

---

## **AUTOREFERAT**

**Dr n. med. Janusz J. Stańczak**

**ANALIZA GENETYCZNA I USPRAWNIANIE DIAGNOSTYKI  
MOLEKULARNEJ WIRUSA ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C  
(HCV) ORAZ LUDZKIEGO WIRUSA UPOŚLEDZENIA  
ODPORNOŚCI (HIV-1)**

**Wojewódzki Szpital Zakaźny w Warszawie  
Warszawa, Styczeń 2016 r.**

# AUTOREFERAT

**1. Imię i nazwisko:** Janusz Julian Stańczak

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

Dyplom magistra biologii, specjalność: Mikrobiologia, uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego (1978 r.)

Stopień naukowy doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, uzyskany w Instytucie Biostruktury Akademii Medycznej, Warszawa (1987)

Tytuł rozprawy doktorskiej:

**Konstrukcja i wykorzystanie wektora plazmidowego do klonowania w bakteriach *Pseudomonas putida* i *Escherichia coli*.**

Promotor: **Prof. dr hab. n. med. Henryk Osowiecki**

**Krótki opis:** zastosowałem wybrane plazmidy oraz endonukleazy restrykcyjne by, metodą klonowania, stworzyć konstrukt plazmidowy zdolny do degradacji wybranych związków organicznych. Ze szczepów szpitalnych *Pseudomonas aeruginosa* izolowałem plazmidy R, niosące gen kodujący oporność na leki – cechę referencyjną, umożliwiającą szybką i łatwą selekcję tworzono konstrukt. Ze szczepu *Pseudomonas putida* wyizolowałem plazmid zawierający kasetę genów warunkujących degradację węglowodorów aromatycznych (ksylen, toluen). Metodą klonowania wprowadziłem w ten plazmid gen R; stworzyłem plazmid hybrydowy, łatwy do selekcji, umożliwiający transformację komórek *E. coli* i *P. putida*. Wykazałem zdolność transformowanych klonów bakterii do rozkładu wybranych węglowodorów aromatycznych. Wykazałem zdolność transformantów *P. putida* do tworzenia biofilmu intensywnie degradującego ksylen i toluen.

**3. Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych**

1991-1995 - adiunkt w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

1988-1991 - staż podoktorski, następnie stanowisko Visiting Instructor of Research, w Medical University of South Carolina, Charleston, South Carolina, USA

1978-1990 – asystent, następnie adiunkt, w Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Instytutu Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie

**4. Wskazanie osiągnięcia naukowe, rozumiane zgodnie z Art. 16 ust. 2 z dnia 3 marca 2002 r. Ustawy o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki**

**a) Tytuł osiągnięcia naukowego:**

**ANALIZA GENETYCZNA I USPRAWNIANIE DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ WIRUSA ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C (HCV) ORAZ LUDZKIEGO WIRUSA UPOŚLEDZENIA ODPORNOŚCI (HIV-1)**

**b) autor/autorzy, tytuł publikacji, rok wydania**

1. **Staćzak JJ.**, Radlińska M., Brojer E., Medyńska J., Seyfried H.: Partial nucleotide sequences and genotypes of hepatitis C virus (HCV) isolated in Polish blood donors and patients with hepatitis. *Hepatologia Polska*, 1995, 2:87-92  
**KBN/MNiSW: 1 pkt.**

2. **Staćzak JJ.**, Opoka-Kegler J, Lipniacki A, Baran J, Piasek A, Horban A. Peripheral blood mononuclear cell-based system for monitoring interferon therapy for hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis.* 1997 Sep;25(3):746-7  
**KBN/MNiSW: 12 pkt.; IF: 2,803 pkt.**

3. Ząbek P, Opoka-Kegler J, Baka M, Dyda T, Stańczak GP, **Staćzak JJ.** Prevalence of hepatitis C virus mutants resistant to protease inhibitors among Polish HCV genotype 1-infected patients. *Przegl Epidemiol.* 2013;67(3):411-3  
**KBN/MNiSW: 7 pkt.**

4. Horban A, **Staćzak JJ.**, Bąkowska E, Tobolewska EJ, Przybylska-Stengiel KJ, Stańczak GP, Burkacka E. High prevalence of genotypic resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors among therapy-naïve individuals from the Warsaw cohort. *Infection.* 2002;30(6):356-9.  
**KBN/MNiSW: 9 pkt.; IF: 1.035**

5. GP Stańczak, **JJ Stańczak.** MJ Majchrzak, E Firląg-Burkacka, A Wiercińska-Drapało, M Leszczyszyn-Pynka, E Jabłonowska, E Małolepsza, A Horban: HIV-1 Drug Resistance Patterns Among Treatment-Naïve and Therapy-Experienced Patients in Poland. *HIV&AIDS Review* 2007;6(1) 32-36 .  
**KBN/MNiSW: 6 pkt.**

6. GP Stańczak, **JJ Stańczak.** E Firląg-Burkacka, A Wiercińska-Drapało, M Leszczyszyn-Pynka, E Jabłonowska, E Małolepsza, A Horban. Transmisja lekoopornych szczepów HIV-1 wśród osób nowozdiagnozowanych w Polsce. *Przegl Epidemiol.* 2007;61(1):29-34  
**KBN/MNiSW: 6 pkt.**

7. GP Stańczak, **JJ Stańczak.** M Marczyńska, E Firląg-Burkacka, E Małolepsza, A Wiercińska-Drapało, M Leszczyszyn-Pynka, E Jabłonowska, T Dyda, P Ząbek, A Horban. Evolving patterns of HIV-1 transmitted drug resistance in Poland in the years 2000-2008. *J Med Virol.* 2010 Jul;82(7):1291-4  
**KBN/MNiSW: 27 pkt.; IF: 2,895 pkt.**

8. Ząbek P, Dyda T. Stańczak GP, Marczyńska M, Firląg-Burkacka E, **Stańczak JJ**. Genetic detection of HLA-B\*5701 allele for prediction of Abacavir hypersensitivity among HIV-positive patients in Polish population. HIV&AIDS Review 2009;8 (3) 13-16

**KBN/MNiSW: 6 pkt.**

**Łączny Impact Factor publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe: 6.733**

**Łączna Punktacja Min. Nauki publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe: 74**

**c) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

**A. WDROŻENIE I USPRAWNIANIE DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ HCV; USTALENIE I ANALIZA ZMIAN WZORCA GENOTYPÓW HCV W POLSCE**

(omówienie wyników zawartych we wskazanych publikacjach Nr 1,2 i 3)

**Wstęp**

Wirus zapalenia wątroby typu C (Hepatitis C Virus – HCV) został zidentyfikowany w 1989 r. (1). W 1991 r. opublikowano pełną sekwencję nukleotydów genomu (2). Był pierwszym wirusem zidentyfikowanym metodą klonowania, bez użycia innych biologicznych lub biofizycznych technik. Jest to wirus otoczkowy, należący do rodziny Flaviviridae. Genom zbudowany jest z jednoniciowego RNA; zawiera nić dodatnią (kodująca, sensowną). W cyklu życiowym HCV, po zakażeniu komórki gospodarza, syntezowana jest nić ujemna (tzw. pośrednik replikacyjny). Na jej wzorze tworzone są nici dodatnie, działające jako matrycowy RNA w syntezie peptydów wirusa; są one też wbudowywane w dojrzewający wirion jako genom wirusów potomnych. Genom zawiera dwa krótkie, terminalne niekodujące regiony 5' UTR i 3'UTR oraz jedną otwartą ramkę odczytu kodującą polipeptyd wielkości ok. 3010 reszt aminokwasowych (3). Podczas obróbki potranslacyjnej polipeptyd jest trawiony na 3 peptydy strukturalne (C, E1, E2), białko p7 kanału jonowego oraz 6 peptydów niestukturalnych (NS2-NS5B).

HCV jest jednym z trzech klinicznie najważniejszych wirusów przenoszonych drogą krwi (też HIV-1 i HBV). W grupie wirusów RNA o nici sensownej wyróżnia się zdolnością wywoływania zakażeń przewlekłych. Heterogenność genetyczna HCV oraz wysoka zmienność w zakażonym organizmie skutecznie utrudniają opracowanie skutecznej szczepionki. Po wprowadzeniu szczepień profilaktycznych przeciwko HBV jest głównym czynnikiem sprawczym wirusowych zapaleń wątroby. W Polsce wykrywa się rocznie 2000 – 2500 osób zakażonych tym wirusem; ostatnie oszacowania podają liczbę 230 000 - 250 000 osób zakażonych, z aktywną replikacją (dane NIZP-PZH w Warszawie; 2015 r.).

Po powrocie ze stypendium podoktorskiego, w 1991 r., zacząłem pracę w Zakładzie Biologii Molekularnej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, kierowanym przez P. dr (obecnie Prof.) Ewę Brojer. Podjąłem pierwsze w Polsce prace nad konstrukcją i wdrożeniem do rutynowej diagnostyki testu genetycznego, wykrywającego RNA HCV metodą odwrotnej transkrypcji i reakcji łańcuchowej polimerazy (RT PCR). Na podstawie pierwszych publikowanych sekwencji genomowego RNA HCV projektowałem sekwencje do syntezy par primerów, następnie używanych do detekcji RNA wirusa.

Za najważniejsze wyniki tego etapu prac uważam:

- Opracowanie warunków biochemicznych, cieplnych i czasowych reakcji RT PCR, zapewniających wykrywanie RNA HCV z wysoką czułością i swoistością.

- Wyselekcjonowanie par primerów najskuteczniej wykrywających RNA HCV typu dominującego w populacji pacjentów polskich.
- Wykazanie różnic w czułości i swoistości poszczególnych par primerów, będących, co wykazały dalsze badania, wynikiem znacznej różnorodności genetycznej HCV.
- Wykazanie przewagi testu genetycznego nad ówczynie stosowanymi testami serologicznymi w wykrywaniu zakażenia HCV oraz potwierdzaniu replikacji HCV.

Stworzony test był używany przez kilka następnych lat, aż do pojawienia się testów komercyjnych o wyższej swoistości i czułości. Metodę przedstawiłem w publikacji oraz promowałem w licznych doniesieniach zjazdowych (4,5).

### **Ustalenie i monitorowanie zmian wzorców genotypów HCV w Polsce**

Publikacja nr 1 - *Partial nucleotide sequences and genotypes of hepatitis C virus (HCV) isolated in Polish blood donors and patients with hepatitis*

Pierwsze porównania sekwencji genomów poszczególnych izolatów HCV wykazały znaczne zróżnicowanie genetyczne wirusa. W 1993 r. P. Simmonds zaproponował obowiązującą do dzisiaj klasyfikację i podział poszczególnych wariantów genetycznych na typy i podtypy genetyczne (6). Wykazano zróżnicowaną podatność poszczególnych typów genetycznych na leczenie interferonem (7,8). Odsetek pacjentów uzyskujących trwałą odpowiedź wirusową (Sustained Viral Response - SVR) był silnie warunkowany typem genetycznym HCV – najniższy wśród pacjentów zakażonych HCV G1 i G4, najwyższy – wśród zakażonych G3.

W 1992 r. podjąłem, wraz z współpracownikami, badania genomowego RNA HCV. Zastosowaliśmy technikę sekwencjonowania nukleotydów. W 44 izolatach HCV analizowaliśmy konserwatywny region 5'UTR oraz region o nasilonej zmienności E2/NS1. Uzyskane sekwencje porównałem z publikowanymi sekwencjami prototypu (obecnie HCV-1 lub 1a) oraz dominującego w Europie typu HCV-J (obecnie – HCV 1b). Metodę sekwencjonowania wykorzystaliśmy również do identyfikowania typu genetycznego HCV, następnie do ustalenia wzorca typów genetycznych HCV w Polsce.

Za najważniejsze przedstawione w tej pracy wyniki uważam:

- Opracowanie techniki sekwencjonowania nukleotydów do charakteryzowania izolatów HCV.
- Wykazanie identyczności sekwencji regionu 5'UTR (zgodność 100%) oraz różnic w sekwencjach regionu E2/NS1 (89,5 % i 79,5%) w polskich izolatach w porównaniu do sekwencji HCV-1 i dominującego w Europie
- Pierwsze w Polsce ustalenie wzorca genotypów HCV. Wśród 44 izolatów genotyp 1b występował w 39 (88,6%) izolatach, w 4 (9,1%) - 3a i w 1 (2,7%) - 2a.

Typ genetyczny HCV był podstawowym czynnikiem warunkującym skuteczność leczenia wirusowego zapalenia wątroby typu C (wzwC) typowym do 2013 r. zestawem leków – PEGylovanym Interferonem z Rybawiryną. Dlatego badania genotypów oraz zmiany ich wzorca prowadzę do chwili obecnej, w Wojewódzkim Szpitalu Zakaźnym w Warszawie, gdzie w 1995 r. stworzyłem Pracownię Diagnostyki Molekularnej. W dalszych pracach, wraz ze współpracownikami, wykazałem zmiany wzorca genotypów – spadek odsetka typu 1b z 88,6% do 77% , narastanie częstości wykrywania genotypu 3 – z 4,2 do 18,2%, pojedyncze przypadki typu 2 oraz pojawienie się typu genetycznego 4 - z uprzednio niestwierdzonego do ok. 2,5%. Czas pierwszych izolacji typu 4 oraz analiza epidemiologiczna sugerowały, że został on przywleczony do Polski z Egiptu, gdzie typ ten jest wykrywany w ponad 80%

przypadków, po intensyfikacji wyjazdów turystycznych w latach 90tych. Ten wynik dobrze dokumentuje oddziaływanie zmian politycznych na epidemie chorób zakaźnych.

Zorganizowałem pierwsze wielośrodkowe reprezentatywne badanie genotypów w Polsce (9). Kolejne zestawienia, dokumentujące trwałość obserwowanych zmian, były prezentowane podczas kongresów międzynarodowych (10).

Uczestniczyłem w największym polskim badaniu wzorca genotypów HCV w Polsce, którego wyniki opublikowano w roku 2013 (11).

### **Opracowanie metody diagnostycznej wykorzystującej komórki jednojądrzaste krwi obwodowej jako źródło RNA HCV**

Publikacja nr 2 - *Peripheral blood mononuclear cell-based system for monitoring interferon therapy for hepatitis C virus infection.*

W latach dziewięćdziesiątych XX w. HCV był uznawany za wirus zakażający wyłącznie hepatocyty. Kolejne badania udowodniły także pozawątrobowe występowanie oraz wydajną replikację wirusa (obecność ujemnej nici RNA – pośrednika replikacyjnego), również w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMCs) (12).

Podjąłem, wraz ze współautorami, badania, których celem było potwierdzenie występowania RNA HCV w PBMCs, porównanie wpływu leczenia antywirusowego na obecność RNA HCV w surowicy/osoczu oraz w komórkach jednojądrzastych. Ostatecznym celem była próba wykorzystania PBMC jako łatwo dostępnego materiału diagnostycznego, zamiast tkanki wątroby pobieranej metodą biopsji. W efekcie tych prac skonstruowałem test umożliwiający wydajną izolację RNA wirusowego z PBMCs. Zastosowaliśmy go do badania 18 próbek krwi pacjentów leczonych Interferonem. W PBMCs izolowanych z dziesięciu próbek krwi, z negatywnym wynikiem testu RT PCR HCV w surowicy, poszukiwaliśmy dodatkowo i ujemnej nici RNA HCV. W 7 próbkach znaleźliśmy materiał genetyczny HCV. Udowodniliśmy możliwość identyfikacji genotypów i subtypów HCV obecnych w PBMCs – 1b, 1b oraz 3a.

Za najważniejsze wyniki tej pracy uważam:

- Opracowanie metody wydajnej i powtarzalnej izolacji wirusowego RNA z PBMCs.
- Stworzenie systemu diagnostycznego z użyciem komórek jednojądrzastych, zamiast tkanki wątroby, jako źródła HCV RNA.
- Wykazanie obecności RNA HCV w PBMC, w tym pośrednika replikacyjnego – ujemnej nici RNA HCV.
- Wykazanie, że u dominującego odsetka pacjentów leczonych interferonem, z wiramią niewykrywaną w badaniu surowicy lub osocza, RNA HCV jest wykrywany w PBMC, a po zakończeniu leczenia następuje wznowa wirusowego zapalenia wątroby
- Wykazanie możliwości oznaczania typu genetycznego HCV w izolatach z PBMC
- Wykazanie skuteczności metody wobec różnych geno- i sub-typów HCV

Opracowaliśmy metodę diagnostyczną służącą do wykrywania RNA HCV znacznie mniej inwazyjną niż biopsja wątroby, a co najmniej równie czułą i swoistą.

Metodę tę stosujemy w Pracowni do chwili obecnej. Jest najbardziej przydatna w diagnostyce próbek pacjentów leczonych hemodializami (z powodu obecności licznych inhibitorów reakcji PCR we krwi, usuwanych podczas izolacji komórek), u dzieci (często bardzo małe objętości próbek diagnostycznych) oraz w każdym przypadku podejrzenia

zakażenia HCV przy ujemnych wynikach badań surowicy lub osocza. Metodę tę promowałem podczas licznych konferencji międzynarodowych.

**Opracowanie i wdrożenie metody identyfikacji wariantów genetycznych HCV opornych na nowe leki; analiza częstości identyfikacji mutantów R wśród pacjentów polskich**

Publikacja nr 3 - *Prevalence of hepatitis C virus mutants resistant to protease inhibitors among Polish HCV genotype 1-infected patients.*

Skuteczność leczenia wzwC została zwiększona poprzez zastosowanie interferonów połączonych z PEG (PEGIFN) oraz Rybawiryną (13). Jednak brak eradykacji wirusa wśród znaczącego odsetka pacjentów oraz liczne niekorzystne efekty uboczne skłoniły firmy farmaceutyczne do opracowania nowych klas leków anti-HCV, bezpośrednio oddziałujących na cykl życiowy wirusa (Direct Acting Agents – DAAs). Wiedza uzyskana podczas tworzenia leków anti-HIV, wykorzystanie osiągnięć genomiki i proteomiki znacznie przyspieszyły stworzenie nowych leków.

W 2011 r. FDA dopuściła do stosowania pierwszą klasę DAA – inhibitory proteazy wirusowej (PIs - Protease Inhibitors) – Boceprewir (BOC) i Telaprewir (TVP) (14). W 2013 r. wprowadzono leki następnej klasy – inhibitory RNA-zależnej polimerazy RNA HCV. Obecnie proponowane schematy leczenia zawierają dwa - trzy leki z trzech klas, inhibujące peptydy HCV kodowane przez trzy regiony genomu – NS3 (proteaza serynowa), NS5A (metaloproteina, odgrywa istotną rolę w replikacji i składaniu dojrzewających wirionów) oraz NS5B (RNA-zależna polimeraza RNA). Skuteczność leczenia takimi zestawami jest bardzo wysoka - stwierdza się eliminację wirusa (SVR) u 95-100 % pacjentów. W większości przypadków leczenie jest krótkie – trwa 12-24 tygodnie. Użyteczność tych schematów ograniczały bardzo wysokie początkowo koszty leczenia, obecnie zmniejszone do 60 tys. zł za terapię (Listopad 2015). Opracowywane są kolejne grupy leków, w tym inhibitory dojrzewania wirusa oraz inhibitory pro-wirusowych czynników komórki gospodarza.

Wstępne badania wykazały, że inhibitory proteazy HCV, podobnie jak pierwsze leki anti-HIV-1, cechują się niską barierą genetyczną – selekcja jednej, dwóch mutacji R w regionie kodującym ten enzym powoduje zmniejszenie lub całkowite zniesienie wrażliwości mutantów na lek. Cecha ta jest, niestety, typowa dla kolejnych fal leków anti-HCV pierwszej generacji. Dotychczas zidentyfikowano kilkanaście mutacji warunkujących oporność HCV na nowe leki (15).

Wiedzę i metody, nabyte i stosowane podczas wieloletnich badań lekooporności wirusa HIV, zastosowałem w badaniach przenoszonej oporności (TDR – Transmitted Drug Resistance) HCV na inhibitory proteazy. Podjąłem, wraz ze współautorami, próbę skonstruowania testu umożliwiającego identyfikację mutacji R w genomie HCV. Wybrałem skuteczne w reakcji RT PCR pary primerów, profile cieplne reakcji oraz warunki reakcji sekwencjonowania. Uzyskane sekwencje były składane przez program SeqScape v. 2,7 (Life Tech., USA). Ostatecznie obecny w Internecie program geno2pheno, (najnowsza dostępna w czasie analizy wersja) był używany do interpretacji wyników – program identyfikuje wzorce mutacji, oszacowuje ich wpływ na aktywność leków i, ostatecznie, przedstawia kompletny wynik w konwencji wrażliwy/obniżona podatność, oporny. Stworzyłem metodę sekwencjonowania populacyjnego i analizy regionu NS3, kodującego domenę katalityczną proteazy HCV. Po uzyskaniu zadowalających wyników wstępnych wdrożyłem ten test do rutynowego wykrywania mutantów opornych na PIs. Oszacowaliśmy częstość występowania

opornych wariantów HCV wśród pacjentów z wzw C, nieleczonych, kwalifikowanych do leczenia BOC lub TVP. Przebadaliśmy 91 surowic pacjentów zakażonych HCV G1; sekwencjonowanie było skuteczne w 85 próbkach. W 12 (14,1%) z nich wykryliśmy mutacje R: w 5 (5,88%) – mutację D168E, w 2 (2,35%) – A87T, obie warunkujące oporność na BOC; w 2 (2,35%) – T54S determinującą oporność na TVP. W 3 (3,52%) próbkach wykryliśmy mutacje R117H oraz V55A, warunkujące oporność na oba leki (częste wśród leków przeciwwirusowych zjawisko oporności krzyżowej).

Za najważniejsze osiągnięcia uważam:

- Stworzenie testu diagnostycznego wykrywającego, z wysoką czułością i swoistością, warianty genetyczne HCV odporne na inhibitory proteazy.
- Wykazanie, podobnie jak w najwcześniejszych moich badaniach, istotnego oddziaływania różnorodności genetycznej HCV na skuteczność diagnozowania – konieczność stosowania różnych par primerów dla poszczególnych izolatów, mimo ich komplementarności do regionów konserwatywnych genomu.
- Stworzenie pierwszej w Polsce, jednej z niewielu w Europie grupy badaczy zajmującej się problemem lekooporności HCV.
- Przedstawione wyniki dokumentują występowanie, w próbkach polskich nieleczonych pacjentów, wariantów genetycznych HCV opornych na leki. Wykryta częstość identyfikacji wyniosła 14,1%. Zgodnie z przyjętym konsensusem opracowanym przez europejskie towarzystwo ESAR oraz program HEPVIR, częstość identyfikacji wariantów lekoopornych HIV-1, HBV oraz HCV w populacji pacjentów nieleczonych, wyższa niż 5%, jest klinicznie istotna i uzasadnia rutynowe badanie oporności przed rozpoczęciem terapii.
- Ilość zbadanych próbek oraz, zróżnicowanie geograficzne miejsc zamieszkania pacjentów zapewniają wysoką reprezentatywność przedstawionych wyników.

Obecnie prowadzę końcowe prace mające na celu skonstruowanie kolejnych testów, umożliwiających wykrywanie mutantów opornych na leki - inhibitory produktów regionu NS5A i NS5B.

Leczenie wzwC lekami z nowych klas będzie, najprawdopodobniej, znacznie prostsze niż terapia zakażeń HIV-1 i HBV. W odróżnieniu od HIV-1 będzie jednorazowe i krótkie - HCV jest łatwo dostępny, jego genom nie integruje z genomem komórek gospodarza oraz nie tworzy depozytów w komórkach długożyjących. Nie tworzy też, w odróżnieniu od HBV, niedostępnych dla leków form nieaktywnych genomu (ccc DNA HBV). Sądzę jednak, że, mimo skuteczności nowych leków, krótkiego czasu terapii zmniejszającego ryzyko selekcji wariantów R, cyklu życiowego wirusa ułatwiającego działanie leków, problem oporności będzie narastał wraz z upowszechnianiem leczenia wzwC, dlatego będzie wymagał skutecznego monitorowania.

### **Usprawnienie diagnostyki pacjentów z wzwC**

W 2008 r. zostały opublikowane pierwsze doniesienia o wpływie jednonukleotydu polimorfizmu regionu IL28B na spontaniczną lub indukowaną leczeniem PEGINF/Ribawiryną eliminację HCV. Sekwencje polimorficzne są zlokalizowane na chromosomie 19, w regionie niekodującym, położonym ok. 3 tys. par zasad powyżej genu *IL 28B* kodującego interleukinę 28. Wykazano znacznie wyższy odsetek pacjentów uzyskujących trwałą odpowiedź wirusową wśród osób homozygotycznych (układ nukleotydów CC) niż heterozygotycznych (CT) oraz homozygotycznych (TT).



Wykorzystując dostępne testy amplifikujące ten region stworzyliśmy system PCR czasu rzeczywistego, identyfikujący polimorfizm pacjenta. W reakcji PCR jest amplifikowany i wykrywany jeden z możliwych układów alleli. Wyniki umożliwiają prognozowanie skuteczności leczenia, też modyfikacje dawek leków oraz wczesne podjęcie decyzji o kontynuowaniu/zaniechaniu terapii po pierwszych 4 tygodniach leczenia. Wśród pacjentów zakażonych HCV wykryliśmy genotyp CC w 23,4% przypadków, CT -64,4% , oraz TT - 12,2%. Taki wzorzec genotypów jest typowy dla naszego regionu Europy.

Jednak w erze nowych leków testowanie polimorfizmu staje się zbędne – ich skuteczność nie jest modyfikowana kompozycją alleli. Pozostaje przydatne przy klasycznych terapiach zawierających interferon

## Piśmiennictwo

1. Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J. et al.: Isolation of cDNA clone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. *Science* 1989, 244, 359-362
2. Kato N., Hijikata M., Ootsuyama Y. Et. Al.: Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1990,87,9524-9528
3. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88: 2451-2455.
4. **Stańczak JJ.**, Brojer E., Radlińska M., Sankowska M., Kacperska E., Głowska-Moraczewska, Z., Seyfried H.: Wykrywanie materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) metodą RT-PCR. *Zeszyty Hepatologiczne*, 1994, 7:18-26
5. **Stańczak JJ**, Radlińska M., Sankowska M., Brojer E. Nucleotide sequence of Polish HCV isolates. IV Regional Congress European Region, ISBT. Barcelona, June 13-16, 1993 (doniesienie ustne)
6. Simmonds P, Holmes EC, Cha T.-A, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS: Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 74:2391, 1993, 74,2391-2399
7. Fuchs K., Motz M., Schneider E. et al.: Characterization of nucleotide sequences from European hepatitis C virus isolates. *Gene*, 1991, 103, 163-169
8. Hino K., Sainokami S., Shomoda K. Et al.: Genotypes and titers of hepatitis C virus for predicting response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.*, 1994, 42, 299-305
9. **Stańczak JJ**, Opoka-Kegler J, Czerwionka-Szaflarska M, Karczewska K, Woźniakowska-Gęsicka T, Horban A. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Poland. *J Hepatol* 1999;31 :574. (list do Wydawcy)
10. **Stańczak JJ**, Tobolewska E, Przybylska-Stengiel, GP Stańczak, A. Horban. Changes in the pattern of Hepatitis c virus genotypes in Poland. *ISVHLD Sydney*, 2003
11. Panasiuk A., Flisiak R., Moser-Lisewska I et al.: Distribution of HCV genotypes in Poland. *Przegl Epidemiol.* 2013;67(1):11-6, 99-103
12. Ferri C, Monti, M, La Civita L, et al. Infection on peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus in mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1993; 82: 3701 – 3704
13. Alexopoulou A., Papatheodoridis GV. Current progress in the treatment of chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 2012;18(42):6060-6069
14. FDA approves Victrelis for Hepatitis C. FDA news release (5/13/2011)

15. Sarrazin, C., Zeuzem, S. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 2010; 138, 447-462

**B. ANALIZA GENETYCZNA HIV-1 I USPRAWNIANIE DIAGNOSTYKI;  
USTALENIE I ANALIZA ZMIAN WZORCA SUBTYPÓW HIV-1 W POLSCE**  
(omówienie wyników zawartych we wskazanych publikacjach Nr 4-8)

**Wstęp**

Ludzki wirus nabytego niedoboru odporności (Human Immune Deficiency Virus - HIV) należy do rodziny Retroviridae. Genom zawiera dwie pojedyncze nici RNA o dodatniej polarności (sensowne). HIV jest wirusem o bardzo nasilonej heterogenności oraz wysokiej zmienności osobniczej. Systematycznie jest podzielony na typy HIV-1 i HIV-2. Dominujący w ilości zakażeń typ HIV-1 jest dzielony na grupy M (Major- wywołuje ok. 95% zakażeń), O (Outlier), N (non-M/non-O), oraz najpóźniej rozpoznaną grupę P. W grupie M wyróżnia się 9 subtypów (A – K - nie zidentyfikowano wariantów prototypowych E oraz I) oraz co najmniej 30 postaci rekombinacyjnych (CRFs – Circulating Recombinant Forms). Wysoka zmienność osobnicza jest skutkiem niedoskonałego mechanizmu replikacji wirusowego genomu – wirusowa odwrotna transkryptaza (RT), tworząca na wzorcu genomowego jednoniciowego RNA komplementarny DNA (cDNA), jest enzymem o niskiej wierności, pozbawionym jednostki korygującej, usuwającej z powstającej nici błędnie inkorporowane nukleotydy. W efekcie błędnie wstawiane są ok. 10 nukleotydy na cykl replikacyjny. Dodatkowo występują substytucje, delecje oraz insercje. Jednym z następstw tej zmienności i różnorodności jest niemożność skonstruowania, po ponad 30 latach intensywnych i kosztownych prac, szczepionki profilaktycznej; innym istotnym problemem jest powstawanie i selekcja mutantów opornych na leki hamujące replikację HIV-1. Zakażenie HIV było/jest zjawiskiem silnie stygmatyzującym społecznie, o znacznej nośności medialnej, dotyczącym grupy o dużej sile oddziaływania. Dlatego stało się potężnym impulsem w rozwoju nowych technik diagnostycznych; spowodowało opracowanie pierwszych leków skutecznie hamujących replikację wirusów. Wprowadzenie tych leków wykazało kilka ciekawych fenomenów - **zjawisko bariery genetycznej** (ilości mutacji warunkujących powstanie wariantu opornego na lek), **oporności krzyżowej** - mutacja selekcyjowana jednym z leków powoduje oporność na inne leki z tej klasy. Oporność krzyżowa była najbardziej nasiloną w pierwszej generacji nienukleozydowych inhibitorów RT (Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors – NNRTIs). Też zjawisko **oporności przenoszonej (transmitowanej)** (Transmitted Drug Resistance – TDR) występującej u pacjentów uprzednio nieleczonych, zakażonych już opornym mutantem.

Badania molekularne wirusa HIV-1 zacząłem w roku 1992 r., pracując w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii. Współtworzyłem pierwszy w Polsce system wykrywający RNA HIV-1 metodą RT-PCR, następnie wprowadzony do rutynowej diagnostyki. Metoda ta była używana do pojawienia się pierwszych, komercyjnych testów molekularnych. Za jej opracowanie i wdrożenie otrzymałem nagrodę Komitetu Naukowego konferencji PTN AIDS w 1994 r.

**Badania oporności na leki polskich izolatów HIV-1 – analiza wzorców i częstości występowania mutacji R**

(wskazane publikacje nr 4 - 7)

W poniższych publikacjach przedstawiam wyniki badań epidemii wariantów genetycznych HIV-1 opornych na trzy klasy leków antyretrowirusowych (ARV) – nukleozydowe/

nukleotydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (Nucleoside/Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors –NRTIs), nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NNRTIs) oraz inhibitory proteazy (Protease Inhibitors –PIs). Klasy te zawierają kolejne generacje leków ARV, najwcześniej opracowanych i włączanych do terapii; do chwili obecnej stanowią podstawę schematów terapeutycznych. Kolejne klasy, np. inhibitory fuzji/wejścia (Fusion/Entry Inhibitors –F/EIs) oraz inhibitory integrazy (Integrase Inhibitors - InIs), zostały opracowane znacznie później.

Przedstawiam głównie analizę oporności przenoszonej (transmitowanej), jako podstawowego mechanizmu propagacji tej cechy HIV-1 w populacji i jednej z najczęstszych przyczyn niepowodzenia terapeutycznego.

Azydetymidyna (AZT) była pierwszym zaakceptowanym lekiem spowalniającym replikację HIV-1 (1). Już w 1986 r. opisano pierwsze warianty genetyczne niosące mutacje zmniejszające podatność na ten lek (2). Obecnie dostępnych jest 7 klas leków antyretrowirusowych, nawet najnowsze ich generacje napotykać barierę oporności (3).

Badania oporności polskich izolatów HIV-1 na leki zainicjowałem, wraz ze współpracownikami, w 1999 r. Ówczesną dostępną techniką była odwrotna hybrydyzacja namnożonego w reakcji RT-PCR fragmentu regionu kodującego enzym wirusa - cel dla leku - z komplementarną sondą umieszczoną na stałym nośniku. Metoda była czuła – umożliwiała wykrycie subpopulacji mniejszościowych stanowiących ok. 5% ogólnej ilości wirionów, natomiast ilość wykrywanych mutacji była zdefiniowana i limitowana ilością stosowanych sond. Zaletą metody była możliwość wykrywania mieszanych (wariant dziki/mutant) subpopulacji, możliwe było wczesne wykrywanie pojawiających się mutantów R. Istotną wadą była metoda interpretacji wyników, polegająca wyłącznie na doświadczeniu diagnosty.

Pierwsze wyniki przedstawiliśmy w 2001 r. Wykazaliśmy bardzo wysoki odsetek mutantów opornych na PIs –36,6% izolatów obecnych w próbkach pacjentów nieleczonych oraz 75% w próbkach pacjentów z niepowodzeniem terapeutycznym zawierało warianty niosące mutacje R. W obu badanych grupach dominowała mutacja I54V (oporność na Sakwinawir <SQV> i Fosamprenawir <FVP>), następnie M46I (oporność na Nelfinawir <NFV>) oraz V82A (oporność na Indinawir <IDV>) (4). W równoległym badaniu oceniliśmy częstość występowania mutacji warunkujących oporność na NRTIs. W 71,1% próbek pobranych od pacjentów nieleczonych wykryliśmy warianty warunkujące oporność na tę grupę leków. Wykazaliśmy, że najwyższy odsetek (67,1% wszystkich wariantów z mutacjami R) stanowiły mutanty zawierające mutację L210W (oporność na AZT), następnie warianty z mutacją K65R (oporność na Lamivudynę <3TC>) - 33,3% próbek (5). Taki wynik był, najprawdopodobniej, skutkiem monoterapii AZT, powszechnej w pierwszych latach terapii antyretrowirusowej, stosowania AZT w większości działań profilaktycznych oraz właściwościami leku - AZT wykazuje słabą siłę przeciwwirusową, dodatkowo cechuje się niekorzystną niską barierą genetyczną. Jednocześnie powstanie i selekcja mutacji warunkujących oporność na AZT otwiera ścieżki szybkiej ewolucji mutacji warunkujących oporność na inne leki z klasy NRTIs.

Kolejne wyniki badań oporności na NRTIs, uzyskane w badaniu większych ilości próbek, zwiększających reprezentatywność wyników, przedstawiłem w 2002 r.

Publikacja nr 4 - *High prevalence of genotypic resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors among therapy-naive individuals from the Warsaw cohort*

Opisaną wyżej metodę wdrożyliśmy do rutynowej diagnostyki. Wyniki laboratoryjne zostały uwzględnione w planowaniu schematów leczenia ARV. Oceniliśmy częstość występowania mutacji warunkujących oporność na NRTI w grupie 128 pacjentów uprzednio nieleczonych (oporność transmitowana).

Za najważniejsze uzyskane wyniki uważam:

- Opracowanie i wdrożenie programu rutynowego badania oporności przenoszonej HIV-1 na leki antyretrowirusowe
- Wykazanie wysokiej częstości mutacji warunkujących oporność na leki z grupy NRTIs – w 66 (51,5%) spośród 128 badanych próbek
- Wykazanie dominacji mutacji K70R (81,8% próbek), następnie mutacji M184V (33,3% próbek) - w kilkunastu próbkach występowały dwie lub więcej mutacje. Potwierdziłem wcześniej przedstawiane dane o częstościach występowania wariantów opornych na NRTIs.
- Interpretacja wykrytych mutacji wykazała dominację mutantów opornych na AZT – obecne były w 20 (30,3%) spośród 66 próbek, następnie w 10 (15,2%) na 3TC i 6 (9,1%) mutanty odporne na Didanozynę (ddI), Zalcytabinę (ddC) i Abakawir (ABC).
- Ustalenie dwóch czynników warunkujących tak wysoką częstość wariantów opornych – wymianę igieł i narkotyków w grupie pacjentów przyjmujących narkotyki dożylnie (dominująca wówczas grupa pacjentów) oraz efekt długoletniej monoterapii AZT.
- Stwierdzony wysoki odsetek izolatów lekoopornych uzasadnił, zgodnie z ówczesnymi zaleceniami Towarzystwa EACS, wprowadzenie oznaczania oporności HIV-1 do rutynowej diagnostyki pacjentów z planowanym włączeniem terapii antyretrowirusowej.

### **Wykrycie zmian wzorca mutacji R i częstości identyfikacji wariantów lekoopornych HIV-1**

(wskazane publikacje nr 5 i 6)

W 2001 r. wprowadziłem do oceniania oporności HIV-1 system sekwencjonowania populacyjnego, wg metody Sangera. W porównaniu do technologii odwrotnej hybrydyzacji sekwencjonowanie jest droższe, wymaga wysokokwalifikowanego personelu, ma też niższą czułość – dolny próg rozróżniania subpopulacji mniejszościowych to 15-20%. Zalety metody to uzyskiwanie sekwencji nukleotydów, umożliwiających nie tylko wykrywanie mutacji warunkujących oporność, ale też identyfikację subtypów, a obecnie – wyrafinowaną analizę filogenetyczną (patrz dalej). Kolejną zaletą jest interpretacja wyników pierwotnych przez algorytmy interpretacyjne, dostarczane przez producentów testów, też obecne w sieci internetowej. Zapewniają one globalną jednoznaczność, powtarzalność i porównywalność oceny wyjściowych sekwencji. Dodatkowo diagnosta może (powinien) porównywać wyniki przedstawiane przez różne algorytmy.

Dzięki wdrożeniu nowej technologii zgłosiłem udział Polski w tworzonym programie SPREAD – największym do chwili obecnej europejskim programie badania lekooporności oraz dróg rozprzestrzeniania się HIV w Europie. Program jest aktywny do dzisiaj; do pierwszych 7 krajów założycielskich (w tym Polski) dołączyły następne 22, czyniąc dane wysoko reprezentatywnymi.

W pierwszych latach XXI w. przenoszona lub selekcyonowana oporność HIV-1 na leki stała się narastającym problemem. Badania, również w programie SPREAD, wykazały, że w Europie ok. 10% osób nowozakażanych nabywa warianty odporne. Identyfikacja mutantów opornych stała się podstawowym narzędziem warunkującym właściwe i skuteczne leczenie, w tym dobór leków w kolejnych etapach leczenia.

Publikacja nr 5 - *HIV-1 Drug Resistance Patterns Among Treatment-Naïve and Therapy- Experienced Patients in Poland*)

Podsumowanie wyników uzyskanych w latach 2003-2004 metodą sekwencjonowania nukleotydów.

Za najważniejsze przedstawione wyniki uważam:

- Skoordynowanie i wieloletnie oznaczanie lekooporności HIV-1 w próbkach dostarczanych przez większość wiodących ośrodków opiekujących się ok. 65% pacjentów zakażonych HIV-1. Zebranie wyników badań oporności HIV-1, wykonywanych dla siedmiu wiodących klinik i ośrodków, ich rozmieszczenie geograficzne oraz ilości leczonych pacjentów zapewniły wysoką reprezentatywność danych.
- Wykazanie istotnego zmniejszenia się odsetka lekoopornych izolatów HIV-1 w grupie pacjentów uprzednio nieleczonych (częstość występowania TDR) – z najwyższych 51,5%, wykrytych we wcześniejszych analizach, do 14,1%.
- Utrzymywanie się wysokiego odsetka (77%) wariantów opornych na leki w grupie pacjentów z niepowodzeniem terapeutycznym
- Wykazanie znacznego odsetka (19%) próbek zawierających warianty genetyczne z mutacjami R wobec wszystkich trzech klas leków.
- Wykazanie zmiany w częstości identyfikacji wiodących mutacji w grupie NRTI-dominacja mutacji M184V (oporność na Lamiwudynę) w miejsce mutacji K70R (oporność na AZT). Jest to odległy efekt odejścia od monoterapii AZT.
- Wykazanie bardzo ważnych epidemiologicznie i społecznie zmian we wzorcu subtypów HIV-1 w Polsce. Pierwsze polskie badania wykazały obecność subtypu B, typowego dla Europy Centralnej, w 100% próbek (6). W tej analizie stwierdziliśmy obecność subtypu B w 94% próbek. Po raz pierwszy wykryliśmy subtypy non-B w 6% próbek – subtypy C, D, oraz formy rekombinacyjne - CRF03\_AB i CRF01\_AE. Takie rekombinanty były powszechnie wykrywane wśród pochodzących z krajów Europy Wschodniej kobiet świadczących usługi seksualne. Te wyniki dowodzą istotnej zmiany w epidemii zakażeń HIV-1 w Polsce – pojawienia się nowych importowanych źródeł zakażeń.

Publikacja Nr 6 - *Transmisja lekoopornych szczepów HIV-1 wśród osób nowozdiagnozowanych w Polsce*

W tej publikacji przedstawiliśmy wyniki analizy oporności na leki w próbkach pobranych w latach 2004-2006, od pacjentów uprzednio nieleczonych, nowozdiagnozowanych. Próbki były dostarczane przez 9 klinik oraz areszty śledcze.

Najważniejsze wyniki uzyskane w tym badaniu:

- Zwiększenie do dziewięciu liczby współpracujących ośrodków – wzrost reprezentatywności danych.
- Potwierdzenie trwałości przedstawionego w publikacji Nr 5 trendu zmniejszania odsetka izolatów lekoopornych – wykryliśmy je w 14,7 % próbek.
- Brak oporności wieloklasowej - we wszystkich przypadkach stwierdziliśmy oporność wobec pojedynczych klas leków.

- Wykazanie dominacji oporności na leki z klasy NRTIs- 41,2% wariantów opornych, równy rozkład (29,4%) częstości identyfikacji wariantów opornych na PIs oraz NNRTIs
- Utrzymująca się najwyższa częstość identyfikacji wariantów opornych na AZT, ale zmniejszona do 6,9% badanych próbek
- Narastanie, w porównaniu do poprzednio uzyskanych wyników, odsetka wariantów genetycznych non-B – do 11,1%. Wykryliśmy nowy rekombinant CRF05\_DF.

### **Zbiorcza analiza wyników monitorowania oporności HIV-1 na leki w Polsce**

Publikacja Nr 7 - *Evolving patterns of HIV-1 transmitted drug resistance in Poland in the years 2000-2008*

W publikacji przedstawiliśmy skumulowane wyniki badań prowadzonych od 1999 r. – zestawienie częstości wykrywania lekooporności przenoszonej wirusa HIV-1 w Polsce oraz oddziaływanie tego zjawiska na skuteczność leczenia antywirusowego. W badanych próbkach dodatkowo identyfikowaliśmy subtypy genetyczne HIV-1, ważne w dochodzeniach epidemiologicznych, oraz zmiany we wzorcu subtypów w ocenianym okresie.

Za najważniejsze osiągnięcia uważam:

- Ciągłe, długoletnie monitorowanie częstości występowania TDR w Polsce. Wykazaliśmy spadek odsetka mutantów lekoopornych – z początkowych 51,5% (rok 2000) do ok.3,8% (2007) i stabilizacji na poziomie 5,3-5,4% w okresie 2011-2014 r. (publikacja przygotowywana). Najprawdopodobniejszą przyczyną stwierdzonych zmian jest wysoka skuteczność antywirusowa nowych leków, ich zestawy i kompozycje życzliwe pacjentowi (zmniejszenie ilości dawek dziennych, przyjmowanie niezależne od posiłków), skuteczna edukacja pacjentów i wynikająca z niej wysoka adherencja; niewątpliwie bardzo istotną rolę odgrywa też wprowadzenie terapii kierowanej – planowania schematu terapeutycznego i doboru leków zgodnego z laboratoryjnymi wynikami analizy oporności.
- monitorowanie zmian we wzorcu subtypów HIV-1 w Polsce – cytowane powyżej badania z 1996 r. wykazały obecność subtypu B w 100% próbek. Kolejne analizy dokumentują pojawienie się i narastanie odsetka subtypów nie-B – do ok. 12% w roku 2012. W tej grupie dominują formy rekombinacyjne (CRF) wirusa, najczęściej spotykane wśród kobiet trudniących się prostytutką, pochodzących z Ukrainy i Federacji Rosyjskiej. Zmiany te powodują utrudnienia diagnostyczne, gdyż większość testów jest optymalizowana do wykrywania i analizy subtypu B, oraz kliniczne – różny przebieg zakażenia, inny wpływ mutacji na lekooporność
- Wykazanie introdukcji nowego subtypu HIV-1 (CRF02\_AG) do Polski – źródłem zakażenia był migrant z Kamerunu, intencjonalnie zakażający uczestniczki organizowanych przezeń wydarzeń teatralnych
- Bardzo wysoka reprezentatywność wyników - przez kilka lat kierowany przeze mnie ośrodek był jedynym w Polsce prowadzącym analizę lekooporności i wzorców subtypów; jest jedynym, prowadzącym badania w tak długim czasie
- Wykorzystanie uzyskanych danych do uczestnictwa w licznych programach europejskich, umożliwiające analizę obserwowanych zmian i trendów w skali kontynentu.

Wykonana w październiku 2015 r. wstępna analiza wyników oznaczania oporności HIV-1 na PI, NRTI i NNRTI, w populacji pacjentów nieleczonych, wykazała dalszy spadek częstości

do 1,1% oraz nieobecność wariantów opornych na więcej niż jedną klasę leków (manuskrypt przygotowywany). Sądzę, że analiza relacji koszt-efektywność (koszt diagnozowania a zysk kliniczny) udowodni niezasadność monitorowania oporności w tej grupie pacjentów.

W ciągu 15 lat badania, charakteryzowania i monitorowania epidemii mutantów lekoopornych HIV-1 w Polsce wykazałem stały trend zmian w częstości ich występowania. Zmiany te są nieocenienie korzystne dla pacjentów, klinicystów oraz płatników składki zdrowotnej.

### **Usprawnienie diagnostyki pacjentów zakażonych HIV-1 - wdrożenie metody identyfikacji allelu HLA B\*5701**

Publikacja Nr 8 - *Genetic detection of HLA-B\*5701 allele for prediction of Abacavir hypersensitivity among HIV-positive patients in Polish population*

W leczeniu wzw C oraz zakażeń HIV-1 pojawiają się elementy terapii personalizowanej, uwzględniającej i cechy patogenów, i kompozycję genetyczną pacjenta. W przypadku leczenia wzwC czynnikiem usprawniającym prognozowanie wyniku leczenia oraz umożliwiającym modyfikacje terapii jest polimorfizm regionu IL28B (warto zauważyć, że skuteczność nowych leków - inhibitorów enzymów HCV jest niezależna od wariantu genetycznego IL28B). Natomiast w przypadku leczenia pacjentów zakażonych HIV-1 dostosowuje się n.p. dobór leków do typu tropowego wirusa – inhibitor wejścia Marawirok (MVC) skutecznie hamuje inwazję komórek gospodarza tylko przez wirusy o tropizmie do receptorów CCR5. Z kolei badanie wykrywające allel HLA B\*5701 w genomie pacjenta powoduje wyłączenie z proponowanego zestawu leków ABC, ze względu na możliwe reakcje nadwrażliwości. Oba te badania wdrożyłem do rutynowej diagnostyki.

Dla oznaczania allelu HLA-B\*5701 zastosowaliśmy technikę PCR z wykorzystaniem specyficznych do sekwencji primerów (PCR-SSP), tanią i szybko.

Za najważniejsze osiągnięcia uważam:

- Wprowadzenie typowania allelu HLA-B\*5701 jako elementu terapii personalizowanej do leczenia pacjentów zakażonych HIV-1. Typowanie to umożliwia zastosowanie podstawowego leku, ABC, zgodnie z genotypem pacjenta, zapobiegając rozwojowi nadwrażliwości na ABC wśród pacjentów z tym allelem.
- Ustalenie częstości występowania w populacji polskiej pacjentów z niekorzystnym allelem HLA B\*5701 na 4,2%. Częstość ta jest typowa dla populacji pacjentów rasy kaukaskiej z Centralnej i Północnej Europy.

### **Usprawnienie diagnostyki pacjentów zakażonych HIV-1 – opracowanie i wdrożenie metody oznaczania tropizmu HIV-1**

HIV-1 wykorzystuje jeden z dwóch koreceptorów gospodarza (CXCR4 lub CCR5) do inwazji komórki. Stosownie warianty te są oznaczane jako X4 lub R5–tropowe. Znane są też warianty wykorzystujące oba koreceptory – tzw. warianty dual. Dane licznych badań wskazują, że u ok. 90 % pacjentów europejskich, we wczesnych fazach zakażenia, dominuje wariant R5. MVC, lek z nowej klasy antagonistów koreceptora CCR5, wydajnie hamuje przyłączanie wariantów R5-tropowych do komórki gospodarza. Opracowano dwie techniki oznaczania tropizmu – feno- i geno-typowanie. W 2011 r. jako jedna z dwu polskich pracowni, wdrożyliśmy oznaczanie tropizmu. Zastosowaliśmy technikę sekwencjonowania fragmentu kodującego pętlę V3 glikoproteiny gp 120. Wykazaliśmy, że ok. 62% polskich

pacjentów jest zakażonych tym wariantem; leczenie MVC będzie u nich skuteczne (dane własne, niepublikowane).

### **Specyfika epidemii HIV-1 w Polsce**

W badaniach wykonanych we współpracy z ośrodkiem w Atenach, metodą analizy filogenetycznej, wykryliśmy dwa główne klastry przenoszenia zakażeń HIV-1 w Polsce – malejącą grupę pacjentów przyjmujących dożylnie narkotyki oraz narastającą grupę MSM – grupę pacjentów homoseksualnych (7).

Dane te są zgodne z wcześniej publikowanymi wynikami analizy filogeograficznej rozprzestrzeniania się HIV-1 w Europie (8). W publikacji tej są też zawarte reprezentatywne, zebrane i opracowane przeze mnie, dane z Polski. Przedstawione wyniki wskazują, że do 2008 r. Polska była krajem z najniższą, wśród 17 krajów uczestniczących, migracją HIV-1 - **była krajem z najbardziej izolowaną epidemią zakażeń tym wirusem**. Jest to, podobnie jak w wykazanych przeze mnie zmianach we wzorcu genotypów HCV oraz pojawianiu się nowych subtypów HIV-1, kolejny przykład wpływu zmian politycznych w Polsce na epidemię analizowanych patogenów.

Wieloaspektowe badania zakażeń HIV-1 w Polsce były przez wiele lat wykonywane jedynie w kierowanym przez mnie ośrodku, dlatego prezentowane wyniki odznaczają się najwyższą możliwą reprezentatywnością.

### **Piśmiennictwo**

1. Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, et. al.: The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial". *N Engl J Med* 1987; 317 (4): 185–91
2. Rooke R<sup>1</sup>, Tremblay M, Soudeyns H. et. al.: Isolation of drug-resistant variants of HIV-1 from patients on long-term zidovudine therapy. *Canadian Zidovudine Multi-Centre Study Group. AIDS*. 1989 Jul;3(7):411-5
3. Schultze A, Phillips AN, Paredes R, et. al.: HIV resistance testing and detected drug resistance in Europe. *AIDS*. 2015 Jul;29(11):1379-89
4. J.J. Stańczak, E. Bakowska, P. Pulik et al. Prevalence of Resistance mutations in the protease gene in naive and drug-experienced patients. *Antiviral Therapy* 2001;6: S 66
5. Horban A., E. Bakowska, P. Pulik et al.: Genotypic analysis of HIV strains resistant to NRTIs In naive patients. *Antiviral Therapy* 2001;6: S 66
6. Lipniacki A., Sheppard HW, Dondero DV. et al.: determination of HIV-1 subtypes in Polish patients using HMA method. Preliminary data. VIth European Congress on Clinical aspects and Treatment of HIV, Hamburg, 1997
7. E. Magiorkinis, G. Stańczak, JJ Stańczak, et al.: Molecular typing of the HIV-1 epidemic in Poland: evidence for extensive dispersal through two distinct local networks. 15th European AIDS Conference (EACS), Bucarest, 2011
8. Paraskiewis D., Pybus O., Magiorkinis G. et al.: Tracing the HIV-1 mobility in Europe: a phylogeographic approach. *Retrovirology* 2009;6:49-60

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

### **Wdrożenie analizy filogenetycznej do rutynowej praktyki diagnostycznej**



Sekwencje fragmentów genomów, otrzymywane podczas oznaczania lekooporności HBV, HCV czy HIV-1, mogą być skutecznie wykorzystywane w innych badaniach. Jednym z nich jest analiza filogenetyczna. Opisuje ona odległości genetyczne, pokrewieństwa, między poszczególnymi izolatami, gatunkami czy rodzajami organizmów. Umożliwia porównywanie sekwencji nowych z archiwizowanymi. Jest stosowana np. w charakterystyce zakażeń- grupy ryzyka, łańcuch zakażeń, klastry, mikroepidemie, nowe subtypy itp.

W ostatnich latach, po wprowadzeniu techniki sekwencjonowania populacyjnego badaniach wybranych wirusów, wprowadziłem metodę analizy filogenetycznej do:

- oceny jakości diagnostyki lekooporności HIV-1,
- analizy grup i klastrów osób zakażonych tym wirusem,
- udokumentowania rozprzestrzeniania się typu genetycznego H wirusa HBV, rzadko dotychczas stwierdzanego w Polsce,
- analizy powiązań genetycznych izolatów HCV – tą metodą udowodniliśmy zakażenie szpitalne HCV w jednej z klinik.

### **Zakończenie**

Od roku 1991 intensywnie promuję wprowadzanie diagnostyki molekularnej do badań oraz diagnozowania bakteryjnych i wirusowych patogenów człowieka. Oprócz usprawniania diagnostyki zakażeń HCV i HIV-1 wprowadziłem diagnostykę zakażeń wirusami EBV, CMV, również zakażeń bakteryjnych. W latach 1993-94, we współpracy z zespołem Zakładu Mikrobiologii AM w Warszawie, opracowałem metodę wykrywania genów *Cl. difficile*, kodujących toksyny A/B. Metodę tę skutecznie stosowaliśmy do 2000 r., gdy upowszechniły się równie czułe, szybsze i tańsze testy serologiczne. Opis metody i wyniki prezentowaliśmy w *Med. Dośw. Mikrobiol.* (1994) i *Acta Microbiol Polon* (1995).

W 1992 r. zacząłem badania HCV i HIV-1 od syntezy, na wzorcu pierwszych publikowanych sekwencji, primerów, następnie użytych w próbach opracowania i użycia w diagnostyce metody RT-PCR. Następnie zorganizowałem i kieruję Pracownią, w której, jednej z niewielu w Europie, bada się warianty genetyczne trzech wirusów przenoszonych drogą krwi – HIV-1, HBV, HCV oraz wybrane cechy genomu pacjenta. Identyfikacja typów i subtypów genetycznych, wariantów opornych na leki oraz wariantów tropowych umożliwia planowanie skutecznego leczenia, prognozowanie jego skutków oraz wykrywanie przyczyn niepowodzenia terapeutycznego. Wykazana w moich badaniach ewolucja wzorców genotypów HCV i subtypów HIV-1, obserwowana od wczesnych lat dziewięćdziesiątych XX wieku, jest dobrym dowodem oddziaływania zmian politycznych na epidemie chorób zakaźnych.

W badaniach wyżej opisanych wirusów przenoszonych drogą krwi znaczne utrudnienie stanowi wyjściowa wysoka różnorodność genetyczna (genotypy, subtypy) wirusów oraz zmienność osobnicza - zdolność do intensywnego różnicowania w zakażonym organizmie. Rzadko dyskutuje się, że większość testów i metod diagnostycznych, oraz leków, była opracowywana i optymalizowana wobec wariantów genetycznych dominujących w krajach Ameryki Północnej i Europy Zachodniej. W przypadku HCV jest to genotyp 1, w HIV-1 – subtyp B. W rezultacie obserwuję utrudnienia w diagnostyce niektórych subtypów nie-B oraz form rekombinacyjnych HIV-1. Znane są przypadki ułomności testów komercyjnych, z niższą czułością wykrywających różne typy genetyczne. Dlatego, tworząc systemy primerów i sond, należy uwzględnić zmienność naturalną nawet wśród sekwencji wysokokonserwowanych. Na przykład dla oznaczania oporności HCV niezbędne było stworzenie dwóch systemów primerów, różnych dla subtypów 1a i 1b.

Od 1995 r. organizuję i uczestniczę w szkoleniach lekarzy oraz pracowników laboratoriów w zakresie diagnostyki mikrobiologicznej i molekularnej patogenów bakteryjnych i wirusowych, również we współpracy z CMKP w Warszawie. We współpracy z towarzystwami europejskimi i w ramach ich programów prowadzę intensywną edukację diagnostów i klinicystów z krajów Europy Wschodniej – Litwy, Słowacji, Ukrainy, Węgier, Federacji Rosyjskiej; też Azerbejdżanu i Kazachstanu.

### **Współpraca naukowa i organizacyjna**

Jestem współautorem i aktywnym uczestnikiem programów europejskich (SPREAD, CATCH, WATCH, HEPVIR, NEAT, CAPRE), mających na celu badania epidemii zakażeń HIV-1 i HCV oraz lekooporności wirusów (HIV-1, HCV, HBV), dróg zakażeń, przenoszenia zakażeń wewnątrz Europy, identyfikację i charakterystykę grup ryzyka; usprawnianie diagnostyki – ujednoczenie treningów personelu, standardów wyposażenia laboratoriów diagnostycznych i stosowanych testów, tworzenie paneli kontrolnych jakości diagnostyki.

Jestem członkiem komitetów organizacyjnych lub naukowych międzynarodowych konferencji i sympozjów:

- International Symposium on Viral Hepatitis, Warsaw, 1997
- IXth European AIDS Conference, Warsaw, Poland, 2003
- European Meeting on HIV & Hepatitis – Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance – od 2005 r. do chwili obecnej

Jestem recenzentem doniesień zjazdowych konferencji organizowanych przez towarzystwa naukowe europejskie i ogólnoswiatowe, m. in. ESAR oraz International AIDS Society.

Dużą część prac naukowo-badawczych wykonywałem lub wykonuję we współpracy z niżej wymienionymi ośrodkami:

1. W zakresie zakażeń HIV-1, HBV i HCV:
  - Klinika Chorób Zakaźnych Wieku dziecięcego WUM,
  - Klinika Chorób Zakaźnych Dla Dorosłych WUM,
  - Klinika hepatologii i Nabytych Niedoborów Oporności WUM,
  - Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii CM w Bydgoszczy,
  - Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii UM w Łodzi,
  - Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UM w Poznaniu
  - Institute of Child Health ECS Coordinating Centre for Paediatric Epidemiology and Biostatistics
  - Pediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA)
  - National Retrovirus Reference Center, Medical School, University of Athens
2. W opracowywaniu innowacyjnych leków przeciwwirusowych lub badaniu nowych schematów leczenia:
  - większość wiodących firm farmaceutycznych (Abbott, AbbVie, Gilead, GSK, Janssen, MSD, Roche, Schering-Plough)
3. W opracowywaniu leków przeciwnowotworowych:
  - Immatics Biotechnologies GmbH, Tübingen, Germany

## PODSUMOWANIE

Omówiłem powyżej cykl ośmiu publikacji wybranych jako podstawa do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.

Ich łączna wartość Impact Factor = **6,733** punktów; suma punktów KBN/MNiSW = **74**.

Sumaryczny wskaźnik IF opublikowanych prac z wyłączeniem prac wchodzących w rozprawę habilitacyjną = **67.255**; suma punktów KBN/MNiSW, z wyłączeniem prac wchodzących w rozprawę habilitacyjną = **302**.

Łączna liczba cytowań wszystkich prac, z wyłączeniem prac wchodzących w rozprawę habilitacyjną, według Web of Science = 331

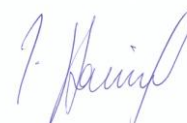
Indeks Hirscha, z wyłączeniem prac wchodzących w rozprawę habilitacyjną = **7**

### Analiza bibliometryczna

W 42 publikacjach, zawartych w analizie bibliometrycznej, w 17 jestem pierwszym lub drugim autorem, w 6 – senior autor. Mój dotychczasowy dorobek publicystyczny przedstawiłem w Tabeli I.

Tabela I. Wykaz publikacji habilitanta

Publikacje	Krajowe	Zagraniczne	Ogółem	IF
Oryginalne	19	13	32	70.283
Poglądowe	8		8	
Opisy przypadków	1		1	
Listy do Redakcji		1	1	3.705
Rozdziały w podręcznikach akademickich	7			
Inne	Ok. 200 haseł w Wielkiej Encyklopedii PWN (2001-2005 r.) Skrypty dla lekarzy - uczestników kursów specjalizacyjnych w ramach CMKP			
Komunikaty zjazdowe				
- ustne	28	7	33	
- plakatowe	17	39	56	



### §3 Osiągnięcia naukowo-badawcze i aktywność naukowa habilitanta.

1. *Autorstwo lub współautorstwo publikacji naukowych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)*

1. Kisiel E, Radkowski M, Pawelczyk A, Horban A, **Stanczak J**, Bukowska-Ośko I, Caraballo Cortes K, Kaźmierczak J, Popiel M, Laskus T. Seronegative hepatitis C virus infection in patients with lymphoproliferative disorders. *J Viral Hepat.* 2014 Jun;21(6):424-9. doi: 10.1111/jvh.12181. Epub 2013 Oct 20.

Impact Factor: 3,909

Udział: 2%

Wkład habilitanta: Charakterystyka polimorfizmu regionu IL 28B pacjentów z wzwC.

Współudział w pisaniu publikacji

2. Bukowska-Ośko I, Radkowski M, Pawelczyk A, Rosinska M, Caraballo Cortés K, Płoski R, Berak H, Horban A, **Stanczak J**, Fic M, Laskus T. Hepatitis C virus 5' untranslated region variability correlates with treatment outcome. *J Viral Hepat.* 2014 Aug;21(8):551-9. doi: 10.1111/jvh.12182. Epub 2013 Oct 13

Impact Factor: 3,909

Udział: 2%

Wkład habilitanta: Charakterystyka genetyczna HCV. Współudział w pisaniu publikacji

3. Berak H, Laskus T, Kołakowska-Rządźka A, Wasilewski M, **Stanczak JJ**, Bardadin K, Walewska-Zielecka B, Horban A. Peginterferon alfa-2a and peginterferon alfa-2b combined with ribavirin in patients with genotype 1 chronic hepatitis C: results of a prospective single-centre study. *Adv Med Sci.* 2014 Sep;59(2):261-5.

Impact Factor: 1,105

Udział: 2%

Wkład habilitanta: analiza genotypów HCV, ocena wiremii. Współudział w pisaniu publikacji

4. Klein N, Sefe D, Mosconi I, Zanchetta M, Castro H, Jacobsen M, Jones H, Bernardi S, Pillay D, Giaquinto C, Walker AS, Gibb DM, De Rossi A; Paediatric European Network for Treatment of AIDS 11 Trial Team. The immunological and virological consequences of planned treatment interruptions in children with HIV infection. *PLoS One.* 2013 Oct 23;8(10):e76582. doi: 10.1371/journal.pone.0076582

Impact Factor: 3,534

Udział: 2%

Wkład habilitanta: kolekcjonowanie próbek z ośrodka polskiego; analiza subtypu i wiremii HIV-1, ocena uszkodzenia układu odpornościowego pacjentów.

5. Walter S, Weinschenk T, Stenzl A, Zdrojowy R, Pluzanska A, Szczylik C, Staehler M, Brugger W, Dietrich PY, Mendrzyk R, Hilf N, Schoor O, Fritsche J, Mahr A, Maurer D, Vass V, Trautwein C, Lewandrowski P, Flohr C, Pohla H, **Stanczak JJ**, Bronte V, Mandrizzato S, Biedermann T, Pawelec G, Derhovanessian E, Yamagishi H, Miki T, Hongo F, Takaha N, Hirakawa K, Tanaka K, Stevanovic S, Frisch J, Mayer-Mokler A,

Kirner A, Rammensee HG, Reinhardt, Sing-Jasuja J. Multipeptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med.* 2012 Jul 29. doi: 10.1038/nm.2883

Impact Factor: 22,462

Liczba cytowań wg Web of Science: 3

Udział: 2%

Wkład habilitanta: Izolowałem i wykonałem wstępną charakterystykę komórek immunokompetentnych krwi w próbkach z polskich klinik. Współudział w pisaniu publikacji

6. Paediatric European Network for Treatment of AIDS. Response to planned treatment interruptions in HIV infection varies across childhood. *AIDS.* 2010 Jan 16;24(2):s.231-41

Impact Factor: 6,348

Udział: 1%

Wkład habilitanta: Udział w pierwszym europejskim badaniu wpływu planowanych przerw w leczeniu na sukces terapeutyczny u dzieci zakażonych HIV-1. Kontynuacja badań programu PENTA (pierwsze wyniki w przedstawił w publikacji Nr 9). Zebrałem wszystkie polskie próbki, oceniłem wielkość wirēmii oraz zmiany w profilu immunologicznym pacjentów. Uzyskane wyniki posłużyły do modyfikacji rekomendacji leczenia antyretrowirusowego dzieci; ułatwiają wybór optymalnych strategii leczniczych.

7. G. P. Stańczak, **J.J. Stańczak**, M. Marczyńska, E. Firląg-Burkacka, E. Małolepsza, Wiercińska-Drapało, M. Leszczyszyn-Pynka, E. Jabłonowska, T. Dyda, P. Ząbek, Horban A. Evolving patterns of HIV-1 transmitted drug resistance in Poland in the years 2000-2008. *J Med Virol.* 2010 Jul;82(7):1291-4

Impact Factor: 2,895

Liczba cytowań wg Web of Science: 3

Udział: 38%

Wkład habilitanta: kontynuacja i podsumowanie wyników badań rozpoczętych przez habilitanta w 1999 r. – organizacja badań, rekrutacja ośrodków klinicznych, analiza sekwencyjna izolatów HIV-1, opracowanie wyników, współudział w pisaniu publikacji

8. Paraskevis D, Pybus O, Magiorkinis G, Hatzakis A, Wensing AM, van de Vijver DA, Albert J, Angarano G, Asjö B, Balotta C, Boeri E, Camacho R, Chaix ML, Coughlan S, Costagliola D, De Luca A, de Mendoza C, Derdelinckx I, Grossman Z, Hamouda O, Hoepelman I, Horban A, Korn K, Kücherer C, Leitner T, Loveday C, Macrae E, Maljkovic-Berry I, Meyer L, Nielsen C, Op de Coul EL, Ormaasen V, Perrin L, Puchhammer-Stöckl E, Ruiz L, Salminen MO, Schmit JC, Schuurman R, Soriano V, **Stanczak J**, Stanojevic M, Struck D, Van Laethem K, Violin M, Yerly S, Zazzi M, Boucher CA, Vandamme AM. Tracing the HIV-1 subtype B mobility in Europe: a phylogeographic approach. *Retrovirology.* 2009;6:49

Impact Factor: 4,105

Liczba cytowań wg Web of Science: 31

Udział: 1%

Wkład habilitanta: Pierwsze europejskie badanie epidemii zakażeń HIV-1. Sekwencje genomów HIV-1, uzyskane z 16 krajów europejskich i Izraela, posłużyły do sporządzenia

porównań filogeograficznych, identyfikujących szlaki epidemiczne wirusa w Europie. Zebrałem, scharakteryzowałem genetycznie i klinicznie wszystkie polskie izolaty HIV-1, których sekwencje użyto w badaniu. Było to również pierwsze europejskie badanie migracji dominującego w Europie subtypu B HIV-1. Sekwencje genomów HIV-1 posłużyły do analiz filogeograficznych identyfikujących szlaki przenoszenia wirusa w Europie.

Za najważniejsze wyniki uważam wykrycie i udowodnienie ważnych epidemiologicznie i klinicznie różnic w rozprzestrzenianiu subtypu B w Europie:

- Grecja, Portugalia, Serbia i Hiszpania - źródła (eksporterzy) zakażeń;
- Austria, Belgia, Luksemburg – kraje importujące zakażenia;
- Inne uczestniczące kraje – migracja dwukierunkowa
- Wykazanie, że Polska w odróżnieniu od innych krajów, nabyła HIV-1 drogą kilku pojedynczych, punktowych introdukcji, poprzez środowiska osób przyjmujących dożylnie narkotyki.
- **Wykazanie, że Polska była krajem o najbardziej izolowanej epidemii HIV-1.**

Wykryte wzorce migracji uzasadniają nasilenie strategii profilaktycznych wśród turystów, podróżników oraz migrantów

9. Cressey TR and Paediatric European Network for Treatment of AIDS II Study Group. Plasma drug concentrations and virologic evaluations after stopping treatment with nonnucleoside reverse- transcriptase inhibitors in HIV type 1-infected children. *Clin Infect Dis.* 2008 May 15;46:s. 1601-1608

Impact Factor: 8,266

Liczba cytowań wg Web of Science: 6

Udział: 1%

Wkład habilitanta: Udział w pierwszym europejskim badaniu PENTA, oceniającym wpływ planowanych przerw w leczeniu dzieci zakażonych HIV-1, na selekcję i kumulację mutacji warunkujących oporność na leki antywirusowe. Zebrałem wszystkie polskie próbki, ustaliłem wzorce mutacji warunkujących lekooporność poszczególnych izolatów HIV-1.

10. Deterding K, Constantinescu I, Nedelcu FD, Gervain J, Nemecek V, Srtunecy O, Vince A, Grgurevic I, Bielawski KP, Zalewska M, Bock T, Ambrozaitis A, **Stanczak J**, Takács M, Chulanov V, Slusarczyk J, Drazd'áková M, Wiegand J, Cornberg M, Manns MP, Wedemeyer H. Prevalence of HBV genotypes in Central and Eastern Europe. *J Med Virol.* 2008 Oct;80(10): 1707-11

Impact Factor: 2,576

Liczba cytowań wg Web of Science: 20

Udział: 3%

Wkład habilitanta: Kolekcjonowanie i analiza kliniczna próbek, identyfikacja genotypu, udział w pisaniu publikacji

11. Radkowski M, Bednarska A, Horban A, **Stanczak J**, Wilkinson J, Adair DM, Nowicki M, Rakela J, Laskus T. Infection of primary human macrophages with hepatitis C virus in vitro: induction of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 8. *J Gen Virol.* 2004; 85:47-59

Impact Factor: 3,221

Liczba cytowań wg Web of Science: 41

Udział: 10%

Wkład habilitanta: Kolekcjonowanie i wstępna charakterystyka genetyczna próbek.

12. Horban A, **Stańczak JJ**, Bąkowska E, Tobolewska EJ, Przybylska-Stengiel KJ, Stańczak GP, Burkacka E. High prevalence of genotypic resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors among therapy-naive individuals from the Warsaw cohort. *Infection*. 2002;30(6):356-9.

Impact Factor: 1,035

Liczba cytowań wg Web of Science: 12

Udział: 50%

Wkład habilitanta: Koncepcja i plan badania. Analiza genetyczna i demograficzna próbek. Wykazanie wysokiego odsetka (51,5%) próbek zawierających mutanty HIV-1 odporne na inhibitory odwrotnej transkryptazy. Napisanie pracy

13. **Stańczak JJ**, Opoka-Kegler J, Czerwionka-Szaflarska M, Karczewska K, Woźniakowska-Gęsicka T, Horban A. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Poland. *J Hepatol* 1999;31 :574 (list do redakcji)

Impact Factor: 3,705

Liczba cytowań wg Web of Science: 3

Udział: 65%

Wkład habilitanta: Kontynuacja badań rozpoczętych w 1992 r. Zorganizowanie pierwszej ogólnokrajowej wielośrodkowej oceny wzorców genotypów HCV występujących w Polsce. Zorganizowanie finansowania badań. Diagnostyka próbek, identyfikacja typów genetycznych HCV. Wykazanie zmniejszenia częstości występowania typu genetycznego 1, wzrostu częstości identyfikacji typu G3. Napisanie publikacji.

14. **Stańczak JJ**, Opoka-Kegler J, Lipniacki A, Baran J, Piasek A, Horban A. Peripheral Blood mononuclear cell-based system for monitoring interferon therapy for hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis*. 1997 Sep;25(3):746-7

Impact Factor: 2,803

Liczba cytowań wg Web of Science: 1

Udział: 55%

Wkład habilitanta: Koncepcja i plan badania. Wykonanie badań. Wykazanie obecności RNA HCV, w tym nici ujemnej - pośrednika replikacyjnego - w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej. Skonstruowanie systemu diagnostycznego z użyciem tych komórek jako źródła HCV RNA. Wykazanie, że u ok. 80% pacjentów leczonych interferonem, z niewykrywaną wiremią, RNA HCV jest wykrywany w komórkach, a po zakończeniu leczenia następuje wznowa wirusowego zapalenia wątroby. Napisanie publikacji. Opracowana metoda jest stosowana do chwili obecnej.

15. Stańczak H, **Stańczak JJ**, Singh I. Chromosomal localization of the human gene for palmitoyl-CoA ligase (FACL1). *Cytogenet Cell Genet*. 1992;59(1):s. 17-9

Impact Factor: 4,115

Liczba cytowań wg Web of Science: 7

Udział: 30%

Wkład habilitanta: Pomysł i plan badania; identyfikacja w banku genów, metodą immunoblottingu, klonu zawierającego fragment ludzkiego genu palmitoyl-CoA ligazy; konstrukcja sondy użytej do mapowania ludzkiego kariotypu, ustalenie chromosomalnej lokalizacji genu w regionie 3q13; udział w pisaniu publikacji

#### **§4. Osiągnięcia naukowo-badawcze habilitanta**

*1. Autorstwo lub współautorstwo monografii, publikacji naukowych w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazach lub na liście, o których mowa w § 3, dla danego obszaru wiedzy*

1. Panasiuk A, Flisiak R, Mozer-Lisewska I, Adamek A, Tyczyno M, Halota W, Pawłowska M, **Stańczak J**, Berak H, Wawrzynowicz-Syczewska M, Boroń-Kaczmarek A, Łapiński TW, Grzeszczuk A, Piekarska A, Tomaszewicz K, Jabłkowski M, Kryczka W, Zarebska-Michaluk D, Stępień P, Garlicki AM, Kozłowska J, Wiercińska-Drapała A, Zasik E, Mazur W, Dobracka B, Dobracki W, Simon K, Ryzko J, Pawłowska J, Dzierzanowska-Fangrat K, Januszkiewicz-Lewandowska D, Szenborn L, Zaleska I, Rokitka M, Strawińska E, Balinowska K, Smiatacz T, Stalke P, Sikorska K, Lakomy A, Zdrojewski M, Lachowicz A. Distribution of HCV genotypes in Poland. *Przegl Epidemiol.* 2013;67(1):11-6, 99-103

Udział: 3 %

Wkład habilitanta: Dostarczenie danych o genotypach HCV. Udział w pisaniu publikacji.

2. Ząbek P, Dyda T, Stańczak GP, **Stańczak JJ**. Diagnostyka molekularna w monitorowaniu leczenia WZW C. *Zakażenia.* 2012;2:69-73

Udział: 30 %

Wkład habilitanta: Koncepcja publikacji. Udział w pisaniu, ostateczna korekta publikacji.

3. Kołakowska-Rządźka A, Berak H, **Stańczak J**, Dyda T, Horban A. Better outcome of HBe Ag - than HBe Ag (+) lamivudine treatment of HBV chronically infected patients. *Przegl Epidemiol.* 2010;64(1):69-71

Udział: 10 %

Wkład habilitanta: Wykonanie oznaczeń typów genetycznych HBV. Oznaczanie wirerii HBV. Udział w pisaniu publikacji.

4. Ząbek P, Dyda T. Stańczak GP, Marczyńska M, Firląg-Burkacka E, **Stańczak JJ**. Genetic detection of HLA-B\*5701 allele for prediction of Abacavir hypersensitivity among HIV-positive patients in Polish population. *HIV&AIDS Review* 2009;8 (3) 13-16

Udział: 15 %

Wkład habilitanta: Koncepcja badań i publikacji. Udział w pisaniu, ostateczna korekta publikacji.

5. **Stańczak JJ**, Stańczak GP. Zalecenia europejskie i polskie do diagnostyki zakażeń HIV-1. *Przegl Epidemiol* 2008;62:509-510

Udział: 55 %



Wkład habilitanta: Analiza zaleceń europejskich. Adaptacja do warunków polskich. Współredagowanie zaleceń. Udział w pisaniu pracy.

6. GP Stańczak, **JJ Stańczak**, MJ Majchrzak, E Firląg-Burkacka, A Wiercińska-Drapało, M Leszczyszyn -Pynka, E Jabłonowska, E Małolepsza, A Horban: HIV-1 Drug Resistance Patterns Among Treatment-Naïve and Therapy-Experienced Patients in Poland. *HIV&AIDS Review* 2007;6(1) 23-27

Udział: 33% %

Wkład habilitanta: Kontynuacja badań zainicjowanych przez habilitanta w 1999 r. Koncepcja badań w grupie pacjentów leczonych, z niepowodzeniem terapeutycznym. Zorganizowanie badania wieloośrodkowego. Analiza danych. Udział w pisaniu pracy.

7. GP Stańczak, **JJ Stańczak**, E Firląg-Burkacka, A Wiercińska-Drapało, M Leszczyszyn-Pynka, E Jabłonowska, E Małolepsza, A Horban: Transmisja lekoopornych szczepów HIV-1 wśród osób nowozdiagnozowanych w Polsce. *Przegl Epidemiol.* 2007;61(1):29-34

Udział: 33% %

Wkład habilitanta: Kontynuacja badań zainicjowanych przez habilitanta w 1999 r. Koordynacja badania wieloośrodkowego. Analiza danych. Udział w pisaniu pracy.

8. Berak H, Kołakowska-Rzadzka A, Wasilewski M, **Stańczak JJ**, Bardadin K., Walewska-Zielecka B, Horban A. Comparison of early virologic response among patients with chronic hepatitis C infected with genotype non 2/3 treated with pegylated interferon alfa-2B and ribavirin in dependence with hepatic fibrosis stages. *Przegl Epidemiol.* 2006;60(4):673-6.

Udział: 10 %

Wkład habilitanta: Wykonanie oznaczeń genotypów i wirerii HCV. Udział w pisaniu pracy.

9. Horban A, Wasilewski M, Berak H, **Stańczak JJ**, Bardadin K, Paprocka H. Study of the efficacy of combined therapy with interferon alfacon-1 and ribavirin for chronic hepatitis C. *Przegl Epidemiol.* 2006;60(3):563-9

Udział: 15%

Wkład habilitanta: Wykonanie oznaczeń genotypów i wirerii HCV. Udział w pisaniu pracy

10. H Berak, M Wasilewski, A Horban, **JJ Stańczak**, A Cybula: Results of 48 weeks lamivudine treatment of patients with chronic hepatitis B and HBeAg (+). *Przegl Epidemiol.* 2006;60(2): 253-7

Udział: 10 %

Wkład habilitanta: Wykonanie oznaczeń wirerii HBV. Udział w pisaniu publikacji

11. H Berak, M Wasilewski, A Horban, **JJ Stańczak**, A Cybula: Results of 48 weeks lamivudine treatment of patients with chronic hepatitis B and HBeAg (-). *Przegl Epidemiol.* 2006;60(2): 247-251

Udział: 10 %

Wkład habilitanta: Wykonanie oznaczeń wirerii HBV. Udział w pisaniu publikacji

12. **Staćczak JJ**, Majchrzak MJ, Stanczak GP. Modern diagnostics of Chlamydia trachomatis infections. *Develop Period Med.* 2005;9-20. Review

Udział: 40 %

Wkład habilitanta: Koncepcja publikacji. Udział w pisaniu publikacji

13. **Staćczak JJ**, Przybylska-Stengiel K, Stańczak GP. Współczesna diagnostyka laboratoryjna zakażeń HIV. *Medycyna po Dyplomie* 2004: (17); 11-16

Udział: 40 %

Wkład habilitanta: Koncepcja publikacji. Udział w pisaniu publikacji

14. Młynarczyk A, Młynarczyk G, Szymanowska A, **Staćczak J**, Łuczak M, Jeljaszewicz J.: Use of PCR for evaluating detection of *coa* and *nuc* genes in methicillin-resistant, coagulase-negative strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA-CN) *Med Dosw Mikrobiol.* 2000;52(3): 217-22

Udział: 15 %

Wkład habilitanta: Koncepcja badań. Opracowanie metody identyfikacji genów *coa* i *nuc* *Staphylococcus*. Ocena występowania tych genów w izolatach klinicznych. Udział w pisaniu publikacji

15. **Staćczak JJ**.: Genetic diagnosis of hepatitis C virus infection. *Pol Merkuriusz Lek.* 1999; 6(32):92-5. (review)

Udział: 100 %

Wkład habilitanta: Koncepcja publikacji, napisanie.

16. Szaflarska-Szczepanik A, **Staćczak JJ**, Czerwionka-Szaflarska M, Kowalska-Winkler, Baran J, Tobolewska E. Przewlekłe zapalenie wątroby typu G u 14-letniego chłopca. *Pediatrics Polska* 1998;LXXIII,3:221-223

Udział: 35 %

Wkład habilitanta: Koncepcja badania. Opracowanie i zastosowanie metody identyfikacji HGV RNA w reakcji RT-PCR. Udział w pisaniu publikacji

17. Hryniewicz HJ, Cianciara J, Stańczak W, Brojer E, **Staćczak J**. Selected diagnostic and clinical aspects of chronic viral hepatitis type C. *Pol Arch Med Wewn.* 1996 Apr;95(4):342-8.

Udział: 15 %

Wkład habilitanta: Koncepcja publikacji. Ocena przydatności reakcji RT-PCR do diagnostyki molekularnej HCV. Udział w pisaniu publikacji

18. Juszczak J., Migdalski P., Flieger J., Świętek K., Adamek J., Brojer E., **Staćczak JJ**.: Reaktywność humoralna anty-HCV i HCV-RNA w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu C. *Hepatologia Polska*, 1995, 1:83

Udział: 20 %

Wkład habilitanta: Koncepcja badań. Wykonanie oznaczeń porównawczych w wykrywaniu zakażenia HCV metodami serologicznymi i molekularnymi. Udział w pisaniu publikacji

19. **Stańczak JJ.**, Brojer E., Radlińska M., Sankowska M., Kacperska E., Głowska-Moraczewska, Z., Seyfried H.: Wykrywanie materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) metodą RT-PCR. *Zeszyty Hepatologiczne*, 1994, 7:18-26

Udział: 30 %

Wkład habilitanta: Koncepcja badań. Stworzenie metody identyfikacji HCV RNA techniką RT-PCR. Wdrożenie opracowanej metody do rutynowej diagnostyki. Udział w pisaniu publikacji

20. Martirosian G., Meisel-Mikołajczyk F., **Stańczak JJ.**, Flis D.: Toxigenicity of *Clostridium difficile* Strains Isolated in the Surgical Ward. *Acta Microbiol. Polon.* 1995, 44: 47-53

Udział: 30 %

Wkład habilitanta: Koncepcja badań. Zastosowanie przedstawionej w publikacji Nr 23 metody identyfikacji genów *Tox A/B* w szczepach *Clostridium difficile* izolowanych na oddziałach chirurgicznych. Udział w pisaniu publikacji

21. **Stańczak JJ.**, Radlińska M., Brojer E., Medyńska J., Seyfried H.: Partial nucleotide sequences and genotypes of hepatitis C virus (HCV) isolated in Polish blood donors and patients with hepatitis. *Hepatologia Polska*, 1995, 2:87-92

Udział: 60 %

Wkład habilitanta: Koncepcja badań. Opracowanie metody sekwencjonowania genomowego RNA HCV. Pierwsze wyniki oznaczania typów genetycznych HCV w Polsce – wykazanie dominacji typu 1, subtypu 1b. Udział w pisaniu publikacji

22. Brojer E, Sankowska M, **Stańczak JJ**, Gronkowska A, Stepień-Sopniewska B, Gorski A, Zupańska B. DRB polymerase chain reaction fingerprinting, DQA oligotyping and mixed lymphocyte culture results in related bone marrow donors and recipients. *Arch Immunol Ther Exp* 1995;43(2):89-92

Udział: 10 %

Wkład habilitanta: Zastosowanie techniki PCR do analizy wybranych alleli układu HLA. Wykonanie badań. Udział w pisaniu publikacji

23. Martirosian G, Meisel-Mikołajczyk F, **Stańczak J**, Mierzejewski J, Flis D. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* strains isolated from alimentary tract of dogs by PCR. *Med Dosw Mikrobiol.* 1994;46(3):201-6

Udział: 20%

Wkład habilitanta: Koncepcja badań. Opracowanie metody identyfikacji genu *Tox A/B Clostridium difficile* techniką PCR Wdrożenie metody do rutynowej diagnostyki. Metoda stosowana przez kilka następnych lat, do pojawienia się pierwszych skutecznych testów serologicznych. Udział w pisaniu publikacji.

24. **Stanczak JJ**, Gutowicz M., Sankowska M, Brojer E. Isolation and Genetic Analysis of HCVs Present in Polish Population, *Bull of Polish Academy of Science*, vol 41, No 2 (1993)

Udział: 40%

Wkład habilitanta: Koncepcja badań. Zastosowanie opracowanej technologii RT-PCR do identyfikacji RNA HCV. Udział w pisaniu publikacji

25. Brojer E, **Stanczak JJ**. The polymerase chain reaction (PCR) and its application in transfusion medicine and hematology. *Acta Haematol Pol.* 1992;23(4):213-9. Review

Udział: 45%

Wkład habilitanta: Koncepcja publikacji. Pierwsza polska publikacja pogładowa dotycząca metody PCR i jej zastosowań w transfuzjologii oraz w diagnostyce pacjentów z dysfunkcjami hematologicznymi Udział w pisaniu publikacji

2. *Autorstwo lub współautorstwo odpowiednio dla danego obszaru: opracowań zbiorowych, katalogów zbiorów, dokumentacji prac badawczych, ekspertyz, utworów i dzieł artystycznych*

A Skrypty dla lekarzy specjalizujących się w dziedzinie chorób zakaźnych, wydawane przez CMKP

B Publikacja skryptów na potrzeby szkoleń diagnostów - zastosowania PCR w diagnostyce Klinicznej

3. *Sumaryczny Impact Factor publikacji naukowych według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania: **73,988 punktów***

4. *Liczba cytowań z bazy Web of Science z dn. 07.07.2015 r. (bez autocytowań) = **376***

5. *Indeks Hirscha z bazy Web of Science z dn. 07.07.2015 r. = **8**.*

6. *Międzynarodowe lub krajowe nagrody za działalność odpowiednio naukową albo artystyczną:*

A. Nagroda Komitetu Naukowego PTN AIDS za publikację dotyczącą oporności HIV-1 na leki – 2011 r.

B. Nagroda Komitetu Naukowego IX konferencji „Biologia molekularna w diagnostyce chorób zakaźnych i biotechnologii” Warszawa – 2007 r.

C. Nagroda zespołowa III0 Ministra Zdrowia za cykl publikacji dotyczących zakażeniu HCV-2007 r.

D. Nagroda Komitetu Naukowego PTN AIDS za doniesienie zjazdowe dotyczące usprawnienia diagnostyki molekularnej zakażeń HIV-1 – 1994 r.

7. *Wygłoszenie referatów na międzynarodowych lub krajowych konferencjach tematycznych:*

1. JJ Stanczak: Clinical aspects of molecular diagnosis of HCV in the era of DAAs. Central Asian Gastroenterology Week, Almaty, October 2015

2. JJ Stanczak: Prevalence of Hepatitis C Virus mutants resistant to Protease Inhibitors among Polish HCV-genotype 1 infected patients. ESAR Meeting, Barcelona, June 2014
3. JJ Staćzak, T Dyda: Interpretacja wyników testów oporności HBV na leki. Wirooskop – Jesienne Spotkania Wirusologiczne, Warszawa, Listopad 2011
4. JJ Staćzak: Rekomendacje w diagnostyce molekularnej wirusów hepatotropowych oraz HIV-1. Konferencja KML, Falenty, Czerwiec 2011
5. GP Staćzak, T. Dyda, P. Ząbek, JJ Staćzak. :Diagnostyka molekularna HIV-1. Konferencja PTN AIDS, Jachranka, Czerwiec 2011,
6. JJ Staćzak, Justyna Ciepły: Lekooporność HIV-1 w Polsce w 2009 r. Posiedzenie PTM, Warszawa, Marzec, 2011r.
7. JJ Staćzak: Medycyna personalizowana w chorobach zakaźnych. Czy możemy skuteczniej leczyć chorych na AIDS? Biotechnologia i genetyka w służbie medycyny. Warszawa, 2010
8. T. Dyda, JJ. Staćzak: Oporność w przebiegu leczenia zakażenia HBV. Forum Zakażeń VI, Ryn, Marzec 2010
9. JJ Staćzak, T Dyda: Diagnostyka genetyczna zakażeń HBV w praktyce klinicznej. Konferencja BMS, listopad 2008
10. JJ Staćzak: Funkcja genotypowania w optymalizacji leczenia ARV . Konferencja Janssen –Cilag, Warszawa, 11. 2008
11. JJ Staćzak: „Diagnostyka molekularna zakażeń HCV; prognozowanie i monitorowanie skuteczności leczenia wzvC”. Konferencja „ Diagnostyka chorób zakaźnych”, 21.XI.2008, Warszawa
12. JJ Staćzak: “Diagnostics of HIV/AIDS” . Konferencja „Diagnostyka zakażeń wirusowych szerzących się drogą krwi”, Zegrze X 2008
13. JJ Staćzak: “Evolution of HIV-1 Drug Resistance in Europe”. Symposium PTNAIDS, Warsaw, June 2008
14. JJ Staćzak: Diagnostics of HIV/AIDS . 7th Annual meeting of Polish AIDS Scientific Society, Zegrze, 2008
15. JJ Staćzak: Evolution of HIV-1 Drug Resistance in Europe. XXVII Annual Meeting of PTEiLChZ, Warsaw, 2008
16. JJ Staćzak: Usprawnienia diagnostyki genetycznej zakażeń wirusowych. Posiedzenie PTDL, Warszawa, czerwiec 2007
17. JJ Staćzak: Epidemiologia lekooporności HIV-1. Zjazd Medycyna Podróży, Białystok, 2007
18. GP Staćzak, P Ząbek, JJ Staćzak: Lekooporność HIV-1 w Europie - zmiany w epidemiologii. Zjazd PTN AIDS, Vistula 2007
19. JJ Staćzak: European guidelines for HIV Drug Resistance testing and modifications proposed for Poland. 6th Annual meeting of Polish AIDS Scientific Society, Dębe, 2007
20. JJ Staćzak: Genetyka układu HLA- jeden z aspektów klinicznych. Konferencja Kompleksowa Terapia Antyretrowirusowa dla indywidualnego pacjenta. Józefów, Grudzień 2007
21. JJ Staćzak: Lekooporność HIV - na- i poza-horyzontem. Warsztaty HIV DR, Ciechocinek, czerwiec 2006
22. JJ Staćzak: Wybrane aspekty diagnostyki HIV/AIDS. Warsztaty Naukowo-Szkoleniowe Krwiodawstwa Wojska Polskiego, Warszawa, 2-4 października 2006
23. JJ Staćzak: Diagnostyka molekularna zakażeń wirusowych. VI Konf. Naukowo-Szkoleniowa Diagnostów Wojska Polskiego, Szklarska Poręba, 12-14 czerwca 2006

24. JJ Stańczak: Rola ewolucji darwinianskiej i neutralnej w patogenności HCV. Konferencja Kolegium Medycyny Laboratoryjnej „Zagadnienia Diagnostyki Wirusowych Zapaleń Wątroby”, Kraków, 11 października 2006
25. JJ Stańczak: Oporność HIV na leki - metody, interpretacja wyników, wskazania do diagnozowania. Warsztaty HIV DR PTN AIDS, Stary Smokovec, styczeń 2006
26. Stanczak JJ: Diagnostyka zakażenia HIV u dzieci. Ogólnopolskie Warsztaty HIV/AIDS u Dzieci. Konstancin, 2004
27. Stanczak GP, Stanczak JJ, Horban A. SPREAD, CATCH and WATCH as the examples for European collaboration study – principles and proposal for Central/Eastern Europe. 2nd Open Europe AIDS Conference. 16-18 September, 2004, Vilnius
28. JJ Stańczak: Współczesna diagnostyka zakażeń Chlamydia trachomatis. Symposium Zakażenia chlamydialne w położnictwie, ginekologii i urologii. Poznań, 2004
29. Stanczak JJ, Tobolewska E, Przybylska-Stengiel, GP Stańczak, A. Horban. Changes in the pattern of Hepatitis c virus genotypes in Poland. ISVHLD Sydney, 2003
30. Stanczak JJ, Opoka-Kegler J, Czekalska-Lachowicz E, Horban A. Lacs of influence of TT Virus Co-infection on Interferon-alfa Therapy of Chronic Hepatitis C Patients; Susceptibility of TTV to Interferon Treatment. APASL Commemorative International Congress on Viral Hepatitis, Prevention and Control. Singapore, 16-19 February, 2000
31. Stanczak JJ. Współczesna diagnostyka zakażeń CMV. Symposium PTT Kraków, 18-20 Listopada 1997
32. Stanczak JJ. Perspektywy zastosowania biologii molekularnej I terapii genowej w medycynie. Symposium Rola Fundacji w promocji nauki, Warszawa, 26 kwietnia 1994
33. Stanczak JJ, Radlińska M., Sankowska M., Brojer E. Nucleotide sequence of Polish HCV isolates. IV Regional Congress European Region, ISBT. Barcelona, June 13-16, 1993

