

Autoreferat

Dr n. biol. Anna Aneta Brożyna

**Collegium Medicum
Uniwersytet Mikołaja Kopernika**

Bydgoszcz 2016

1. IMIĘ I NAZWISKO	3
2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE/ ARTYSTYCZNE – Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	3
3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ ARTYSTYCZNYCH.....	4
4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (Dz. U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.):.....	4
4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO/ARTYSTYCZNEGO	4
4.2. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	4
4.3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO/ARTYSTYCZNEGO WW. PRACY/PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA.....	6
4.3.1. WSTĘP	6
4.3.2. CELE BADAWCZE PODJĘTE W PUBLIKACJACH STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE	10
4.3.3. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ PRZEPROWADZONYCH W POSZCZEGÓLNYCH PRACACH SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA OSIĄGNIĘCIE HABILITACYJNE	12
PUBLIKACJA 1: Expression of vitamin D receptor decreases during progression of pigmented skin lesions. <i>Human Pathology</i> 2011, 42(5):618-31	12
PUBLIKACJA 2: Decreased VDR Expression in Cutaneous Melanomas as Marker of Tumor Progression: New Data and Analyses. <i>Anticancer Research</i> 2014, 34:2735-2744	13
PUBLIKACJA 3: High basal NF- κ B activity in nonpigmented melanoma cells is associated with an enhanced sensitivity to vitamin D3 derivatives. <i>British Journal of Cancer</i> 2011, 105(12):1874-84	14
PUBLIKACJA 4: Expression of vitamin D activating enzyme 1-alpha-hydroxylase (CYP27B1) decreases during melanoma progression. <i>Human Pathology</i> 2013, 44:374-387	15
PUBLIKACJA 5: CYP24A1 Expression Inversely Correlates with Melanoma Progression: Clinic-Pathological Studies. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> 2014, 15:19000-19017..	17
PUBLIKACJA 6: ROR α and ROR γ expression inversely correlates with human melanoma, <i>Oncotarget</i> 2016, 7(39):63261-63282.	18
4.3.4. PODSUMOWANIE	20
5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO - BADAWCZYCH (ARTYSTYCZNYCH)	22
5.1. PODSUMOWANIE WSPÓŁCZYNNIKA WPLYWU IF, PUNKTACJI MNiSW PUBLIKACJI NIE ZGŁOSZONYCH DO POSTĘPOWANIA HABILITACYJNEGO	22
5.2. OSIĄGNIĘCIA W PRACY BADAWCZEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA.....	23
5.3. OSIĄGNIĘCIA W PRACY BADAWCZEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA	24

1. IMIĘ I NAZWISKO

Anna Aneta Brożyna

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE/ ARTYSTYCZNE – Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- 1) 2015r. - obecnie – Podyplomowe Studium Analityki Medycznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
- 2) 2005r. - doktor nauk biologicznych, specjalność biologia molekularna, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń
 - a. tytuł rozprawy doktorskiej: „Podatność komórek skóry i narządów wewnętrznych na indukcję pęknięć jądrowego DNA promieniowaniem ultrafioletowym A”
 - b. promotor: prof. dr hab. Barbara W. Chwirot
- 3) 1999r. - magister biologii, specjalność biologia molekularna, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń
 - a. tytuł pracy magisterskiej: „Badania in vitro i in vivo diagnostycznego potencjału i biologicznych podstaw metody biopsji optycznej w odniesieniu do wykrywania nowotworów żołądka człowieka przy wzбудzaniu fluorescencji ultrafioletowym promieniowaniem linii 337nm i 325nm”
 - b. promotor: prof. dr hab. Barbara W. Chwirot
- 4) 1997 – 1999 – Studium Pedagogiczne, Uniwersytet Mikołaja Kopernika (uzyskane kwalifikacje pedagogiczne)

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ ARTYSTYCZNYCH

- 1) 01.09.2011 – obecnie – adiunkt, Zakład Patologii Nowotworów i Patomorfologii, Wydział Nauk o Zdrowiu, Collegium Medicum Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Bydgoszcz
- 2) 01.07.2009 – obecnie – asystent/pracownik zespołu laboratoryjnego, Zakład Patologii Nowotworów i Patomorfologii, Centrum Onkologii, Bydgoszcz
- 3) 01.10.2007 – 30.06.2009 – adiunkt, Zakład Biologii Medycznej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń
- 4) 01.10.1999 – 30.09.2007 – asystent, Zakład Biologii Medycznej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń
- 5) 15.07.1999 – 30.09.1999 – młodszy asystent, Pracownia Autofluorescencji Znamion, Interdyscyplinarny Zespół Optycznych Metod Wczesnego Wykrywania Nowotworów, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wojewódzki Szpital Zespolony, Toruń

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (Dz. U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.):

4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO/ARTYSTYCZNEGO

Endokrynnny system witaminy D a czerniak: rola jądrowych receptorów witaminy D oraz hydroksylaz CYP27B1 i CYP24A1 w patogenezie i progresji czerniaka skóry

4.2. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem 6 oryginalnych prac przedstawionych poniżej i opublikowanych w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR), cytowanych łącznie **112** razy, których sumaryczny **IF** wynosi **20,420** a łączna liczba punktów **MNiSW** wynosi **195**. Wymienione prace

powstały po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, specjalność biologia molekularna:

1. **Anna A. Brożyna**, Wojciech Jóźwicki, Zorica Janjetovic, Andrzej T. Slominski, 2011, Expression of vitamin D receptor decreases during progression of pigmented skin lesions. Human Pathology 42(5):618-31.

IF = 2,876

35 pkt. MNiSW

2. **Anna A. Brożyna**, Wojciech Jóźwicki, Andrzej T. Slominski, 2014, Decreased VDR Expression in Cutaneous Melanomas as Marker of Tumor Progression: New Data and Analyses. Anticancer Research 34:2735-2744.

IF = 1,826

20 pkt. MNiSW

3. Zorica Janjetovic, **Anna A. Brożyna**, Robert C. Tuckey, Minh N. Nguyen, Tae-Kang Kim, Susan R. Pfeffer, Lawrence M. Pfeffer, Wojciech Jóźwicki, Andrzej T. Slominski, 2011, High basal NF-κB activity in nonpigmented melanoma cells is associated with an enhanced sensitivity to vitamin D3 derivatives. British Journal of Cancer 105(12):1874-84.

IF = 5,042

35 pkt. MNiSW

4. **Anna A. Brożyna**, Wojciech Jóźwicki, Zorica Janjetovic, Andrzej T. Slominski, 2013, Expression of vitamin D activating enzyme 1-alpha-hydroxylase (CYP27B1) decreases during melanoma progression. Human Pathology 44:374-387.

IF = 2,806

35 pkt. MNiSW

5. **Anna A. Brożyna**, Cezary Jochymowski, Zorica Janjetovic, Wojciech Jóźwicki, Robert C. Tuckey, Andrzej T. Slominski, 2014, CYP24A1 Expression Inversely Correlates with Melanoma Progression: Clinic-Pathological Studies. International Journal of Molecular Sciences 15:19000-19017.

IF = 2,862

30 pkt. MNiSW

6. **Anna A. Brożyna**, Wojciech Jóźwicki, Cezary Skobowiat, Anton Jetten, Andrzej T. Slominski, 2016, ROR α and ROR γ expression inversely correlates with human melanoma. Oncotarget 7(39):63261-63282

IF = 5,008

40 pkt. MNiSW

4.3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO/ARTYSTYCZNEGO WW. PRACY/PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

4.3.1. WSTĘP

SYNTEZA I METABOLIZM WITAMINY D

Promieniowanie ultrafioletowe (UV) uważane jest za główny czynnik etiologiczny zaangażowany w powstawanie złośliwych nowotworów skóry, w tym czerniaków. Jednakże promieniowanie ultrafioletowe z zakresu UVB ($\lambda=280-320\text{nm}$) jest niezbędne w produkcji witaminy D w skórze, która pokrywa ponad 90% zapotrzebowania organizmu na ten hormon¹. Absorpcja promieniowania UVB przez

¹ Bikle DD. Vitamin D receptor, UVR, and skin cancer: a potential protective mechanism. J Invest Dermatol 2008;128(10):2357-2361.

obecny w skórze 7-dehydrocholesterol powoduje powstanie prewitaminy D, szybko ulegającej izomeryzacji w temperaturze skóry. Jednym z powstających w wyniku izomeryzacji związków jest cholekalcyferol (witamina D₃)², który po dwuetapowej hydroksylacji jest przekształcany do biologicznie aktywnego związku, kalcytriolu. Pierwsza z hydroksylacji, mająca miejsce w wątrobie i katalizowana przez 25-hydroksylazę CYP2R1 lub CYP27A1, powoduje powstanie 25-hydroksycholekalcyferolu (25(OH)D₃), głównego metabolitu witaminy D krążącego we krwi. Natomiast druga hydroksylacja, przebiegająca w nerkach, jest katalizowana przez 1 α -hydroksylazę (**CYP27B1**) i prowadzi do powstania biologicznie aktywnej formy witaminy D, 1,25-dihydroksycholekalcyferolu (1,25(OH)₂D₃, kalcytriolu). **CYP2R1 i CYP27B1 występują również poza wątrobą i nerkami, m. in. w komórkach skóry, co pokazuje, że cholekalcyferol może być w pełni aktywowany w skórze.** Pozanerkowy CYP27B1 został zidentyfikowany w komórkach i tkankach prawidłowych i nowotworowych. Kalcytriol jest inaktywowany przez hydroksylazę **CYP24A1**, która poprzez hydroksylację kalcytriolu w pozycji C24, rozpoczyna proces degradacji biologicznie aktywnej witaminy D^{3,4}.

MECHANIZM PLEJOTROPOWEGO DZIAŁANIA WITAMINY D

Kalcytriol reguluje szereg procesów komórkowych i ogólnoustrojowych, działając poprzez jądrowy receptor **VDR** (ang. *vitamin D receptor*), znany także jako NR1I1, należący do grupy receptorów steroidowych. VDR funkcjonuje jako heterodimer z retinoidowym receptorem X (RXR), który po translokacji z cytoplazmy do jądra komórkowego spełnia funkcję czynnika transkrypcyjnego genów zawierających w promotorze specyficzną sekwencję DNA, zwaną VDRE (ang. *vitamin D response elements*). VDR ulega ekspresji w prawie wszystkich narządach i komórkach naszego organizmu, regulując wiele procesów, nie tylko związanych z gospodarką wapniowo-

² Holick MF, Frommer JE, McNeill SC, et al. Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D₃ in skin. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;76(1):107-114.

³ Bikle DD, Chang S, Crumrine D, et al. 25 Hydroxyvitamin D 1 alpha-hydroxylase is required for optimal epidermal differentiation and permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 2004;122(4):984-992.

⁴ Zhu JG, Ochalek JT, Kaufmann M, et al. CYP2R1 is a major, but not exclusive, contributor to 25-hydroxyvitamin D production in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(39):15650-15655.

fosforanową⁵. Ekspresja około 3% ssaczego genomu jest regulowana bezpośrednio/pośrednio przez VDR⁶. Witamina D₃ wykazuje m. in. działanie przeciwnowotworowe hamując proliferację, migrację i inwazyjność komórek nowotworowych oraz angiogenezę, stymulując różnicowanie, dojrzewanie, starzenie komórek, apoptozę, ekspresję cząsteczek adhezyjnych (np.: E-kadheryny) i aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, regulując działanie układu immunologicznego, osłabiając aktywność telomerazy i wykazując ochronne działanie przeciw oksydacyjnym uszkodzeniom DNA⁷. Ponadto, niektóre hydroksylowane pochodne witaminy D mogą funkcjonować jako ligandy receptorów sierocych alfa i gamma związanych z receptorem kwasu retinowego (**RORα** i **RORγ**) i działać jako ich antagoniści i odwrotni agoniści.

PRZECIWNOWOTWOROWE DZIAŁANIE WITAMINY D

Pierwsze doniesienia wskazujące na związek pomiędzy witaminą D₃ a nowotworami pojawiły się prawie 40 lat temu i ukazywały zwiększone ryzyko zachorowania na chorobę nowotworową oraz większe ryzyko zgonu u osób z obniżonym stężeniem witaminy D₃ w surowicy^{8,9}. Wyniki te zostały potwierdzone w późniejszych badaniach epidemiologicznych¹⁰. Badania eksperymentalne przeprowadzone na modelach zwierzęcych pokazały natomiast, że myszy pozbawione receptora VDR (VDR(-/-)) są również bardziej narażone na rozwój nowotworu oraz cechują się obniżoną odpowiedzią na przeciwnowotworowe działanie witaminy D (ocenianą poprzez zmniejszanie się wielkości guza)^{11,12}. Przeciwnowotworowe działanie wykazuje zarówno

⁵ Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, et al. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev* 2016;96(1):365-408.

⁶ Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 2008;29(6):726-776.

⁷ Picotto G, Liaudat AC, Bohl L, Tolosa de Talamoni N. Molecular aspects of vitamin D anticancer activity. *Cancer Invest.* 2012 30(8):604-14

⁸ Garland CF, Garland FC. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int J Epidemiol* 1980;9(3):227-231.

⁹ Garland CF, Comstock GW, Garland FC, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study. *Lancet* 1989;2(8673):1176-1178.

¹⁰ Engel P, Fagherazzi G, Mesrine S, et al. Joint effects of dietary vitamin D and sun exposure on breast cancer risk: results from the French E3N cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20(1):187-198.

¹¹ Zinser GM, Sundberg JP, Welsh J. Vitamin D(3) receptor ablation sensitizes skin to chemically induced tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2002;23(12):2103-2109.

¹² Eisman JA, Martin TJ, MacIntyre I, et al. 1,25-dihydroxyvitamin-D-receptor in breast cancer cells. *Lancet* 1979;2(8156-8157):1335-1336

kalcytriol, jak i nowo zidentyfikowane pochodne (np.: $20(\text{OH})\text{D}_3$, $20(\text{OH})\text{D}_2$, $1,20(\text{OH})_2\text{D}_3$, $20,23(\text{OH})_2\text{D}_3$)¹³.

WITAMINA D A CZERNIAK SKÓRY

Ludzkie komórki nowotworowe, w tym komórki ludzkiego czerniaka, wykazując zdolność do syntezy VDR, posiadają potencjalną zdolność do odpowiedzi na plejotropowe działanie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, co pokazały badania *in vitro* na liniach komórkowych. **Czerniak skóry**, wywodzący się z melanocytów nowotwór złośliwy, nie jest zbyt częstym nowotworem i w Polsce w 2013r. stanowił u mężczyzn 1,8% i u kobiet 2,1% zachorowań na nowotwory¹⁴. Jednak liczba nowych zachorowań zarówno na świecie jak i w Polsce wciąż rośnie, zwłaszcza w populacji osób starszych, i w Polsce w latach 1980-2010 zanotowano prawie 3-krotny wzrost nowych przypadków czerniaka¹⁵. Ponadto, wskaźnik 5-letniego przeżycia także nie jest zadowalający i wynosi 60-90% dla czerniaków we wczesnym stadium zaawansowania, 20-70% w stadium regionalnego zaawansowania i 5-10% w stadium uogólnionej choroby nowotworowej. Również odsetek zgonów z powodu czerniaka w latach 1990-2010 wzrastał i wciąż pozostaje na wysokim poziomie. W 2013r. czerniak był przyczyną zgonów u 1,42% mężczyzn i u 1,58% kobiet chorych na nowotwory złośliwe^{13,14}. W ostatnich latach do leczenia czerniaka zostało opracowanych i wprowadzonych kilka nowoczesnych metod terapeutycznych, w tym tzw. terapii celowanych. Jednak są one często związane z poważnymi skutkami ubocznymi, wysokimi kosztami leczenia i nabywaniem wtórnej oporności, prowadzącej do nawrotu choroby. Zatem konieczne są nowe cele i podejścia w strategiach terapeutycznych czerniaka. Jednym z potencjalnych leków w terapii czerniaka wydaje się być witamina D_3 i jej pochodne. Jednak niektóre doniesienia naukowe sugerowały, że w komórkach czerniaka może dochodzić do zaburzenia funkcjonowania ścieżek sygnałowych regulowanych przez kalcytriol. Jedną z przyczyn tych zaburzeń mogą być deficyty i niedobory witaminy $\text{D}_{2/3}$ u pacjentów z czerniakiem, u których

¹³ Slominski AT, Janjetovic Z, Kim TK, et al., Novel non-calcemic secosteroids that are produced by human epidermal keratinocytes protect against solar radiation. J Steroid Biochem Mol Biol. 2015 Apr;148:52-63

¹⁴ Didkowska J, Wojciechowska U. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2013 roku. Centrum Onkologii Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Krajowy Rejestr Nowotworów, Zakład Epidemiologii, Warszawa 2015

¹⁵ Krajowy Rejestr Nowotworów: Czerniak skóry (C43). <http://onkologia.org.pl/czerniak-skory-c43/>, 05-09-2016

niedostateczne stężenie 25(OH)D₃ lub 25(OH)D₂ było związane z większą grubością guza według skali Breslow'a i znacznie zredukowanym czasem przeżycia^{16, 17, 18}. Ponadto, niektóre polimorfizmy receptora VDR są również związane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju czerniaka, agresywnością i gorszą prognozą¹⁹. Badania *in vitro* wskazują, że komórki czerniaka mogą być wrażliwe na antyproliferacyjne, przeciwnowotworowe i proróżnicujące działanie 1,25(OH)₂D₃ i jej analogów. Jednak ta wrażliwość wymaga ekspresji receptora VDR^{20, 21}.

4.3.2. CELE BADAWCZE PODJĘTE W PUBLIKACJACH STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Liczne badania *in vitro* oraz badania na modelach zwierzęcych wskazują, że nieprawidłowe funkcjonowanie ścieżek sygnałowych regulowanych przez kalcytriol, może odgrywać istotną rolę w patogenezie chorób nowotworowych. Zaburzenia te mogą wynikać z **nieprawidłowej ekspresji VDR**, niedostatecznej aktywacji witaminy D₃ (**nieodpowiedniego poziomu/aktywności CYP27B1**) lub nadmiernej inaktywacji kalcytriolu (**nadmiar/nadaktywność CYP24A1**). Ponadto, w ostatnich latach rozważane są nowe terapie czerniaka z zastosowaniem witaminy D i/lub jej pochodnych, zatem koniecznym wydawało się zbadanie i dokładne **scharakteryzowanie ekspresji VDR (oraz enzymów zaangażowanych w metabolizm witaminy D)** w materiale klinicznym obejmującym zarówno pierwotne czerniaki skóry, jak i przerzuty czerniaków. Obecnie prowadzone są randomizowane badania kliniczne 2 i 3 fazy dotyczące wpływu suplementacji witaminą D na czas wolny od choroby i ryzyko nawrotu czerniaka.

¹⁶ Newton-Bishop JA, Davies JR, Latheef F, et al. 25-Hydroxyvitamin D₂ /D₃ levels and factors associated with systemic inflammation and melanoma survival in the Leeds Melanoma Cohort. *Int J Cancer* 2015;136(12):2890-2899.

¹⁷ Wyatt C, Lucas RM, Hurst C, et al. Vitamin D deficiency at melanoma diagnosis is associated with higher Breslow thickness. *PLoS One* 2015;10(5):e0126394.

¹⁸ Caini S, Boniol M, Tosti G, et al. Vitamin D and melanoma and non-melanoma skin cancer risk and prognosis: a comprehensive review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2014;50(15):2649-2658.

¹⁹ Szyska P, Zmijewski MA, Slominski AT. New vitamin D analogs as potential therapeutics in melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2012;12(5):585-599.

²⁰ Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 2008;29(6):726-776.

²¹ Piotrowska A, Wierzbicka J, Nadkarni S et al., Antiproliferative Activity of Double Point Modified Analogs of 1,25-Dihydroxyvitamin D₂ Against Human Malignant Melanoma Cell Lines. *Int J Mol Sci.* 2016 Jan 8;17(1). pii: E76.

Ostatnio wykazaliśmy także, że kacytriol i jego pochodne są ligandami dla receptorów sierocych alfa i gamma związanych z receptorem kwasu retinowego (**ROR α** i **ROR γ**).

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe argumenty, postawiłam następujące cele badawcze:

- scharakteryzowanie ekspresji VDR, CYP27B1, CYP24A1, ROR α i ROR γ w znamionach melanocytarnych, czerniakach pierwotnych skóry i przerzutach czerniaka oraz określenie rozkładu ekspresji badanych receptorów i enzymów w populacji pacjentów z czerniakiem skóry o różnym stopniu zaawansowania
- określenie zależności pomiędzy ekspresją receptora VDR, CYP27B1 oraz CYP24A1 a progresją choroby u pacjentów z czerniakiem oraz określenie potencjału prognostycznego receptora VDR i enzymów CYP27B1 oraz CYP24A1 poprzez:
 - zbadanie ekspresji receptora witaminy D (VDR), enzymów biorących udział w metabolizmie witaminy D, CYP27B1 oraz CYP24A1, w melanocytarnych nowotworach skóry człowieka
 - określenie zależności pomiędzy ekspresją VDR, CYP27B1 oraz CYP24A1 a danymi kliniczno-patomorfologicznymi, w tym markerami prognostycznymi czerniaka
 - określenie zależności pomiędzy przeżyciem pacjentów z czerniakiem i czasem wolnym od choroby a ekspresją VDR, CYP27B1 oraz CYP24A1
- zbadanie wrażliwości ludzkich komórek czerniaka na działanie witaminy D i jej pochodnych
- zbadanie ekspresji receptorów ROR α i ROR γ w komórkach czerniaka i melanocytarnych zmianach nowotworowych skóry człowieka oraz określenie zależności pomiędzy ekspresją tych receptorów a progresją choroby u pacjentów z czerniakiem, poprzez analizę poziomu ROR α i ROR γ w odniesieniu do cech patomorfologicznych czerniaków, czasu przeżycia i czasu do progresji choroby.

Badawczy materiał kliniczny (łagodne znamiona melanocytarne, czerniaki pierwotne skóry, przerzuty czerniaków oraz próbki prawidłowej skóry, stanowiące kontrolę) został pobrany od pacjentów leczonych w Centrum Onkologii im. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy.

4.3.3. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ PRZEPROWADZONYCH W POSZCZEGÓLNYCH PRACACH SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA OSIĄGNIĘCIE HABILITACYJNE

PUBLIKACJA 1: Expression of vitamin D receptor decreases during progression of pigmented skin lesions. *Human Pathology* 2011, 42(5):618-31

Celem badań była analiza ekspresji receptora VDR w melanocytarnych nowotworach skóry człowieka w odniesieniu do danych klinicznych, typu histologicznego, morfologii, tempa proliferacji i markerów apoptozy. W tych samych próbkach wykonaliśmy oznaczenia aktywności proliferacyjnej (liczba mitoz/mm²) i apoptotycznej (poprzez oznaczanie ekspresji Bcl-2), obecność słonecznej elastozy oraz stopnia pigmentacji zmian nowotworowych. Ponadto, przeprowadziliśmy także analizę ekspresji receptora VDR w hodowli ludzkich komórek czerniaka SkMel-188, charakteryzujących się zdolnością do indukcji melanogenezy, w zależności od składu pożywki hodowlanej (zawartości tyrozyny). Praca ta, **po raz pierwszy charakteryzowała ekspresję VDR *in situ* w populacji pacjentów z melanocytarnymi zmianami, w tym ze znamionami, czerniakiem i przerzutami czerniaków.** Obserwowaliśmy zarówno cytoplazmatyczną, jak i jądrową immunolokalizację VDR, a zmiany w poziomie VDR w cytoplazmie i jądrze komórkowym były skorelowane z badanymi cechami czerniaków i stanem ogólnym pacjentów. Obecność receptora VDR stwierdziliśmy w prawidłowej skórze i zmianach nowotworowych, jednak w nowotworach ekspresja VDR była znacząco niższa, a najniższą ekspresję VDR zaobserwowaliśmy w zmianach złośliwych: czerniakach i ich przerzutach. Obniżony poziom VDR był najsilniej zaznaczony dla jądrowej immunolokalizacji VDR. Szczegółowa analiza VDR w czerniakach wykazała, że poziom **VDR był ujemnie skorelowany z zaawansowaniem czerniaków**, ocenionym zarówno według skali Breslow'a jak i Clark'a. **Redukcja poziomu VDR była związana z bardziej agresywnym fenotypem czerniaka**, tzn. była silniej zaznaczona w inwazyjnej, pionowej fazie wzrostu, czerniakach o wysokiej aktywności mitotycznej oraz czerniakach guzowatych. Po raz pierwszy także opisaliśmy **obniżenie czasu przeżycia pacjentów, u których stwierdziliśmy obniżenie poziomu VDR zarówno w czerniakach pierwotnych, jak i ich przerzutach.** Po raz pierwszy wykazaliśmy również, że

ekspresja VDR jest zależna od syntezy melaniny przez komórki czerniaka. Czerniaki charakteryzujące się wysokim stopniem pigmentacji wykazywały znacząco niższy poziom VDR niż czerniaki amelanotyczne i czerniaki słabo upigmentowane. Wyniki te potwierdziliśmy w badaniach na komórkach czerniaka linii SkMel-188. Jedną z rycin tej publikacji – mikrofotografia przedstawiająca ekspresję VDR w skórze, została umieszczona na okładce czasopisma *Human Pathology*.

PUBLIKACJA 2: Decreased VDR Expression in Cutaneous Melanomas as Marker of Tumor Progression: New Data and Analyses. *Anticancer Research* 2014, 34:2735-2744

Do badań prezentowanych w *Publikacji 1* zakwalifikowano pacjentów leczonych w latach 2003-2009. Natomiast w 2010 roku została opublikowana nowa klasyfikacja oceny zaawansowania czerniaka TNM AJCC/UICC (T - ang. *tumor*, N - ang. *nodes*, M - ang. *metastases*; AJCC – ang. *American Joint Committee on Cancer*; UICC – fr. *Union internationale contre le cancer*)²². Zatem w czerniakach, w których wykonano immunohistochemiczną detekcję VDR, dokonaliśmy ponownej oceny i klasyfikacji patomorfologicznej, wg nowej klasyfikacji. Przeprowadziliśmy także analizę zależności pomiędzy poziomem VDR a obecnością limfocytów naciekających nowotwór (TILs – ang. *tumor infiltrating lymphocytes*) oraz brakiem owrzodzenia, czyli pozytywnych prognostycznych markerów czerniaka. Zarówno cytoplazmatyczny, jak i jądrowy VDR korelował z badanymi cechami patomorfologicznymi. Podobnie jak w *Publikacji 1*, zaobserwowaliśmy **redukcję VDR wraz ze wzrostem zaawansowania ocenianego jako wielkość czerniaka pierwotnego (pT), wraz z rozwojem przerzutów do węzłów chłonnych (pN1-3) oraz przerzutów do narządów odległych (pM1)**. A najniższe poziomy VDR obserwowano w czerniakach pT3 - pT4, pN3 i pM1. A w konsekwencji, znaczny **spadek poziomu VDR obserwowano w II-IV stopniu zaawansowania choroby**, ocenionego na podstawie mikrostopniowania ogniska pierwotnego i oceny patologicznej węzłów chłonnych oraz przerzutów odległych. Należy także zaznaczyć, że 11% czerniaków o wysokim stopniu zaawansowania (pT3-pT4) cechowało się wysokim poziomem ekspresji VDR, natomiast w grupie czerniaków o niskim stopniu

²² Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, et al. Melanoma of the skin. AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer-Verlag; 2010.

zaawansowania (pT1 – pT2) taką ekspresję wykazywało 28% zmian. Wysokiego poziomu VDR nie obserwowano w żadnym przypadku czerniaka o zaawansowaniu pN1 – pN3 oraz pM1. **Niskiemu poziomowi VDR towarzyszył brak lub średnioobfity naciek TILs oraz obecność owrzodzenia. Ponadto, obecność VDR i brak owrzodzenia był związany ze znacznie dłuższym czasem całkowitego przeżycia.** A w grupie czerniaków bez owrzodzenia, wysoki poziom VDR determinował znacząco lepsze rokowanie (ocenione czasem całkowitego przeżycia). Powyższe wyniki sugerują, że obniżenie poziomu lub całkowity brak VDR jest istotnym zaburzeniem w czerniakach, związanym z nabywaniem przez komórki bardziej złośliwego fenotypu i ułatwianiem, bądź umożliwianiem progresji choroby. Natomiast wysoka ekspresja VDR związana z lepszą prognozą przeżycia, wskazuje, że **ocena poziomu VDR może okazać się przydatnym, nowym markerem prognostycznym w rutynowej diagnostyce czerniaka.**

PUBLIKACJA 3: High basal NF- κ B activity in nonpigmented melanoma cells is associated with an enhanced sensitivity to vitamin D3 derivatives. *British Journal of Cancer* 2011, 105(12):1874-84

Wyniki badań przedstawionych w *Publikacji 1* i *2* wskazywały, że w badanej populacji w prawie 85% przypadkach komórki czerniaka skóry wykazywały ekspresję VDR (choć była to ekspresja heterogenna), jednak synteza melaniny znacząco obniżała syntezę tego receptora. Te wyniki wskazywały, że komórki czerniaka mogą być wrażliwe na przeciwnowotworowe działanie witaminy D i jej pochodnych. Jednocześnie sugerowały, że obecność melaniny może zmniejszać tę wrażliwość. Dlatego w kolejnej pracy podjęliśmy próbę odpowiedzi na pytanie, czy pigmentacja wpływa na antyproliferacyjne działanie kalcytriolu i jego pochodnych w komórkach czerniaka oraz czy wpływa na ekspresję i aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (składającego się z podjednostki p50 i p65), ulegającego konstytutywnej aktywacji w komórkach czerniaka i promującego rozwój i progresję choroby nowotworowej. Badania molekularne prowadzone na liniach czerniaka wykazały, że w komórkach produkujących melaninę ekspresja receptora VDR jest znacznie zredukowana w porównaniu z komórkami amelanotycznymi, co potwierdziło wyniki prezentowane w *Publikacji 1*.

W amelanotycznych komórkach czerniaka translokacja podjednostki p65 NF-κB do jądra komórkowego była silniej wyrażona niż w komórkach zawierających melaninę, co obserwowano zarówno w badaniach na liniach komórkowych, jak i w klinicznych próbkach czerniaka skóry człowieka. Translokacja p65 NF-κB do jądra komórkowego była związana z większą aktywnością proliferacyjną. W amelanotycznych komórkach obserwowano również zwiększoną zdolność wiązania DNA przez NF-κB. Wykazano także, że **w amelanotycznych komórkach czerniaka kalcytriol i 20(OH)D₃ hamowały transkrypcyjną aktywność NF-κB. Jednocześnie w tych samych komórkach, 1,25(OH)₂D₃ i 20(OH)D₃ silnie i w sposób zależny od dawki hamowały proliferację**. Natomiast w komórkach czerniaka zawierających melaninę nie stwierdzono hamującego efektu na transkrypcyjną aktywność NF-κB, a inhibicja proliferacji była obserwowana tylko przy wysokich dawkach kalcytriolu. Te badania pokazały, że witamina D₃ i jej pochodne regulują aktywność transkrypcyjną NF-κB w amelanotycznych komórkach czerniakach i mogą hamować proliferację komórek amelanotycznego czerniaka. Natomiast **obecność melaniny jest związana z opornością czerniaka na antynowotworowe działanie 1,25(OH)₂D₃ i 20(OH)D₃**.

PUBLIKACJA 4: Expression of vitamin D activating enzyme 1-alpha-hydroxylase (CYP27B1) decreases during melanoma progression. *Human Pathology* 2013, 44:374-387

Badania opublikowane w *Publikacji 1* oraz *Publikacji 2* wykazujące **wyraźne oraz statystycznie znamienne zależności między ekspresją VDR a agresywnym fenotypem i zaawansowaniem czerniaków skóry**, sugerowały, że zaburzenia ścieżek sygnałowych regulowanych przez VDR, a zatem też przez witaminę D, są ważnym czynnikiem zaangażowanym w patogenezę i progresję zmian melanocytarnych skóry oraz determinującym zachowanie komórek czerniaka. CYP27B1, będąc enzymem biorącym udział w aktywacji witaminy D, w istotny sposób może oddziaływać na ścieżki sygnałowe regulowane przez VDR. Zatem kolejnym celem badań było określenie ekspresji CYP27B1 w nowotworach melanocytarnych skóry oraz analiza zależności poziomu CYP27B1 i cech patomorfologiczno-klinicznych. Praca ta, **po raz pierwszy przedstawiła wzorzec ekspresji CYP27B1 *in situ* w populacji pacjentów ze znamionami melanocytarnymi, czerniakiem skóry i przerzutami czerniaków**.

Immunolokalizację CYP27B1 stwierdzono we wszystkich próbkach prawidłowej skóry (100%), 26 z 29 znamion melanocytarnych (89,7%), 61 z 75 czerniaków pierwotnych (81,3%) oraz 19 z 44 przerzutów i wznów (43,2%). **CYP27B1 był nieznacznie podwyższony w znamionach w porównaniu z prawidłową skórą, a w czerniakach (niezależnie od typu histologicznego) ekspresja ulegała redukcji i najniższy poziom CYP27B1 był stwierdzony w przerzutach czerniaka.** Obecność owrzodzenia, pionowa faza wzrostu - VGP (ang. *vertical growth phase*), markery niekorzystnego rokowania w czerniaku, obserwowaliśmy znacznie częściej w czerniakach bez CYP27B1 lub z jego niskim poziomem, a obecność TILs i niski potencjał proliferacyjny, oceniany odsetkiem komórek czerniaka wykazujących ekspresję Ki-67 (markery pozytywnego rokowania), stwierdzaliśmy znacznie częściej w czerniakach z wysokim poziomem CYP27B1. **W czerniakach pierwotnych wraz z progresją choroby poziom CYP27B1 ulegał znacznemu spadkowi i najniższy był obserwowany w czerniakach o najwyższym stopniu zaawansowania i czerniakach, które rozwinęły przerzuty** (Clark III-V, Breslow > 2.0 mm, pT3 - pT4 według AJCC pTNM, w III-IV stopniu zaawansowania choroby oraz pN1-3). Ponadto, analiza porównawcza par czerniak pierwotny-przerzut od tego samego pacjenta wykazała, że w 28 z 38 przypadków (74,0%) poziom CYP27B1 w czerniakach pierwotnych był istotnie wyższy niż w przerzutach, w 6 przypadkach przerzuty czerniaków wykazywały wyższy poziom CYP27B1, a w 4 przypadkach immunoznakowanie było podobne. Redukcję ekspresji CYP27B1 potwierdziliśmy *in vitro* w 8 z 11 zbadanych linii komórek czerniaka. Badania nad zależnością poziomu CYP27B1 i pigmentacją komórek czerniaka również wykazały, że **ekspresja CYP27B1, podobnie jak VDR, jest istotnie zredukowana w komórkach czerniaka o wysokiej pigmentacji.** Wyniki te potwierdziliśmy w badaniach na komórkach czerniaka linii SkMel-188, w których, we frakcji cytoplazmatycznej komórek z melaniną, nie obserwowaliśmy CYP27B1, obecnego w komórkach bez melaniny. Ponieważ dotychczasowa analiza wskazywała, iż **redukcja CYP27B1 następuje wraz z zaawansowaniem czerniaków i w zmianach przerzutowych immunoznakownie było najniższe a obecność markerów korzystnego rokowania była związana z wyższą ekspresją CYP27B1**, w kolejnym etapie analizowaliśmy zależności pomiędzy CYP27B1 a czasem wolnym od choroby i czasem całkowitego przeżycia. Podobnie jak w

przypadku VDR, **po raz pierwszy także wykazaliśmy, że obniżenie poziomu CYP27B1 w czerniakach pierwotnych jest istotnie skorelowane zarówno ze skróceniem czasu całkowitego przeżycia i czasu wolnego od choroby pacjentów z czerniakiem skóry.**

PUBLIKACJA 5: CYP24A1 Expression Inversely Correlates with Melanoma Progression:

Clinic-Pathological Studies. International Journal of Molecular Sciences 2014, 15:19000-19017

Kolejnym etapem badań było scharakteryzowanie ekspresji CYP24A1 w łagodnych i złośliwych (pierwotnych oraz przerzutowych) melanocytarnych nowotworach skóry. Praca ta **po raz pierwszy pokazała szczegółowo ekspresję CYP24A1, wykrywaną *in situ* immunohistochemicznie, w populacji pacjentów ze znamionami melanocytarnymi, czerniakiem skóry i przerzutami czerniaków.** Obecność CYP24A1 obserwowaliśmy w 14,3% próbek skóry prawidłowej, 80,0% znamion, 61,4% czerniaków i 54,2% przerzutów czerniaków. Wysoki poziom immunoznakowania CYP24A1 cechował głównie znamiona (40,0%), natomiast taki poziom CYP24A1 wykazywało tylko 24,2% czerniaków pierwotnych i 8,3% przerzutów. **Średni poziom CYP24A1 był najwyższy w znamionach, a w czerniakach i przerzutach ulegał istotnej redukcji.** W czerniakach niezaawansowanych poziom CYP24A1 był porównywalny z poziomem obserwowanym w znamionach. A **progresja czerniaka, zwłaszcza oceniana według Breslow'a (>2,0 mm), pT (pT3 i pT4) oraz ogólnego zaawansowania choroby (III i IV stopień), była związana z silną redukcją poziomu tego enzymu, podobnie jak pojawienie się przerzutów regionalnych (pN1-3) i odległych (pM1).** Uzyskane w badaniach klinicznego materiału tkankowego pacjentów wyniki zostały potwierdzone w eksperymentach *in vitro* na kilku ludzkich liniach komórkowych, w których najwyższą ekspresję CYP24A1 stwierdziliśmy w noworodkowych melanocytach. W 12 z 13 linii czerniaka ekspresja była niższa, ale porównywalna z ekspresją CYP24A1 w prawidłowych keratynocytach. Podobnie jak w przypadku VDR, CYP24A1 był skorelowany z agresywnym fenotypem czerniaka. **Wysoki indeks mitotyczny (oceniony zarówno jako ilość mitoz/HPF, jak i odsetek komórek wykazujących znakowanie Ki-67), guzowaty typ histologiczny, obecność**

owrzdzenia i obecność martwicy były obserwowane w czerniakach, w których nie stwierdzono CYP24A1 lub jego niski poziom. CYP24A1 był też dodatnio skorelowany z cytoplazmatycznym i jądrowym poziomem VDR oraz CYP27B1. Jednak przeciwnie niż VDR i CYP27B1, wyższy poziom CYP24A1 zaobserwowaliśmy w czerniakach oraz linii SkMel-188 o wysokim stopniu pigmentacji. Ponieważ stwierdziliśmy odwrotną zależność CYP24A1 i zaawansowania czerniaka oraz obecnością markerów niekorzystnego rokowania, wykonaliśmy analizę całkowitego czasu przeżycia i przeżycia wolnego od choroby. Podobnie jak w przypadku VDR i CYP27B1, **brak lub niski poziom CYP24A1 w czerniakach pierwotnych był związany zarówno ze znacznie krótszym czasem całkowitego przeżycia i przeżycia wolnego od choroby.** Było to szczególnie zaznaczone w czerniakach o niskim stopniu zaawansowania (pTis i pT1). Uzyskane wyniki nie były zgodne z założeniami teoretycznymi, według których CYP24A1 powinien stymulować degradację $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, osłabiając jej przeciwnowotworowe działanie i umożliwiając wzrost nowotworu²³. Jednak te obserwacje mogą być wyjaśnione ostatnimi doniesieniami, wykazującymi, że CYP24A1, obok inaktywacji kalcytriolu, hydroksyluje także $20(\text{OH})\text{D}_3$ do dwóch pochodnych $20,24$ -dihydroksyywitaminy D_3 ($20,24(\text{OH})_2\text{D}_3$) i $20,25$ -dihydroksyywitaminy D_3 ($20,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), które charakteryzują się znacznie silniejszym antyproliferacyjnym działaniem na komórki czerniaka niż $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Zatem, **wyższa ekspresja CYP24A1 w znamionach i czerniakach o niskim stopniu zaawansowania mogłaby wykazywać działanie przeciwnowotworowe i zapobiegać progresji nowotworu.**

PUBLIKACJA 6: [ROR \$\alpha\$ and ROR \$\gamma\$ expression inversely correlates with human melanoma, *Oncotarget* 2016, 7\(39\):63261-63282.](#)

Obok powyższych badań, stanowiących podstawowy nurt moich zainteresowań naukowych, byłam także zaangażowana w badania dotyczące innych receptorów jądrowych, receptorów sierocych alfa i gamma związanych z receptorem kwasu

²³ Fleet JC, DeSmet M, Johnson R, Li Y. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem J* 2012;441: 61–76

retinowego ($ROR\alpha$ i $ROR\gamma$)²⁴. Badania te pokazały, że kalcitriol i jego pochodne $20(OH)D_3$ i $20,23(OH)_2D_3$, funkcjonujące jako ligandy dla VDR, są także antagonistami lub odwrotnymi agonistami dla receptorów $ROR\alpha$ i $ROR\gamma$. Receptory te regulują wiele biologicznych procesów, ważnych także dla prawidłowej ontogenezy i rozwoju nowotworu. Dlatego kolejny etap moich badań pozwolił na **pierwszą, kompleksową charakterystykę ekspresji *in situ* $ROR\alpha$ i $ROR\gamma$ w znamionach melanocytarnych, czerniakach pierwotnych skóry i przerzutach czerniaka**. Podobnie jak VDR, $ROR\alpha$ i $ROR\gamma$ wykazywały zarówno jądrową jak i cytoplazmatyczną lokalizację i ich poziom spadał wraz z progresją nowotworów melanocytarnych, czyli najwyższy poziom był stwierdzony w znamionach, w czerniakach pierwotnych ulegał znacznej redukcji i najniższy poziom był obserwowany w przerzutach czerniaków. **W grupie czerniaków pierwotnych najniższy poziom $ROR\alpha$ i $ROR\gamma$ był obserwowany w czerniakach cechujących się najwyższym stopniem zaawansowania (Clark III-V, Breslow > 2,0 mm, pT3-pT4, III-IV stadium zaawansowania choroby). Progresji czerniaka, związanej ze zdolnością do przerzutowania (pN1-3) i obecnością markerów niekorzystnego rokowania (owrzodzenia, braku lub nieobfitego nacieku limfocytów TILs, guzowego typu histologicznego i wysokiej aktywności proliferacyjnej) także towarzyszyła redukcja poziomu $ROR\alpha$ i $ROR\gamma$. A w konsekwencji, brak lub redukcja poziomu $ROR\alpha$ i $ROR\gamma$ była związana z istotnie krótszym czasem całkowitego przeżycia i przeżycia wolnego od progresji choroby**. Ponadto, zarówno w materiale klinicznym, jak i w hodowlach komórek czerniaków obserwowaliśmy redukcję poziomu $ROR\alpha$ i $ROR\gamma$ także w czerniakach o wysokim stopniu pigmentacji, podobnie jak VDR i CYP27B1. Zatem **rozwój czerniaka i agresywny fenotyp czerniaka wydają się być związane z obniżoną ekspresją $ROR\alpha$ i $ROR\gamma$, sugerując, że receptory ROR mogą być ważne w progresji czerniaka i odpowiedzi antynowotworowej organizmu**. Nie jest także wykluczone, że $ROR\alpha$ i $ROR\gamma$ mogą stanowić cel w nowych terapiach czerniaka opartych na terapii genowej, przywracającej ich normalne funkcje.

²⁴ Slominski AT, Kim TK, Takeda Y, et al. $ROR\alpha$ and $ROR\gamma$ are expressed in human skin and serve as receptors for endogenously produced noncalcemic 20-hydroxy- and 20,23-dihydroxyvitamin D. *FASEB J* 2014;28(7):2775-2789

4.3.4. PODSUMOWANIE

Na tle aktualnego stanu wiedzy podjęte przeze mnie badania są nowe, oryginalne i ważne w zakresie poznania biologii czerniaka i poszukiwania potencjalnych markerów prognostycznych oraz potencjalnych celów terapeutycznych. Prace te były pierwszymi doniesieniami opisującymi endokrynną system witaminy D w materiale klinicznym. Za **elementy nowości naukowej oraz najważniejsze osiągnięcia o charakterze poznawczym i praktycznym** zawarte w jednotematycznym cyklu publikacji naukowych pt.: „Endokrynną system witaminy D a czerniak: rola jądrowych receptorów witaminy D oraz hydroksylaz CYP27B1 i CYP24A1 w patogenezie i progresji czerniaka skóry” można uznać:

1. szczegółowe scharakteryzowanie *in situ* ekspresji receptorów jądrowych, dla których ligandem jest witamina D i jej pochodne: VDR, ROR α oraz ROR γ i enzymów odpowiedzialnych za metabolizm witaminy D: CYP27B1, CYP24A1 w reprezentatywnej grupie znamionach melanocytarnych, czerniaków i przerzutów czerniaków (*Publikacja 1, Publikacja 2, Publikacja 4, Publikacja 5, Publikacja 6*)
2. wykazanie zależności pomiędzy ekspresją VDR, CYP27B1 i CYP24A1 a zaawansowaniem czerniaka, określanym według skali Clark’a, Breslow’a, AJCC pTNM i stadium zaawansowania ogólnej choroby, oraz obecnością patomorfologicznych markerów prognostycznych czerniaka; zatem VDR, CYP27B1 oraz CYP24A1 mogą stanowić potencjalne **nowe markery diagnostyczne** w rutynowej diagnostyce patomorfologicznej zmian melanocytarnych (*Publikacja 1, Publikacja 2, Publikacja 4, Publikacja 5*)
3. wykazanie podobnych zależności dla receptorów ROR α oraz ROR γ , dla których ostatnio zidentyfikowanymi ligandami są kalcytriol i jego pochodne; ROR α oraz ROR γ także mogą stanowić potencjalne **nowe markery diagnostyczne** w rutynowej diagnostyce patomorfologicznej zmian melanocytarnych (*Publikacja 6*)
4. określenie **znaczenia prognostycznego** oznaczenia poziomu VDR, CYP27B1 i CYP24A1 poprzez wykazanie dodatniej korelacji pomiędzy bardziej agresywnym fenotypem i progresją zmian melanocytarnych a redukcją poziomu badanych markerów oraz poprzez wykazanie zależności braku receptora VDR, badanych hydroksylaz i krótszym całkowitym czasem przeżycia i czasem wolnym od

- progresji; VDR, CYP27B1 i CYP24A1 mogą stanowić **nowe markery prognostyczne** czerniaka (*Publikacja 1, Publikacja 2, Publikacja 4, Publikacja 5*)
5. określenie **znaczenia prognostycznego** oznaczania ROR α oraz ROR γ (redukcja ekspresji tych receptorów towarzyszy bardziej agresywnemu fenotypowi i krótszemu czasowi przeżycia); receptory te także mogą stanowić **nowe markery prognostyczne** czerniaka (*Publikacja 6*)
- 6a. wykazanie ujemnej zależności między ekspresją VDR i CYP27B1 oraz **syntezą melaniny** przez komórki czerniaka (*Publikacja 1, Publikacja 3, Publikacja 4*) oraz
- 6b. wykazanie roli kalcytriolu i jego pochodnych w regulowaniu progresji/wzrostu czerniaka w **amelanotycznych komórkach czerniaka**; wyniki te popierają naszą koncepcję hamowania melanogenezy jako nowej, uzupełniającej strategii terapeutycznej czerniaka, zwłaszcza w połączeniu z nowoopracowywanymi terapiami opartymi na witaminie D i jej pochodnych (*Publikacja 3*)
7. wykazanie istotnej roli wysokiego poziomu **NF- κ B** we wrażliwości **nieupigmentowanych** komórek czerniaka na antynowotworowe działanie kalcytriolu i jego pochodnych (*Publikacja 3*)
8. wykazanie, że zaburzenia lokalnego metabolizmu witaminy D (zmiany poziomu enzymów metabolizujących witaminę D: CYP27B1 i CYP24A1) (*Publikacja 4, Publikacja 5*) oraz ekspresji receptorów dla witaminy D (VDR, ROR α i ROR γ) mogą wpływać na biologię czerniaka (*Publikacja 1, Publikacja 2, Publikacja 6*)
9. wskazanie na nową, potencjalną rolę CYP24A1 w powstawaniu znamion melanocytarnych i czerniaków oraz ich progresji, poprzez wykazanie podwyższonego poziomu CYP24A1 w znamionach i wczesnych stadiach rozwoju czerniaka (*Publikacja 5*).

Podsumowując, zaburzenia lokalnego endokrynnego systemu witaminy D w czerniakach wpływają na zachowanie komórek czerniaka w sposób złożony. Progresja zmian melanocytarnych, gorsze rokowanie i krótszy czas przeżycia związane są z brakiem lub redukcją badanych jądrowych receptorów i enzymów. A zatem badane

receptory i enzymy mogą okazać się przydatne jako nowe histologiczne markery czerniaka (prognostyczne i diagnostyczne).

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO - BADAWCZYCH (ARTYSTYCZNYCH)

5.1. PODSUMOWANIE WSPÓŁCZYNNIKA WPŁYWU IF, PUNKTACJI MNiSW PUBLIKACJI NIE ZGŁOSZONYCH DO POSTĘPOWANIA HABILITACYJNEGO

Po wyłączeniu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, współczynnik wpływu dla pozostałych publikacji wynosi IF = **60,109**, w tym IF = **20,716** przypada na publikacje, w których jestem pierwszym autorem i IF = **18,855**, w których jestem drugim autorem.

Suma punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla tych publikacji wynosi **615** pkt. MNiSW, w tym **210** pkt. MNiSW przypada na publikacje, w których jestem pierwszym autorem i **241** pkt. MNiSW, w których jestem drugim autorem.

Liczba cytowań dla wyżej wymienionych publikacji wynosi **238**.

Podsumowując dorobek publikacyjny poza publikacjami składającymi się na osiągnięcie naukowe, jestem autorem lub współautorem:

a/ **20** oryginalnych publikacji naukowych w czasopismach z bazy Journal Citation Reports

b/ **1** opisu przypadku opublikowanego w czasopiśmie z bazy Journal Citation Reports

c/ **3** prac poglądowych w czasopiśmie „bez impact factor”

d/ **12** rozdziałów w opracowaniach monograficznych, w tym **11** w opracowaniach międzynarodowych i **1** w krajowym

e/ **1** referatu zjazdowego

f/ **67** streszczeń zjazdowych, w tym **23** ze zjazdów międzynarodowych i **44** ze zjazdów krajowych.

Szczegółowa lista publikacji i analiza bibliometryczna przygotowana przez Bibliotekę Medyczną Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy przedstawiona jest w odrębnym dokumencie (Załącznik nr 7 oraz Załącznik nr 8).

5.2. OSIĄGNIĘCIA W PRACY BADAWCZEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Będąc studentem 5 roku biologii na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu zostały mi powierzone obowiązki studenta-stażysty, a moja aktywność naukowa była skoncentrowana na możliwościach detekcji nowotworów *in situ* przy zastosowaniu autofluorescencji (AFL) indukowanej promieniowaniem z zakresu ultrafioletu (UV). Brałam udział w badaniach dotyczących różnic w widmach AFL o szerokim spektrum oraz w analizie obrazów AFL rejestrowanych w wąskim zakresie widmowym z prawidłowych i nowotworowych obszarów skóry, jelita grubego i żołądka. Badania te, prowadzone w ścisłej współpracy z personelem Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego w Toruniu oraz Szpitala Miejskiego w Toruniu, obejmowały zarówno pomiary w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* (w trakcie badań endoskopowych) i dotyczyły możliwości diagnostycznego różnicowania tkanek prawidłowych oraz nowotworowych. Ponieważ zarówno powyższe badania, jak i doniesienia literaturowe, które były publikowane w ówczesnym czasie, używały promieniowania UV w badaniu narządów wewnętrznych pojawiło się pytanie, czy jest ono bezpieczne dla komórek tych narządów. Dlatego celem pracy doktorskiej było określenie podatności komórek narządów wewnętrznych i skóry na działanie ciągłego promieniowania ultrafioletowego A w dawkach poniżej 1 minimalnej dawki rumieniowej, uważanych za dawki bezpieczne. Badania te, jeszcze przed uzyskaniem stopnia doktora, zostały rozszerzone o ciągłe i impulsowe promieniowanie UVB. Uzyskane wyniki były prezentowane w formie 11 posterów lub ustnych wystąpień na międzynarodowych i krajowych konferencjach oraz zostały opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (*Photochem Photobiol.* 2005; 81(3):674-81; *J Toxicol Environ Health A.* 2006;69(12):1155-65; *J Toxicol Environ Health A.* 2009;72:789-795). Poszerzając moje

doświadczenie naukowe i zdobywając dodatkowe umiejętności w 2002r. odbyłam 2-miesięczny staż w Department of Radiation Biology, Institute of Aerospace Medicine, German Aerospace Centre (DLR) w Kolonii w Niemczech. Za prowadzone badania otrzymałam, wraz innymi pracownikami Zakładu Biologii Medycznej Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMK w Toruniu, nagrodę zespołową II stopnia Rektora UMK w Toruniu za osiągnięcia naukowo-badawcze w roku 2005.

5.3. OSIĄGNIĘCIA W PRACY BADAWCZEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Poza głównym tematem badań związanych z endokrynnym systemem witaminy D w nowotworach melanocytarnych skóry, zwłaszcza w czerniakach i ich przerzutach, od kilku lat, głównie w ramach współpracy międzynarodowej, jestem zaangażowana w realizację innych projektów badawczych, dotyczących różnych aspektów biologii nowotworów.

A) ROLA MELANIZACJI KOMÓREK W REGULACJI BIOLOGII CZERNIAKA

Główny kierunek badań prowadzonych w ramach stażu podoktorskiego, który odbywałam w University of Tennessee Health Science Center w Memphis w Tennessee, USA, pod kierunkiem prof. **Andrzeja Słominskiego**, dotyczył uwrażliwiania komórek czerniaka na promieniowanie jonizujące. Obrana strategia badawcza obejmowała zmniejszenie protekcyjnego działania melaniny (barwnika produkowanego przez prawidłowe i nowotworowe melanocyty, w tym przez komórki czerniaka), poprzez hamowanie procesu melanogenezy, co w konsekwencji zwiększało podatność komórek czerniaka na antynowotworowe działanie promieniowania gamma (*Int J Cancer* 2008;123:1448-56). Uzyskane wyniki były bardzo obiecujące, dlatego postanowiłam kontynuować badania nad rolą melanizacji w regulacji biologii czerniaka po ukończeniu stażu podoktorskiego. Realizując te zadania, nawiązałam współpracę z prof. **Andrew J. Carlsonem** z Albany Medical Center, Department of Pathology, Albany Medical College, Albany, NY, USA. Mając dostęp do danych klinicznych pacjentów z czerniakiem oraz do materiału pooperacyjnego i standardowych preparatów patomorfologicznych, postanowiłam sprawdzić wpływ melanizacji czerniaków na czas całkowitego przeżycia i czas wolny od progresji (*Human Pathol* 2013;44:2071–2074) oraz na wyniki leczenia z

użyciem radioterapii (*Oncotarget* 2016;7(14):17844-17853). Jednocześnie, kolejne badania potwierdziły wpływ melanizacji na generowanie warunków hipoksji i stymulacji ekspresji czynnika indukowanego hipoksją-1 (HIF-1 α , ang. *hypoxia inducible factor-1 α*) oraz ścieżek sygnałowych regulowanych przez ten czynnik transkrypcyjny (*Arch Biochem Biophys* 2014;563:79-93). Na zgłębianie tematu związanego z rolą melanizacji komórek czerniaka w kształtowaniu agresywnego fenotypu i mikrośrodowiska promującego rozwój czerniaka otrzymałam grant, w którym jestem kierownikiem i głównym wykonawcą, finansowany przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Opus 8 (panel NZ4).

B) ENDOKRYNNY SYSTEM WITAMINY D W INNYCH NOWOTWORACH CZŁOWIEKA

We współpracy z prof. **Andrzejem Slominskim** z University of Birmingham w Alabamie, USA, prof. **Antonem Jettenem** z Cell Biology Section, Immunity, Inflammation and Disease Laboratory, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC, USA, **prof. Robertem C. Tuckeyem** ze School of Chemistry and Biochemistry, University of Western Australia w Crawley w Australii oraz prof. **Krystyną Urbańską** z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie prowadzę badania nad endokrynnym systemem witaminy D, obejmujące analizę wpływu kalcytriolu i jego pochodnych na komórki tych nowotworów oraz analizę ekspresji receptora VDR oraz enzymów CYP27B1 i CYP24A1 w innych niż czerniak skóry nowotworach takich jak: rak jajnika, rak pęcherza moczowego oraz czerniak gałki ocznej. Wyniki tych badań wskazują, że zaburzenia ekspresji receptora VDR oraz enzymów zaangażowanych w aktywację witaminy D są związane z bardziej agresywnym fenotypem nowotworu i krótszym czasem przeżycia (*FASEB J* 2014;28:2775-2789; *Oncol Rep* 2015;33(2):599-606; *Int J Mol Sci* 2015;16(10):24369-86; *Melanoma Management*, 2(1): 1-4). Podejmowana tematyka badawcza jest bardzo aktualna. W ostatnich latach organizowane są konferencje przybliżające szerszemu gronu zagadnienia związane z pleiotropowym działaniem witaminy D. A w 2015 i 2016 roku zostałam zaproszona do wygłoszenia 3 wykładów na międzynarodowej i krajowej konferencji (informacje o konferencjach i tematy wykładów podane są w Załączniku nr 4). Ponadto,

započetkowane w publikacji *FASEB J* 2014;28(7):2775-2789²⁵ oraz w *Publikacji 6*, składającej się na osiągnięcie naukowe, badania nad ekspresją ROR α i ROR γ oraz pokazujące zróżnicowany, zależny od zaawansowania i złośliwości poziom tych receptorów, wskazały na dalszy kierunek prowadzonych przeze mnie badań.

C) IMMUNOLOGIA NOWOTWORÓW

Moje zainteresowania naukowe dotyczą także immunologii nowotworów. Od kilku lat jestem zaangażowana w projekty naukowe, których celem jest scharakteryzowanie zaburzeń funkcji układu immunologicznego u pacjentów z chorobą nowotworową, zarówno na poziomie ogólnoustrojowym (analiza poziomu limfocytów Treg we krwi obwodowej) oraz na poziomie mikrośrodowiska guza (analiza zaburzeń limfocytów TILs, analiza ekspresji RCAS1 - białka odpowiedzialnego za ucieczkę guza spod nadzoru immunologicznego organizmu) (*Int J Mol Sci* 2016, 17(3), 285; *Int J Mol Sci* 16(2): 3783-3803; *Oncotarget* 2016;7(10):11450-11462; *Am J Reprod Immunol* 2011;66: 444-450 (2011); *Cell Tissue Res* 2011; 345(3):405-14). Sprawując funkcję opiekuna naukowego Małgorzaty Kowalczewskiej, doktorantki na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UMK w Toruniu, brałam udział w badaniach nad związkiem alergii i ryzyka powstawania raka piersi (analiza stężenia cytokin we krwi obwodowej i ekspresji cytokin przez limfocyty krwi obwodowej, analiza badań ankietowych) (*Contemp Oncol (Pozn)* 2014;18(6):396–402).

D) MARKERY PROGNOSTYCZNE W NOWOTWORACH UKŁADU MOCZOWO-PLCIOWEGO

W badaniach, w które jestem zaangażowana, poszukujemy także nowych markerów prognostycznych nowotworów takich jak rak pęcherza moczowego i rak jajnika. Badania skupiają się m. in. na identyfikacji nowych morfologicznych wykładników złośliwości (np.: liczba nieklasycznych histologicznych utkań, NDN, ang. *non-classic differentiation number*, czy obecność zw. modelingu – dynamicznego dialogu między komórkami nowotworu a komórkami podścieliska). Badamy także użyteczność innych markerów (np.: markera komórek macierzystych Oct4), jako potencjalnych

²⁵ Slominski AT, Kim TK, Takeda Y, et al. ROR α and ROR γ are expressed in human skin and serve as receptors for endogenously produced noncalcemic 20-hydroxy- and 20,23-dihydroxyvitamin D. *FASEB J* 2014;28(7):2775-2789

markerów prognostycznych (*Oncol Rep* 2015;33(2):599-606; *Int J Mol Sci* 2014;15(9),16069-16082; *Arch Med Sci* 2011;7(5):918-922; *Cent European J Urol* 2010;63(3),112-116).

Brożyna