

# Autoreferat

Opis osiągnięć i dorobku naukowego

Dr n. biol. Sława Szostek

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum,

Katedra Mikrobiologii, Zakład Wirusologii

Kierownik Zakładu: Prof. dr hab. Magdalena Kosz-Vnenchak

Kraków, 2016

## 1. Imię i nazwisko: Sława Szostek

## 2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

- 1985 rok – uzyskanie magisterium z biologii, Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Kraków. Tytuł pracy magisterskiej: „Dobowe zmiany aktywności arylosulfatazy A i B w wątrobie szczura”, promotor – dr hab. Jacek Twardowski,
- 1989 rok – uzyskanie specjalizacji I stopnia z zakresu mikrobiologii, nr dyplomu 69/1989r. z prawem wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego nr 04050
- 1997 rok - uzyskanie tytułu doktora nauk biologicznych ze specjalnością mikrobiologia, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Wydział Lekarski. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Nowoczesne metody wykrywania zakażeń dróg rodnych wywołanych wirusem Papilloma”, promotor – prof. dr hab. Izabella Zgórniak-Nowosielska.

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

- 1985 – 1998, asystent i starszy asystent w Zakładzie Wirusologii Katedry Mikrobiologii, Wydział Lekarski Akademii Medycznej w Krakowie następnie Collegium Medicum UJ w Krakowie,
- 1998 – 2011, adiunkt w Zakładzie Wirusologii Katedry Mikrobiologii UJ CM w Krakowie,
- 2011 – nadal, starszy wykładowca w Zakładzie Wirusologii Katedry Mikrobiologii UJ CM w Krakowie.

#### 4. Przedstawienie osiągnięcia naukowego

Tytuł osiągnięcia naukowego wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

**„ Rola wybranych czynników infekcyjnych i polimorfizmu onkogenu E6 w procesie kancerogenezy komórek nabłonka szyjki macicy zakażonych wirusem brodawczaka ludzkiego typu 16”**

Większość badań była prowadzona w ramach projektu N N401 219034 finansowanego przez MNiSW w latach 2008 – 2012 oraz projektów prowadzonych w ramach dotacji Uczelni na działalność statutową.

##### 4.1. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

- 1) Szostek S., Klimek M., Zawilinska B., Kosz-Vnenchak M. (2008) Genotype-specific human papillomavirus detection in cervical smears. Acta Biochim Pol 55, 687-692.  
(IF = 1,448; MNiSW = 15 pkt.)

*Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na przeprowadzeniu oznaczeń metodą PCR i identyfikacji genotypów wirusa brodawczaka ludzkiego techniką hybrydyzacji na paskach nitrocelulozowych, zebraniu i przeanalizowaniu wyników oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy oceniam na 80%.*

- 2) Szostek S., Zawilińska B., Kopeć J., Kosz-Vnenchak M. (2009) Herpesviruses as possible cofactors in HPV16-related oncogenesis. Acta Biochim Pol 56, 337-342.  
(IF = 1,262; MNiSW = 15 pkt.)

*Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na sformułowaniu koncepcji badań, kierowaniem całą pracą doświadczalną, przeprowadzeniem zadań eksperymentalnych dotyczących ustalenia genotypu wirusa i postaci genomu HPV-16, na analizie wyników oraz opracowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy oceniam na 75%.*

- 3) Szostek S., Zawilińska B., Klimek M., Wójcik K., Koprynia M., Kosz-Vnenchak M. (2011) Różnicowanie postaci zintegrowanej i episomalnej DNA HPV-16 metodą real-

time PCR w wydzielinie szyjki macicy kobiet z rozpoznaną śród nabłonkową neoplazją rakiem szyjki macicy (Differentiation of an integrated and episomal HPV-16 DNA using real-time PCR in cervical specimens of women diagnosed with intraepithelial lesions and invasive cervical cancer). Ginekol Pol 82, 441-445.

**(IF = 0,411; MNiSW = 15 pkt.)**

*Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu zadań eksperymentalnych związanych z opracowaniem metody różnicowania postaci zintegrowanej i episomalnej DNA HPV przy użyciu metody real-time PCR oraz analizie wyników i napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy oceniam na 75%.*

- 4) Szostek S., Zawilinska B., Biernat-Sudolska M., Kopeć J., Kleszcz E., Koprynia M., Rojek-Zakrzewska D., Kosz-Vnenchak M. (2014) Differences in the expression of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E6 oncogene mRNA in SiHa cell line inoculated with CMV, HSV or ureaplasmas. Folia Biol (Kraków) 62, 73-78.

**(IF = 0,882; MNiSW = 15 pkt.)**

*Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na sformułowaniu koncepcji badań, zorganizowaniu całej pracy doświadczalnej, na przeprowadzeniu części doświadczeń obejmujących ocenę poziomu ekspresji onkogenu wirusowego w badanych komórkach metodą real-time PCR, na zebraniu i opracowaniu wyników oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy oceniam na 65%.*

- 5) Szostek S., Zawilińska B., Klimek M., Kosz-Vnenchak M. (2016) HPV16 E6 polymorphism and physical state of viral genome in relation to the risk of cervical cancer in women from the south of Poland. Acta Biochim Pol 63, doi.org/10.18388/abp.2016

**(IF = 1,187; MNiSW = 15 pkt.)**

*Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na sformułowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu zadań eksperymentalnych dotyczących ustalenia postaci genomu HPV-16, analizie sekwencji danego wariantu wirusa, opracowaniu wyników oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy oceniam na 80%.*

**Sumaryczny Impact Factor powyższych prac: 5,19 oraz 75 pkt MNiSW.**

#### 4.2 Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników.

Jednotematyczny cykl prac zatytułowany

**„ Rola wybranych czynników infekcyjnych i polimorfizmu onkogenu E6 w procesie kancerogenezy komórek nabłonka szyjki macicy zakażonych wirusem brodawczaka ludzkiego typu 16”**

obejmuje badania oceniające częstość występowania wybranego genotypu wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV-16) w narządzie rodnym kobiet z różnym zaawansowaniem zmian cytologicznych szyjki macicy oraz rakiem szyjki macicy, jak również ocenę jego znaczenia w procesie onkogenezy. Rola tego genotypu w kancerogenezie szyjki macicy była badana w powiązaniu z postacią genomu wirusowego oraz występowaniem innych czynników infekcyjnych - wirusów z rodziny *Herpesviridae* oraz atypowych bakterii z rodzaju *Ureaplasma*. Przeanalizowano również stopień polimorfizmu sekwencji kodującej onkogen E6 HPV-16 w powiązaniu z oceną jego znaczenia u kobiet z rakiem szyjki macicy i kobiet ze zmianami o małym stopniu zaawansowania (LSIL).

Neoplazja szyjki macicy jest procesem złożonym i wieloczynnikowym, w którym rolę inicjującą przypisuje się głównie wirusowi brodawczaka ludzkiego (ang. human papillomavirus, HPV), szczególnie HPV-16. Wirus typu 16 klasyfikowany jest do gatunku *Alphapapillomavirus-9*, rodziny *Papillomaviridae*. Jest to mały (52-55 nm), nie posiadający osłonki wirus zawierający dwuniciowy, kolisty DNA o długości około 8 kpz. Wirusowy genom składa się z regionu wczesnego (geny wczesne: E1, E2, E4, E5, E6, E7), regionu późnego (geny późne (L1, L2) i regionu kontrolnego LCR (ang. non-coding long control region). Klasyfikacja HPV została oparta na genetycznym podobieństwie sekwencji DNA kodującej białko kapsydu L1 co pozwoliło na identyfikację ponad 100 genotypów związanych z zakażeniami błon śluzowych i skóry człowieka. W obrębie narządu płciowego występuje około 30 genotypów HPV, które ze względu na częstość występowania w zmianach przednowotworowych i nowotworowych podzielono na te o:

- wysokim potencjale onkogennym HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 i 82
- prawdopodobnym wysokim potencjale onkogennym HPV 26, 53, 66
- niskim potencjale onkogennym HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 [Bosch i wsp. 2002, Munoz i wsp. 2003, Bernard i wsp. 2010].

Rak szyjki macicy stanowi w Polsce nadal poważny problem epidemiologiczny. Pomimo, że liczba zachorowań stopniowo obniża się, pozostaje jednak wciąż na wysokim poziomie w porównaniu z innymi krajami europejskimi. Według danych z 2012 roku, Polska plasuje się na 24 miejscu wśród 40 krajów europejskich, z zapadalnością 15,3 na 100 000 w porównaniu do średniej krajów Unii Europejskiej 11,3 na 100 000 i chociaż od początku lat 80-tych XX wieku obserwuje się spadek umieralności z powodu raka szyjki macicy we wszystkich grupach wiekowych, to nadal umieralność w Polsce jest 2 razy wyższa niż przeciętna dla krajów Unii Europejskiej [Ferlay i wsp. 2013]. Na rolę wysokoonkogennych typów papillomawirusów, a szczególnie HPV-16, w inicjacji procesu transformacji nowotworowej szyjki macicy wskazują wyniki badań epidemiologicznych pochodzące z różnych regionów geograficznych [Clifford i wsp. 2003a, Clifford i wsp. 2003b]. W Polsce badania dotyczące występowania poszczególnych genotypów papillomawirusów w nabłonku szyjki macicy kobiet nie były przed rokiem 2008 prowadzone na szeroką skalę i ograniczały się tylko do określonych województw [Dudkiewicz i wsp. 2001; Liss i wsp. 2002; Dybikowska i wsp. 2002; Bardin i wsp. 2002] i dlatego

w pracy nr 1. pt. **“Genotype-specific human papillomavirus detection in cervical smears”** podjęłam próbę oceny częstości występowania poszczególnych genotypów wirusa brodawczaka ludzkiego występujących w komórkach nabłonka szyjki macicy u kobiet z terenu Polski południowej, w zależności od zaawansowania zmian cytologicznych. Badania przeprowadzone u kobiet ze zdiagnozowaną śródnabłonkową neoplazją szyjki macicy, rakiem szyjki macicy oraz w grupie kontrolnej (bez zmian cytologicznych) potwierdziły obecność 19 różnych genotypów HPV w badanych materiałach. Najczęściej wykrywano DNA HPV-16, a następnie HPV-51 i HPV-52. Zakażenia mieszane, spowodowane 2-5 różnymi genotypami wirusa potwierdzono u prawie 50% badanych kobiet. Dominowały one w grupie kontrolnej oraz u kobiet ze zmianami o małym stopniu zaawansowania. Wraz z progresją zmian śródnabłonkowych następowała redukcja liczby wykrywanych genotypów oraz selekcja wysokoonkogennych wirusów, z dominacją HPV-16 jako jedyne wykrywanego genotypu u kobiet z rakiem szyjki macicy.

Proces onkogenezy związany z zakażeniem HPV jest szeroko badany na poziomie molekularnym. Wykazano, że warunkiem progresji zmian śródnabłonkowych szyjki macicy jest przetrwała infekcja wirusowa, z wysoką ekspresją onkogenów E6 i E7 HPV oraz produkcją znacznych ilości wirusowych białek onkogennych E6/E7 [Ganguly i wsp. 2009].

Wirusowe onkoproteiny mają zdolność wiązania się z komórkowymi produktami genów supresorowych p53 i pRb, co prowadzi do zaburzenia cyklu komórkowego, blokowania procesów apoptozy, a następnie transformacji komórek nabłonkowych [Dyson i wsp. 1989, Scheffner i wsp. 1990, Magal i wsp. 2005]. W większości zakażeń wysokoonkogennymi typami HPV wzrost ekspresji sekwencji E6 i E7 występuje po integracji wirusa z genomem komórki gospodarza. W tym procesie następuje uszkodzenie otwartej ramki odczytu E2, rzadziej E1, co wpływa na zahamowanie funkcji tych genów i niekontrolowaną ekspresję wirusowych onkogenów E6 i E7.

Wysoka częstość występowania HPV o wysokim potencjale onkogennym (76/90 HPV+; 84%) u kobiet w populacji Polski południowej, co wykazano w pracy nr 1. pt. „*Genotype-specific human papillomavirus detection in cervical smears*”, skłoniła mnie do opracowania metody oceniającej postać genomu wirusa (postać zintegrowana, mieszana, episomalna) jako czynnika ryzyka progresji zmian śródnabłonkowych szyjki macicy do raka szyjki macicy. Pierwsze badania polegały na jednoczasowej amplifikacji genu regulatorowego E2 i onkogenu E6 HPV-16 w danym izolacie DNA pochodzącym z materiału klinicznego, z zastosowaniem metody multiplex PCR i komputerowej oceny półilościowej uzyskanych produktów amplifikacji, na podstawie intensywności ich świecenia po rozdziale elektroforetycznym [Szostek i wsp. 2008 - ze spisu publikacji poza głównym osiągnięciem naukowym].

W późniejszej pracy nr 3. pt. „**Różnicowanie postaci zintegrowanej i episomalnej DNA HPV-16 metodą real-time PCR w wydzielinie szyjki macicy kobiet z rozpoznaną śródnabłonkową neoplazją i rakiem szyjki macicy**” opracowano i opisano metodę ilościową wykrywania postaci genomu HPV (zintegrowana, mieszana i episomalna) w oparciu o stosunek liczby kopii sekwencji E2 i E6 w badanym izolacie DNA. Metodą PCR w czasie rzeczywistym szacowano także stopień zaawansowania infekcji poprzez określenie wirusowego ładunku (viral load) w zakażonych komórkach nabłonka. Uzyskane wyniki korelowano ze stopniem zaawansowania zmian śródnabłonkowych i rakiem szyjki macicy. Zaobserwowano znamienne różnice średnich ilości kopii wirusa w grupie kobiet z LSIL i HSIL (ang. high-grade squamous intraepithelial lesion) w porównaniu z rakiem szyjki macicy ( $p < 0,001$ ). U kobiet ze zintegrowaną postacią genomu HPV-16 wykrywano najwyższe wartości liczby kopii wirusa. Wykazano również, że częstość występowania postaci zintegrowanej genomu HPV-16 wzrastała znamienne wraz z zaawansowaniem zmian dysplastycznych szyjki macicy ( $p < 0,001$ ). Zwrócono także uwagę na stosunkowo wysoki udział mieszanych postaci (zintegrowana i episomalna w jednym izolacie) genomu HPV-16 u

młodych kobiet ze zmianami o małym stopniu zaawansowania, co sugerowałoby że integracja jest możliwa już na wczesnym etapie procesu nowotworzenia szyjki macicy.

Chociaż zakażenia HPV są szeroko rozpowszechnione w narządzie rodnym młodych kobiet, to często mają one charakter przejściowy z samoistną eliminacją wirusa [Moscicki i wsp. 2004, Brown i wsp. 2005]. Szacuje się, że do przetrwałej infekcji HPV dochodzi tylko u 5-10% zakażonych kobiet, co sugeruje rolę innych czynników decydujących o tej formie zakażenia. Spośród nich najczęściej wskazuje się na znaczenie typu HPV i jego potencjału onkogenego, młodego wieku rozpoczęcia kontaktów płciowych, liczby partnerów seksualnych, palenia tytoniu, długiego okresu stosowania hormonalnych środków antykoncepcyjnych, immunosupresji np. związanej z zakażeniem HIV [Castellsagué X. 2008]. Proces kancerogenezy szyjki macicy jest złożony i wieloczynnikowy wobec tego poszukiwanie kofaktorów rokowniczych pozwalających na identyfikację kobiet najbardziej zagrożonych transformacją nowotworową szyjki macicy jest ważne z punktu widzenia klinicznego. Jakkolwiek już inni autorzy zwracali uwagę, że współistniejące zakażenia przenoszone drogą płciową mogą być istotne w progresji zmian przednowotworowych, co zostało potwierdzone na przykładzie *Chlamydia trachomatis*, to nadal kwestia ta jest ciągle dyskutowana [Mendoza i wsp. 2014, Vielot i wsp. 2015, Wohlmeister i wsp. 2016, Liu i wsp. 2016, de Abreu i wsp. 2016].

Badania serologiczne przeprowadzone już w latach 60. i 70. XX wieku zwracały uwagę, że u kobiet posiadających przeciwciała swoiste dla wirusa Herpes simplex 2 (HSV-2) wystąpienie raka szyjki macicy wiązało się z 2-3 krotnie wyższym ryzykiem niż u kobiet seronegatywnych [Rawls i wsp. 1986]. W badaniach przeprowadzonych *in vitro* uzyskano transformację nowotworową komórek nabłonka szyjki macicy immortalizowanych HPV po ich stymulacji poprzez trwałą integrację subfragmentami Xho2, uzyskanymi po cięciu enzymami restrykcyjnymi genomu HSV-2 (DiPaolo i wsp. 1998). Również udział ludzkiego wirusa cytomegalii (CMV) w powstawaniu zmian dysplastycznych i nowotworowych próbowano potwierdzić w eksperymentach przeprowadzanych na modelu mysim [Heggie i wsp. 1986]. Ukazały się także pojedyncze prace sugerujące rolę wirusa Epsteina-Barr (EBV) w etiopatogenezie raka szyjki macicy na podstawie danych epidemiologicznych wykrywających swoiste przeciwciała lub obecności wirusowego DNA i jego transkryptów [Sagawa i wsp. 2000, Szkaradkiewicz i wsp. 2004, Prayitno A. 2006, Aromseree i wsp. 2015]. Celem pracy nr 2. pt. „**Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16-related oncogenesis**” była ocena występowania zależności pomiędzy postacią genomu HPV-16 a



równoczesną infekcją komórek nabłonka szyjki macicy wirusami z rodziny *Herpesviridae* (CMV, EBV, HSV-1, HSV-2, HHV-6, HHV-7) u kobiet ze zmianami przednowotworowymi i z rakiem szyjki macicy.

Wykazano u 72% HPV-16 pozytywnych kobiet występowanie koinfekcji z herpeswirusami. U ponad połowy tych pacjentek (52%) wykryto zakażenie szyjki macicy wirusem cytomegalii, u 22% wirusem Epsteina-Barr, u 14,5% HHV-7, u 10% HHV-6, a najrzadziej HSV-1 (5%) i HSV-2 (4%). Współistnienie HPV-16 z pojedynczym herpeswirusem wykazano u 60% badanych i najczęściej była to infekcja CMV (61,5%), następnie EBV (15%), HHV-7 (11,5%), HHV-6 (7,6%), HSV-1 (3,8%). Obecność dwóch herpeswirusów wykryto u 37% badanych kobiet, przy czym w 50% przypadków był to CMV i EBV. Wirusy te najczęściej występowały w grupie kobiet z rakiem szyjki macicy w porównaniu z LSIL ( $p < 0.004$ ) i grupą z HSIL ( $p < 0.006$ ) a ich obecność wiązała się odpowiednio z 6- i 7-krotnym ryzykiem wystąpienia postaci mieszanej lub zintegrowanej genomu HPV-16. Na tej podstawie wysunięto wniosek, że zakażenia herpeswirusami szyjki macicy, a szczególnie wirusem cytomegalii i/lub Epsteina-Barr sprzyjają integracji HPV-16, co może przyczyniać się do inicjacji i rozwoju raka szyjki macicy.

Badania ostatnich lat zwracają również uwagę na skład mikrobiomu pochwy i przewodu pokarmowego w rozwoju nowotworów narządu rodowego. Wzrost pH wydzieliny pochwy może być związany nawet z 30% wyższym ryzykiem rozwoju zmian dysplastycznych małego stopnia komórek nabłonkowych [Clark i wsp. 2012]. U kobiet HPV-dodatnich wykazano większe zróżnicowanie gatunkowe środowiska pochwy, co może mieć związek z utrzymaniem przetrwałej infekcji wirusowej [Gao i wsp. 2013]. Ponadto Brotman i wsp. 2014 potwierdzili w badaniach wielokrotnie powtarzanych przez 16 tygodni, że dominacja *Lactobacillus gasseri* w mikrobiomie kobiet aktywnych seksualnie wpływała istotnie na eliminację zakażenia HPV.

Już w 1993 roku wykrywałam częściej zakażenia ureaplazmami u kobiet ze śródnabłonkową neoplazją szyjki macicy w porównaniu z grupą kontrolną. [Szostek i wsp. 1993, ze spisu publikacji poza głównym osiągnięciem naukowym]. Ewentualna kooperacja ureaplazm w onkogenezie szyjki macicy jest w literaturze rzadko podejmowana, prawdopodobnie ze względu na przyjęty dla tej grupy drobnoustrojów status składnika flory fizjologicznej. Jednak nasze późniejsze badania przeprowadzone na większej grupie pacjentek (N=387) wykazały, że ryzyko zakażenia wysokoonkogennymi typami HPV wzrastało prawie 5-krotnie u kobiet równocześnie zakażonych *Ureaplasma urealyticum* [Biernat-Sudolska i wsp. 2011 ze

spisu publikacji poza głównym osiągnięciem naukowym]. Mechanizm tego oddziaływania nie został jeszcze poznany i nie wiadomo, czy dochodzi tutaj do bezpośredniej interakcji innych czynników infekcyjnych na molekularne mechanizmy wirusowej patogenezы HPV, czy też współistniejące patogeny potęgują zaburzenia prawidłowego cyklu komórkowego wywołane onkoproteinami wirusowymi, co w konsekwencji może prowadzić do niekontrolowanej proliferacji i transformacji nowotworowej. Odpowiedź na te pytania mogą przynieść kolejne badania.

Dlatego też w pracy nr 4. pt. „**Differences in the Expression of Human Papillomavirus Type 16 (HPV-16) E6 Oncogene mRNA in SiHa Cell Line Inoculated with CMV, HSV or Ureaplasmas**” próbowałam odpowiedzieć na pytanie czy czynniki infekcyjne takie jak ureaplazmy (*Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*) oraz wirusy opryszczki i cytomegalii mogą prowadzić do zmian w ekspresji onkogenu E6 HPV-16. Badanie przeprowadzono na modelu komórkowym, w linii komórek SiHa wywodzących się z raka szyjki macicy i charakteryzującej się występowaniem zintegrowanego genomu HPV-16 w ilości 1-2 kopii wirusa na komórkę. Hodowle inokulowano oddzielnie sześcioma różnymi patogenami: HSV-1 i HSV-2, CMV szczepami Town i AD169 oraz *Ureaplasma parvum* i *Ureaplasma urealyticum*. Po 24 godzinach inkubacji izolowano całkowite RNA i poddawano odwrotnej transkrypcji. Ilościową ocenę poziomu ekspresji mRNA onkogenu E6 HPV-16 w komórkach SiHa przeprowadzono metodą real-time PCR i standaryzowano jego ilość z poziomem ekspresji komórkowego genu regulatorowego GAPDH (ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, gen kodujący dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego). Wykazano około 1,5 – krotny, nieznamienny statystycznie wzrost mRNA onkogenu E6 HPV-16 w hodowlach SiHa inokulowanych HSV-1 i HSV-2 w porównaniu z poziomem ekspresji E6 w niezakażonych komórkach kontrolnych. W przypadku obu szczepów wirusa cytomegalii obserwowano brak wpływu lub nieznaczną redukcję poziomu mRNA E6. Poziom mRNA E6 HPV-16 w hodowli SiHa inokulowanej *Ureaplasma parvum* nie uległ zmianie natomiast prawie pięciokrotny wzrost ekspresji tego onkogenu obserwowano w przypadku obecności *Ureaplasma urealyticum*. Uzyskane wyniki po raz pierwszy pokazały, że obecność *Ureaplasma urealyticum* w drogach rodnych kobiet może wpływać na nadekspresję onkogenu E6 HPV-16.

Badania ostatnich lat koncentrują się także na znaczeniu genetycznych zmian w obrębie sekwencji genomów wysookonkogennych typów HPV, ich zróżnicowanej dystrybucji w różnych regionach świata i ich ewentualnym związku z rozwojem raka szyjki macicy.

Celem kolejnej pracy nr 5. pt. „**HPV16 E6 polymorphism and physical state of viral genome in relation to the risk of cervical cancer in women from the south of Poland**”

była ocena polimorfizmu onkogenu E6 HPV-16 i analiza postaci genomu (forma zintegrowana, mieszana, episomalna) wykrywanych wariantów wirusowych u kobiet z rakiem szyjki macicy w porównaniu z grupą kobiet ze zmianami o niskim stopniu zaawansowania (LSIL).

Wśród badanych 80 kobiet wykryto 12 różnych wariantów onkogenu E6 HPV-16, w tym 96% należało do typu europejskiego (EUR), pozostałe zakwalifikowano do typu północno-amerykańskiego (NA1). Spośród wariantów europejskich tylko 34% było identycznych z sekwencją prototypową (EUR-350T). Warianty z mutacją T350G dominowały i występowały z podobną częstością u kobiet z rakiem szyjki macicy (67,5%) i LSIL (60%). Analiza sekwencji onkogenu E6 wykazała w 34% badanych materiałach substytucje 9 różnych nukleotydów (G122A, T137G, G145T, C153T, G176A, G188A, T295G, C335T, T350G) prowadzące do zmian aminokwasów oraz 4 ciche mutacje, wśród których najczęściej wykrywano T109C (16%). Zidentyfikowano nie opisane wcześniej w literaturze, dodatkowe punktowe mutacje w pozycjach G122A, C153T oraz G188A występujące w onkogenie E6 wariantów europejskich. Te nowe warianty zostały zgłoszone do bazy danych GenBank. Częstość wykrywanych zmian nukleotydowych w wariantach EUR-350G była znamienne wyższa (w 24/48 materiałów) w porównaniu do sekwencji EUR-350T (3/29 materiałów). Nie wykazano znamienych różnic w średniej liczbie mutacji w przeliczeniu na próbkę w grupach badanych kobiet. Natomiast potwierdzono, że mutacje ciche (synonimiczne) znamienne częściej występowały u kobiet z LSIL i ich obecność 6-krotnie zwiększała prawdopodobieństwo wystąpienia zmian o małym stopniu nasilenia.

Wszystkie warianty typu NA1 (n=3) charakteryzowały się mieszaną postacią genomu wirusa. Postać mieszana dominowała także w wariantach EUR-350G. Wśród próbek z episomalną formą wirusowego DNA najczęściej występowała sekwencja prototypowa EUR-350T (brak mutacji) badanego onkogenu. Mutacje niesynonimiczne częściej były obserwowane w materiałach zawierających mieszaną lub zintegrowaną postać wirusowego DNA w porównaniu z postacią episomalną. Różnice te były istotne statystycznie ( $p=0,002$ ).

Wieloczynnikowa analiza dystrybucji wariantów w zależności od postaci genomu HPV-16 i rozpoznania klinicznego wykazała, że w próbkach raka szyjki macicy ze zintegrowaną postacią najczęściej był wykrywany prototyp EUR-350T (43%) lub EUR-350G bez dodatkowych mutacji (47%). Wyniki te w porównaniu do pozostałych wariantów były istotne statystycznie (odpowiednio  $p = 0,001$  i  $p = 0,004$  (przy  $df = 2$ ), Pearson  $\chi^2$ ).

Wyniki pracy pozwoliły na wysunięcie następujących wniosków:

- W badanej populacji kobiet z Polski południowej głównie występują europejskie warianty onkogenu E6 HPV-16.
- Występowanie dodatkowych mutacji punktowych w sekwencji kodującej onkogen E6 znamienne częściej obserwowane w wariantach EUR-350G w porównaniu do wariantów EUR-350T może wskazywać na istotną rolę tego miejsca (T350G) w promowaniu zmienności sekwencji onkogenu E6.
- Dominacja sekwencji prototypowej EUR-350T i wariantu EUR-350G bez dodatkowych zmian nukleotydowych u kobiet z rakiem szyjki macicy i postacią zintegrowaną genomu HPV-16 może sugerować o predyspozycji tych wariantów do integracji wirusa z genomem komórki gospodarza.

### **Wnioski końcowe**

Przeprowadzony cykl badań pozwolił na wyłonienie dodatkowych czynników prognostycznych, ułatwiających ocenę ryzyka progresji zmian śród nabłonkowych szyjki macicy u kobiet zakażonych wysoko onkogennym typem HPV-16, mających również znaczenie praktyczne, które może być wykorzystane w przygotowaniu zaleceń służących profilaktyce raka szyjki macicy.

1. Potwierdzenie, że wraz z postępem zmian w komórkach nabłonka szyjki macicy następuje selekcja typów HPV do pojedynczego wysoko onkogenego wirusa wskazuje, że u kobiet HPV-pozytywnych wielokrotnie powtarzane genotypowanie HPV ma znaczenie prognostyczne.
2. Wysoka częstość występowania mieszanych postaci genomu HPV u kobiet z zaawansowanymi zmianami i rakiem szyjki macicy sugeruje, że nie tylko postać zintegrowana ale również mieszana może być traktowana jako dodatkowy czynnik ryzyka progresji zmian cytologicznych szyjki macicy i może być użytecznym markerem w selekcji kobiet narażonych na progresję zmian przednowotworowych do raka szyjki macicy.
3. Współistnienie HPV z zakażeniami herpeswirusowymi narządu rodowego, szczególnie wirusem cytomegalii i EBV, sprzyja integracji DNA HPV do genomu komórki

nabłonkowej szyjki macicy, co może przyczyniać się do przetrwania wirusa i inicjacji zmian przednowotworowych i nowotworowych.

4. Nadekspresja onkogenu E6 HPV-16 w obecności *Ureaplasma urealyticum* potwierdzona w badaniach *in vitro*, może być dowodem na udział tego drobnoustroju w inicjacji procesu onkogenezy związanej z zakażeniem HPV.
5. Opierając się na wniosku nr 3 i nr 4 można wysunąć sugestię, że u kobiet z rozpoznaniem zmian cytologicznych szyjki macicy konieczne jest wykonywanie badań w kierunku zakażeń herpeswirusowych jak i mykoplazmowych wraz z oceną ilościową *Ureaplasma urealyticum* w celu właściwej oceny ryzyka progresji zmian śród nabłonkowych szyjki macicy i ewentualnego wdrożenia skutecznego leczenia przeciwdrobnoustrojowego.
6. Ocena polimorfizmu HPV-16 w sekwencji onkogenu E6 potwierdziła, że dodatkowe mutacje punktowe występują częściej w wariantach europejskich z mutacją T350G. Obserwacje te mogą wskazywać na istotną rolę guaniny w pozycji 350 w promowaniu zmienności sekwencji onkogenu E6.
7. Badania pokazały, że wystąpienie zmian nukleotydowych (za wyjątkiem T350G) w sekwencji onkogenu E6 HPV-16 wiąże się z mniejszym prawdopodobieństwem rozwoju raka szyjki macicy a brak mutacji zwiększa prawdopodobieństwo integracji wirusowego DNA do genomu komórki gospodarza. Z tego względu analizę polimorfizmu onkogenu E6 HPV-16 można traktować jako czynnik prognostyczny rozwoju raka szyjki macicy.
8. Ponadto, ze względu na wysoką częstość występowania typów wysokoonkogennych HPV, szczególnie genotypu HPV-16 w populacji kobiet z Polski południowej konieczne jest zintensyfikowanie działań propagujących swoistą profilaktykę zakażeń HPV, nie tylko przez ginekologów ale także pediatrów. Przy braku refundowanych szczepień celowana edukacja skierowana do nastolatek i młodych kobiet jest ważnym działaniem w profilaktyce raka szyjki macicy.

**Kierunki badań prowadzonych aktualnie i plany na najbliższy czas.**

Obecnie w ramach projektu badań statutowych podjęłam próbę oceny w badaniach prospektywnych tempa progresji zmian szyjki macicy u kobiet z infekcją wywołaną różnymi wariantami HPV-16. W trakcie kontrolnych badań monitorowany będzie polimorfizm genów E2, E6, LCR w celu oszacowania ewentualnych punktowych zmian w odpowiednich sekwencjach w próbkach pobranych w różnych odstępach czasowych. Na każdym etapie badań, wyniki będą korelowane z występującymi współzakażeniami herpeswirusami i bakteriami z rodzaju *Mycoplasmataceae*.

Oddziaływanie ureaplazm na ekspresję onkogeny E6 HPV-16 będzie także celem moich pogłębianych badań, które być może wyjaśnią mechanizm umożliwiający przetrwanie zakażenia wirusowego w komórkach nabłonka szyjki macicy. Badania na poziomie komórkowym dotyczyć będą oddziaływań ureaplazm na ekspresję onkogenów E6/E7 HPV-16 poprzez mechanizm cytokinowy i szlaki sygnałowe komórki. W dalszej przyszłości planuję uzyskane wyniki porównać z innymi genotypami HPV o wysokim potencjale onkogennym.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

### A. Dane bibliometryczne

Jestem autorem lub współautorem **45** publikacji naukowych w tym **28** oryginalnych prac twórczych i jednego opisu przypadku, pozostałe to prace pogładowe (6) i rozdziały w podręcznikach (10). Jestem również autorem lub współautorem 9 pełnotekstowych prac, które ukazały się w ramach materiałów konferencyjnych (załącznik nr 3). Miałam również zaszczyt dołączyć do grona współautorów takich publikacji popularnonaukowych jak Encyklopedia Biologiczna oraz Słownik Biologii Komórki.

Łączna punktacja MNiSW wszystkich prac wynosi **263 pkt.**

Jestem również autorem lub współautorem 69 doniesień zjazdowych w tym 19 prezentowanych na zjazdach międzynarodowych i 50 na konferencjach krajowych.

Sumaryczny Impact Faktor : **13,977**

Liczba cytowani wg Web of Science Core Collection: **85**

Indeks Hirscha wg Web of Science Core Collection: **6**

### B. Tematyka pozostałych prac badawczych

Pierwsze doświadczenia badawcze zdobywałam pod kierunkiem Pani prof. dr hab. med. Izabelli Zgórnika-Nowosielskiej. Zostałam włączona do prac zespołu zajmującego się oceną konsekwencji zakażenia wirusem różyczki kobiet w ciąży. Badania były prowadzone w dwóch okresach epidemicznych w Polsce, w latach 1985-86 i 1991-92. Spośród około sześciuset kobiet ciężarnych, które miały kontakt z wirusem, zakażenie potwierdzono metodami serologicznymi u 12% kobiet. Przeanalizowano następstwa tego zakażenia dla 55 kobiet i ich potomstwa. U dzieci zakażonych w I lub II trymestrze ciąży dominującą wadą wrodzoną była głuchota. Późne następstwa różyczki wrodzonej oceniono po 7 latach, co było tematem kolejnej pracy. Dzięki badaniom kontrolnym ujawniono dodatkowo u 6 dzieci uszkodzenia słuchu o różnym stopniu nasilenia. Wyniki rozwoju intelektualnego dzieci dotkniętych zakażeniem wrodzonym nie odbiegały od normy populacyjnej, co prawdopodobnie związane było z tym, że dzieci te już od momentu urodzenia objęto wielospecjalistyczną opieką i mogły być wcześniej zaopatrzone w aparaty słuchowe.

Wyniki omawianych badań zostały zaprezentowane w następujących pracach:

1. **Zgórniak-Nowosielska I., Zawilińska B., Rojek-Zakrzewska D., Kryczko E., Szostek S. (1998) Consequences of rubella infection in pregnant women in Poland. *Alpe Adria Microbiol. J* 7, 29-34.**
2. **Zgórniak-Nowosielska I., Zawilińska B., Szostek S. (1996) Rubella infection during pregnancy in the 1985-86 epidemic: Follow-up after seven years. *Eur J Epidemiol* 12, 303-308.**

Wyniki badań będące tematem dwóch powyższych publikacji pozwoliły na zwrócenie uwagi na problem występującej w Polsce różyczki wrodzonej i pilną potrzebę wdrożenia badań przesiewowych u kobiet w wieku rozrodczym, w celu ewentualnej immunizacji przed planowaną ciążą. Było to bardzo istotne w tym okresie, gdyż szczepionka przeciwko różyczce została włączona do kalendarza szczepień dopiero w 1989 roku i tylko dla dziewcząt w wieku 13 lat.

Uczestniczyłam także w przygotowaniu ekspertyzy (DOT/E/1) dla Ministerstwa Zdrowia i Opieki Społecznej na temat „Profilaktyki zakażeń wirusem różyczki u kobiet w wieku rozrodczym”. Na podstawie oceny skuteczności szczepionki przeciwko różyczce, którą podawano w pojedynczej dawce w ramach badań pilotażowych studentkom i uczennicom szkół medycznych, zwrócono uwagę na konieczność wprowadzenia dawki przypominającej, w celu zapewnienia ochronnego poziomu przeciwciał, który skutecznie zapobiegałby zakażeniu w wieku prokreacyjnym.

Odrębnym tematem moich zainteresowań są zakażenia herpeswirusami. Uczestniczyłam w badaniach kierowanych przez dr hab. Barbarę Zawilińską, dotyczących znaczenia wirusa Epsteina-Barr (EBV) dla pacjentów po allogenicznym przeszczepie szpiku kostnego (w ramach projektu badawczego KBN, 3P04C02325). Na podstawie badań serologicznych i molekularnych stwierdzono powszechne występowanie tego zakażenia, szczególnie w pierwszym roku po transplantacji i często ze współtowarzyszącym mu wirusem cytomegalii (CMV). Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków: dominującym typem EBV w polskiej populacji jest typ 1; rozpoznanie aktywnego zakażenia u pacjentów leczonych przeszczepieniem komórek hematopoetycznych wymaga zastosowania ilościowych metod molekularnych; częsta, równoczesna obecność EBV i CMV może wskazywać na wzajemne oddziaływania tych wirusów co przedstawiono w pracy:

**Zawilińska B., Piątkowska-Jakubas B., Kopeć J., Daszkiewicz E., Kleszcz E., Szostek S., Mensah-Glanowska P., Hawrylecka D., Skotnicki A. (2006) Zakażenia**



**wirusem Epsteina- Barr (EBV) u pacjentów leczonych allogenicznym przeszczepieniem komórek hemopoetycznych (allo-HCT). Przegląd Epidemiol 60, 87-92.**

W kolejnych badaniach podjęto próbę określenia wpływu limfotropowych herpeswirusów (EBV, HHV-6, HHV-7) na przebieg aktywnego zakażenia CMV u pacjentów po przeszczepieniu komórek hematopoetycznych. Obserwowano, że poszczególne limfotropowe herpeswirusy uaktywniają się sekwencyjnie w kolejnych miesiącach po transplantacji i że równoczesna obecność, szczególnie HHV-7 może predysponować do rozwoju przewlekłego zakażenia CMV. W kolejnych badaniach była oceniana różnorodność genotypowa CMV (genotypy gB1, gB2, gB3 i gB4) u pacjentów po przeszczepie szpiku kostnego, a także noworodków i niemowląt z objawami cytomegalii wrodzonej i nabytej. Zastosowana metodyka pozwoliła na ujawnienie w okresie poprzszczepowym częstych reinfekcji odmiennymi genotypami CMV. Celem badań prowadzonych u dzieci w ramach Grantu Mechanizmu Finansowego Europejskiego Obszaru Gospodarczego oraz Norweskiego Mechanizmu Finansowego (nr PL0270-K/IFP/000003) było poznanie roli poszczególnych genotypów w patogenezie zakażenia wrodzonego CMV.

Powyższe badania były, przedmiotem następujących publikacji:

1. **Zawilińska B., Kopeć J., Szostek S., Piątkowska-Jakubas B., Kosz-Vnenchak M. (2011) Lymphotropic herpesvirus DNA detection in patients with active CMV infection - a possible role in the course of CMV infection after hematopoietic stem cell transplantation. Med Sci Monit 17, CR432-441.**
2. **Zawilińska B., Szostek S., Kopeć J., Koprynia M., Kosz -Vnenchak M. (2011) Różnorodność genotypowa UL55 szczepów wirusa cytomegalii izolowanych od noworodków i niemowląt hospitalizowanych w Polsce Południowej. Przegląd Epidemiol 65, 409-413.**
3. **Zawilińska B., Szostek S., Kopeć J., Piątkowska-Jakubas B., Kosz-Vnenchak M. (2016) Multiplex real-time PCR to identify a possible reinfection with different strains of human cytomegalovirus in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. Acta Biochim Pol 63, 161-166.**

Inny problem, który jest nadal obiektem moich zainteresowań, to mieszane zakażenia narządu rodowego wywołane papillomawirusami, herpeswirusami i bakteriami z rodziny *Mycoplasmatace* u kobiet ze zmianami patologicznymi szyjki macicy. Badania były prowadzone w ramach kierowanego przeze mnie projektu badawczego (MNiSW, N401 219034). W grupie kobiet z rozpoznaniem zmian atypowych szyjki macicy o nieznanym pochodzeniu (ASCUS) zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego występowało znamienne

częściej w obecności drobnoustrojów z rodziny *Mycoplasmatace*. W grupach kobiet z różnym stopniem zaawansowania zmian śród nabłonkowych i rakiem szyjki macicy wykazano natomiast, że w przypadku wykrycia jednego z czterech gatunków mykoplazm płciowych, ryzyko wystąpienia infekcji wysoko onkogennymi typami HPV było dwukrotnie większe niż u kobiet, u których nie wykrywano mykoplazm. Zaobserwowano również, że częstość występowania HPV i *Ureaplasma urealyticum* wzrastała wraz z zaawansowaniem zmian śród nabłonkowych, osiągając najwyższy poziom u chorych na raka szyjki macicy. Metodą regresji logistycznej wykazano, że w obecności *Ureaplasma urealyticum* ryzyko wystąpienia infekcji wysoko onkogennymi typami HPV wzrastało 4,7 do 6,5 krotnie. Wyniki te sugerują, że ten gatunek mykoplazm płciowych może być kluczowym w przetrwaniu zakażenia HPV w komórkach nabłonkowych szyjki macicy. Rezultaty tych badań zostały przedstawione w następujących pracach:

1. **Biernat-Sudolska M., Szostek S., Rojek-Zakrzewska-D. (2008) Coinfections with urogenital mycoplasmas and papillomavirus in women with atypical squamous cell of undetermined significance. Annales UMCS sectio DDD 21, 13-17.**
2. **Biernat-Sudolska M., Szostek S., Rojek-Zakrzewska D., Kopeć J., Zawilińska B. (2008) Czy obecność ureaplazm w drogach rodnych kobiet zakażonych HPV wpływa na występowanie zmian cytologicznych w obrębie szyjki macicy? Przegląd Epidemiol 62, 447-452.**
3. **Biernat-Sudolska M., Szostek S., Rojek-Zakrzewska-D., Klimek M., Kosz-Vnenchak M. (2011) Concomitant infections with human papillomavirus and various mycoplasma and ureaplasma species in women with abnormal cervical cytology. Adv Med Sci 56, 299-303.**

W ramach tego samego projektu badawczego oceniono częstość występowania wirusów CMV, HSV-1, HSV-2, EBV w korelacji z HPV w wydzielinie szyjki macicy u kobiet ze zmianami przednowotworowymi i rakiem szyjki macicy. Zaobserwowano, że w raku szyjki macicy zachodzi istotny związek pomiędzy obecnością DNA HPV a zakażeniem CMV i EBV. Badania te były przedmiotem publikacji:

**Szostek S., Zawilińska B., Klimek M., Kopeć J., Kosz-Vnenchak M. (2009) Czy obecność herpeswirusów w wydzielinie szyjki macicy może być czynnikiem rokowniczym patologii szyjki macicy kobiet zakażonych HPV. Przegl Epidemiol 63, 97-101.**

Wyniki powyższych badań, sugerujące że herpeswirusy, a szczególnie EBV i CMV oraz drobnoustroje z rodziny *Mycoplasmataceae*, a głównie *Ureaplasma urealyticum* mogą współuczestniczyć wraz z HPV w patogenezie raka szyjki macicy skłoniły mnie do dalszych badań prowadzących do sformułowania tematu osiągnięcia habilitacyjnego.

Moje zainteresowania nad zakażeniami papillomawirusami sięgają roku 1990, kiedy wprowadziłam metodę pozwalającą na wykrywanie obecności antygeny kapsydowego HPV techniką immunoperoxydazową jako badania wspomagającego testy cytologiczne w profilaktyce raka szyjki macicy. Pierwsze oznaczenia były przeprowadzane u kobiet ze zmianami atypowymi nabłonka szyjki macicy. W badaniach tych po raz pierwszy zwróciłam uwagę na częste występowanie koinfekcji HPV i ureaplazm w grupie badanej:

**Szostek S., Wojtyś A., Zgórniak-Nowosielska I. (1993) Zakażenia kobiet wirusami Papilloma w przypadku zmian patologicznych szyjki macicy. Med Dośw Mikrobiol 45, 133-136.**

Po stażu jaki odbyłam na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w Zakładzie kierowanym przez Panią prof. dr hab. Annę Goździcką-Józefiak z zakresu metod molekularnych, wprowadziłam metody hybrydyzacji i PCR do identyfikacji i genotypowania HPV. Badania prowadziłam u kobiet z różnym stopniem zaawansowania zmian śródnabłonkowych szyjki macicy, w ramach projektu badawczego, kierowanego przez prof. dr. hab. med. Izabellę Zgórniak-Nowosielską (KBN, nr PB 1888/4/91). W tym okresie, dzięki współpracy z Kliniką Ginekologii Onkologicznej Centrum Onkologii Oddział w Krakowie rozpoczęłam badania w zakresie znaczenia zakażenia HPV jako czynnika rokowniczego u chorych na raka szyjki macicy leczonych napromienianiem. Obecność DNA HPV wykrywałam w materiale biopsyjnym części pochwowej metodą hybrydyzacji *in situ* z sondą znakowaną biotyną. Zaobserwowałam, że chore z potwierdzonym zakażeniem HPV mają niższe 3 letnie przeżycia całkowite i bezobjawowe co przedstawiłam w publikacji:

**Szostek S., Klimek M., Urbański K., Pudełek J., Kojs Z., Karolewski K., Jakubowicz J., Zgórniak-Nowosielska I. (1994) Zakażenie wirusem Papilloma a rokowanie u chorych na raka szyjki macicy leczonych napromienianiem. Nowotwory 44, 343-348.**

Podsumowaniem moich badań dotyczących opracowania metod wykrywania HPV i oceny zastosowanych różnych technik (metody immunoperoxydazowej, hybrydyzacji dot blot, hybrydyzacji *in situ* z sondą znakowaną biotyną, hybrydyzacji *in situ* z sondą znakowaną izotopem fosforu oraz PCR) była rozprawa doktorska pt. „Nowoczesne metody wykrywania zakażeń dróg rodnych wywołanych wirusem Papilloma” przygotowana pod kierunkiem Prof. dr hab. med. Izabelli Zgórniak-Nowosielskiej i obroniona w 1997 roku na Wydziale Lekarskim CMUJ.

Kontynuacją moich zainteresowań związanych z doskonaleniem technik stosowanych w wykrywaniu HPV była późniejsza praca, w której została przeprowadzona analiza porównawcza wyników uzyskanych techniką hybrydyzacji Hybrid Capture i metodą PCR z użyciem trzech różnych par starterów. W wyniku tej analizy wybrałam metodykę PCR z wykorzystaniem starterów MY09/MY11 jako najbardziej odpowiednią do badań przesiewowych. Metoda PCR połączona z hybrydyzacją na paskach nitrocelulozowych pozwoliła na wykrycie mieszanych zakażeń papillomawirusowych (2-4 genotypów) w komórkach raka szyjki macicy i węzłów chłonnych zajętych przez nowotwór. Dzięki tej technice wykazałam, że w trakcie przerzutowania do węzłów chłonnych dochodzi do selekcji genotypów do HPV-16 i HPV-52. Wyniki powyższych badań ujęto w następujących publikacjach:

1. Szostek S., Klimek M., Ryś J., Kopeć J., Zawilińska B. (2007) Występowanie wirusów Papilloma (HPV) w przerzutach do węzłów chłonnych u kobiet z rakiem szyjki macicy – badania wstępne. *Nowotwory. Journal of Oncology* 57, 547-549.
2. Szostek S., Klimek M., Zawilińska B., Ryś J., Kopeć J., Daszkiewicz E. (2006) Detection of human papillomavirus in cervical cell specimens by hybrid capture and PCR with different primers. *Acta Biochem Pol* 53, 603-607.

Następny ważny problem, który próbowałam rozwiązać to opracowanie jak najlepszej metody oceny postaci genomu HPV jako czynnika rokowniczego w progresji zmian śródnabłonkowych szyjki macicy. Początkowo badania polegały na jednoczesnej amplifikacji genu regulatorowego E2 i onkogenu E6 HPV-16 w danym izolacie DNA, z zastosowaniem metody multiplex PCR i komputerowej ocenie ilościowej uzyskanych produktów amplifikacji z wykorzystaniem programu Quantity One (BIORAD). Podstawowym kryterium integracji wirusowego DNA z genomem komórki był brak amplikonu genu E2, w wyniku przzerwania tej sekwencji i linearyzacji genomu. W pracy opublikowanej w 2015 roku przedstawiono natomiast nowo opracowaną metodę multiplex PCR w czasie rzeczywistym do ilościowej oceny sekwencji E6 i E2 HPV-16. Wyniki testu porównano z równocześnie wykonywanym badaniem dla poszczególnych genów, przeprowadzanym w osobnych próbkach na tej samej płytce jako metody referencyjnej. Nowa metoda okazała się równie czuła i swoista jak referencyjna, a koszty takiego oznaczenia były znacznie niższe, co daje szansę na wykorzystanie jej w ocenie postaci genomu wirusa jako dodatkowego czynnika prognostycznego w progresji zmian szyjki macicy.

1. Szostek S., Klimek M., Zawilińska B., Kosz-Vnenchak M. (2008) Physical state of human papillomavirus type 16 in cervical cell DNA. *Folia Biol (Kraków)* 56, 269-271.
2. Szostek S., Biesaga B., Zawilinska B., Klimek M., Kosz-Vnenchak M. (2015) Physical state of human papillomavirus type 16 in cervical intraepithelial lesions and cancers determined by two different quantitative real-time PCR methods. *Acta Biochim Pol* 62, 923-928.

W wyniku współpracy z dr hab. Beatą Biesagą z Zakładu Radiobiologii Klinicznej Centrum Onkologii, Oddział w Krakowie (COI) powstała publikacja, w której porównano po raz pierwszy czułość i specyficzność metody PCR w czasie rzeczywistym i hybrydyzację *in situ* w badaniach materiałów tkankowych zatopionych w parafinie pod kątem wykrycia wirusów HPV-16 i HPV-18 oraz określenia ich postaci genomu w badanym materiale. Wykazano, że zastosowanie hybrydyzacji *in situ* w detekcji papillomawirusów powoduje wyższe ryzyko uzyskania wyników fałszywie negatywnych, natomiast ocena postaci genomu wirusa z użyciem tej techniki jest porównywalna z wynikami uzyskanymi metodą real-time PCR i ma dodatkowe zalety, bo pozwala na równoczesną mikroskopową ocenę morfologiczną badanej tkanki. Wyniki przedstawiono w publikacji:

**Biesaga B., Szostek S., Klimek M., Jakubowicz J, Wysocka J. (2012) Comparison of sensitivity and specificity of real time PCR and in situ hybridization in HPV 16 and 18 detection in archival cervical cancer specimens. *Folia Histochem Cytobiol* 50, 239-47.**

Obecnie toczące się badania we współpracy z Zakładem Radiobiologii Klinicznej, COI, Oddział w Krakowie dotyczą występowania infekcji HPV-16 w rakach płaskonabłonkowych jamy ustnej i krtaniowej części gardła oraz oceny potencjału prognostycznego tej infekcji dla jednoczesnej chemioradioterapii chorych na tego typu nowotwory złośliwe. W ramach realizacji tego programu badawczego przygotowano 3 doniesienia zjazdowe i pierwszą publikację dotyczącą porównania metod izolacji genomowego DNA z archiwalnych materiałów tkankowych z raka głowy i szyi. Porównano dostępne na rynku komercyjne testy do izolacji DNA z utrwalonych w parafinie skrawków. Na podstawie uzyskanych wyników badań wskazano zestaw odczynnikowy ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System jako ten, który spełnia wszystkie warunki dla najlepszego testu do izolacji DNA z tkanek zatopionych w parafinie w celu skutecznego wykrycia krótkich fragmentów onkogenu E6 HPV-16 i  $\beta$ -aktywny metodą real-time PCR.

**Biesaga B, Janecka A, Mucha – Małecka A, Adamczyk A, Szostek S, Słonina D, Halaszka K, Przewoźnik M. (2016) HPV16 detection by qPCR method in relation to quantity and quality of DNA extracted from archival formalin fixed and paraffin embedded head and neck cancer tissues by three commercially available kits. J Virol Methods 236, 157–163.**

Szczegółowy wykaz opublikowanych przeze mnie prac naukowych wraz z informacją o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki stanowi odrębny załącznik (nr 3) do Wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.

### **Literatura uzupełniająca do opisu osiągnięcia naukowego.**

Aromseree S, Pientong C, Swangphon P, Chaiwongkot A, Patarapadungkit N, Kleeboon P, Tungsirivattana T, Kongyingyoes B, Vendrig T, Middeldorp JM, Ekalaksananan T. (2015) Possible contributing role of Epstein-Barr virus (EBV) as a cofactor in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. *J Clin Virol* 73, 70–76.

Bardin A, Vaccarella S, Clifford GM, Lissowska J, Rekosz M, Bobkiewicz P, Kupryjańczyk J, Krynicki R, Jonska-Gmyrek J, Danska-Bidzinska A, Snijders PJ, Meijer CJ, Zatonski W, Franceschi S. (2008) Human papillomavirus infection in women with and without cervical cancer in Warsaw, Poland. *Eur J Cancer* 44, 557–564.

Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen Hz, de Villiers EM. (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401, 70–79.

Biernat-Sudolska M., Szostek S., Rojek- Zakrzewska-D., Klimek M., Kosz -Vnenchak M. (2011) Concomitant infections with human papillomavirus and various mycoplasma and ureaplasma species in women with abnormal cervical cytology. *Adv Med Sci* 56, 299-303.

Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. (2002) The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55, 244–265.

Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, Tracy JK, Zenilman JM, Ravel J, Gravitt PE. (2014) Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection. *J Infect Dis* 210, 1723-1733.

Brown DR, Shew ML, Qadadri B, Neptune N, Vargas M, Tu W, Juliar BE, Breen TE, Fortenberry JD. (2005) A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J Infect Dis* 191, 182-192.

Castellsagué X. (2008) Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 110, Suppl 2, S4-7.

- Clarke MA, Rodriguez AC, Gage JC, Herrero R, Hildesheim A, Wacholder S, Burk R, Schiffman M. (2012) A large, population-based study of age-related associations between vaginal pH and human papillomavirus infection. *BMC Infect Dis* 12, 33. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/12/33>
- Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. (2005) Human Papillomavirus Genotype Distribution in Low-Grade Cervical Lesions: Comparison by Geographic Region and with Cervical Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 1157-1164.
- Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. (2003a) Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 89, 101-105.
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. (2003b) Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 88, 63-73.
- de Abreu AL, Malaguti N, Souza RP, Uchimura NS, Ferreira ÉC, Pereira MW, Carvalho MD, Pelloso SM, Bonini MG, Gimenes F, Consolaro ME. (2016) Association of human papillomavirus, *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* co-infections on the risk of high-grade squamous intraepithelial cervical lesion. *Am J Cancer Res* 6, 1371-1383.
- DiPaolo JA, Woodworth CD, Coutlée F, Zimonin DB, Bryant J, Kessous A. (1998) Relationship of stable integration of herpes simplex virus-2 Bg/II N subfragment Xho2 to malignant transformation of human papillomavirus-immortalized cervical keratinocytes. *Int J Cancer* 76, 865-871.
- Dudkiewicz J, Waksowski B, Cieslak-Stec M. (2001) Detection of human papillomavirus genome in cervical squamous intraepithelial lesions. *Gin Pol* 72, 1489-1496
- Dybikowska A, Licznarski P, Podhajski A. (2002) HPV detection in cervical cancer patients in northern Poland. *Oncol Rep* 9, 871-874.
- Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. (1989) The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243(4893), 934-937.
- Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer* 49, 1374-1403.
- Ganguly N, Parihar SP. (2009) Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci* 34, 113-123.
- Gao W, Weng J, Gao Y, Chen X. (2013) Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 13, 271. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/271>
- Heggie AD, Wentz WB, Reagan JW, Anthony DD. (1986) Roles of cytomegalovirus and *Chlamydia trachomatis* in the induction of cervical neoplasia in the mouse. *Cancer Res* 46, 5211-5214.

- Liss J, Lukaszuk K, Gulczynski J, Zwalinski M, Wozniak I, Emerich J, Wojcikowski C. (2002) The incidence of human papillomavirus DNA in patients with cervical carcinoma from Gdansk region. *Gin Pol* 73, 740–744.
- Liu J, Liu W, Liu Y, Zhou X, Zhang Z, Sun Z. (2016) Prevalence of microorganisms co-infections in human papillomaviruses infected women in Northern China. *Arch Gynecol Obstet* 293, 595–602.
- Mendoza L, Mongelos P, Paez M, Castro A, Rodriguez-Riveros I, Gimenez G, Araujo P, Echagüe G, Diaz V, Laspina F, Castro W, Jimenez R, Marecos R, Ever S, Deluca G, Picconi MA. (2013) Human papillomavirus and other genital infections in indigenous women from Paraguay: a cross-sectional analytical study. *BMC Infect Dis* 13, 531.  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/531>
- Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jay N, Hanson EN, Miller S, Canjura-Clayton KL, Farhat S, Broering JM, Darragh TM.. (2004) Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet* 364, 1678-1683.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM. (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348, 518–527.
- Narisawa-Saito M, Kiyono T. (2007) Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci* 98, 1505-1511.
- Prayitno A. (2006) Cervical cancer with Human Papilloma Virus and Epstein Barr Virus positive. *J Carcinog* 5, 13. <http://www.carcinogenesis.com/content/5/1/13>
- Rawls WE, Tompkins WA, Figueroa ME, Melnick JL. (1968) Herpesvirus type 2: association with carcinoma of the cervix. *Science* 161, 1255–1256.
- Sasagawa T, Shimakage M, Nakamura M, Sakaike J, Ishikawa H, Inoue M. (2000) Epstein-Barr virus (EBV) genes expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer: a comparative study with human papillomavirus (HPV) infection. *Hum Pathol* 31, 318–326.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as an ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495–505.
- Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, Rush BB, Glass AG, Schiffman M. (2005) The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 97, 1072–1079.
- Szkaradkiewicz A, Wal M, Kuch A, Pięta P. (2004) Human papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr Virus (EBV) cervical infections in women with normal and abnormal cytology. *Pol J Microbiol* 53, 95-99.



Szostek S., Klimek M., Zawilińska B., Kosz-Vnenchak M. (2008) Physical state of human papillomavirus type 16 in cervical cell DNA Folia Biol. (Kraków) 56, 269-271.

Szostek S., Wojtyś A., Zgórniak-Nowosielska I. (1993) Zakażenia kobiet wirusami Papilloma w przypadku zmian patologicznych szyjki macicy Med Dośw Mikrobiol 45, 133-136.

Vielot N, Hudgens MG, Mugo N, Chitwa M, Kimani J, Smith J. (2015) The role of Chlamydia trachomatis in high-risk human papillomavirus persistence among female sex workers in Nairobi, Kenya. Sex Transm Dis 42, 305–311.

Wohlmeister D, Vianna DR, Helfer VE, Gimenes F, Consolaro ME, Barcellos RB, Rossetti ML, Calil LN, Buffon A, Pilger D. (2016) Association of human papillomavirus and Chlamydia trachomatis with intraepithelial alterations in cervix samples. Mem Inst Oswaldo Cruz 111, 106-113.



Dr n. biol. Sława Szostek