

AUTOREFERAT
kandydata do stopnia doktora habilitowanego

1. Dane osobowe

- Imię i nazwisko: Anna Goździalska
- Data i miejsce urodzenia: 18.12.1972 Kraków
- Obecnie zajmowane stanowisko: adiunkt, Pełnomocnik Rektora Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego ds. Kosmetologii na Wydziale Zdrowia i Nauk Medycznych
- Miejsce pracy (szczegółowe dane zostały przedstawione w tabeli 1):

Tabela 1. Miejsca pracy wraz z pełnionymi funkcjami przez dr Annę Goździalską

Daty: od (m-c/rok) do (m-c/rok)	Nazwa i adres pracodawcy	Miejsce	Stanowisko
X 2009-nadal	Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego ul. Gustawa Herlinga Grudzińskiego 1 30-705 Kraków	Wydział Zdrowia i Nauk Medycznych	Pełnomocnik Rektora ds. Kosmetologii (X 2010)
		Zakład Kosmetologii Medycznej	adiunkt Kierownik zakładu
III 2002-VII 2012	Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum ul. Św. Anny 12 30-008 Kraków	Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum Zakład Analityki Biochemicznej,	adiunkt
VII 1995 – XI 2001	Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum ul. Św. Anny 12 30-008 Kraków	Wydział Lekarski Zakład Immunochemii Klinicznej	młodszy asystent, pracownik naukowo-techniczny

Od 1 października 2012 roku pierwszym miejscem pracy jest dla mnie, jako dla nauczyciela akademickiego, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Zdrowia i Nauk Medycznych. Jestem włączona do minimum programowego kierunku kosmetologia – studia pierwszego stopnia oraz kierunku pielęgniarstwo – studia magisterskie.

- **Wykształcenie:**

Ukończyłam kierunek biologia ze specjalnością biologia molekularna (1991-1995) na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. W roku 1995 obroniłam pracę magisterską: „Zastosowanie testu kometowego wg Singha do oceny apoptozy komórek fagocytyzujących” i uzyskałam dyplom magistra biologii ze specjalnością biologia molekularna. Promotorem pracy magisterskiej, wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii i Immunologii, Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego, była Prof. dr hab. Zofia Porwit-Bóbr.

W latach 1997-2002 wykonywałam badania celem przygotowania rozprawy doktorskiej pt. „Porównawcze badania aktywności esterazy aspirynowej i cholinesterazy surowicy ludzkiej krwi” w Zakładzie Immunochemii Klinicznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, której obrona odbyła się w roku 2002 na Wydziale Farmacji z Oddziałem Analityki Medycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Promotorem pracy doktorskiej był dr hab. Władysław Pajdak. Tytuł doktora nauk farmaceutycznych został mi nadany Uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej w dniu 27.06.2002. Rozprawa doktorska została wyróżniona przez członków Rady Wydziału.

2. Praca naukowa

- Główne zainteresowania, kierunki i osiągnięcia w zakresie prowadzonych badań przed i po otrzymaniu stopnia doktora :

Moja działalność naukowa związana jest z dziedziną nauk o zdrowiu, a także dziedziną nauk medycznych. Zainteresowania naukowe dotyczą społecznych aspektów chorób, a szczególnie oceny stopnia rozwoju i diagnostyki nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem raka podstawnocomórkowego skóry, przy użyciu metod biologii molekularnej.

W zakresie moich zainteresowań badawczych znajduje się obecnie przede wszystkim tematyka przydatności klinicznej metod biologii molekularnej, w szczególności dla oceny stopnia rozwoju i diagnostyki nowotworów, w tym raka podstawnocomórkowego skóry. W nurcie moich

zainteresowań badawczych znajdują się również: patomechanizm schorzeń metabolicznych oraz aspekty społeczne chorób – szeroko ujęte w zakresie tematyki rodziny w zdrowiu i chorobie. Podejmowałam również badania w zakresie biochemicznego i molekularnego podobieństwa enzymów: esterazy aspirynowej i cholinesterazy surowicy ludzkiej krwi z wykorzystaniem wielu metod biochemii i biologii molekularnej, w tym autorskiej metody barwienia produktu katalizy esterazy aspirynowej. Powyższą działalność naukową podzielić można na poniższe grupy tematyczne:

- 1. Społeczne aspekty zdrowia i choroby – rodzina w zdrowiu i chorobie**
- 2. Ocena stopnia rozwoju i diagnostyka nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem raka podstawnocomórkowego skóry, przy użyciu metod biologii molekularnej.**
- 3. Badanie patomechanizmu schorzeń metabolicznych – cukrzyca, otyłość, skolioza, łuszczyca.**
- 4. Biochemiczne i molekularne różnice między esterazą aspirynową i cholinoesterazą surowicy ludzkiej krwi.**

- **Liczba** recenzowanych publikacji (komunikaty, streszczenia oddzielnie)

Dorobek naukowy obejmuje 78 prac, w tym 26 artykułów naukowych opublikowanych na liście Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, w tym również 6 artykułów w czasopismach z listy Filadelfijskiego Instytutu Informacji Naukowej (ICI Master Journal List) oraz autorstwo monografii.

Do dorobku naukowego należą również rozdziały w recenzowanych monografiach, redakcja naukowa siedmiu recenzowanych monografii (w tym pięciu na pierwszym miejscu), a także 73 komunikaty zjazdowe z konferencji krajowych i zagranicznych, a także 3 referaty na Zjazdach Polskiego Towarzystwa Dietetyki.

Łączna ilość punktów uzyskanych z pełnotekstowych prac naukowych oraz redakcji naukowych recenzowanych monografii wynosi wg KBN/MNiSW 496 punktów, wśród nich jest 6 artykułów opublikowanych w czasopismach zawartych na Liście Journal Citation Reports o łącznym wskaźniku wpływu – Impact Factor = 14,122.

Łączna punktacja artykułów, w których jestem pierwszym autorem wynosi 147 punktów KBN/MNiSW.

Liczba cytowań wynosi [wg Google Scholar =27/ISI Web of Science= 3].

Współczynnik Hirscha wynosi [wg Google Scholar =3/JCR Web of Science Core Collection= 1].

Szczegółowe dane dotyczące dorobku naukowego zostały przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2. Dorobek naukowy dr Anny Goździalskiej

	przed doktoratem		po doktoracie	
	w j. polskim	w j. angielskim	w j. polskim	w j. angielskim
<u>oryginalne</u>	1	-	5	6
<u>poglądowe</u>	1	-	13	-
<u>podręczniki</u>	-	-	-	-
<u>rozdziały</u>	-	-	46	6
<u>monografie</u>	-	-	1	-

	przed doktoratem	po doktoracie
komunikaty zjazdowe krajowe	1	54
komunikaty zjazdowe w j. angielskim	4	14
streszczenia zjazdowe w języku polskim	4	13
streszczenia zjazdowe w j. angielskim	3	2
projekty badawcze	-	14

<u>punktacja</u>	przed doktoratem	po doktoracie
IF	-	14,122
MNISW	10	496
IC	11,16	497,29
Liczba Cytowań	-	3
Index Hirscha	-	1

3. Charakterystyka rozprawy habilitacyjnej (główne osiągnięcia naukowe przedstawione w rozprawie habilitacyjnej wraz z uzasadnieniem, co one wnoszą do rozwoju dziedziny nauk o zdrowiu).

(w przypadku cyklu publikacji – dodatkowo przedstawić ich wykaz, zawierający tytuł, autorów, datę i miejsce publikacji oraz punktację)

Najważniejszym moim osiągnięciem naukowym, uzyskanym po otrzymaniu stopnia naukowego doktora jest monografia:

Goździalska A.: Ocena ekspresji mRNA dla kolagenów typu I, III i IV oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w guzkowym raku podstawnocomórkowym i odmianie naciekającej. Oficyna Wydawnicza AFM, 2014. Stron 163. ISBN 978-83-7571-324-4. Recenzenci wydawniczy: prof. dr hab. Anna Wojas – Pelc, prof. dr hab. Krystyna Olczyk

Cel naukowy badania

Nadrzędnym celem niniejszej pracy było wykazanie i porównanie ekspresji transkryptów mRNA dla kolagenu typu I, III, IV oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w biopsjach skórnych pobranych od chorych na raka podstawnocomórkowego skóry (BCC) oraz w biopsjach skóry zdrowej pobranej z marginesu guza, od tych samych pacjentów.

Dla realizacji nadrzędnego celu pracy przyjęto następujące zadania badawcze:

1. Wykazanie zależności pomiędzy poziomem ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, III, IV oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w biopsjach skórnych pobranych od chorych na raka podstawnocomórkowego skóry a wiekiem pacjentów, miejscem lokalizacji guza, rodzajem fototypu skóry pacjenta, a także płcią pacjentów.
2. Wykazanie, czy istnieje różnica w ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, III, IV oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 pomiędzy tkanką nowotworową w raku podstawnocomórkowym naciekającym a tkanką nowotworową w raku guzkowym.
3. Wykazanie czy istnieje zależność pomiędzy ekspresją mRNA dla MMP-2 i MMP-9 w raku podstawnocomórkowym naciekającym i guzkowym a ekspresją mRNA dla kolagenu typu IV, odpowiednio, w tych samych typach raka.
4. Wykazanie, czy istnieje zależność pomiędzy ekspresją mRNA dla MMP-2 w raku podstawnocomórkowym naciekającym i guzkowym i ekspresją mRNA dla kolagenu typu I, odpowiednio w tych samych typach nowotworów.

Krótką charakterystyka monografii:

Przedmiotem opracowania była ocena ekspresji transkryptów mRNA dla kolagenów typu I, III i IV oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w biopsjach skórnych osób z rakiem podstawnocomórkowym skóry (postacią guzkową lub naciekającą) oraz w biopsjach skóry

zdrowej, pozyskanych z marginesu guza tych samych chorych. Praca podejmuje istotny problem dotyczący molekularnych podstaw procesu powstawania i rozwoju nowotworu, poprzez utratę kontroli nad rozwojem zmienionych komórek.

Nowotwory i choroby układu krążenia to najczęstsze przyczyny zgonów u ludzi. Rak podstawnocomórkowy, należący do nieczerniakowych raków skóry jest najczęstszym nowotworem rozwijającym się na skórze u ludzi rasy białej. Liczba pacjentów diagnozowanych z powodu wystąpienia tego nowotworu w ostatnich latach istotnie wzrasta, a ryzyko zachorowania nasila się wraz z wiekiem, jakkolwiek obserwuje się obecnie tendencję obniżania średniej wieku zachorowań. Pomimo faktu, że rozwój zmiany rzadko prowadzi do zgonu chorego, to często jest istotną przyczyną obniżenia jakości życia pacjenta. Omawiana choroba nowotworowa stanowi dzisiaj już nie tylko problem kliniczny, ale i społeczny. Zmiany nowotworowe zlokalizowane są w miejscach odsłoniętych, narażonych na działanie promieniowania UV pochodzącego ze słońca, którego rola w etiopatogenezie raka podstawnocomórkowego jest istotnie podkreślana. Zmiany te mogą prowadzić do dużych zniekształceń penetrując głęboko w sąsiadujące tkanki.

Temat pracy wpisuje się w nurt badań, mających na celu poszukiwanie wczesnych wskaźników procesu nowotworowego dla ustalenia trafnego rozpoznania i jak najszybszego włączenia skutecznego leczenia. Przy odpowiednio wczesnym rozpoznaniu zmian w podścielisku tkankowym można liczyć nawet na możliwość zapobiegnięcia rozwojowi procesu nowotworowego.

We wstępie monografii przedstawiono budowę skóry, ze szczególnym zwróceniem uwagi na struktury pozakomórkowe – składniki glikoproteinowe i heteropolisacharydowe. W dalszej części poruszona została problematyka nowotworów skóry, z uwzględnieniem raka podstawnocomórkowego. Opisana została epidemiologia, klasyfikacja, czynniki ryzyka oraz molekularne zmiany prowadzące do rozwoju raka podstawnocomórkowego, obejmujące mutacje genu *RAS*, genu *P53*, zaburzenia szlaku sygnałowego Hedgehog, rolę cykliny D1, ekspresję podjednostki hTR genu telomerazy, ekspresję białka KI-67, β kateniny, cyklooxygenazy 2 (COX-2), zaburzeń apoptozy w rozwoju ognisk raka podstawnocomórkowego skóry, a także rolę angiogenezy w rozwoju i progresji raka podstawnocomórkowego. Dalsza część wstępu poświęcona jest diagnostyce i leczeniu zmian o charakterze raka podstawnocomórkowego oraz przedstawione zostały powody prowadzące do wznowy nowotworu. Kolejna część wstępu przedstawia metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej – budowę, regulację ekspresji, specyfikę substratową, rolę w procesach fizjologicznych i patologicznych, w tym w patogenezie raka podstawnocomórkowego skóry.

Badania opisane w monografii miały na celu wykazanie i porównanie ekspresji transkryptów mRNA dla kolagenu typu I, III, IV oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w bioptatach skórnych pobranych od chorych na raka podstawnocomórkowego skóry oraz w bioptatach skóry zdrowej pobranej z marginesu guza, od tych samych pacjentów. Wykazano przydatność wykorzystania technik biologii molekularnej, równorzędnie do oceny klinicznej i badań histopatologicznych, w diagnostyce raka podstawnocomórkowego.

Materiałem do badań były bioptaty pozyskane od chorych, z ognisk guzów raka podstawnocomórkowego guzkowego i odmiany naciekającej tego nowotworu, jak również – z marginesu zdrowej tkanki, pobranej od tych samych pacjentów. Rozpoznanie obecności nowotworu oraz jego typu dokonano w Oddziale Klinicznym Dermatologii, Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, na podstawie badania klinicznego i histopatologicznego. Wszyscy pacjenci reprezentowali typ kaukaski. Badaniem objęto 85 pacjentów, a w tym 34 kobiety i 51 mężczyzn, u których zdiagnozowano raka podstawnocomórkowego skóry. Pacjenci zostali podzieleni na grupy wiekowe. W wieku poniżej 68 lat było 30 badanych, w przedziale 69-78 lat było 32 badanych, w wieku +79 było 23 badanych. Średni wiek pacjentów wynosił $71,7 \pm 9,4$ lat. Typ guzkowy raka podstawnocomórkowego skóry zdiagnozowany został u 45 pacjentów, a odmianę naciekającą BCC zdiagnozowano u 40 pacjentów. W każdym przypadku znany był fototyp skóry pacjenta oceniony wg klasyfikacji Fitzpatricka oraz lokalizacja zmiany nowotworowej na skórze chorego. Fototyp II został określony u 15 badanych, fototyp III u 46 badanych, a fototyp IV reprezentowało 24 chorych. U 71 badanych osób zmiany nowotworowe były zlokalizowane na głowie, a u 14 na tułowie. Kryterium doboru grupy było stwierdzenie na podstawie badania klinicznego i histopatologicznego guzów raka podstawnocomórkowego guzkowego lub odmiany naciekającej w skórze pacjentów. W pozyskanym materiale tkankowym oceniono ekspresję mRNA dla genów kolagenu typu I, III i IV (*COL1A1*; *COL3A1*; *COL4A4*), metaloproteinaz – 2 i 9 (*MMP-2*; *MMP-9*) oraz genu reporterowego dla β -aktyny (*ACTB*). Uzyskano pozytywną opinię Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego dotyczącą przeprowadzenia badań w pozyskanych bioptatach skóry nr KBET/37/B/2009, a następnie nr KBET/74/B/2011.

Metodologię pracy, oparto o techniki biologii molekularnej, m.in. takie jak reakcja odwrotnej transkrypcji RT-PCR, łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR, oraz – elektroforeza DNA w żelu agarozowym.

W bioptatach skóry pobranych od chorych na raka podstawnocomórkowego skóry wykonano oznaczenie ekspresji mRNA dla genów kolagenu typu I (*COL1A1*), kolagenu typu III (*COL3A1*),

kolagenu typu IV (*COL4A4*), metaloproteinazy 2 (*MMP-2*), metaloproteinazy 9 (*MMP-9*) oraz genu reporterowego dla β -aktyny (*ACTB*). Oznaczenia wykonano zarówno w tkankach pobranych z guza BCC, jak i w tkankach zdrowych, pochodzących z marginesu guza od tych samych pacjentów. Z wszystkich pobranych biopatów, kolejno, wyizolowano całkowite RNA. Zestawienie odczynników i aparatury niezbędnej do wykonania powyższych oznaczeń, a także zasady wykorzystanych metod przedstawione zostały w Aneksie monografii.

Biopaty skóry ważono i pulweryzowano w ciekłym azocie, a następnie przeprowadzono ekstrakcję całkowitego RNA z tkanek guza oraz z tkanek zdrowych, zmodyfikowaną metodą Chomczyńskiego i Sacchi, w temperaturze 4°C. Oceniano stężenie i czystość uzyskanego całkowitego RNA, wyizolowanego z tkanek nowotworowych guzów BCC oraz z tkanek zdrowych.

Reakcję odwrotnej transkrypcji wykonano przy użyciu zestawu: Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Litwa). Reakcja RT umożliwia przeprowadzenie na matrycy wyizolowanego RNA efektywnej reakcji syntezy nici cDNA. Otrzymane cDNA przechowywano w temp. -20°C. Uzyskane cDNA fragmentu genu *COL1A1*, *COL3A1*, *COL4*, *MMP-2*, *MMP-9* i *ACTB* następnie amplifikowano w reakcji PCR, do której wykorzystywano odpowiednie primery.

Otrzymane w wyniku reakcji PCR produkty amplifikacji fragmentów genów dla *COL1A1*, *COL3A1*, *COL4A4*, *MMP-2*, *MMP-9* i *ACTB* rozdzielono kolejno w 1.5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Elektroforegramy dokumentowano przy użyciu aparatu cyfrowego (Olympus, USA) i transluminatora UV (Vilber Lourmat, Francja) z wykorzystaniem systemu dokumentacji i analizy obrazu żeli PolyDoc. Cyfrowy zapis elektroforegramu poddano analizie densytometrycznej przy użyciu programu Quantity One 4.2.1. (Bio-Rad, USA). Analizowano gęstość densytometryczną uzyskanych produktów reakcji RT PCR. Przyjęto, że wartość gęstości densytometrycznej otrzymanych produktów odpowiada ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV, *MMP-2*, *MMP-9*, i β -aktyny.

Uzyskane wyniki zostały opisane i poddane analizie statystycznej. Wyniki badań są przedstawione w tabelach od 6-25 i omówione w tekście pod tabelami. Na końcu pracy w rozdziale Aneks zostało zamieszczone szczegółowe objaśnienie zasad wykonywanych badań molekularnych - uzasadniając wybór metodyki badań oraz wykaz odczynników i aparatury badawczej.

W pracy wykazano istnienie odmiennych poziomów ekspresji mRNA dla kolagenów typu I, III i IV oraz dla *MMP-2* i 9 w tkankach zmienionych nowotworowo, w stosunku do tkanek prawidłowych. Wykazane zostały również różnice w stopniu inwazyjności dwóch analizowanych postaci raka podstawnokomórkowego, w oparciu o pomiar ekspresji mRNA *MMP-2* i 9 oraz

kolagenów typu I i III. Dowiedziono istniejące różnice w odmiennej roli kolagenów typu I i III a typu IV, w patomechanizmie raka podstawnocomórkowego.

Konkluzje:

1. W przebiegu raka podstawnocomórkowego skóry występują istotnie odmienne poziomy ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV i MMP-2 oraz MMP-9 w porównaniu do tkanek zdrowych pobranych z marginesu guza od tych samych pacjentów

2. W odmianie naciekającej raka podstawnocomórkowego skóry występuje istotnie wyższa ekspresja mRNA dla metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9, co świadczy o bardziej inwazyjnym charakterze tej postaci guza

3. W obrębie guza BCC guzkowego występuje znamienne wyższa ekspresja mRNA dla kolagenu typu I i III, co warunkuje otoczenie guza przez białka kolagenowe, tym samym zapewniając mniejszy potencjał inwazyjny guza w BCC guzkowym niż w odmianie naciekającej

4. W podziale pacjentów wg wieku, fototypu skóry, lokalizacji guza na ciele oraz płci, w każdej z grup występują zawsze istotnie wyższe poziomy ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, III oraz MMP-2 i MMP-9, a także zawsze niższy poziom ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV w tkance guza w porównaniu do tkanki marginesu guza pobranych od tych samych pacjentów, w obu typach guza BCC. Postrzegane różnice świadczą o odmiennej roli kolagenów I i III oraz kolagenu IV w patomechanizmie rozwoju raka BCC

5. Sugeruje się, że metaloproteinazy MMP-2 i MMP-9 mogą być wykorzystane jako czynniki prognostyczne toczącego się procesu nowotworowego w przebiegu raka podstawnocomórkowego skóry

Pozycje piśmiennicze monografii:

W spisie piśmiennictwa, na końcu pracy umieszczono 258 pozycji piśmiennictwa, w tym pozycje polsko- i angielskojęzyczne.

Znaczenie uzyskanych wyników i możliwość ich ewentualnego wykorzystania:

W przypadku wystąpienia BCC, poszerzenie diagnostyki zmian nowotworowych o badania porównujące ekspresję mRNA i/lub białek MMPs w zmianie nowotworowej w odniesieniu do tkanki prawidłowej, mogłoby znacznie zwiększyć prawdziwość oceny marginesu zmiany, a tym samym zwiększyłyby przydatność oznaczeń dla potwierdzenia lub wykluczenia rozwoju procesu nowotworowego na bardzo wczesnych etapach. W przypadku działań terapeutycznych, u chorych z BCC stosuje się najczęściej chirurgiczne usunięcie zmiany. Stąd też stale poszukiwane są markery

molekularne umożliwiające odróżnienie tkanki zmienionej nowotworowo od marginesu tkanki zdrowej. Za takie markery mogą być uznane metaloproteinazy MMP-2 i MMP-9. Uzyskane obecnie wyniki dotyczące ekspresji mRNA dla MMP-2 i MMP-9 potwierdzają przydatność tych oznaczeń dla diagnostyki molekularnych zmian nowotworowych w raku podstawnocomórkowym skóry, chociaż wzrost poziomu tych cząsteczek obserwuje się także w innych typach nowotworów, a także w stanach zapalnych.

Najistotniejszym osiągnięciem niniejszej pracy było ustalenie, że metaloproteinazy MMP-2 i MMP-9 mogą być wykorzystane jako molekularne markery procesu nowotworowego w przebiegu raka podstawnocomórkowego skóry. Zastosowany w pracy warsztat molekularny okazał się przydatny do dopełnienia oceny stanu klinicznego chorych, wskazując możliwość stosowania oznaczeń molekularnych przebiegających równolegle do metod histopatologicznych.

A. Goździalska