doktorantka postawiła sobie cztery cele, które wynikają z założeń i hipotezy rozprawy. Postanowiła ocenić czy zmiany ilościowe i jakościowe cfDNA są związane z przebiegiem klinicznym SLE, w szczególności z rozwojem nefropatii, czy parametry charakteryzujące cfDNA mają znaczenie kliniczne i czy istnieje związek pomiędzy infekcją wirusem EBV a zmianami ilościowymi i jakościowymi cfDNA. Postanowiła również ocenić, czy istnieje związek pomiędzy infekcją wirusem EBV a przebiegiem klinicznym SLE.

Realizowała założenia dysertacji w pracach opublikowanych w renomowanych i recenzowanych czasopismach naukowych:

**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. (IF: 3,2; MEiN: 25 pkt.)

**2. Anna Truszevska, Agnieszka Wirkowska, Kamila Gala, Piotr Truszevski, 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. (IF: 2,25; MEiN: 100 pkt.)

**3. Anna Truszevska, Agnieszka Wirkowska, Kamila Gala, Piotr Truszevski, 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. (IF: 2,25; MEiN: 100 pkt.)

W cyklu tych prac Doktorantka omówiła dotychczasowy stan wiedzy na temat cirDNA w SLE, przedstawiła wyniki analizy laboratoryjnej frakcji cfDNA, w skład której wychodzi immunologicznie czynne fdDNA i egzosomalne DNA w grupie 43 chorych na SLE i w grupie 50 zdrowych ochotników

Publikacja 1. jest pracą przeglądową podsumowującą dotychczasowe informacje literaturowe na temat cirDNA w toczniu układowym. Doktorantka analizuje w niej wyniki około 30 lat badań nad cirDNA w SLE, opisuje różnorodną metodologię izolacji cirDNA. Doktorantka opisała również potencjalne możliwości zastosowania oznaczeń cirDNA w jego diagnostyce.

W publikacji 2., która jest pracą oryginalną, po raz pierwszy opisano szereg cech charakteryzujących cfDNA w SLE oraz wskazano na istotne zależności pomiędzy profilem cfDNA a nefropatią toczniową. W publikacji omówiono które parametry mają znaczenie kliniczne i mogą w przyszłości znaleźć

zastosowanie w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu SLE. Praca zawiera wiele nowatorskich odkryć, choćby zidentyfikowanie nietypowych fragmentów DNA związanych z aktywnością choroby, gorszą funkcją nerek i mianem przeciwciał anti-dsDNA. Współczynnik fragmentacji to nowy termin zaproponowany w omawianej pracy, który informuje o jednorodności fragmentacji cfDNA i jest wyliczany w oparciu o analizę długości fragmentów cfDNA metodą elektroforezy automatycznej z użyciem chipów mikroprzepływowych. Podsumowując, w pracy opisano związek pomiędzy niejednorodnym wzorem fragmentacji cfDNA a funkcją nerek i przebiegiem klinicznym tocznia, co stanowi istotną obserwację w kontekście możliwości stosowania cfDNA w diagnostyce i monitorowania przebiegu LN.

W publikacji 3. Autorzy wykazali istotne związki pomiędzy stężeniem i fragmentacją cfDNA, ilością kopii wirusa EBV w leukocytach krwi obwodowej (*peripheral blood leukocytes, PBLs*) 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 PBLs. Obserwacje te wskazują na silne powiązanie fragmentacji cfDNA z ładunkiem EBV w leukocytach, szczególnie u pacjentów z chorobą nerek. Jest to pierwsza i w chwili obecnej jedyna praca łącząca wirusa EBV z fragmentacją i stężeniem cfDNA. Udowodniono przyjętą wcześniej hipotezę która zakłada, że cfDNA jest istotnym elementem w propagacji układowej reakcji zapalnej i rozwoju nefropatii toczniowej.

Na podstawie wykonanych badań Doktorantka postawiła odpowiadające celom pracy wnioski. Zasadniczym jest wykazanie, że profil cfDNA jest związany z przebiegiem klinicznym SLE oraz rozwojem nefropatii toczniowej. Kolejnymi wykazanie związków pomiędzy infekcją wirusem EBV a przebiegiem klinicznym SLE. Doktorantka wskazuje również na uznanie profilowania cfDNA jako elementu diagnostyki w nefropatii toczniowej.

Opis dysertacji zawiera również zwięźle napisane streszczenia w języku polskim i angielskim i piśmiennictwo zawierające 59 aktualnych i właściwie cytowanych w tekście pozycji.

*W ocenie recenzenta:* przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma duże znaczenie naukowe i kliniczne. Doktorantka postawiła właściwe hipotezy, zaplanowała odpowiednią metodykę, przeanalizowała wyniki i wyciągnęła z nich wnioski. Wykazała, że profil cfDNA jest związany z przebiegiem klinicznym sLE, a analiza ilościowa i jakościowa cfDNA posiada dużą wartość

diagnostyczną w nefropatii toczniowej. W prezentowanej pracy po raz pierwszy przeprowadzono analizę mitochondrialnej frakcji cfDNA w SLE. Stwierdzono, że podwyższony stosunek mt/mt-cfDNA u pacjentów jest związany z gorszą funkcją nerek. Ta ważna obserwacja pokazuje, że analiza mitochondrialnej frakcji cfDNA może mieć wartość diagnostyczną w monitorowaniu przebiegu LN. Wykazała zależności pomiędzy funkcją nerek a niejednorodnym wzorem fragmentacji i wysokim stężeniem cfDNA oraz ładunkiem EBV, co może wskazywać na potencjalną rolę cfDNA w patogenezie LN, i że wirus EBV może być czynnie zaangażowany w patogenezę choroby. Wyniki prac są nowatorskie i wskazują dalsze kierunki badań nad diagnostyką SLE i patogenezą nefropatii toczniowej.

Podsumowując uważam, że przedstawiona do recenzji dysertacja prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie nauki medyczne oraz dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Uzyskane przez Autorkę wyniki są nowatorskie, poszerzają dotychczasową wiedzę na temat etiopatogenezy i diagnostyki SLE, w tym szczególnie nefropatii toczniowej i wskazują dalsze kierunki badań. W mojej opinii przedstawiona rozprawa **lek., mgr biotech. Anny Marii Truszewskiej** spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj.: Dz.U. z 2017 r., poz. 1789) 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 2018 r., poz. 1669) toteż zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie **lek., mgr biotech. Anny Marii Truszewskiej** do dalszych etapów postępowania. Ze względu na nowatorski charakter prac i znaczny wkład uzyskanych wyników w rozwój nauki wnoszę o wyróżnienie dysertacji.

Prof. dr hab. Alicja Dębska-Ślizień

Kierownik Katedry i Kliniki Nefrologii Transplantologii i Chorób Wewnętrznych

Gdański Uniwersytet Medyczny

Kierownik Katedry i Kliniki  
Nefrologii, Transplantologii  
i Chorób Wewnętrznych

Prof. dr hab. Alicja Dębska-Ślizień

