

dr Joanna Liss

Obszar wiedzy: Nauki Przyrodnicze

Dziedzina: Nauki Biologiczne

Dyscyplina: Biologia

**OPRACOWANIE I ZASTOSOWANIE METOD
BIOLOGII MOLEKULARNEJ W DIAGNOSTYCE
GENETYCZNEJ KOMÓREK ROZRODCZYCH I
ZARODKÓW**

Katedra Biologii i Genetyki Medycznej

Gdańsk 2019

1. Imię i Nazwisko: JOANNA LISS

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

Doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, 2000, Akademia Medyczna w Gdańsku, Instytut Położnictwa i Chorób Kobięcych

Tytuł rozprawy doktorskiej, wykonanej w Samodzielnej Pracowni Endokrynologii i Diagnostyki Laboratoryjnej:

„Wstępna ocena wpływu infekcji HPV na rozwój raka szyjki macicy na podstawie obecności DNA wirusowego w zainfekowanych tkankach”

Promotor: Prof. dr hab. Czesław Wójcikowski

Magister biologii w zakresie biologii ogólnej, 1995, Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii

Tytuł pracy magisterskiej, wykonanej w Katedrze Biochemii: "Próby ekspresji genu Rz1 bakteriofaga λ w wybranych systemach ekspresyjnych".

Promotor: Prof. dr hab. Alina Taylor

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

Od 02.2018 do chwili obecnej: adiunkt w Katedrze Biologii i Genetyki Medycznej, Wydziału Biologii, Uniwersytetu Gdańskiego

Od 02.2001 do chwili obecnej: kierownik Laboratorium In Vitro i Banku Komórek Rozrodczych i Zarodków, INVICTA

06.1999 – 01.2001: młodszy asystent w Samodzielnym Publicznym Szpitalu Klinicznym Nr 2 Akademii Medycznej w Gdańsku

09.1995 – 02.2001: asystent w Samodzielnej Pracowni Endokrynologii i Diagnostyki Laboratoryjnej Instytutu Położnictwa i Chorób Kobięcych Akademii Medycznej w Gdańsku

4. Wskazanie osiągnięcia1 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. 2017 r. poz. 1789)

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Opracowanie i zastosowanie metod biologii molekularnej w diagnostyce genetycznej komórek rozrodczych i zarodków.

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Liss J.**, Pastuszek E., Pukszta S., Hoffmann E., Kuczynski W., Łukaszuk A., Łukaszuk K. 2018. Effect of next-generation sequencing in preimplantation genetic testing on live birth ratio. *Reprod Fertil Dev.* 2018 Jun 22. doi: 10.1071/RD17428.

IF: 2,105; MNiSW:30. Mój udział procentowy szacuję na 45%.

2. **Liss J.**, Chromik I., Szczyglińska J., Jagiełło M., Łukaszuk A., Łukaszuk K. 2016. Current methods for preimplantation genetic diagnosis. *Ginekol Pol.* 87(7):522-6.

IF: 0,576; MNiSW: 15. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

3. Łukaszuk K., Pukszta S., Wells D., Cybulska C., **Liss J.**, Płóciennik Ł., Kuczynski W., Zabielska J. 2015. Routine use of next-generation sequencing for preimplantation genetic diagnosis of blastomeres obtained from embryos on day 3 in fresh in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* Apr;103(4):1031-6.

IF: 4,426; MNiSW: 45. Mój udział procentowy szacuję na 15%.

4. **Liss J.**, Kiewisz J., Zabielska J., Kulwikowska P., Łukaszuk K. 2015. Application of FISH method for preimplantation genetic diagnostics of reciprocal and Robertsonian translocations. *Folia Histochem Cytobiol.* 53(2):162-8.

IF: 1,06; MNiSW: 15. Mój udział procentowy szacuję na 45%.

5. **Liss J.**, Bruszczyńska A., Łukaszuk K. 2010. Preimplantation genetic diagnosis in prevention of genetic diseases-diagnostic of spinal muscular atrophy (SMA). *Ginekol Pol;* 81(12):918-21.

IF: 0,367; MNiSW: 9. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

6. **Liss J.**, Łukaszuk K., Bruszczyńska A., Szczerkowska Z., Rebała K. 2008. Pregnancy and life after preimplantation genetic diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Fertil Steril.* Nov;90(5):2011.e13-6.

IF: 4,167; MNiSW: 24. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego zostało przedstawione w cyklu 6 publikacji powiązanych tematycznie, obejmujących własne badania dotyczące opracowania i wdrożenia metod diagnostycznych stosowanych w diagnostyce preimplantacyjnej pacjentów obciążonych genetycznie, a także zmagającymi się z niepowodzeniami w rozrodzie z powodów zaburzeń genetycznych występujących w komórkach rozrodczych. Wszystkie badania, na podstawie których powstał cykl publikacji będący osiągnięciem naukowym, przeprowadzono zgodnie z protokołami zatwierdzonymi przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku. W 5 z tych prac jestem pierwszym autorem, a **sumaryczny IF i MNiSW** wspomnianych publikacji wynosi odpowiednio **12,701 i 138**.

Diagnostyka preimplantacyjna (ang. PGT - preimplantation genetic testing) jest metodą diagnostyczną mogącą mieć zastosowanie jedynie w przebiegu leczenia niepłodności metodami wspomaganego rozrodu. Pozwala na badanie genetyczne komórki jajowej przed jej zapłodnieniem lub zarodka przed wprowadzeniem go do macicy. Została ona zastosowana po raz pierwszy w 1990 roku. Dzięki tej metodzie urodziło się pierwsze dziecko nie zagrożone związaną z chromosomem X adrenoleukodystrofią (Handyside i wsp. 1990).

Dzięki zastosowaniu PGT do 2004 roku urodziło się około 1000 dzieci (Verlinsky i wsp. 2004), a do roku 2013 liczba ta wzrosła do ponad 10 000 (Simpson i wsp. 2010, Coco i wsp. 2014, De Rycke i wsp. 2017). Diagnostyka preimplantacyjna to sekwencja działań umożliwiająca wybranie zdrowego pod względem genetycznym zarodka do transferu. Składa się ona z pobrania materiału do badania (biopsja), przygotowania materiału genetycznego do analizy (izolacja DNA i jego amplifikacja), przeprowadzenia analizy (wybór metody) oraz opracowania i wydania wyniku.

W ramach diagnostyki preimplantacyjnej można wyróżnić dwa zasadnicze działania:

1. Diagnostyczne badanie preimplantacyjne – PGT (Preimplantation Genetic Testing: PGD-M/PGD-SR) określające genotyp zarodka, wykonywane u par obciążonych nieprawidłowościami genetycznymi takimi jak: choroby jednogenowe, mutacje punktowe, translokacje czy inne zaburzenia dotyczące genów.
2. Preimplantacyjny skrining zarodków – PGT-A (Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies) określający potencjalne aneuploidie wszystkich 24 chromosomów wykonywany zwłaszcza u: pacjentek po 35 roku życia, z niepowodzeniami implantacji, nawracającymi poronieniami przy prawidłowych kariotypach partnerów

oraz gdy powodem niepłodności jest ciężki czynnik męski. PGT ma na celu wybór do transferu zarodka lub zarodków z prawidłowym kariotypem (Harper i wsp. 2014).

Badania nad wykorzystaniem metod molekularnych w diagnostyce genetycznej komórek rozrodczych i zarodków rozpoczęłam w 2005 roku w laboratorium in vitro przy klinice leczenia niepłodności INVICTA w Gdańsku. Badania te były innowacyjnym podejściem do diagnostyki genetycznej komórek rozrodczych na skalę krajową jak również w niektórych przypadkach jednostek chorobowych na skalę światową. Pozwoliły one na wprowadzenie do rutynowego leczenia niepłodności, diagnostyki genetycznej komórek rozrodczych, zarodków u par z obciążonym rodzinnym wywiadem genetycznym, gdzie mutacje odpowiedzialne za wystąpienie danej jednostki chorobowej były tu już wcześniej zdiagnozowane. Możliwe zatem stało się zapobieganie wystąpieniu danej jednostki chorobowej na etapie przedimplantacyjnym.

Szukając możliwości wykorzystania dostępnych technik biologii molekularnej skupiłam się, w pierwszej kolejności, na diagnostyce chorób jednogenowych. Na uwagę zasługuje fakt, że badania takie do tej pory nie były w Polsce prowadzone. Diagnostyka przedurodzeniowa dotyczyła wyłącznie badań genetycznych wykonywanych w ciąży, w ramach badań prenatalnych, w oparciu o analizę krwi matki lub płodu, materiał pobrany podczas biopsji trofoblastu lub płyn owodniowy pobrany podczas amniopunkcji. Była ona wykonywana przy podejrzeniu wystąpienia choroby genetycznej u płodu, celem przygotowania i zaplanowania terapii dla dziecka po porodzie.

Pierwszą jednostką chorobową, podlegającą ocenie i zaprojektowaniu przeze mnie diagnostyki genetycznej był zespół Smitha, Lemlego i Opitza (SLOS). Jest to choroba metaboliczna, dziedziczona w sposób autosomalny recesywny. Należy ona do chorób rzadkich i charakteryzuje się występowaniem mnogich wad wrodzonych. Częstość jej występowania szacuje się na 1:20 000 – 1:60 000 urodzeń. W Polsce częstotliwość występowania tej choroby jest wyższa niż w innych krajach europejskich i wynosi 1:2300 – 1:3937 co zalicza tę jednostkę chorobową do najczęstszych chorób metabolicznych występujących w naszym kraju. Choroba ta spowodowana jest zaburzeniem w biosyntezie cholesterolu, na skutek mutacji w genie *DHCR7*, znajdującego się na długim ramieniu chromosomu 11, w lokalizacji 11q12-13 (Nowaczyk i wsp. 2001). Według dotychczasowych doniesień znanych jest ponad 120 mutacji w obrębie tego genu. Większość z nich stanowią jednonukleotydowe substytucje (90%). Bardzo rzadko występują mutacje typu delecji czy insercji (10%) (Yu i wsp. 2005). Gen ten odpowiada za powstawanie białka *DHCR7* - reduktazy 7-dehydrocholesterolu, które jest enzymem, uczestniczącym w przemianie 7-dehydrocholesterolu do cholesterolu. W wyniku mutacji organizm nie jest w stanie wytworzyć dostatecznej ilości cholesterolu, który jest konieczny do prawidłowego rozwoju zarodka i płodu. Cholesterol jest elementem budującym m.in. błony komórkowe i otoczki ochraniające komórki

nerwowe. Ponadto na jego bazie syntetyzowanych jest wiele hormonów. Podejmowane są próby ustalenia korelacji między genotypem a fenotypem choroby. Łagodne objawy kliniczne u chorych (typ I SLOS) wywoływane są przez mutacje zmieniające informację kodonu. Ciężka postać choroby (typ II SLOS) jest związana z mutacjami zmieniającymi ramkę odczytu i wprowadzającymi kodon terminacyjny, który całkowicie znosi aktywność białka enzymatycznego.

Genetyczna diagnostyka przed- i pourodzeniowa zespołu SLOS opiera się na wykonywaniu dwóch rodzajów badań: biochemicznych, dotyczących oznaczeń cholesterolu i 7-, 8- dehydrocholesteroli w surowicy krwi oraz molekularnych, gdzie analizuje się sekwencję kodującą genu *DHCR7* w poszukiwaniu mutacji. Jak dotąd nie było możliwości zbadania ryzyka nosicielstwa mutacji w genie *DHCR7* na poziomie przedimplantacyjnym.

Swoje badania ukierunkowałam na zdiagnozowanie mutacji *W151X* typu nonsensownego G>A w pozycji 3557 bp w obrębie genu *DHCR7*, która została stwierdzona u 2 par podczas diagnostyki genetycznej dzieci poczętych drogą naturalną.

W pierwszej kolejności zaprojektowałam sekwencje starterów, pozwalające na amplifikację fragmentu genu *DHCR7*, obejmujące miejsce w/w mutacji. Warunki reakcji PCR musiały zostać dobrane specyficznym do analizowanego materiału, czyli pojedynczej komórki pochodzącej z komórki jajowej (ciałko kierunkowe) i zarodka (pojedynczy blastomer pobrany z zarodka 6-8 komórkowego). Metodą pozwalającą na zwiększenie czułości i specyficzności amplifikacji okazała się w tym przypadku metoda nested-PCR. Projektując startery zewnętrzne i wewnętrzne, zwróciłam uwagę na ryzyko parowania starterów i tworzenia dimerów (primer-dimer). Dodatkowo temperatury topnienia musiały różnić się od siebie, żeby uniknąć hybrydyzacji starterów wewnętrznych podczas pierwszych cykli amplifikacji. Pierwszy etap analizy obejmował etap lizy komórki pobranej do badania. W przypadku pracy z tylko jedną komórką na uwagę zasługują warunki reakcji i stężenia enzymów wykorzystywanych w tym procesie. W etapie tym zastosowałam dodatkowo etap inkubacji pobranego materiału w temperaturze -20°C , co pozwoliło na skuteczną analizę jej genomu. Dwuetapowa amplifikacja fragmentu genu *DHCR7* pozwoliła na uzyskanie poszukiwanego fragmentu z dużą czułością i specyficznością. Produkt amplifikacji został tak zaprojektowany, że posiadał ponadto miejsce restrykcyjne dla enzymu *AluI* w miejscu wystąpienia mutacji, co pozwoliło na precyzyjną analizę wyniku badania.

Przedstawiona powyżej metoda stanowiła mój autorski wkład w rozwój diagnostyki zespołu SLOS na etapie przed-urodzeniowym. Została ona przeze mnie opracowana, zaprojektowana i zastosowana z sukcesem po raz pierwszy na świecie. Pozwoliła na uzyskanie zdrowej ciąży i urodzenie zdrowych dzieci, bez ryzyka nosicielstwa tej choroby (**Liss J. i wsp. 2008**). Opublikowane wyniki badań zostały nagrodzone nagrodą zespołową II stopnia przez rektora AMG. Metoda ta miała swoje zastosowanie w kolejnych 2 przypadkach zdiagnozowanego wcześniej

nosicielstwa wskazanych mutacji genu *DHCR7* w przebiegu leczenia metodami wspomaganego rozrodu, których leczenie zakończyło się urodzeniem zdrowych dzieci.

Pozytywny wynik przeprowadzonych badań, a w szczególności fakt urodzenia zdrowych dzieci bez ryzyka nosicielstwa genetycznego choroby, skłoniły mnie do kontynuacji prac nad projektowaniem metod diagnostycznych, pozwalających na badanie pojedynczych komórek w przypadkach kolejnych jednostek chorobowych. Obiecujące wyniki przyniosły badania prowadzone przeze mnie w zakresie diagnostyki rdzeniowego zaniku mięśni – SMA (*ang.* spinal muscular atrophy) w komórkach rozrodczych pacjentów obciążonych genetycznie (Liss i wsp. 2010). SMA to rzadkie schorzenie nerwowo-mięśniowe, charakteryzujące się degeneracją jąder przednich rdzenia kręgowego, czego efektem jest upośledzenie mięśni szkieletowych. Za SMA w około 95% przypadków tej choroby odpowiedzialne są mutacje genu *SMN* (*ang.* survival of motoneuron), a ściślej kopii telomerowej tego genu, określanej jako *SMN1*. Gen ten zlokalizowany jest w locus umiejscowionym na długim ramieniu chromosomu 5 (5q13) (Mazurczak i wsp. 2003, Daniels i wsp. 2001). Defekt molekularny polega na delecji eksonu 7 kopii telomerowej i jest odpowiedzialny za około 95% przypadków SMA. W pozostałych 5% przypadków stwierdza się występowanie mutacji o charakterze substytucji lub małych delecji, położonych w różnych częściach genu, zaburzających prawidłową jego ekspresję. Delecje w obrębie kopii centromerowej nie wywołują objawów klinicznych i występują u około 5% zdrowej populacji. W Polsce jak dotąd nie było możliwe wykluczenie ryzyka urodzenia chorego dziecka u rodziców nosicieli wadliwego genu. Na świecie diagnostyka preimplantacyjna w kierunku SMA stosowana była już od kilku lat.

Również w tym przypadku jedyną diagnostyką przedurodzeniową była analiza molekularna DNA płodu pochodzącego z materiału pobranego w ciąży (podczas kordocentezy, biopsji trofoblastu czy amniopunkcji) celem oceny nosicielstwa lub pełnego defektu genetycznego w obrębie genu *SMN1*.

Także w tym przypadku kluczowym elementem diagnostyki było przygotowanie pojedynczych komórek do badania. Liza pojedynczej komórki prowadzona była w środowisku PBS/PVP, które okazało się najwydajniejsze pod względem uzyskiwanego sygnału amplifikacji z pojedynczej komórki, a wprowadzony przeze mnie etap inkubacji w temperaturze -20°C także dodatkowo wzmocnił efektywność całego procesu.

Mając na uwadze wyniki badań i metody zastosowane w przypadku badań nad zespołem SLOS także w tym przypadku wykorzystałam zasady projektowania reakcji nested-PCR, zwracając szczególną uwagę na warunki reakcji, w tym temperatury topnienia sekwencji starterów oraz liczbę cykli amplifikacji. Zaprojektowane startery pozwoliły na wydajną amplifikację fragmentu genu *SMN1*

obejmującego miejsce delekcji. Fragment ten posiadał w swojej sekwencji dwa miejsca restrykcyjne rozpoznawane przez enzym *HinfI*. Jedno z nich było miejscem pochodzącym z samej sekwencji analizowanego fragmentu, drugie, było miejscem zaprojektowanym na potrzeby analizy i znajdowało się w obrębie sekwencji wewnętrznego startera, a obejmującego miejsce delekcji. Dzięki temu w przypadku prawidłowego sposobu dziedziczenia genu *SMN1* uzyskiwano po analizie restrykcyjnej 3 produkty. Obecność delekcji w obrębie genu *SMN1* pozwalała uzyskać natomiast dwa produkty cięcia (tylko z naturalnego miejsca w sekwencji), ze względu na brak (delekcję) nukleotydu rozpoznawanego przez *HinfI*. Tak dobrana analiza restrykcyjna zamplifikowanego fragmentu genu *SMN1* pozwoliła na nieskomplikowaną ocenę defektu molekularnego w badanych zarodkach. Opracowane przeze mnie testy diagnostyczne pozwoliły na przeprowadzenie badania preimplantacyjnego u 5 par, u których w wywiadzie stwierdzono przypadki urodzeń dzieci ze zdiagnozowaną i potwierdzoną badaniami molekularnymi chorobą Werdniga-Hoffmana (typ I SMA). U 4 z nich leczenie zakończyło się ciążą i urodzeniem zdrowych dzieci. Leczenie farmakologiczne dzieci z SMA jest aktualnie bardzo kosztowne, jak również opieka na dzieckiem wymaga specjalistycznego przygotowania zarówno rodziców jak i posiadania sprzętu do rehabilitacji. Z tego powodu rodzice dziecka z SMA często nie decydują się na posiadanie kolejnego, ze względu na ryzyko powtórzenia się choroby. Genetyczne badania preimplantacyjne pozwalają uniknąć tego ryzyka, a opracowana i wdrożona przeze mnie metoda diagnostyczna w stosunkowo prosty sposób pozwala na zdiagnozowanie tego problemu i może być z powodzeniem stosowana przez inne laboratoria wykonujące diagnostykę preimplantacyjną.

W tym miejscu warto nadmienić, że opisane powyżej badania skupiały się wyłącznie na opracowaniu wskazanych mutacji, defektów molekularnych, odpowiedzialnych za wystąpienie konkretnych jednostek chorobowych, zdiagnozowanych uprzednio w rodzinach, podczas gdy na uwagę zasługują również pozostałe ryzyka genetyczne, mogące mieć wpływ na zdrową ciążę.

Chromosomowe aberracje strukturalne diagnozowane są najczęściej na podstawie wyniku kariotypu pacjenta. Występująca tu anomalia chromosomowa ma charakter zrównoważony, bez efektu klinicznego. Ilość materiału genetycznego jest prawidłowa, ma miejsce jedynie przemieszczenie fragmentu chromosomu w jego obrębie lub pomiędzy chromosomami. Kariotyp o charakterze translokacji lub inwersji może przyczyniać się do powstawania niezrównoważenia genetycznego na poziomie tworzenia się i rozwoju zarodka, czego efektem są poronienia ciąż (Munne i wsp. 2002, Vanneste i wsp. 2009, Voet i wsp. 2011).

Przedmiotem moich dalszych badań nad wykorzystaniem dostępnych technik molekularnych do diagnozowania defektów molekularnych w komórkach rozrodczych stała się grupa pacjentów – nosiciele translokacji wzajemnych zrównoważonych oraz typu Robertsonowskiego. Diagnostyka przedurodzeniowa w przypadkach nosicielstwa translokacji dotyczy analizy kariotypu z amniocytów i

wykorzystuje klasyczną ocenę cytogenetyczną badanego materiału w oparciu o hodowlę komórkową. Chcąc analizować pojedynczą komórkę pochodzącą z zarodka, niemożliwe jest poprowadzenie hodowli komórkowej lub też namnożenie komórki, tak aby móc zastosować ten materiał do klasycznej analizy cytogenetycznej. Kluczowym w projektowaniu tego typu diagnostyki stało się więc opracowanie metody analizy pojedynczej komórki, a docelowo jądra komórkowego pochodzącego z pojedynczej komórki zarodka. Analiza jądra komórkowego blastomeru wymaga pełnej lizy elementów morfotycznych komórki oraz unieruchomienia jądra na szkiełku podstawowym celem dalszej jego oceny. Do lizy komórki i utrwalenia jądra komórkowego mogą być stosowane różne bufory, zawierające w składzie detergenty destabilizujące błony komórkowe. Porównując różne składy, najlepszy efekt uzyskałam stosując lizę komórki w środowisku 0.01N HCL/0.1% Tween20, a następnie utrwalając jądro roztworem metanolu i kwasu octowego 3:1. Również na uwagę zasługiwał fakt opracowania przez mnie sposobu rozmieszczenia i oznakowania pojedynczych jąder komórkowych na szkiełku, dzięki czemu analiza obrazu mogła być przeprowadzona szybko. W celu oceny aberracji chromosomowych wykorzystałam komercyjne sondy molekularne, znakowane fluorescencyjnie (metoda fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ – FISH). Proces hybrydyzacji został również zmodyfikowany o dopracowanie czasów inkubacji i stężeń, tak aby cała analiza mogła mieć miejsce w ciągu 36 godzin, co w przypadku decyzji o wykonaniu transferu zarodka w danym cyklu jest kluczowe w całym procesie leczenia. Żeby lepiej ocenić możliwe ryzyko wystąpienia aberracji, dodałam do analizy sondy pozwalające na ocenę centromeru i telomeru chromosomów biorących udział w rearanżacji. Uzyskane wyniki wykazały wysoki odsetek niezrównoważenia materiału genetycznego w zarodkach w obrębie badanych chromosomów u nosicieli translokacji, a podanie tylko zrównoważonych genetycznie zarodków pozwoliło uzyskać zdrowe ciążę ze skutecznością porównywalną do skuteczności uzyskiwanej u pacjentów bez takiego ryzyka (Liss i wsp. 2015).

Wykorzystanie sond fluorescencyjnych w diagnostyce preimplantacyjnej komórek rozrodczych i zarodków pozwoliło na rozszerzenie zakresu ich wykorzystania o analizę liczby chromosomów pod kątem oceny ploidii. Jednak specyfika samej metody (możliwe analizowanie max. 7 rodzajów chromosomów w dwóch rundach hybrydyzacji) nie pozwoliła na badanie wszystkich chromosomów, tylko wybranych, co uniemożliwiało kompleksową ocenę statusu genetycznego zarodka. Dopiero zastosowanie techniki sekwencjonowania następnej generacji NGS (*ang.* Next Generation Sequencing) pozwoliło na skuteczniejszą jego ocenę.

Diagnostyka przedurodzeniowa ploidii oparta jest o rutynowe badania prenatalne, gdzie badaniu poddawany jest materiał pobrany podczas biopsji trofoblastu, płyn owodniowy lub krew obwodowa matki, płodu i w zależności od metody diagnostycznej analizowany jest kariotyp płodu. Badania te pozwalają jednak na stwierdzenie faktu obecności nieprawidłowej liczby chromosomów i

zaplanowaniu dalszego postępowania po porodzie lub w szczególnych przypadkach przyczyniają się do podjęcia decyzji o terminacji ciąży.

Ocena ploidii w zarodku na etapie przedimplantacyjnym pozwala uniknąć ryzyka wystąpienia wady u płodu (Gianaroli i wsp. 2001, Macklon i wsp. 2002).

Mając na uwadze możliwości techniczne metody NGS, dołączyłam do zespołu badawczego, który jako jeden z pierwszych na świecie wdrażał tę metodę do preimplantacyjnych badań genetycznych. NGS jest aktualnie najnowocześniejszą techniką diagnostyczną stosowaną w analizie genetycznej, dającą unikalne możliwości w zakresie ilości pozyskanych informacji oraz czułości i wiarygodności badania. NGS pozwala na sekwencjonowanie wielu fragmentów z badanego regionu, dając nowe narzędzie, tzw. głębokość odczytu (Kobpldt i wsp. 2013). Analiza obejmuje tu kilkanaście tysięcy miejsc na wszystkich 46 chromosomach. Przedmiotem moich dalszych rozważań było więc wykorzystanie tej techniki w analizie genetycznej komórek rozrodczych i zarodków. Aby wdrożyć tak zaawansowaną metodę molekularną do badań preimplantacyjnych, zaplanowano serię doświadczeń mających na celu przygotowanie materiału do badań, pochodzącego z komórki jajowej, zarodka 8-komórkowego oraz blastocysty, celem weryfikacji zgodności uzyskanego wyniku. Mój wkład w opracowanie schematu kompleksowego badania zarodka dotyczył w tym przypadku opracowania metod lizy komórek podlegających badaniu (**Łukaszuk i wsp. 2015**). Każda z metod diagnostycznych wymaga skrupulatnego przygotowania materiału do analizy, a materiał w postaci pojedynczej komórki jest bardzo wymagający. Specyfika metody sekwencjonowania następnej generacji, ze względu na swoją czułość, wymaga dostosowania środowiska, w którym przeprowadzana jest amplifikacja, do rodzaju badanego materiału. Mając na uwadze te wymagania, przetestowałam różne rodzaje buforów do lizy, w zależności od analizowanego typu komórek (ciałko kierunkowe, blastomer, komórki z blastocysty) i ostatecznie wybrałam bufor, gdzie uzyskano najmniejszy odsetek wyników nie diagnostycznych (<5%). Przeprowadzone dalsze analizy potwierdziły zasadność tego wyboru i pozwoliły na zastosowanie go w rutynowych badaniach preimplantacyjnych.

Nieustanny rozwój technik biologii molekularnej, obserwowany na przestrzeni lat, polegający na wdrażaniu nowych metod diagnostycznych, pozwolił na podniesienie poziomu czułości i specyficzności badań preimplantacyjnych. Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ została zastąpiona przez bardziej rzetelne technologie jak: mikromacierze (aCGH) oraz sekwencjonowanie następnej generacji NGS. Biorąc pod uwagę własne, wieloletnie doświadczenia w zakresie badań preimplantacyjnych zarodków, zwróciłam uwagę na możliwości diagnostyczne poszczególnych metod (**Liss i wsp. 2016**). Różne defekty genetyczne, pojawiające się podczas wczesnych podziałów komórek rozrodczych, mogą być rozpoznane wyłącznie w oparciu o specyficzne techniki. Ponieważ technika NGS daje jednak największe możliwości diagnostyczne, postanowiłam kontynuować badania z wykorzystaniem tego narzędzia.

W świetle danych literaturowych, techniki diagnostyczne stosowane w badaniach preimplantacyjnych, w tym również NGS, wymagają krioprezervacji zarodków po pobraniu materiału do badań. Czas samej analizy często nie pozwala na otrzymanie wyniku badania w ciągu jednego dnia. Skuteczność takiego leczenia uzależniona jest od efektywności technik mrożenia i rozmrażania zarodków. Pozwala jednak w zaplanowany sposób przygotować pacjentkę do transferu zarodków. Przedmiotem moich dalszych rozważań naukowych stało się więc oszacowanie skuteczności zastosowania badań PGT metodą NGS w cyklach z wykorzystaniem mrożonych zarodków (Liss i wsp., 2018). Materiał do badań genetycznych pobierany był przed zamrożeniem zarodków, w 5 lub 6 dobie ich hodowli. Badanie preimplantacyjne obejmowało analizę wszystkich 46 chromosomów za pomocą techniki NGS. Uzyskane wyniki pozwoliły jednoznacznie wysunąć hipotezę, że ocena ploidii zarodka przed jego podaniem do macicy daje wyższe szanse powodzenia leczenia w porównaniu do braku takiej informacji, a stosowana metoda sekwencjonowania następnej generacji może być z powodzeniem wykorzystywana rutynowo w takich badaniach, co potwierdzają również inne doniesienia literaturowe (Fiorentino i wsp. 2014, Tan i wsp. 2014, Yang i wsp. 2015, Liu i wsp. 2016).

Biorąc pod uwagę całokształt wyników i doniesień opisanych w powyższym cyklu publikacji, wykorzystanie metod biologii molekularnej w diagnostyce preimplantacyjnej, przynosi bardzo wymierną korzyść w leczeniu niepłodnych par. Możliwe jest wykluczenie ryzyka urodzenia chorego dziecka w rodzinach z obciążonym wywiadem genetycznym. Pozytywnym aspektem jest również fakt uniknięcia terminacji ciąży, szczególnie w przypadkach, gdy ryzyko wad genetycznych może być uwarunkowane nosicielstwem ze strony rodziców, np. translokacje, choroby genetyczne dziedziczone w sposób autosomalny dominujący lub recesywny. Podsumowując własne dokonania w tej dziedzinie, na uwagę zasługuje fakt iż opracowane przeze mnie metody badań pozwoliły na zdiagnozowanie problemów o podłożu genetycznym w komórkach rozrodczych i zarodkach na etapie przed-implantacyjnym, co wymiennie przekłada się na efekt leczenia u par korzystających z metod wspomaganego rozrodu. Wiele z nich może być z powodzeniem stosowana przez inne laboratoria wykonujące diagnostykę preimplantacyjną.

Literatura (zawiera pozycje nie wymienione w punkcie 4b)

1. Coco R. Repro genetics: Preimplantational genetic diagnosis. Genetic and Molecular Biology. 2014, 37:271-284.
2. Daniels G, Pettigrew R, Thornhill A et al. Six unaffected livebirths following preimplantation diagnosis for spinal muscular atrophy. 2001. Mol Hum Reprod. 7:995-1000.
3. De Rycke M, Goossens V, Kokkali G, Meijer-Hoogeveen M, Coonen E, Moutou C. ESHRE PGD Consortium data collection XIV-XV: cycles from January 2011 to

- December 2012 with pregnancy follow-up to October 2013. 2017. *Hum Reprod.* 32:1974-1994.
4. Fiorentino, F., Biricik, A., Bono, S., Spizzichino, L., Cotroneo, E., Cottone, G., Kokocinski, F., and Michel, C.-E. 2014. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertil. Steril.* 101:1375–1382.e2.
 5. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP The in vivo and in vitro efficiency and efficacy of PGD for aneuploidy. 2001. *Mol Cell Endocrinol.* 22;183 Suppl 1:S13-8.
 6. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. 1990. *Nature*;344 (6268):768–770.
 7. Harper JC, Geraedts J., Borry P. Current issues in medically assisted reproduction and genetics in Europe: research, clinical practice, ethics, legal issues and policy. 2014. *Human Reproduction*, 29,8:1603–1609.
 8. Kobpldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. 2013. *Cell*;155:27-38.
 9. Liu, M., Su, Y., and Wang, W.-H. 2016. Assessment of clinical application of preimplantation genetic screening on cryopreserved human blastocysts. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 14,16.
 10. Macklon NS, Geraedts JP, Fauser BC Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. 2002. *Hum Reprod Update*;Jul-Aug;8(4):333-43.
 11. Mazurczak T, Hausmanowa-Petrusewicz I, Zaremba J i wsp. 2003. Zastosowanie technik biologii molekularnej w diagnostyce rdzeniowego zaniku mięśni (SMA). Ekspertyza naukowa wykonana na zlecenie Ministerstwa Zdrowia, Warszawa.
 12. Munne S. Preimplantation genetic diagnosis of numerical and structural chromosome abnormalities. 2002. *Reprod Biomed Online*;4:183–196.
 13. Nowaczyk MJM, Waye JS. The Smith Lemli-Opitz syndrome: a novel way of understanding developmental biology, embryogenesis and dysmorphology. 2001. *Clin Genet*;59:375–86.
 14. Simpson JL. 2010. Preimplantation genetic diagnosis at 20 years. *Prenat Diagn.* 30: 682-695.
 15. Tan, Y., Yin, X., Zhang, S., Jiang, H., Tan, K., Li, J., Xiong, B., Gong, F., Zhang, C., Pan, X., Chen, F., Chen, S., Gong, C., Lu, C., Luo, K., Gu, Y., Zhang, X., Wang, W., Xu, X., Vajta, G., Bolund, L., Yang, H., Lu, G., Du, Y., and Lin, G. 2014. Clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis and screening using next generation sequencing. *Gigascience* 3, 30.
 16. Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, Debrock S, Amyere M, Vikkula M, Schuit F, Fryns JP, Verbeke G, D'Hooghe T, Moreau Y, Vermeesch JR. 2009. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med.* May;15(5):577-83.

17. Verlinsky Y, Cohen J, Munné S. 2004. Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis: a multicenter report. *Fertility and Sterility*. 82: 292–294.
18. Voet T, Vanneste E, Van der Aa N, Melotte C, Jackmaert S, Vandendael T, Declercq M, Debrock S, Fryns JP, Moreau Y, D'Hooghe T, Vermeesch JR. 2011. Breakage-fusion-bridge cycles leading to inv dup del occur in human cleavage stage embryos. *Hum Mutat*. Jul;32(7):783-93.
19. Yang, Z., Lin, J., Zhang, J., Fong, W. I., Li, P., Zhao, R., Liu, X., Podevin, W., Kuang, Y., and Liu, J. 2015. Randomized comparison of next-generation sequencing and array comparative genomic hybridization for preimplantation genetic screening: a pilot study. *BMC Med. Genomics* 8, 30.
20. Yu H., Patel SB. 2005. Recent insights into the Smith–Lemli–Opitz syndrome. *Clin Genet*. Nov; 68(5): 383–391

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

5.1. Publikacje naukowe

Poza publikacjami składającymi się na osiągnięcie naukowe, przedstawionymi powyżej, dorobek mój składa się z **29 publikacji**, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports, których jestem współautorem oraz **5 publikacji** w czasopismach naukowych bez punktacji IF.

Sumaryczny **IF** dla tych prac wynosi **62,435 (MNiSW: 678)**.

Poniżej znajduje się omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych ze wskazaniem publikacji związanych z danym tematem badawczym.

5.1.1. Zakres tematyczny: znaczenie rezerwy jajnikowej w leczeniu niepłodności.

1. Kunicki M, Łukaszuk K, **Liss J**, Jakiel G, Skowrońska P (2018). Demographic characteristics and AMH levels in rural and urban women participating in an IVF programme. *Ann Agric Environ Med*. 2018 Mar 14;25(1):120-123.

IF: 1,116; MNiSW: 20

2. **Liss J**, Kunicki M, Czyzyk A, Pastuszek E, Zabielska J, Meczekalski B, Łukaszuk K. (2017). Clinical utility of different anti-Müllerian hormone - AMH assays for the purpose of pregnancy prediction. *Gynecol Endocrinol*. Apr 27:1-6.

IF=1,453; MNiSW: 15

3. Nelson SM, Pastuszek E, Kloss G, Malinowska I, **Liss J**, Lukaszuk A, Plociennik L, Lukaszuk K. (2015). Two new automated, compared with two enzyme-linked immunosorbent, antimüllerian hormone assays. *Fertil Steril*. Oct;104(4):1016-1021
IF=4,426; MNiSW: 45

4. Lukaszuk K, Kuczynski W, Kunicki M, Ludwikowska B, **Liss J**, Malinowska I, Lukaszuk A, Bednarowska A, Kuczynska A, Kuc P, Pastuszek E. (2014). Comparison of the second-generation Beckman Coulter IVD and first-generation AnshLabs ELISA assays for anti-Müllerian hormone in patients undergoing IVF treatment. *Ginekol Pol.*;85(10):778-83.
IF=0,601; MNiSW: 15

5. Lukaszuk K, **Liss J**, Kunicki M, Jakiel G, Wasniewski T, Woclawek-Potocka I, Pastuszek E. (2014). Anti-Müllerian hormone (AMH) is a strong predictor of live birth in women undergoing assisted reproductive technology. *Reprod Biol.*;14(3):176-81.
IF=1,524; MNiSW: 15

6. Lukaszuk K, Ludwikowska B, **Liss J**, Kunicki M, Sawczak M, Lukaszuk A, Plociennik L, Jakiel G, Wasniewski T, Woclawek-Potocka I, Bialobrzeska D. (2014). Decreasing quality of the new generations of anti-Müllerian hormone assays. *Biomed Res Int*; 2014:165352. doi: 10.1155/2014/165352.
IF: 1,579; MNiSW: 20

7. Lukaszuk K, Kunicki M, **Liss J**, Bednarowska A, Jakiel G. (2014). Probability of live birth in women with extremely low anti-Müllerian hormone concentrations. *Reprod Biomed Online*;28(1):64-9
IF: 3,015; MNiSW: 35

8. Lukaszuk K, Kunicki M, **Liss J**, Lukaszuk M, Jakiel G. (2013). Use of ovarian reserve parameters for predicting live births in women undergoing in vitro fertilization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. Jun;168(2):173-7.
IF: 1,627; MNiSW: 25

Od wielu lat ocena rezerwy jajnikowej jest ważnym elementem w diagnostyce i leczeniu niepłodności partnerskiej. We wczesnym okresie rozrodczym umożliwia ona wychwycenie problemu płodności jeszcze przed jego wystąpieniem, uświadamiając zagrożenie niepłodnością i umożliwiając działania protekcyjne. Również świadomość szans na sukces podczas podjętego leczenia jest istotnym elementem prowadzonej terapii. Podstawowym wskaźnikiem w diagnostyce niepłodności jest obecnie badanie poziomu hormonu antymullerowskiego (AMH). Jego wyniki pozwalają na określenie rezerwy jajnikowej kobiety, a tym samym określenie jej potencjału rozrodczego. AMH stanowi bardzo dobry marker zdolności

pacjentki do uzyskania własnych komórek jajowych i pozwala określić szanse posiadania własnego potomstwa. Jego poziom zmniejsza się wraz z wiekiem, w związku z czym może on być również znacznikiem spadku płodności, w tym przedwczesnego wygasania czynności jajników. Ze względu na szerokie spektrum diagnostyczne AMH, zasadnicze znaczenie ma tu rzetelność i wiarygodność wyników badań. AMH jest stosunkowo młodym markerem rezerwy jajnikowej, który zastąpił do tej pory powszechnie wykorzystywany do oceny płodności poziom FSH. Powszechne stosowanie AMH napotyka jednak na wiele trudności. Szybka komercjalizacja osiągnięć naukowych powoduje braki w standaryzacji produktów, w tym wypadku zestawów do oznaczania hormonu. Dodatkowo chęć upowszechnienia wyników poprzez sieciowe firmy laboratoryjne jeszcze bardziej obniżyła jakość uzyskiwanych danych. Przypadkowość pobrań i błąd przed-laboratoryjny może znacząco obniżyć wiarygodność wyników.

Istotnym osiągnięciem autora jest czynny udział w pracach zespołowych nad standaryzacją wyników badań AMH oraz opracowaniem modeli predykcyjnych stosowanych obecnie w leczeniu niepłodności (**pozycje 1-8**).

5.1.2. Zakres tematyczny: wykorzystanie aktualnych dostępnych metod badawczych w leczeniu niepłodności partnerskiej

1. Pastuszek E, Kiewisz J, Skowronska P, **Liss J**, Lukaszuk M, Bruszczyńska A, Jakiel G, Lukaszuk K. (2017). An investigation of the potential effect of sperm nuclear vacuoles in human spermatozoa on DNA fragmentation using a neutral and alkaline Comet assay. *Andrology*. Mar;5(2):392-398.

IF= 2,734; MNiSW: 35

Jednym z ważnych parametrów podlegających ocenie podczas diagnostyki i leczenia niepłodnej pary jest ocena nasienia partnera. O jakości nasienia nie stanowi obecnie podstawowe badanie nasienia wg norm WHO, którego znaczenie w rozrodzie wspomaganym jest coraz częściej podważane. Obecnie najważniejszym parametrem nasienia jest jakość zawartego w nim materiału genetycznego, którego najlepszym wykładnikiem jest fragmentacja DNA plemników. Dodatkowo obecność charakterystycznych form morfologicznych w plemniku (wakuoli) pozwala klasyfikować plemniki bardziej szczegółowo i na tej podstawie szacować ich potencjał do rozwoju prawidłowego, zdrowego zarodka. Poziom uszkodzeń w DNA plemnika, a dokładniej chromatyny plemnika ma ogromny wpływ na płodność. Z uwagi na cały proces spermatogenezy i wykorzystanie porcji nasienia podczas leczenia metodami wspomaganego rozrodu, badanie fragmentacji ograniczone zostaje jedynie do wartości prognostycznej. Podczas właściwego procesu

zapłodnienia pozaustrojowego nie ma obecnie możliwości zbadania poziomu fragmentacji DNA w konkretnym plemniku wykorzystanym do zapłodnienia komórki jajowej. Dostępne są jedynie metody optycznej analizy obrazu, pod dużym powiększeniem celem szczegółowej oceny morfologii plemnika. Ważne zatem było określenie, korelacji między jakością DNA plemnika a jego morfologią, tak aby parametr ten mógł być wykorzystany praktycznie (**pozycja nr 1**).

5.1.3. Zakres tematyczny: rola poziomu hormonów, w tym DHEA, w opracowywaniu strategii postępowania w leczeniu niepłodności

1. Kunicki M, Łukaszuk K, **Liss J**, Skowrońska P, Szczyptańska J. (2017). Granulocyte colony stimulating factor treatment of resistant thin endometrium in women with frozen-thawed blastocyst transfer. *Syst Biol Reprod Med*. Feb;63(1):49-57.

IF: 1,582; MNiSW: 20

2. Łukaszuk K, **Liss J**, Kunicki M, Kuczynski W, Pastuszek E, Jakiel G, Plociennik L, Zielinski K, Zabielska J. (2015). Estradiol Valerate Pretreatment in Short Protocol GnRH-Agonist Cycles versus Combined Pretreatment with Oral Contraceptive Pills in Long Protocol GnRH-Agonist Cycles: A Randomised Controlled Trial. *Biomed Res Int*. 2015:628056

IF: 2,134; MNiSW: 20

3. Łukaszuk K, Kunicki M, Kulwikowska P, **Liss J**, Pastuszek E, Jaszczolt M, Męczekalski B, Skowroński K. (2015). The impact of the presence of antithyroid antibodies on pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection-ICSI and embryo transfer in women with normal thyreotropine levels. *J Endocrinol Invest*. Dec;38(12):1335-43

IF: 1,994; MNiSW: 15

4. Kunicki M, Łukaszuk K, Jakiel G, **Liss J**. (2015). Serum Dehydroepiandrosterone Sulphate Concentration Is Not a Predictive Factor in IVF Outcomes before the First Cycle of GnRH Agonist Administration in Women with Normal Ovarian Reserve. *PLoS One*. 4;10(3)

IF: 3,057; MNiSW: 40

5. Kunicki M, Łukaszuk K, Woclawek-Potocka I, **Liss J**, Kulwikowska P, Szczyptańska J. (2014). Evaluation of granulocyte colony-stimulating factor effects on treatment-resistant thin endometrium in women undergoing in vitro fertilization. *Biomed Res Int*. 2014

IF: 1,579; MNiSW: 20

6. Łukaszuk K., Liss J., Łukaszuk M., Maj B. (2005). Optimization of estradiol supplementation during the luteal phase improves the pregnancy rate in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil. Steril.*; vol. 83, nr 5, 1372-1376.

IF: 3,114; MNiSW: 24

Leczenie niepłodności metodami wspomaganego rozrodu wymaga analizy wielu czynników jeszcze przed przystąpieniem do właściwej terapii. Istotnym jest interpretacja i wdrożenie właściwego leczenia hormonalnego w przypadku nieprawidłowych poziomów hormonów w tym m.in. DHEA, który okazuje się być ostatnio ważnym czynnikiem w prognozowaniu jakości odpowiedzi na stymulację hormonalną, w tym jakości komórek jajowych. Włączenie właściwego, dedykowanego dla pacjenta protokołu stymulacji okazuje się być kluczowym w uzyskaniu zamierzonego efektu leczenia (**pozycje nr 1-4**).

Nie bez znaczenia okazuje się także jakość endometrium. Powodzenie implantacji zarodka w przebiegu leczenia metodami wspomaganego rozrodu – IVF-ET uzależnione jest od wielu czynników, w tym od jakości zarodka oraz receptywności endometrium czyli obecności tzw. okienka implantacyjnego. Ocenia się, że 50-75% utrat szans na ciążę w przebiegu prowadzonego leczenia spowodowane jest brakiem odpowiedniej receptywności endometrium (**pozycja nr 5**). Implantacja jest bardzo skomplikowanym procesem, w który zaangażowany jest zarówno układ endokryny jak i immunologiczny i wymaga skomplikowanego dalszego leczenia w postaci suplementacji fazy lutealnej po przeprowadzonym leczeniu metodami wspomaganego rozrodu (**pozycja nr 6**).

5.1.4. Zakres tematyczny: roli wirusa HPV w patogenezie raka szyjki macicy.

1. Liss J., Łukaszuk K., Gulczyński J., Zwaliński M., Woźniak I., Emerich J., Wójcikowski Cz. (2002). Występowanie DNA wirusa HPV u pacjentek z rakiem szyjki macicy w regionie gdańskim. *Gin. Pol.*; 73(9), 740-745.

KBN/MNiSW: 5

2. Łukaszuk K., Liss J. (2002). Wartość kliniczna stosowanych testów diagnostycznych na obecność infekcji HPV w profilaktyce i leczeniu raka szyjki macicy. *Gin. Pol.*; 73(8):719-726.

KBN/MNiSW: 5

3. Łukaszuk K., Liss J., Wójcikowski Cz. (2002). Recombinant DNA templates as a competitive internal standard in qualitative PCR of human papillomavirus detection in cervical cytology. *Pol. J. Gynaecol. Invest.*; 5, 253-260.

KBN/MNiSW: 4

4. Łukaszuk K., **Liss J.**, Woźniak I., Emerich J., Wójcikowski Cz. (2003). Human Papillomavirus Type 16 Status in Cervical Carcinoma Cells DNA Given by Multiplex PCR. *J Clin. Microbiol.*; 41, 608-612.

IF: 3,489; KBN/MNiSW:14

5. Łukaszuk K., **Liss J.**, Emerich J., Wójcikowski Cz. (2003). Zastosowanie ilościowej oceny kopii genów E2/E6 HPV16 jako markera diagnostycznego raka szyjki macicy. *Ginekol. Pol.*; t. 74, nr 9, 793-798

KBN/MNiSW: 5

6. Łukaszuk K., **Liss J.**, Woźniak I., Śliwiński W., Emerich J., Wójcikowski Cz. (2004). HPV and histological status of pelvic lymph node metastases in cervical cancer: a prospective study. *J. Clin. Pathol.*; 57:472-476

IF: 2,619; KBN/MNiSW:12

7. Łukaszuk K., **Liss J.**, Woźniak I., Emerich J. (2006). Ocena korelacji obecności DNA HPV w węzłach chłonnych chorych na raka szyjki macicy z parametrami histopatologicznymi w zmianie pierwotnej. *Przeg. Lek.*:63, 3, 113-116.

KBN/MNiSW: 5

8. Łukaszuk K., **Liss J.**, Gulczyński J., Nowaczyk M., Nakonieczny M., Piątkowski M., Śliwiński W., Baay M., Woźniak I., Maj B., Łukaszuk M.. (2007). Predictive value of HPV DNA in lymph nodes in surgically treated cervical carcinoma patients - a prospective study. *Gynecol Oncol. Mar*;104(3):721-6

IF: 2,614; MNiSW: 24

9. Łukaszuk K., **Liss J.**, Nowaczyk M., Śliwiński W., Maj B., Woźniak I., Nakonieczny M., Barwińska D. (2007). Survival of 231 cervical cancer patients, treated by radical hysterectomy, according to clinical and histopathological features. *Eur J Gynaecol Oncol.*;28(1):23-7.

IF: 0,587; MNiSW: 10

10. Baay MF, Nakonieczny M, Wozniak I, Deschoolmeester V, **Liss J**, Lukaszuk K, Sotlar K, Emerich J, Vermorken JB. (2009). Microsatellite instability and HPV genotype in Polish women with cervical cancer. *Eur J Gynaecol Oncol.*;30(2):162-6.

IF: 0,614; MNiSW: 10

Rak szyjki macicy jest najczęstszym nowotworem narządu rodnego w Polsce i czwartym pod względem częstości występowania nowotworem u kobiet. Na podstawie retrospektywnych i prospektywnych badań epidemiologicznych prowadzonych w wielu ośrodkach na całym świecie, za główny czynnik etiologiczny raka szyjki macicy uznano infekcje wirusem HPV. Wirus po penetracji komórki, we wczesnej fazie infekcji, znajduje się w niej postaci episomalnej (nie związanej z

genomem zainfekowanej komórki). Znajduje się on zarówno w cytoplazmie jak i w jądrze. Prawdopodobnie, jednym z czynników zwiększających ryzyko rozwinięcia się nowotworu jest włączenie DNA wirusa HPV do genomu komórki nabłonkowej. Na początku XXI wieku w Polsce brak było badań epidemiologicznych, które określałyby częstotliwość występowania infekcji HPV w populacji kobiet klinicznie zdrowych.

W latach 2001-2002 powszechnie stosowanym testem komercyjnym był test hybrydacyjny - Hybrid Capture, polegający na stosowaniu sond RNA wykrywających DNA określonych typów HPV. Sondy stosowane w tym teście oparte były na sekwencjach DNA genów dla białek kapsydowych wirusów HPV, czego konsekwencją było wykrywanie zakażeń HPV w przypadkach łagodnej infekcji. W przypadkach, kiedy dochodzi do integracji DNA HPV z DNA komórkowym, a więc w dużym odsetku raków szyjki macicy oraz w przypadkach postępującej dysplazji przy braku form episomalnych wirusa, nie możliwe staje się wykrycie infekcji HPV wyżej wymienioną metodą. Europejska Organizacja Naukowa Infekcji Genitalnych i Nowotworów – EUROGIN na międzynarodowej konferencji raka szyjki macicy w 1997 roku w Paryżu zaleciła stosowanie metody PCR do wykrywania infekcji HPV jedynie przez wyspecjalizowane laboratoria diagnostyczne. Testy oparte na metodach hybrydacyjnych zalecane były natomiast dla laboratoriów bez wysoko specjalistycznego zaplecza diagnostycznego. Stąd podjęta została próba opracowania testów diagnostycznych w oparciu o metody biologii molekularnej celem wiarygodnej oceny obu form wirusa w badanym materiale (**pozycje nr 1-2**). Ważnym zagadnieniem było również opracowanie testów diagnostycznych wraz z szerokim panelem kontroli, nie tylko kontroli negatywnej i pozytywnej, ale także wewnętrznej kontroli pozytywnej danej reakcji PCR i wdrożenie ich do praktyki klinicznej (**pozycja nr 3**).

Szczegółowe badania nad transformacją nowotworową komórek nabłonka płaskiego szyjki macicy pozwoliły dodatkowo ocenić udział onkoprotein wirusa HPV (E6 oraz E7) i potwierdzić ich znaczenie w całym procesie nowotworzenia. W tym celu opracowane zostały szczegółowe metody molekularne wykrywania konkretnych genów wirusa HPV w jednej mieszaninie reakcyjnej, co pozwoliło na ocenę stosunków ilościowych produktów amplifikowanych genów wirusa (**pozycje nr 4-5**). Metoda ta może znaleźć zastosowanie do oceny zaawansowania infekcji wirusowej oraz ustalenia dodatkowych kryteriów rokowniczych u pacjentów z rakiem szyjki macicy HPV-pozytywnym (**pozycje nr 6-10**).

5.2. Pozostałe przejawy aktywności naukowej

Podsumowując, jestem autorem i współautorem **40 publikacji** o łącznym **IF: 75,136 (MNIŚW: 816)**. **Liczba cytowań** moich prac Web of Science wynosi **344**. **Indeks Hirscha** wynosi **10**.

Przygotowałam i **wygłosiłam 21 wykładów** podczas konferencji międzynarodowych, krajowych i spotkań naukowych.

Jestem **członkiem zarządu** Polskiego Towarzystwa Medycyny Rozrodu i Embriologii oraz **członkiem 5 towarzystw** naukowych.

Byłam opiekunem naukowym **4 prac magisterskich** prowadzonych we współpracy z Wydziałem Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Od października 2018 jestem **promotorem 1 pracy magisterskiej**, a od lutego 2019 **2 prac licencjackich**.

Prowadzę szkolenia podyplomowe dla lekarzy podczas kursów specjalistycznych z endokrynologii ginekologicznej i rozrodczości z zakresu niepłodności i technik wspomaganego rozrodu.

Uczestniczyłam w **9 kursach zawodowych** dotyczących technik wspomaganego rozrodu i diagnostyki preimplantacyjnej:

Brałam czynny udział w realizacji **1 międzynarodowego i 5 krajowych projektów badawczych**.

W 2004 roku otrzymałam **zespołową nagrodę pierwszego stopnia** od **Rektora Akademii Medycznej w Gdańsku** za ocenę obecności i integracji wirusa HPV z genomem komórki u chorych na raka szyjki macicy. W roku 2009 otrzymałam od **Rektora Akademii Medycznej w Gdańsku zespołową nagrodę pierwszego stopnia** za badania nad wartością prognostyczną wybranych parametrów molekularnych u chorych na raka szyjki macicy oraz raka jelita grubego oraz **zespołową nagrodę drugiego stopnia** za badania nad zastosowaniem genetycznej diagnostyki preimplantacyjnej.

Szczegółowy opis moich osiągnięć naukowych, dydaktycznych i organizacyjnych znajduje się w osobnym załączniku (załącznik nr 4).

Joanna Liss