

AUTOREFERAT

w postępowaniu o nadanie stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu,
w dyscyplinie nauki medyczne



Dr n. med. Aneta Ścieżyńska
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa 2023

1. ŻYCIORYS I PODSUMOWANIE PRACY ZAWODOWEJ

1.1. Dane osobowe:

Imię i nazwisko: Aneta Ścieżyńska (z d. Federowicz)

1.2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

27.04.2017	Stopień doktora nauk medycznych w dziedzinie nauk medycznych, w dyscyplinie biologia medyczna, uzyskany z wyróżnieniem, nadany przez Radę Naukową Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Tytuł rozprawy: Zastosowanie sekwencjonowania następnej generacji w celu identyfikacji i charakterystyki profilu mutacji genu <i>ABCA4</i> u pacjentów z dziedzicznymi chorobami siatkówki. Obrona z wyróżnieniem. Promotor: Dr hab. n. med. Monika Ołdak Recenzenci: Prof. dr hab. Marzena Gajęcka, Dr hab. Jakub Kałużny
25.11.2015	Tytuł Diagnosty Laboratoryjnego – wpis do Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych.
15.06.2011	Tytuł magistra (specjalizacja Biotechnologia) na Międzywydziałowym Studium Biotechnologii - Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (średnia studiów: 4,62; ocena na dyplomie: 5,00). Tytuł pracy: Opracowanie metod identyfikacji mutacji w genach <i>TGFBI</i> , <i>UBIADI</i> , <i>ZEB1</i> i <i>COL8A2</i> u pacjentów z dystrofiami rogówki.
16.02.2010	Tytuł inżyniera (specjalizacja Biotechnologia) Międzywydziałowym Studium Biotechnologii - Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (średnia studiów: 4,5; ocena na dyplomie: 5,00). Tytuł pracy: Badanie genetycznego uwarunkowania zaniku nerwu wzrokowego za pomocą analizy sprzężeń z wykorzystaniem mikrosatelitarnego DNA.

1.3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

01.10.2017– obecnie	Adiunkt , pracownik dydaktyczno–naukowy w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii WUM – Laboratorium Zaawansowanych Biotechnologii Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii (CEPT) Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
------------------------	---

25.02.2014– 30.09.2017	Asystent , pracownik dydaktyczno–naukowy w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
01.09.2022– 31.07.2023	Diagnosta laboratoryjny w Zakładzie Biologii Medycznej, Narodowy Instytut Kardiologii im. Stefana kardynała Wyszyńskiego – Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie
01.10.2021– 30.06.2022	Adiunkt dydaktyczny w Collegium Medicum, Uniwersytetu Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie
31.08.2017– 30.06.2022	Główny Specjalista ds. inżynieryjno - technicznych w Zakładzie Medycyny Regeneracyjnej, Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Warszawie
27.10.2011– 2015	Doktorant Studium Medycyny Molekularnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

2. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT 2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 r. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2021 r. POZ. 478 Z PÓŹN. ZM.)

2.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Podstawą niniejszego wniosku zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” jest osiągnięcie naukowo-badawcze w zakresie opracowania i wykorzystania modelu badawczego w analizie funkcjonalnych konsekwencji mutacji genu *ABCA4* (ang. *ATP-binding cassette transporter*) oparte na 5 opublikowanych, powiązanych tematycznie pracach naukowych. Tytuł osiągnięcia to **„Zastosowanie komórek skóry jako modelu do badań molekularnego podłoża chorób siatkówki wywoływanych mutacjami genu *ABCA4*”**.

Analiza bibliometryczna prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego przeprowadzona na dzień 15 września 2023 roku wykazała, że sumaryczny impact factor (IF) wynosi **21,767**, zaś liczba punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) wg nowej listy – **560 punktów**. Inspiracją do przeprowadzenia ukierunkowanych badań w obszarze osiągnięcia naukowego były wyniki pracy badawczo-naukowej opublikowane w czasopiśmie *Experimental Eye Research* w 2016 r.: Ścieżyńska A. i wsp. „*Next-generation sequencing of ABCA4: High frequency of complex alleles and novel mutations in patients with retinal dystrophies from Central Europe*”, stanowiącej podsumowanie rozprawy doktorskiej. Wszystkie omawiane we wniosku wyniki prac naukowo-badawczych powstały po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora nauk medycznych i zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych, z których cztery są pozycjonowane w bazie Journal Citation Reports (JCR). We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem, a w jednej także autorem korespondującym.

2.2. WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO (AUTOR/AUTORZY, TYTUŁ/ TYTUŁY PUBLIKACJI, ROK WYDANIA, NAZWA WYDAWNICTWA)

Publikacja 1: Ścieżyńska A, Nogowska A, Sikorska M, Konys J, Karpińska A, Komorowski M, Ołdak M, Malejczyk J. *Isolation and culture of human primary keratinocytes-a methods review*. *Exp Dermatol*. 2019 Feb;28(2):107-112.

IF: 3,368

MEiN: 100 pkt

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji polegał na: postawieniu hipotezy badawczej, pozyskaniu finansowania (grant Narodowego Centrum Nauki (NCN)/ Preludium 12/ 2016/23/N/NZ5/02588), opracowaniu koncepcji badań i planu badawczego, wybraniu haseł PubMed do przeglądu systematycznego literatury, przeprowadzeniu analizy piśmiennictwa (tu wraz ze współautorami), graficznym i statystycznym opracowaniu wyników (częściowo ze współautorami), przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu, a także jego korekcie (tu wraz ze współautorami) po uwagach recenzentów.

Publikacja 2: Ścieżyńska A, Sobiepanek A, Kowalska PD, Soszyńska M, Łuszczynski K, Grzywa TM, Krześniak N, Gózdź A, Włodarski PK, Galus R, Kobiela T, Malejczyk J. *A Novel and Effective Method for Human Primary Skin Melanocytes and Metastatic Melanoma Cell Isolation*. *Cancers (Basel)*. 2021 Dec 13;13(24):6244.

IF: 6,575

MEiN: 140 pkt

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji polegał na: postawieniu hipotezy badawczej, pozyskaniu finansowania (grant Narodowego Centrum Nauki (NCN)/ Preludium 12/ 2016/23/N/NZ5/02588), opracowaniu koncepcji badań i planu badawczego, przeprowadzeniu eksperymentów (tu ze współautorami), analizie wyników, ich opracowaniu graficznym (tu ze współautorami) i statystycznym, analizie piśmiennictwa, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu, a także jego korekcie (tu wraz ze współautorami) po uwagach recenzentów.

Publikacja 3: Ścieżyńska A, Sobiepanek A, Soszyńska M, Łuszczynski K, Radziszewski M, Levkovich I, Krześniak N, Orzechowska B, Lutyńska A, Malejczyk J. *Role of geneticin in isolation and culturing of skin melanocytes and melanoma cells*. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2023;77(1): 72-81

IF: 0,3

MEIN: 40 pkt

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji polegał na: postawieniu hipotezy badawczej, pozyskaniu finansowania (grant Narodowego Centrum Nauki (NCN)/ Preludium 12/2016/23/N/NZ5/02588), opracowaniu koncepcji badań i planu badawczego, przeprowadzeniu eksperymentów (tu ze współautorami), analizie wyników, ich opracowaniu graficznym (ze współautorami) i statystycznym, analizie piśmiennictwa, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu, a także jego korekcie (tu wraz ze współautorami) po uwagach recenzentów.

Publikacja 4: Ścieżyńska A, Soszyńska M, Komorowski M, Podgórska A, Krześniak N, Nogowska A, Smolińska M, Szulborski K, Szaflik JP, Noszczyk B, Ołdak M, Malejczyk J. *Molecular Analysis of the ABCA4 Gene Mutations in Patients with Stargardt Disease Using Human Hair Follicles*. Int J Mol Sci. 2020 May 13;21(10):3430.

IF: 5,924

MEiN: 140 pkt

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji polegał na: postawieniu hipotezy badawczej, pozyskaniu finansowania (grant Narodowego Centrum Nauki (NCN)/ Preludium 12/2016/23/N/NZ5/02588), ustaleniu koncepcji badań i planu badawczego, przeprowadzeniu eksperymentów (ze współautorami), analizie wyników, ich opracowaniu graficznym (ze współautorami) i statystycznym, analizie piśmiennictwa, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu, a także jego korekcie (tu wraz ze współautorami) po uwagach recenzentów.

Publikacja 5: Ścieżyńska A, Łuszczynski K, Radziszewski M, Komorowski M, Soszyńska M, Krześniak N, Shevchenko K, Lutyńska A, Malejczyk J. *Role of the ABCA4 Gene Expression in the Clearance of Toxic Vitamin A Derivatives in Human Hair Follicle Stem Cells and Keratinocytes*. Int J Mol Sci. 2023 May 5;24(9):8275.

IF: 5,600

MEiN: 140 pkt

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji polegał na: postawieniu hipotezy badawczej, pozyskaniu finansowania (grant Narodowego Centrum Nauki (NCN)/ Preludium 12/2016/23/N/NZ5/02588, oraz dwóch grantów Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego: 1M15/1/M/MBS/N/21/21 (Grant dla młodych naukowców) i 1M15/2/M/MG/N/21/21 (Mini-grant studencki), opracowaniu koncepcji badań i planu badawczego, przeprowadzeniu eksperymentów (ze współautorami), analizie wyników, ich opracowaniu graficznym (ze współautorami) i statystycznym, analizie piśmiennictwa, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu, a także jego korekcie (tu wraz ze współautorami) po uwagach recenzentów.

2.3. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

2.3.1. Wprowadzenie merytoryczne do osiągnięcia naukowego

Białko ABCA4 (*ang. ATP - binding cassette transporter*) należy do nadrodziny białek ABC, czyli transporterów wiążących kasetę ATP [1]. Białka z rodziny ABC występują u wszystkich żywych organizmów i odpowiadają za transport różnorodnych substancji m.in. jonów metali, peptydów, aminokwasów, cukrów, hydrofobowych cząsteczek oraz metabolitów wbrew gradientowi stężeń z wykorzystaniem energii pochodzącej z hydrolizy adenozyno-5-trójfosforanu (ATP, *ang. Adenosine Triphosphate*) [2].

Transporter ABCA4 kodowany jest przez gen *ABCA4* (*ang. ATP-binding cassette subfamily A member 4*), który jest zlokalizowany w obrębie krótkiego ramienia chromosomu 1 (1p21-p22.1) i składa się z 50 egzonów kodujących białko złożone z 2273 aminokwasów o masie około 250 kDa [3]. Gen *ABCA4* ulega wysokiej ekspresji w błonie dysków zewnętrznych segmentów fotoreceptorów. Przez wiele lat uważano, że jest to jedyne miejsce ekspresji tego genu. Z tego względu prawie wszystkie dotychczas opublikowane artykuły naukowe koncentrowały się na analizach roli transportera ABCA4 w funkcjonowaniu komórek siatkówki. Głównym substratem transportera ABCA4 jest produkt świetlnego rozpadu rodopsyny, będący pochodną witaminy A, czyli all-trans retinal (at-RAL). Podczas przetworzenia światła na impuls elektryczny, czyli fototransdukcji, w indukowanej światłem rodopsynie, stanowiącej połączenie białka opsyny z kofaktorem 11-cis-retinalem, 11-cis retinal ulega przekształceniu do all-trans retinalu, który po odłączeniu od białka staje się związkiem hydrofobowym. Uzyskane właściwości są przyczyną swobodnej dyfuzji tego związku przez błonę plazmatyczną dysku fotoreceptora, w którym może dochodzić do spontanicznego połączenia z fosfolipidem błonowym dysku fosfatydyloetanolaminą (PE) i utworzenia N-retinylideno-fosfatydyloetanolaminy (N-ret-PE). N-ret-PE nie może swobodnie przenikać przez błonę plazmatyczną dysku fotoreceptorów, a do jego przeniesienia z wnętrza dysku fotoreceptora do części cytoplazmatycznej wymagany jest udział aktywnego transportu białka ABCA4. Mechanizm ten jest istotny dla utrzymania procesu prawidłowego widzenia, gdyż all-trans retinal przeniesiony z wnętrza dysku fotoreceptorów do części cytoplazmatycznej może być enzymatycznie przekształcony przez komórki nabłonka barwnikowego siatkówki (RPE, *ang. Retinal Pigment Epithelium*) do izomeru 11-cis retinalu. 11-cis retinal powraca do fotoreceptorów, w których podlega zwrotnemu wykorzystaniu do odbudowy cząsteczek rodopsyny.

W przypadku dysfunkcji transportera ABCA4, gromadzący się we wnętrzu dysków fotoreceptorów N-ret-PE może reagować z kolejną cząsteczką at-RAL, prowadząc do powstania złożeń autofluorescencyjnych cząsteczek dietinoido- pirydyno-fosfatydyloetanolaminy (A2PE). W wyniku dalszych przemian A2PE zostają przekształcone do związków pozbawionych komponenty fosfolipidowej (A2E, *ang. pyridinium bis-retinoid*), które nie mogą być już dalej hydrolizowane, jednak stanowią główny składnik barwnika lipofuscyny, która uruchamia kaskadę

stresu oksydacyjnego, powstawanie rodników epoksydowych, co prowadzi do śmierci komórek fotoreceptorowych oraz RPE [4], [5].

Mutacje genu *ABCA4* prowadzą do powstania dystrofii siatkówki, określanych mianem retinopatii *ABCA4*, do których należy m.in. choroba Stargardta, dno żółto-plamiste (ang. *Fundus flavimaculatus*), pewnych form dystrofii czopkowo-pręcikowych (CRD; ang. *Cone-rod dystrophies*), zwyrodnienia barwnikowego siatkówki (RP, ang. *Retinitis Pigmentosa*) lub pośrednich form w/w fenotypów. Objawy tych dziedziczonych w sposób recesywny chorób narządu wzroku pojawiają się wcześnie w dzieciństwie lub u młodych osób dorosłych i skutkują postępującą, nieodwracalną utratą wzroku w wyniku dysfunkcji fotoreceptorów i komórek RPE [6]. Choroby te są obecnie nieuleczalne, jednak stosując odpowiednie substancje farmakologiczne możliwe jest spowolnienie postępu choroby. Sposoby farmakologicznego spowolnienia progresji dystrofii Stargardta zostały przeze mnie podsumowane w pracy przeglądowej: „*Ścieżyńska A, Oziębło D, Ołdak M. Experimental studies on medical treatments of retinal dystrophies with a particular focus on ABCA4 retinopathies. Klin Oczna. 2016 Aug; 118(1):59-65*”, natomiast potencjalne strategie terapii molekularnych pozwalające na spersonalizowane leczenie pacjentów z retinopatiami *ABCA4*, zostały przedstawione w pracy mojego autorstwa: „*Ścieżyńska A, Oziębło D, Ołdak M. Experimental studies on cell and gene therapies for retinal dystrophies with a particular focus on ABCA4 retinopathies. Klin Oczna. 2016 Aug;118(1):66-71*”. Wspomniane prace zostały opublikowane w 2016 roku w Klinice Ocznej i nie wchodzą w skład cyklu publikacji niniejszego osiągnięcia.

Szacuje się, że częstość nosicielstwa mutacji *ABCA4* w populacji ogólnej wynosi 1/10 -1/20 [7], a dotychczas zidentyfikowano ponad 1000 mutacji genu *ABCA4* [8]. Występowanie tzw. łagodnych, umiarkowanych lub ciężkich mutacji genu *ABCA4* wpływa na stopień uszkodzenia struktury białka *ABCA4*, a w konsekwencji zaburzenia jego funkcji prowadząc do różnych fenotypów retinopatii *ABCA4*. Z tych względów, diagnostyka genetyczna, a następnie spersonalizowane poradnictwo dla pacjentów z dystrofią Stargardta lub pozostałymi „retinopatiami *ABCA4*”, pozostają kluczowe dla określenia szybkości i ryzyka stopnia progresji choroby [7].

W badaniach własnych przedstawionych w pracy: „*Ścieżyńska A, et al. Next-generation sequencing of ABCA4: High frequency of complex alleles and novel mutations in patients with retinal dystrophies from Central Europe. Exp Eye Res. 2016 Apr;145:93-99.*” opublikowanej w Experimental Eye Research w 2016 r., która nie wchodzi w skład cyklu publikacji niniejszego osiągnięcia, po raz pierwszy przebadalam, z wykorzystaniem technologii sekwencjonowania następnej generacji, obszar kodujący genu *ABCA4* wśród 92 pacjentów z „retinopatiami *ABCA4*” w populacji polskiej. Doprowadziło to do wstępnego ustalenia częstości występowania poszczególnych mutacji w naszym kraju oraz istotnego przyspieszenia diagnostyki pacjentów poprzez ustalenie strategii sekwencjonowania egzonów genu *ABCA4*.

Mimo wielu zidentyfikowanych wariantów *ABCA4* patogenność wielu z nich nadal pozostaje niezbadana. W celu oceny patogenności wariantów *ABCA4* niezbędne jest określenie ich negatywnego wpływu na strukturę i funkcję transportera *ABCA4*. Niestety, wyniki analiz bioinformatycznych zdefiniowanych wariantów podczas wysokoprzepustowego sekwencjonowania

następnej generacji wraz z analizą częstości ich występowania pozostają nadal niewystarczające do jednoznacznego potwierdzenia ich patogenności. Charakter zidentyfikowanych genetycznych wariantów genetycznych powinien być potwierdzony w badaniach funkcjonalnych *in vitro* i *in vivo*, najlepiej w tkance objętej procesem chorobowym, co niestety w przypadku chorób siatkówki jest bardzo trudne i praktycznie niemożliwe z uwagi na znikomą dostępność materiału klinicznego. W przypadku tkanek niedostępnych do badania, znakomitą alternatywą byłoby wykorzystanie do badań innych łatwo dostępnych tkanek, w których gen *ABCA4* ulega ekspresji.

Przez wiele lat uważano, że gen *ABCA4* ekspresjonowany jest niemal wyłącznie w komórkach fotoreceptorowych. Ostatnio opublikowane wyniki prac w tym zakresie wskazują na niewielką ekspresję tego genu w komórkach RPE. Wydaje się jednak, że skala tej ekspresji choć niewielka, może być istotna dla ich funkcjonowania [9]. Wyniki dostępne na portalu www.genecards.org wskazują na umiarkowanie wysoki poziom ekspresji *ABCA4* w komórkach skóry, a potwierdzają je pojedyncze badania naukowe przeprowadzone w mieszkach włosowych [10] oraz keratynocytach [11]. Niestety, dotychczas nie potwierdzono obecności pełnej długości transkryptu oraz roli genu *ABCA4* w komórkach skóry (keratynocytach, fibroblastach lub mieszkach włosowych). W związku z tym, zarówno wyniki moich wcześniejszych prac naukowo-badawczych oraz wyżej opisane wyniki dostępnych badań ukierunkowały moje dalsze działania naukowe i stały się inspiracją do przeprowadzenia oceny komórek skóry (fibroblastów, keratynocytów lub mieszków włosowych) jako potencjalnego i alternatywnego modelu do badań konsekwencji molekularnych mutacji *ABCA4*.

2.3.2. Cele naukowe osiągnięcia naukowego:

- Przeprowadzenie szczegółowej analizy, mającej określić czy komórki skóry tj. keratynocyty, fibroblasty, melanocyty, oraz mieszkki włosowe, mogą stanowić dogodny model do badania funkcjonalnych konsekwencji mutacji genu *ABCA4*.
- Określenie domniemanej funkcji genu *ABCA4* w wybranych komórkach skóry.
- Opracowanie optymalnych metod hodowli wybranych komórek skóry na potrzeby zwiększenia dostępności metodyki do prowadzenia rutynowych badań funkcjonalnych konsekwencji mutacji genu *ABCA4* (oraz innych jednostek chorobowych) w komórkach skóry wyizolowanych bezpośrednio od pacjentów, jako elementu medycyny personalizowanej.

2.3.3. Analiza poszczególnych prac osiągnięcia naukowego

Publikacja 1

Ścieżyńska A, Nogowska A, Sikorska M, Konys J, Karpińska A, Komorowski M, Oldak M, Malejczyk J. Isolation and culture of human primary keratinocytes-a methods review. Exp Dermatol. 2019 Feb;28(2):107-112.

Poziom ekspresji i obecność pełnej długości transkryptu *ABCA4* badano w pierwotnych ludzkich fibroblastach, keratynocytach i melanocytach wyizolowanych z bioptatów skóry pobranych od osób z grupy kontrolnej. Na podstawie przeprowadzonych badań, spośród w/w komórek skóry w sposób najłatwiejszy uzyskano i prowadzono hodowlę ludzkich fibroblastów. Zdecydowanie większą trudność prowadzenia i utrzymania czystej hodowli, tj. niezanieczyszczonej innymi rodzajami komórek, sprawiały keratynocyty oraz melanocyty.

Ponadto, stosunkowo duże rozbieżności w metodyce hodowli keratynocytów, zaobserwowane w publikacjach oraz dostępnych protokołach, stały się przesłanką do opracowania systematycznej pracy przeglądowej na temat wydajności sposobów hodowli keratynocytów w celu wyboru optymalnej procedury niezbędnej do wykonania kolejnych etapów badawczych niniejszego osiągnięcia.

Manuskrypt „*Isolation and culture of human primary keratinocytes - a methods review*” opublikowany w czasopiśmie *Experimental Dermatology*, będący **pierwszą publikacją niniejszego osiągnięcia naukowego**, stanowił przegląd 945 prac opublikowanych od 2008 r. o zadanych kryteriach wyszukiwania. Brak pełnych danych dotyczących sposobu hodowli analizowanych komórek był przyczyną zakwalifikowania do dalszych analiz 603 publikacji, z których następnie wykluczono 210 prac, w których wykorzystywano komercyjnie dostępne linie komórkowe zamiast hodowli pierwotnych komórek. Z dalszych analiz usunięto publikacje, w których nie podano niezbędnych informacji dotyczących sposobu izolacji komórek, użytego stężenia enzymów trawiących, składu pożywek stosowanych do hodowli, jak również poziomu żywotności oraz pasażu komórek. Z tych względów dalszą analizę wydajności izolacji komórek przeprowadzono dla wyników 161 z 393 publikacji, natomiast analizę wpływu podłoża hodowlanych na żywotność keratynocytów dla wyników 318 publikacji.

Przygotowany przegląd stanowił przekrój najczęściej stosowanych metod do hodowli keratynocytów wraz z odniesieniem do żywotności komórek w zależności od zastosowanego sposobu ich izolacji i hodowli. Na podstawie przeprowadzonych analiz ustalono, że najlepsze efekty hodowli keratynocytów uzyskano podczas oddzielenia naskórka od skóry właściwej stosując trawienie w dyspazie w stężeniu 1.45 – 2.5 U/mL w temp. 4°C przez 12 h oraz uwolnienie keratynocytów z naskórka podczas 3 minutowej inkubacji w 0.25% trypsinie w temp. 37°C. Pożywki dedykowane do hodowli keratynocytów w podobnym stopniu wpływały na tempo ich wzrostu, przy czym najczęściej używaną pożywką była Epilife firmy ThermoFisher Scientific. Wybrane parametry zostały z powodzeniem wdrożone przez nasz zespół badawczy do rutynowej hodowli keratynocytów. Pierwsza publikacja niniejszego osiągnięcia dostarczyła koniecznych informacji w celu prowadzenia celowanych eksperymentów z wykorzystaniem ludzkich keratynocytów oraz bezsprzecznie wpłynęła na usprawnienie technik izolacji i hodowli. Od 2019 r., na dzień 11.09.2023, publikacja została zacytowana (bez autocytowań) 16 razy wg bazy Scopus, 13 razy według bazy Web of Science oraz 25 razy według bazy ResearchGate, co niewątpliwie świadczy, o zainteresowaniu badaczy jej tematyką.

Publikacja 2

Ścieżyńska A, Sobiepanek A, Kowalska PD, Soszyńska M, Łuszczynski K, Grzywa TM, Krześniak N, Góźdź A, Włodarski PK, Galus R, Kobiela T, Malejczyk J. A Novel and Effective Method for Human Primary Skin Melanocytes and Metastatic Melanoma Cell Isolation. Cancers (Basel). 2021 Dec 13;13(24):6244.

Opracowany i wdrożony protokół hodowli opisany w publikacji nr 1 umożliwił skuteczną izolację i namnażanie keratynocytów oraz zebranie materiału biologicznego niezbędnego do przeprowadzenia kolejnych badań związanych z analizą ekspresji genu *ABCA4*. Niestety opracowany i opisany powyżej protokół nie pozwalał na uzyskanie wysokiej wydajności hodowli melanocytów. Po wykonaniu szeregu doświadczeń opracowano innowacyjny, optymalny i wydajny protokół hodowli melanocytów z zastosowaniem techniki hodowli eksplantów skóry, który po raz pierwszy został opisany w **drugiej pracy opublikowanej w czasopiśmie Cancers** tj. „*Novel and Effective Method for Human Primary Skin Melanocytes and Metastatic Melanoma Cell Isolation*”. Opracowana procedura obejmowała etapy: uzyskiwania cienkich pasków naskórka z bioapatów skóry, poddawanych cięciu na fragmenty o wielkości około 1 mm² umieszczanych następnie w płytkach hodowlanych. Do dołków płytek dodawano pożywkę Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) z dodatkiem 10% bydlęcej surowicy płodowej (FBS, ang. *fetal bovine serum*). Według obserwacji Guo i wsp [12], po 2 dniach hodowli, dookoła eksplantów powinny pojawiać się migrujące keratynocyty, natomiast po 7 dniach hodowla zostaje zdominowana przez fibroblasty. Wobec powyższego założyłam hipotezę, że wraz z migrującymi keratynocytami, a później fibroblastami, mogą migrować również melanocyty. Zbiór komórek migrujących między 2 a 5 dniem hodowli eksplantów, poprzez trawienie enzymem trypsyną, pozwolił na izolację i hodowlę keratynocytów, a także melanocytów przy braku zanieczyszczenia fibroblastami. Początkowa mieszana hodowla melanocytów i keratynocytów umożliwiała zwrotne wydzielanie substancji, które pobudzały wzrost zarówno keratynocytów oraz melanocytów [13]. Następnie dokonywano oddzielenia melanocytów od keratynocytów przez wykorzystanie odmiennego czasu trypsynizacji (tj. czasu potrzebnego do oderwania komórek od podłoża hodowlanego w obecności enzymu trypsyny).

Opracowany innowacyjny protokół stanowi alternatywę dla standardowych procedur wykorzystujących techniki enzymatyczne i z powodzeniem może znaleźć zastosowanie w badaniach fizjologii i patologii melanocytów. Ponadto zastosowanie protokołu umożliwiło uzyskanie melanocytarnych sferoidów wypełnionych pigmentem, które następnie mogą być łatwo przeniesione do nowego podłoża hodowlanego. Nowatorski sposób hodowli melanocytów został po raz pierwszy z powodzeniem wykorzystany przy przygotowaniu pracy doktorskiej, której jestem promotorem pomocniczym oraz podczas współpracy badawczej z naukowcami z Katedry Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków Politechniki Warszawskiej. Dalsze badania dowiodły, iż opracowana oraz zastosowana metodyka pozwalała również na prostą izolację komórek czerniaka, przez co może znaleźć wszechstronne zastosowanie w badaniach patogenezy chorób skóry. Czystość hodowli komórkowych została potwierdzona za pomocą identyfikacji markerów charakterystycznych dla fibroblastów i melanocytów, przy użyciu metody qRT-PCR oraz

cytometrii przepływowej. Podsumowując, przedstawiona w publikacji, nowa metoda izolacji i hodowli zarówno pierwotnych melanocytów skóry oraz komórek czerniaka stanowi łatwo dostępne narzędzie hodowli komórek, co może przyczynić się do pogłębienia wiedzy na temat mechanizmów rozwoju m.in. czerniaka, w tym opracowania nowych terapii przeciwnowotworowych. Co najważniejsze, opracowana procedura pozwoliła na pozyskanie czystych hodowli melanocytów, które następnie mogły zostać użyte do dalszych analiz związanych z badanym genem *ABCA4*.

Publikacja 3

Ścieżyńska A, Sobiepanek A, Soszyńska M, Łuszczynski K, Radziszewski M, Levkovich I, Krześniak N, Orzechowska B, Lutyńska A, Malejczyk J. Role of geneticin in isolation and culturing of skin melanocytes and melanoma cells. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. 2023;77(1): 72-81.

Wdrożenie nowego protokołu hodowli melanocytów, w porównaniu do stosowanych metod enzymatycznych prowadzących często do ich zanieczyszczenia szybko dzielącymi się fibroblastami, znacznie uprościło izolację melanocytów z materiału pobranego od osób z grupy kontrolnej. Przerost melanocytów fibroblastami przekreślał szansę ich dalszego wykorzystania, bez użycia drogich metod sortowania komórek, ponieważ czas trypsynizacji obu typów komórek jest identyczny. Zastosowanie selektywnej pożywki do hodowli melanocytów nie stanowiło także optymalnej alternatywy, bowiem fibroblasty bardzo dobrze namnażają się w dedykowanej melanocytom pożywce z łatwością przerastając hodowlę (badania własne). Z uwagi na fakt, że bioptaty skóry są materiałem unikatowym pozyskiwanym w sposób inwazyjny, często nie jest możliwe powtórne pobranie tkanki. W związku z powyższym, w swoich badaniach podjęłam próby oczyszczania hodowli melanocytów z fibroblastów, aby móc je wykorzystać do dalszych badań. Dotychczasowe dane literaturowe wskazywały, że do usunięcia fibroblastów z hodowli melanocytów potencjalnie może być zastosowana genetycyna, antybiotyk aminoglikozydowy, który blokuje proces syntezy polipeptydów zarówno w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych. Z tego względu komórki ulegające stosunkowo szybkim podziałom pozostają szczególnie narażone na działanie genetycyny w większym stopniu, niż wolno proliferujące melanocyty. Z kolei, toksyczne działanie genetycyny na komórki eukariotyczne wymagało indywidualnego doboru stężenia antybiotyku dla każdej badanej linii komórkowej. Należy podkreślić, że wpływ stężenia genetycyny na żywotność melanocytów nie był dotychczas zbadany. W związku z powyższym **w trzeciej pracy niniejszego osiągnięcia**, pt. „*Role of geneticin in isolation and culturing of skin melanocytes and melanoma cells*” dokonano oceny bezpieczeństwa stężeń genetycyny wobec izolowanych melanocytów oraz opracowano schemat postępowania umożliwiający usunięcie zanieczyszczających fibroblastów z hodowli komórkowych. Jest to o tyle istotne, że do kontaminacji hodowli melanocytów fibroblastami może dojść zawsze, także podczas zastosowania nowo opracowanej metody przedstawionej w publikacji nr 2 niniejszego osiągnięcia, co w sposób istotny wpływa na dobór dalszego postępowania z hodowlami w celu wyselekcjonowania czystych melanocytów. Wyniki badań przedstawione w publikacji nr 3 stanowią zatem rozszerzenie

i uzupełnienie publikacji nr 2. Wstępne stężenie genetycyny zostało ustalone na podstawie dogłębnej analizy wyników 174 opublikowanych publikacji. W zdecydowanej większości prac, genetycyna była wykorzystywana do innych celów niż eliminacja fibroblastów z hodowli. W celu analizy wpływu na żywotność keratynocytów, melanocytów i fibroblastów hodowanych z wykorzystaniem różnych podłoży hodowlanych, w publikacji nr 3 zastosowano stężenia genetycyny: 0.05 - 1 mg/mL. Otrzymane wyniki wskazywały na bardzo wysoką toksyczność genetycyny wobec keratynocytów niezależnie od badanego stężenia i zastosowanej pożywki, co wskazuje na konieczność rozdzielenia keratynocytów od melanocytów i fibroblastów z wykorzystaniem określonych wcześniej różnic w czasie trypsynizacji. Dodanie FBS do pożywek hodowlanych, osłabiało działanie genetycyny. Ponadto, stosowanie genetycyny w stężeniu większym niż 0.1 mg/mL zmniejszało o ponad 20% żywotność melanocytów w dedykowanej pożywce hodowlanej (Medium 254, ThermoFisher Scientific Inc.). Z drugiej strony, bez dodatku genetycyny, fibroblasty oraz keratynocyty doskonale namnażały się w dedykowanym melanocytom podłożu hodowlanym i stosunkowo łatwo przerastały wolno dzielące się melanocyty. Zastosowanie genetycyny w stężeniu 0.05 mg/mL obniżało żywotność melanocytów do 85%, przy znacznym spadku żywotności fibroblastów i keratynocytów. Z tego też względu w opracowanej procedurze ustalono konieczność stosowania stężenia genetycyny wynoszącego 0.05 mg/mL przez 24 godziny w podłożu hodowlanym Medium 254, a następnie wymianę zużytej pożywki w celu zminimalizowania ryzyka negatywnego działania genetycyny na melanocyty. Należy podkreślić, że ten schemat postępowania jest optymalny przy niewielkiej kontaminacji fibroblastami, natomiast podczas wysokich zanieczyszczeń, procedurę należałoby powtarzać, co jednak zwiększa ryzyko uszkodzenia samych melanocytów. Podsumowując, w publikacji nr 3 po raz pierwszy ustalono, w jakich stężeniach genetycyna wpływa na komórki melanocytów oraz sposób postępowania podczas potencjalnej kontaminacji hodowli melanocytów fibroblastami w celu ich dalszego wykorzystania do badań. Omówiona publikacja stanowi powtarzalny protokół badawczy umożliwiający utrzymanie czystości hodowli melanocytów.

Publikacja 4

Ścieżyńska A, Soszyńska M, Komorowski M, Podgórska A, Krześniak N, Nogowska A, Smolińska M, Szulborski K, Szaflik JP, Noszczyk B, Ołdak M, Malejczyk J. Molecular Analysis of the ABCA4 Gene Mutations in Patients with Stargardt Disease Using Human Hair Follicles. Int J Mol Sci. 2020 May 13;21(10):3430.

Uzyskanie czystych hodowli pierwotnych ludzkich keratynocytów, fibroblastów i melanocytów, pozwoliło na przeprowadzenie dalszych badań ukierunkowanych na analizę ekspresji pełnej długości transkryptu genu *ABCA4*. W omawianej publikacji, poziom ekspresji genu *ABCA4* został zbadany na poziomie mRNA i białka w ludzkich keratynocytach, melanocytach, fibroblastach oraz mieszkach włosowych brwi pobranych od osób z grupy kontrolnej. Obecność pełnej długości transkryptu *ABCA4* została potwierdzona z wykorzystaniem metody sekwencjonowania Sangera przy użyciu samodzielnie zaprojektowanych starterów, obejmujących obszar zawierający po 5-6 kolejnych egzonów transkryptu *ABCA4* w mRNA (przepisanym

następnie na sekwencję cDNA). Analiza Western Blot potwierdziła także obecność fragmentu o masie około 250 kDa, odpowiadającego wielkości białka ABCA4, w mieszkach włosowych, jak również w hodowanych pierwotnych ludzkich fibroblastach i keratynocytach. Fragmentu tego nie zaobserwowano w melanocytach, co mogło świadczyć o jego braku lub bardzo niskiej ekspresji w tym typie komórek. Analiza ekspresji przy użyciu ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real time quantitative polymerase chain reaction, qPCR*) wykazała, że melanocyty, w porównaniu do keratynocytów i fibroblastów, wykazują najmniejszą ekspresję genu *ABCA4*. Interesujący jest fakt wykazania najwyższej ekspresji genu *ABCA4* w mieszkach włosowych.

Wysoka ekspresja genu *ABCA4* na poziomie mRNA oraz białka, jak również obecność transkryptu pełnej długości w badanym materiale sugeruje, że mieszki włosowe mogą stanowić doskonały model do badania konsekwencji występowania mutacji *ABCA4*, zwłaszcza tych, które wpływają na zaburzenia ramki odczytu transkryptu *ABCA4*. W związku z powyższym, zweryfikowano funkcjonalne konsekwencje wybranych mutacji *ABCA4* w mieszkach włosowych pacjentów z chorobą Stargardta. W tym celu pobrano mieszki włosowe od pacjentów z mutacjami genu *ABCA4*: c.5312+1G>A, c.5312+2T>G oraz c.5836-3C>A. Z wykorzystaniem sekwencjonowania metodą Sanger wykazano, że warianty c.5312+1G>A oraz c.5312+2T>G prowadziły do utraty egzonu 37 transkryptu *ABCA4*. Z kolei wariant c.5836-3C>A charakteryzował się insercją 30 nukleotydów do transkryptu *ABCA4* między egzonem 41 i 42.

Uzyskane wyniki są zgodne z obserwacjami dostępnymi w piśmiennictwie z wykorzystaniem m.in. sekwencjonowania tzw. *minigenów*, czyli transfekowanych do linii komórkowych sekwencji okalających wybrane do analizy warianty miejsca składania genu *ABCA4*. W przeciwieństwie do w/w skomplikowanych procedur, analiza miejsca składania przeprowadzana w materiale uzyskanym bezpośrednio z mieszków włosowych pobranych od pacjentów może stanowić optymalny model do badań i alternatywę dla wyżej wspomnianych metod. Analiza qRT-PCR ekspresji genu *ABCA4* w mieszkach włosowych pacjentów wykazała obniżoną ekspresję tego genu w porównaniu do osób z grupy kontrolnej.

W publikacji nr 4 wykazano po raz pierwszy, że badania mieszków włosowych mogą w sposób bezinwazyjny ocenić patogenność wariantów miejsc składania *ABCA4*, stając się bezpośrednią przesłanką do opracowania nowych procedur terapeutycznych. Odkrycie to jest niezwykle ważne do pogłębienia analiz nad rolą genu *ABCA4*, co dotychczas było w znacznym stopniu utrudnione ze względu na brak łatwo dostępnego materiału klinicznego oraz konieczność opracowywania drogich, czaso- i pracochłonnych konstruktów.

Publikacja 5

Ścieżyńska A, Łuszczyński K, Radziszewski M, Komorowski M, Soszyńska M, Krześniak N, Shevchenko K, Lutyńska A, Malejczyk J. Role of the ABCA4 Gene Expression in the Clearance of Toxic Vitamin A Derivatives in Human Hair Follicle Stem Cells and Keratinocytes. Int J Mol Sci. 2023 May 5;24(9):8275.

Wykazanie wysokiej ekspresji genu *ABCA4* oraz obecności pełnej długości transkryptu w mieszkach włosowych, potwierdziła słuszność prowadzenia badań roli genu *ABCA4* z zastosowaniem nowo opracowanego modelu. Uśredniona ekspresja genu *ABCA4* w pobranych mieszkach włosowych wśród osób z grupy kontrolnej, przedstawiona w publikacji nr 4 niniejszego osiągnięcia, choć istotnie wyższa od pacjentów z chorobą Stargardta, charakteryzowała się stosunkowo wysokim odchyleniem standardowym otrzymanych wyników. Ta obserwacja była powodem wykonania kolejnych badań dotyczących funkcji genu *ABCA4* w mieszkach włosowych oraz naskórku. Przeprowadzone badania funkcji genu *ABCA4* w komórkach skóry zostały przedstawione w **piątej publikacji** niniejszego osiągnięcia pt. „*Role of the ABCA4 Gene Expression in the Clearance of Toxic Vitamin A Derivatives in Human Hair Follicle Stem Cells and Keratinocytes*”.

Geny ulegające ekspresji w komórkach siatkówki, mogą być również eksprymowane przez komórki skóry, co udowodniono dotychczas dla opsyn, które okazały się być zaangażowane w procesy gojenia ran, melanogenezę, wzrost włosów, a także fotostarzenie skóry [14]. Funkcja genu *ABCA4* w skórze nie została jak dotąd zbadana, dlatego nowo stawiane hipotezy są unikatowe i stanowią wstęp do dalszych badań dotyczących roli pochodnych retinoidów, zwłaszcza all-trans retinalu w komórkach naskórka i mieszków włosowych.

W komórkach skóry, pochodne witaminy A metabolizowane są w różnych kompartmentach komórek. Redukcja retinalu do retinolu może zachodzić zarówno w cytoplazmie, jak i błonach siateczki śródplazmatycznej, przy czym utlenianie retinalu do kwasu retinowego zachodzi w cytoplazmie [15]. Lokalizacja transportera *ABCA4* w pierwotnych, izolowanych komórkach skóry została po raz pierwszy przedstawiona w publikacji piątej niniejszego utworu. Barwienia immunofluorescencyjne z wykorzystaniem markerów wybranych organelli komórkowych wykazały, że białko *ABCA4* występuje w obszarze częściowo zlokalizowanym w obrębie siateczki śródplazmatycznej (*SERCA2*, ang. *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*), jak również, mitochondriów (*SDHA*, ang. *succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A*). Może to świadczyć o lokalizacji białka *ABCA4* w błonach siateczki śródplazmatycznej związanych z mitochondriami (*MAMs*, ang. *mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes*), w których inicjowana jest lokalna synteza drugiego substratu badanego transportera czyli fosfatydyloetanoloaminy (PE).

Retinoidy w skórze biorą udział m.in. w regulacji cyklu mieszków włosowych i transportu melanosomów z melanocytów do keratynocytów, a także są zaangażowane w procesy różnicowania komórek naskórka. W związku z powyższym, w publikacji nr 5 przedstawiono wpływ all-trans retinalu na ekspresję genu *ABCA4* w komórkach, które przede wszystkim podlegają różnicowaniu, czyli keratynocytach, jak również w niezróżnicowanych komórkach macierzystych mieszków włosowych. Zaobserwowano, że dodanie do badanych komórek all-trans retinalu zwiększa ekspresję mRNA *ABCA4* w sposób dawko-zależny, aż do momentu osiągnięcia dawki toksycznej, która w komórkach macierzystych mieszków włosowych jest niższa niż w keratynocytach. W komórkach macierzystych mieszków włosowych all-trans retinal redukuje ich potencjał proliferacyjny o ok. 18%. Z kolei, wyciszenie genu *ABCA4* obniża proliferację do ok. 0.03%.

Podobnie, żywotność komórek macierzystych mieszków włosowych jest istotnie obniżona w komórkach, w których wyciszono gen *ABCA4*, wskazując na jego istotną rolę w utrzymaniu żywotności komórek w odpowiedzi na traktowanie all-trans retinalem. W komórkach macierzystych mieszków włosowych, w których najpierw wyciszono gen *ABCA4*, a następnie dodawano all-trans retinal, zaobserwowano wtórne zniesienie wyciszenia ekspresji badanego genu w porównaniu do komórek z grupy kontrolnej.

All-trans retinal zwiększał również ekspresję *ABCA4* w keratynocytach. Stymulacja all-trans retinalem wyraźnie zwiększała również ekspresję markera różnicowania keratynocytów, czyli inwolukryny oraz zmniejszała ekspresję markera komórek macierzystych keratynocytów, czyli keratyny 5. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem ekspresji *ABCA4* wzrastała ekspresja inwolukryny oraz obniżała się ekspresja keratyny 5, co mogło świadczyć o przejściu komórek na szlak różnicowania. W keratynocytach podlegającym różnicowaniu, retinal przekształcany jest dużo szybciej do kwasu retinowego ze względu na ekspresję enzymów odpowiadających za konwersję tych związków, co nasila skuteczność w neutralizowaniu all-trans retinalu [16]. Istotnie, w wynikach przedstawionych w publikacji nr 5 niniejszego utworu, wykazano, że w przeciwieństwie do komórek macierzystych mieszków włosowych, wyciszenie genu *ABCA4* w naturalnych ludzkich keratynocytach nie wpływało na szybkość proliferacji ani żywotność komórek w porównaniu z komórkami z grupy kontrolnej. Dodatkowo, uprzednie wyciszenie genu *ABCA4* było znoszone przez dodanie all-trans retinalu w keratynocytach lub komórkach macierzystych mieszków włosowych, co wskazuje, że transporter ten jest silnie ekspresjonowany w odpowiedzi na podanie jego naturalnego substratu.

Podsumowując, w publikacji nr 5, wykazano po raz pierwszy lokalizację transportera w warstwach skóry, jak również w pierwotnych, hodowanych komórkach skóry. Potwierdzono, że komórki macierzyste mieszków włosowych są bardziej wrażliwe na działanie all-trans retinalu niż keratynocyty. W odpowiedzi na stymulację komórek all-trans retinalem proliferacja tych komórek obniżyła się lub nawet została zahamowana w tych komórkach, w których uprzednio wyciszono gen *ABCA4*, co jest szczególnie zauważalne w komórkach macierzystych mieszków włosowych. Omawiana praca po raz pierwszy określa potencjalną rolę transportera *ABCA4* w komórkach skóry i stanowi wstęp do dalszych badań ukierunkowanych na badanie metabolizmu retinoidów w skórze.

2.3.4. Podsumowanie, wnioski oraz potencjalne wykorzystanie wyników prac

- Najważniejszym osiągnięciem niniejszego dzieła jest wykazanie, po raz pierwszy, że komórki skóry, zwłaszcza mieszki włosowe pacjentów z retinopatią *ABCA4*, mogą stanowić optymalny i powtarzalny model do badania funkcjonalnych konsekwencji mutacji tego genu.
- Ponadto, po raz pierwszy potwierdzono lokalizację transportera *ABCA4* w ludzkiej skórze, jak również w izolowanych, pierwotnych keratynocytach. Na przykładzie komórek macierzystych mieszków włosowych wykazano, że gen *ABCA4*, chroni je przed toksycznym działaniem all-trans retinalu.

- Istotnym osiągnięciem była optymalizacja metod hodowli wybranych komórek skóry, a także opracowanie innowacyjnego protokołu do szybkiej i efektywnej izolacji melanocytów, w celu prowadzenia zoptymalizowanych badań molekularnych w komórkach skóry pobranych od pacjentów, nie tylko z retinopatią *ABCA4*, ale także osób z innymi jednostkami chorobowymi.

Otrzymane rezultaty stanowią doskonały wstęp do kolejnych badań, w których planowane jest porównanie fizjologii komórek skóry osób z grupy kontrolnej z materiałem pobranym od pacjentów z mutacjami genu *ABCA4*, potwierdzenie lokalizacji białka *ABCA4* w obrębie MAMs, analiza wpływu dodania, bądź zahamowania syntezy fosfatydyloetanolaminy na ekspresję *ABCA4* oraz badania funkcjonalności transportera.

2.3.5. Piśmiennictwo cytowane w opisie osiągnięcia naukowego

1. Tsybovsky, Y.; Wang, B.; Quazi, F.; Molday, R.S.; Palczewski, K. Posttranslational modifications of the photoreceptor-specific ABC transporter *ABCA4*. *Biochemistry* 2011, *50*, 6855-6866.
2. Wilkens, S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep* 2015, *7*, 14.
3. Molday, R.S.; Zhong, M.; Quazi, F. The role of the photoreceptor ABC transporter *ABCA4* in lipid transport and Stargardt macular degeneration. *Biochim Biophys Acta* 2009, *1791*, 573-583.
4. Scortecci, J.F.; Molday, L.L.; Curtis, S.B.; Garces, F.A.; Panwar, P.; Van Petegem, F.; Molday, R.S. Cryo-EM structures of the *ABCA4* importer reveal mechanisms underlying substrate binding and Stargardt disease. *Nature communications* 2021, *12*, 5902.
5. Ścieżyńska, A.; Oziebło, D.; Oldak, M. Experimental studies on medical treatments of retinal dystrophies with a particular focus on *ABCA4* retinopathies. *Klin Oczna* 2016, *118*, 59-65.
6. Farnoodian, M.; Bose, D.; Khristov, V.; Susaimanickam, P.J.; Maddileti, S.; Mariappan, I.; Abu-Asab, M.; Campos, M.; Villasmil, R.; Wan, Q., et al. Cell-autonomous lipid-handling defects in Stargardt iPSC-derived retinal pigment epithelium cells. *Stem cell reports* 2022, *17*.
7. Cornelis, S.S.; Runhart, E.H.; Bauwens, M.; Corradi, Z.; De Baere, E.; Roosing, S.; Haer-Wigman, L.; Dhaenens, C.M.; Vulto-van Silfhout, A.T.; Cremers, F.P.M. Personalized genetic counseling for Stargardt disease: Offspring risk estimates based on variant severity. *American journal of human genetics* 2022, *109*, 498-507.
8. Garces, F.; Jiang, K.; Molday, L.L.; Stohr, H.; Weber, B.H.; Lyons, C.J.; Maberley, D.; Molday, R.S. Correlating the Expression and Functional Activity of *ABCA4* Disease Variants With the Phenotype of Patients With Stargardt Disease. *Investigative ophthalmology & visual science* 2018, *59*, 2305-2315.
9. Lenis, T.L.; Hu, J.; Ng, S.Y.; Jiang, Z.; Sarfare, S.; Lloyd, M.B.; Esposito, N.J.; Samuel, W.; Jaworski, C.; Bok, D., et al. Expression of *ABCA4* in the retinal pigment epithelium and its implications for Stargardt macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2018, *115*, E11120-E11127.

10. Haslam, I.S.; El-Chami, C.; Faruqi, H.; Shahmalak, A.; O'Neill, C.A.; Paus, R. Differential expression and functionality of ATP-binding cassette transporters in the human hair follicle. *The British journal of dermatology* 2015, 172, 1562-1572.
11. Wiley, L.; Kaalberg, E.; Penticoff, J.; Mullins, R.; Stone, E.; Tucker, B. Expression of the retina-specific flippase, ABCA4, in epidermal keratinocytes [version 1; peer review: 2 approved with reservations]. *F1000Research* 2016, 5.
12. Guo, A.; Jahoda, C.A. An improved method of human keratinocyte culture from skin explants: cell expansion is linked to markers of activated progenitor cells. *Exp Dermatol* 2009, 18, 720-726.
13. Hirobe, T. Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes. *Pigment Cell Res* 2005, 18, 2-12.
14. Suh, S.; Choi, E.H.; Atanaskova Mesinkovska, N. The expression of opsins in the human skin and its implications for photobiomodulation: A Systematic Review. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2020, 36, 329-338.
15. Ruiz, F.X.; Porte, S.; Pares, X.; Farres, J. Biological role of aldo-keto reductases in retinoic Acid biosynthesis and signaling. *Front Pharmacol* 2012, 3, 58.
16. Siegenthaler, G.; Saurat, J.H.; Ponc, M. Retinol and retinal metabolism. Relationship to the state of differentiation of cultured human keratinocytes. *The Biochemical journal* 1990, 268, 371-378.

3. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ

3.1. REALIZACJA PROJEKTÓW/GRANTÓW BADAWCZYCH

Podczas mojej dotychczasowej działalności naukowej, kierowałam, realizowałam i sprawowałam opiekę nad realizacją kilku projektów naukowych.

W czasie studiów inżynierskich i magisterskich brałam udział w realizacji mini-grantów studenckich Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego finansowanych w latach 2009 – 2011 („Identyfikacja mutacji w genie *COL8A2* u pacjentów z dystrofią śródłonkową rogówki Fuchsa i charakterystyka zależności genotypowo- genotypowych”; M15/NM4/2009) oraz 2010 – 2012 („Analiza podłoża genetycznego dystrofii śródłonkowej rogówki Fuchsa na podstawie identyfikacji polimorfizmu genu *TCF4* w polskiej populacji – potencjalne implikacje kliniczne” 1M15/NM4/2011). Ponadto w latach 2011 – 2014 byłam wykonawcą dwóch grantów finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego pt. „Poszukiwanie nowego podłoża genetycznego dziedzicznego zaniku nerwu wzrokowego” (nr 5915/B/P01/2011/40) oraz „Diagnostyka chorób siatkówki związanych z mutacjami genu *ABCA4* z wykorzystaniem metody „sekwencjonowania następnej generacji” (nr 5916/B/P01/2011/40). Następnie w latach 2014-2015 byłam kierownikiem projektu naukowego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego dla Młodych Naukowców „Analiza genu *ABCA4* w kontekście genomowym z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji i genotypowania w czasie rzeczywistym: znaczenie

w diagnostyce i postępowaniu terapeutycznym u pacjentów z chorobami siatkówki” (nr 1M15/PM11D/14). Wyniki uzyskane podczas realizacji tych ostatnich projektów zostały przedstawione w pracy mojego autorstwa pt. „*Ścieżyńska A, et al. Next-generation sequencing of ABCA4: High frequency of complex alleles and novel mutations in patients with retinal dystrophies from Central Europe*”, opublikowanej w *Experimental Eye Research* w 2016 r. i zostały opisane w mojej rozprawie doktorskiej.

Po obronie mojej rozprawy doktorskiej, w latach 2017- 2019 realizowałam jako **kierownik** projekt badawczy z konkursu **Preludium 12 Narodowego Centrum Nauki** pt. „Komórki skóry jako model do badania konsekwencji mutacji w genach powodujących dziedziczne dystrofie siatkówki” (grant nr 2016/23/N/NZ5/02588). Dzięki wynikom uzyskanym z tego projektu, jak również dzięki finansowaniu dwóch projektów pozyskanych w konkursie Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego dla Młodych Naukowców, którymi kierowałam w latach 2018 – 2019 oraz 2021 – 2022, odpowiednio „Przez lokalizację do funkcji- poszukiwanie specyficznego dla fotoreceptorów białka ABCA4 w komórkach skóry na potrzeby medycyny personalizowanej” (nr 1M15/PM2/18) oraz „Analiza funkcji genu *ABCA4* w fizjologii i patologii ludzkiej skóry” (nr 1M15/1/M/MBS/N/21/21), jak również dzięki finansowaniu uzyskanemu w ramach Mini-Grantu studenckiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, w latach 2021 – 2022, którego byłam opiekunem, pt. „Udział genu *ABCA4* w utrzymaniu potencjału różnicującego komórek naskórka” (nr 1M152M/MG/N/2121), możliwe było przeprowadzenie badań, których wyniki zostały opisane w publikacjach, które wchodzą w skład cyklu niniejszego osiągnięcia.

Oprócz opisanych wyżej projektów obecnie pełnię rolę opiekuna Mini-grantu studenckiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pt. „Badanie wpływu chromograniny A na proliferację i migrację komórek endometrium” (1M15/1/M/MG/N/23) realizowanego od października 2023 r.

W latach 2018 – 2020, we współpracy z Wojskowym Instytutem Higieny i Epidemiologii, a także prof. Dariuszem Góreckim z Uniwersytetu w Portsmouth, brałam udział w realizacji grantu Kościuszko finansowanego przez Ministerstwo Obrony Narodowej pt. „Genetyczno-proteomiczna analiza receptora purynergicznego P2X7 w warunkach fizjologicznych i patologicznych”. Głównym celem i sukcesem niniejszego projektu było stworzenie zwierzętarni w standardzie SPF (ang. *specific pathogen free*), a rozpoczęte badania są obecnie kontynuowane podczas realizacji dwóch prac doktorskich (mgr Marty Soszyńskiej i mgr Michała Komorowskiego), których jestem promotorem pomocniczym.

Ponadto, w latach 2020 – 2022, pełniłam **rolę kierownika prac badawczych** realizowanych na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym w ramach **Grantu “Szybka ścieżka” Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR)**, podczas których realizowałam prace badawczo-rozwojowe w ramach programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 pt: "Przygotowanie w skali laboratoryjnej płynu do krótko- i długo-terminowego przechowywania komórek oraz przeprowadzenie badań płynów w celu wykazania jego właściwości w odniesieniu do płynów konkurencyjnych" (nr 1M15/UK1/411/20). Projekt polegał na analizie zachowania komórek macierzystych w dostępnych na rynku płynach do przechowywania komórek i narządów. Wyniki uzyskane z niniejszego projektu pozwoliły na opracowanie nowych sugestii dotyczących czasu

i sposobu przechowywania komórek macierzystych, w celu zachowania ich jak najlepszych parametrów umożliwiających ich podanie do pacjentów. Wykaz projektów, w których brałam udział, wraz z pełnionymi przeze mnie funkcjami, został przedstawiony w Tabeli 1.

Tabela 1. Wykaz projektów badawczych.

Lp.	Funkcja w projekcie	Jednostka finansująca/ nazwa projektu/ numer identyfikacyjny	Tytuł projektu	Lata realizacji projektu
1.	Kierownik projektu	Narodowe Centrum Nauki (NCN)/ Preludium 12/ 2016/23/N/NZ5/02588	Komórki skóry jako model do badania konsekwencji mutacji w genach powodujących dziedziczne dystrofie siatkówki	2017-2019
2.	Kierownik usługi badawczo-rozwojowej realizowanej na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym	Narodowe Centrum Badań i rozwoju (NCBiR)/ 1M15/UK1/411/20	Przygotowanie w skali laboratoryjnej płynu do krótko- i długo-terminowego przechowywania komórek oraz przeprowadzenie badań płynów w celu wykazania jego właściwości w odniesieniu do płynów konkurencyjnych	2020-2022
3.	Kierownik projektu	Warszawski Uniwersytet Medyczny / Grant dla Młodych Naukowców/ 1M15/1/M/MBS/N/21/21	Analiza funkcji genu <i>ABCA4</i> w fizjologii i patologii ludzkiej skóry	2021-2022
4.	Kierownik projektu	Warszawski Uniwersytet Medyczny / Grant dla Młodych Naukowców/ /1M15/PM2/18	Przez lokalizację do funkcji- poszukiwanie specyficznego dla fotoreceptorów białka <i>ABCA4</i> w komórkach skóry na potrzeby medycyny spersonalizowanej	2018- 2019
5.	Kierownik projektu	Warszawski Uniwersytet Medyczny / Grant dla Młodych Naukowców/ /1M15/PM11D/14	Analiza genu <i>ABCA4</i> w kontekście genomowym z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji i genotypowania w czasie rzeczywistym: znaczenie w diagnostyce i postępowaniu terapeutycznym u pacjentów z chorobami siatkówki	2014 – 2015
6.	Opiekun	Warszawski Uniwersytet	Badanie wpływu chromograniny	2023-obecnie

	projektu	Medyczny / Mini-grant studencki/1M15/1/M/MG/N/23	A na proliferację i migrację komórek endometrium	
7.	Opiekun projektu	Warszawski Uniwersytet Medyczny / Mini-grant studencki/ 1M152M/MG/N/2121	Udział genu <i>ABCA4</i> w utrzymaniu potencjału różnicującego komórek naskórka	2021-2022
8.	Koordynator i wykonawca projektu	Ministerstwa Obrony Narodowej / Grant „Kościuszko”	Genetyczno-proteomiczna analiza receptora purynergicznego P2X7 w warunkach fizjologicznych i patologicznych	2018 - 2020
9.	Wykonawca projektu	Narodowe Centrum Badań i rozwoju (NCBiR)/ Grant Era-Net / ANR-16-ECVD-0004	Targeted LYmphatic and Microvessel Treatments in metabolic-DISEase HFpEF	2017- 2021
10.	Wykonawca projektu	Grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego/ 5916/B/P01/2011/40	Diagnostyka chorób siatkówki związanych z mutacjami genu <i>ABCA4</i> z wykorzystaniem metody „sekwencjonowania następnej generacji”	2011 – 2014
11.	Wykonawca projektu	Grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego/ 5915/B/P01/2011/40	Poszukiwanie nowego podłoża genetycznego dziedzicznego zaniku nerwu wzrokowego	2011 – 2014
12.	Wykonawca projektu	Warszawski Uniwersytet Medyczny / Mini-grant studencki/ M15/NM4/2009	Identyfikacja mutacji w genie <i>COL8A2</i> u pacjentów z dystrofią śródbłonkową rogówki Fuchsa i charakterystyka zależności genotypowo- genotypowych	2009 – 2011
13.	Wykonawca projektu	Warszawski Uniwersytet Medyczny / Mini-grant studencki/ 1M15/NM4/2011	Analiza podłoża genetycznego dystrofii śródbłonkowej rogówki Fuchsa na podstawie identyfikacji polimorfizmu genu <i>TCF4</i> w polskiej populacji – potencjalne implikacje kliniczne	2010 – 2012

3.2. PATENTY

Podczas mojej dotychczasowej działalności naukowej, poza badaniami podłoża molekularnego chorób oczu i skóry, po uzyskaniu stopnia doktora, zajmowałam się również badaniem patogenezą endometriozy. Przełomowe badania dotyczące genu *FUT4* opisane w pracy: Żeberkiewicz M, Hyc A, Iwan A, Zwierzchowska A, Ścieżyńska A, Kalaszczyńska I, Barcz E, Malejczyk J. *Expression of Fucosyltransferase 4 (FUT4) mRNA is Increased in Endometrium from Women with Endometriosis*. J Clin Med. 2022, doprowadziły do przyznania 13.06.2022r przez Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej patentu (Pat.240830) na „Sposoby wykrywania endometriozy”; Wynalazcy: JACEK MALEJCZYK, ANNA IWAN, ANNA HYC, ANETA ZWIERZCHOWSKA, ANETA ŚCIEŻYŃSKA, EWA BARCZ, MARTA ŻEBERKIEWICZ. Patent ten stanowi obecnie podstawę do opracowania testu diagnostycznego umożliwiającego szybką, bezinwazyjną diagnostykę endometriozy.

3.3. WYKAZ PRAC NIE WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO (AUTOR/ AUTORZY, TYTUŁ/ TYTUŁY PUBLIKACJI, ROK WYDANIA, NAZWA WYDAWNICTWA)

Poza opisanym cyklem prac, w mojej pracy badawczej zajmowałam się tematyką związaną przede wszystkim z biologią molekularną komórki, zwłaszcza z uwzględnieniem procesów związanych z patogenezą chorób skóry, chorób okulistycznych oraz endometrium. Poniżej zamieszczam wykaz publikacji, których jestem współautorem, a które nie wchodzi w skład cyklu publikacji stanowiącego niniejsze osiągnięcie. Prace opublikowano w recenzowanych czasopismach naukowych i zostały pogrupowane zgodnie z tematyką poruszanych zagadnień.

3.3.1. Publikacje związane z molekularnym podłożem chorób oczu

Przed obroną doktoratu moja działalność skupiała się głównie na poszukiwaniu molekularnego podłoża chorób oczu. Tematyka ta była przede mnie realizowana z wybitnymi naukowcami Zakładu Genetyki Medycznej WUM oraz Katedry i Kliniki Okulistyki WUM. Oprócz wspomnianych we wstępie (lecz nie wchodzących w skład cyklu publikacji) prac dotyczących retinopatii *ABCA4* (P1-P3), prowadzone przeze mnie badania dotyczyły również analizy wariantów genetycznych powiązanych z zanikiem nerwu wzrokowego (P5, P7), jak również dystrofiami rogówki typu Schnydera (P4), Fuchsa (P6), oraz dystrofii siateczkowatej rogówki (P8).

P1. Ścieżyńska A, Oziębło D, Ambroziak AM, Korwin M, Szulborski K, Krawczyński M, Stawiński P, Szaflik J, Szaflik JP, Płoski R, Ołdak M. *Next-generation sequencing of ABCA4: High frequency of complex alleles and novel mutations in patients with retinal dystrophies from Central Europe*. Exp Eye Res. 2016; Apr;145:93-99.

P2. Ścieżyńska A, Oziębło D, Ołdak M. *Experimental studies on cell and gene therapies for retinal dystrophies with a particular focus on ABCA4 retinopathies*. Klin Oczna. 2016 Aug;118(1):66-71

- P3.** Ścieżyńska A, Oziębło D, Ołdak M. *Experimental studies on medical treatments of retinal dystrophies with a particular focus on ABCA4 retinopathies*. *Klin Oczna*. 2016 Aug;118(1):59-65
- P4.** Sarosiak A, Udziela M, Ścieżyńska A, Oziębło D, Wawrzynowska A, Szaflik JP, Ołdak M. *Clinical diversity in patients with Schnyder corneal dystrophy-a novel and known UBIAD1 pathogenic variants*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2018 Nov;256(11):2127-2134
- P5.** Ścieżyńska A, Ruszkowska E, Szulborski K, Rydz K, Wierzbowska J, Kosińska J, Rękas M, Płoski R, Szaflik JP, Ołdak M. *Processing of OPA1 with a novel N-terminal mutation in patients with autosomal dominant optic atrophy: Escape from nonsense-mediated decay*. *PLoS One*. 2017 Aug 25;12(8):e0183866
- P6.** Ołdak M, Ruszkowska E, Udziela M, Oziębło D, Bińczyk E, Ścieżyńska A, Płoski R, Szaflik JP. *Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy: Strong Association with rs613872 Not Paralleled by Changes in Corneal Endothelial TCF4 mRNA Level*. *Biomed Res Int*. 2015;2015:640234
- P7.** Ołdak M, Ścieżyńska A, Szulborski K, Szaflik JP, Szaflik J. *Nie tylko neuropatia wzrokowa: nowe aspekty molekularne i kliniczne mutacji w genie OPA1 [Not only optic neuropathy: new molecular and clinical aspects of OPA1 gene mutations]*. *Klin Oczna*. 2014;116(1):52-8
- P8.** Ołdak M, Szaflik JP, Ścieżyńska A, Udziela M, Maksym RB, Rymgayło-Jankowska B, Hofmann-Rummelt C, Menzel-Severing J, Płoski R, Żarnowski T, Kruse FE, Szaflik J. *Late-onset lattice corneal dystrophy without typical lattice lines caused by a novel mutation in the TGFBI gene*. *Cornea*. 2014 Mar;33(3):294-9.

3.3.2. Publikacje związane z analizami molekularnymi komórek macierzystych

Po obronie doktoratu moje zainteresowania badawcze, oprócz tych przedstawionych w ramach cyklu publikacji niniejszego osiągnięcia, skoncentrowane były na badaniach molekularnych komórek skóry. W tym czasie rozwijałam współpracę z wieloma ośrodkami badawczymi m.in. Zakładem Biologii Medycznej Narodowego Instytutu Kardjologii Stefana kardynała Wyszyńskiego - Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie, Zakładem Histologii Uniwersytetu Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie, jak również Zakładem Medycyny Regeneracyjnej Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii. W Zakładzie Medycyny Regeneracyjnej Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii współpracowałam przy realizacji projektu Kościuszko z prof. Dariuszem Góreckim z Uniwersytetu z Portsmouth w Wielkiej Brytanii, dzięki której możliwe było założenie zwierzętarni w standardzie mikrobiologicznym SPF, a także rozpoczęcie badań nad funkcją receptora purynergicznego P2X7 w komórkach skóry oraz endometrium. Obecnie, tematyka badań jest kontynuowana przez dwóch doktorantów Szkoły Doktorskiej WUM, których jestem promotorem pomocniczym.

Ponadto, we współpracy z naukowcami z Zakładu Biotechnologii Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, byłam zaangażowana w analizę polimorfizmów promotora *HMOX1* indukowanych ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych: Polak K, Stępniewski J, Ścieżyńska A, Podgórska A, Dulak J, Florczyk-Soluch U. *Generation of human induced*

pluripotent stem cell lines with HMOX1 promoter polymorphism and CRISPR/Cas9-mediated deletion of exon 50 of DMD gene. Stem Cell Res. 2023 Feb (P9).

Podczas realizacji projektu **Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR)**/ “Szybka ścieżka”/ 1M15/UK1/411/20, we współpracy z Kliniką Chirurgii Plastycznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie powstała praca: **Ścieżyńska A**, Soszyńska M, Szpak P, Krześniak N, Malejczyk J, Kalaszczyńska I. *Influence of Hypothermic Storage Fluids on Mesenchymal Stem Cell Stability: A Comprehensive Review and Personal Experience.* Cells. 2021 Apr 28;10(5):1043 (P10), stanowiąca przegląd systematyczny 826 publikacji dotyczących sposobów hodowli komórek macierzystych i przygotowania preparatów komórkowych, pod względem ich największej żywotności i przydatności do podania pacjentom. Praca ta od momentu opublikowania, na dzień 11.09.2023, została zacytowana 13 razy wg bazy Web of Science, 11 razy według bazy Scopus, oraz 13 razy według ResearchGate, co podkreśla ważność podjętego zagadnienia naukowego.

3.3.3. Publikacje związane z molekularnym podłożem endometriozy

Kolejnym, bardzo ważnym zagadnieniem, było poznanie mechanizmów zaangażowanych w powstawanie endometriozy. W 2019 roku byłam pierwszym autorem opublikowanej pracy przeglądowej: **Ścieżyńska A**, Komorowski M, Soszyńska M, Malejczyk J. *NK Cells as Potential Targets for Immunotherapy in Endometriosis.* J Clin Med. 2019 Sep 14;8(9):1468 (P11), która od momentu publikacji, na dzień 11.09.2023r, była cytowana (bez autocytowań) 36 razy wg bazy Scopus, 30 razy według bazy Web of Science oraz 51 razy według danych z ResearchGate.

Ponadto, w 2021 r. uczestniczyłam w badaniach związków między polimorfizmem w genie *HMOX1* a rozwojem endometriozy. Wyniki tych badań zostały przedstawione w pracy: Milewski Ł, **Ścieżyńska A**, Ponińska J, Soszyńska M, Barcz E, Roszkowski PI, Kamiński P, Włodarski P, Płoski R, Malejczyk J. *Endometriosis Is Associated with Functional Polymorphism in the Promoter of Heme Oxygenase 1 (HMOX1) Gene.* Cells. 2021 Mar 21;10(3):695 (P12).

Jednym z najważniejszych osiągnięć było wykazanie, że u pacjentek z endometriozą ekspresja genu *FUT4* była znacznie wyższa w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej, co zostało opublikowane w pracy: Żeberkiewicz M, Hyc A, Iwan A, Zwierzchowska A, **Ścieżyńska A**, Kalaszczyńska I, Barcz E, Malejczyk J. *Expression of Fucosyltransferase 4 (FUT4) mRNA Is Increased in Endometrium from Women with Endometriosis.* J Clin Med. 2022 Sep 23;11(19):5606 (P13). Odkrycie to stanowi podstawę przyznanego patentu oraz przyczyniło się do opracowania testu diagnostycznego, umożliwiającego nieinwazyjną metodę diagnostyczną endometriozy, znacząco skracając procedurę diagnostyczną (z kilku lat do kilku tygodni). Badania nad tematyką związaną z endometriozą prowadzone są we współpracy z Katedrą i Kliniką Ginekologii i Położnictwa Wydziału Medycznego CM UKSW w Międzyzleskim Szpitalu Specjalistycznym w Warszawie.

3.3.4. Publikacje realizowane w ramach współpracy z naukowcami z innych ośrodków

Podczas mojej pracy naukowo-badawczej realizowałam również badania, które nie mieściły się w opisanej powyżej tematyce badawczej, lecz dzięki zdobytym umiejętnościom z zakresu sekwencjonowania następnej generacji (NGS, ang. *next-generation sequencing*) i analizy ekspresji genów, mogłam uczestniczyć w wielu wartościowych projektach i dalej rozwijać wieloosobową współpracę naukową. W ramach tej działalności, we współpracy z badaczem Centrum Archeologii Śródziemnomorskiej Uniwersytetu Warszawskiego, byłam zaangażowana w analizę filogenetyczną szczątków starożytnych zwierząt, a wyniki tych badań zostały opisane w publikacji: Iwaszczuk U, Niderla-Bielińska J, **Ścieżyńska A**. *Kings and peasants from El-Zuma/El-Detti microregion in the Early Makurian period. Economic aspects of animal bones from funerary contexts*. PLoS One. 2019 Feb 15;14(2):e0212423 (P14).

W ramach współpracy z prof. dr hab. n. med. Anną Ratajską z Katedry i Zakładu Patomorfologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, podczas realizacji projektu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR) (Grant Era-Net), byłam zaangażowana w analizę miRNomu, przy użyciu wysokoprzepustowego sekwencjonowania następnej generacji, subpopulacji sercowych makrofagów wyizolowanych od myszy z zespołem metabolicznym. Eksperymenty realizowane były w ramach trzymiesięcznego stażu w Zakładzie Biologii Medycznej Narodowego Instytutu Kardjologii - Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie, pod opieką naukową pani prof. dr hab. n. med. Anny Lutyńskiej. Wyniki tej współpracy opisano w publikacji: Niderla-Bielińska J, **Ścieżyńska A**, Moskalik A, Jankowska-Steifer E, Bartkowiak K, Bartkowiak M, Kiernożek E, Podgórska A, Ciszek B, Majchrzak B, Ratajska A. *A Comprehensive miRNome Analysis of Macrophages Isolated from db/db Mice and Selected miRNAs Involved in Metabolic Syndrome-Associated Cardiac Remodeling*. Int J Mol Sci. 2021 Feb 23;22(4):2197 (P15).

Ponadto uczestniczyłam w badaniach dotyczących oddziaływania ranatensyny na receptory dopaminergiczne D2, w kontekście możliwości zastosowania w leczeniu nowotworów trzustki we współpracy z badaczami z Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, oraz Instytutu Biochemii, Centrum Badań Biologicznych Węgierskiej Akademii Nauk, które zostały opublikowane w pracy: Laskowska AK, Szudzik M, **Ścieżyńska A**, Komorowski M, Szűcs E, Gombos D, Bączek B, Lipka-Miciuk J, Benyhe S, Kleczkowska P. *The Role of a Natural Amphibian Skin-Based Peptide, Ranatensin, in Pancreatic Cancers Expressing Dopamine D2 Receptors*. Cancers (Basel). 2022 Nov 10;14(22):5535 (P16).

3.4. POGŁĘBIANIE KWALIFIKACJI NAUKOWYCH

Równolegle z rozwijaniem działalności naukowej podnosiłam również swoje kwalifikacje zawodowe. Doświadczenie w zakresie sekwencjonowania następnej generacji skłoniło mnie do pogłębienia moich kompetencji w zakresie analizy uzyskanych danych: „Wprowadzenie do obróbki i analizy danych NGS” oraz „NGS w badaniach regulacji genów” 15-17.06. 2018 r.

W związku z podejmowaniem zagadnień naukowych, które niejednokrotnie wymagały dostępu do materiału pobranego od zwierząt, ukończyłam **certyfikowane szkolenie** prowadzone

w dniach 08.09. do 22.09.2015 dla osób wykonujących procedury na zwierzętach, jak również odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń, ich prowadzenie oraz pozyskanie materiału zwierzęcego do dalszych badań.

Ponadto, pogłębiam swoją wiedzę podczas realizacji szkoleń i praktyk podczas **specjalizacji z laboratoryjnej toksykologii medycznej**, którą rozpoczęłam 01.04.2023 r.

4. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKE

4.1. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA

4.1.1. Działalność dydaktyczna wśród studentów

Oprócz działalności naukowej, rozwijałam również intensywnie moją działalność dydaktyczną. W ramach tych działań opracowywałam materiały dydaktyczne oraz wygłaszałam seminaria i objaśnienia, jak również prowadziłam ćwiczenia z Histologii, Embriologii oraz Cytofizjologii dla studentów Wydziału Lekarskiego (zarówno studentów studiów stacjonarnych, niestacjonarnych, jak i English Division) oraz Analityki Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Jako adiunkt na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym działalność dydaktyczną pełnię od 2017 r., natomiast od października 2021 r. do czerwca 2022 r. pełniłam również funkcję adiunkta dydaktycznego w Collegium Medicum Uniwersytetu Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie. Chciałam podkreślić, że moje nazwisko umieszczono na **42 pozycji w rankingu 100 najlepiej ocenianych nauczycieli akademickich Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego** w 2020 r., sporządzonym na podstawie ankiet studentów WUM dotyczących ponad 1800 nauczycieli akademickich zatrudnionych na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym.

Od 2021 r. pełnię funkcję koordynatora przedmiotu Histologia z Embriologią dla studentów Wydziału Lekarskiego, podczas której jako przedstawiciel Zakładu Histologii i Embriologii uczestniczę w Radach Pedagogicznych, biorę udział w przygotowywaniu kolokwium i egzaminów centralnych dla studentów WUM, oraz nadzorowaniu poprawnego ich przebiegu. Ponadto, będąc w stałym kontakcie ze starostami poszczególnych lat, dbam o jak najlepszą współpracę naszych studentów z Katedrą i Zakładem Histologii i Embriologii WUM.

Obecnie biorę także udział w przygotowaniu nowego podręcznika z Histologii, pod redakcją profesora dr hab. n. med. Jacka Malejczyka, w którym jestem autorem rozdziałów dotyczących tkanki nabłonkowej oraz skóry.

4.1.2. Działalność w ramach studenckiego koła naukowego

Od wielu lat współpracuję ze studenckim kołem naukowym HESA, działającym przy Zakładzie Histologii i Embriologii WUM, a od 2015 roku, wraz z dr hab. n. med. Izabelą Młynarczuk-Biały, jestem jego współprowadzącą. Dotychczas sprawowałam opiekę naukową nad sześcioma osobami należącymi do HESA: trzema studentkami wydziału lekarskiego, które obecnie

są już absolwentkami naszej uczelni oraz trzema studentami wydziału lekarskiego, z którymi obecnie realizuję omawiane powyżej projekty naukowe. Spośród studentów, z którymi mam przyjemność współpracować, dwóch zostało kierownikami Mini-Grantów WUM, w których pełnię rolę opiekuna projektu. Jeden z Mini-Grantów WUM pt. „*Udział genu ABCA4 w utrzymaniu potencjału różnicującego komórek naskórka*” został już z powodzeniem zakończony i rozliczony, natomiast realizacja drugiego Mini-Grantu pt. „*Badanie wpływu chromograniny A na proliferację i migrację komórek endometrium*” rozpocznie się w październiku 2023 r. Współpracujący ze mną studenci chętnie biorą udział w kongresach krajowych i zagranicznych. Współpraca i zaangażowanie studentów w prowadzone przeze mnie projekty naukowe zaowocowały przyznaniem trzeciego miejsca w sesji: „Molekularne Podłoże Chorób” studentowi Krzysztofowi Łuszczynskiemu za pracę „*Rola genu ABCA4 w fizjologii i patologii komórek naskórka*” na XIV Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej „Postępy w Badaniach Biomedycznych”, która odbyła się 04.03.2022 r.

4.1.3. Promotorstwo prac dyplomowych

W ramach wspierania rozwoju młodych naukowców jestem promotorem pomocniczym dwóch słuchaczy Szkoły Doktorskiej (mgr Marty Soszyńskiej oraz mgr Michała Komorowskiego) WUM.

Obecnie jestem także promotorem pracy magisterskiej pt. „*Ekspresja genów EVER w mysim modelu łuszczycy*” studenta I roku studiów II stopnia (magisterskich) na kierunku Biotechnologia w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego (SGGW) w Warszawie. Realizacja zadań w ramach badań do pracy magisterskiej rozpocznie się we wrześniu 2023 r.

4.2. DZIAŁALNOŚĆ POPULARYZUJĄCA NAUKĘ

4.2.1. Recenzje

Jestem aktywnym recenzentem w czasopismach indeksowanych o wysokim współczynniku oddziaływania. W latach 2021-2023 byłam recenzentką 5 publikacji zgłoszonych do renomowanych czasopism naukowych: „Cells” [5-letni Impact Factor: 6.7 (2022), JCR - Q2 (Cell Biology)], „Metabolites” [5-letni Impact Factor: 4.5 (2022)], „Pharmaceuticals” [5-letni Impact Factor: 4.9 (2022)] oraz „International Journal of Health and Environmental Research and Public Health”.

4.2.2. Udział w konferencjach naukowych

Od 2019 r. uczestniczę w pracach Komitetu Naukowego jako członek oraz jako Juror podczas Ogólnopolskiej Konferencji Postępy w Badaniach Biomedycznych (PBB). Warto również podkreślić, że współpracujący ze mną studenci koła HESA aktywnie uczestniczyli w organizacji w/w konferencji pełniąc w niej liczne funkcje od członków Komitetu Organizacyjnego, przez Przewodniczących Obrad Konferencji (lek. Justyna Konys, 2019 r.), do Przewodniczącego

Komitetu Organizacyjnego (p. Krzysztof Łuszczynski, 2020 rok). W **2019 r.**, **2021 r.** oraz **2023 r.** **miałam zaszczyt uczestniczyć w tej konferencji jako juror w sesjach:** Genetyka (PBB edycja 10), Genetyka Medyczna + Mechanizmy Regulacji Układu Odpornościowego + Medycyna Regeneracyjna (PBB edycja 11) oraz Medycyna Regeneracyjna (PPB edycja 14).

Ponadto wraz ze współpracującymi ze mną studentami koła naukowego HESA prezentowaliśmy wyniki z naszych prac badawczych na ogólnokrajowych i międzynarodowych konferencjach:

15.09.2017: **Ścieżyńska A.**; *Sekwencjonowanie następnej generacji i co dalej? Analiza nowych mutacji miejsc składania na przykładzie genu ABCA4*. 51. Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Warszawa, Polska

30.11.2019: **Ścieżyńska A.**, Soszyńska M., Komorowski M., Podgórska A., Krześniak N., Nogowska A., Smolińska M., Szulborski K., Szaflik J. P., Noszczyk B., Ołdak M., Malejczyk J.; *Ludzkie mieszki włosowe jako model do analizy patogenności wariantów genu ABCA4 u pacjentów z dziedzicznymi dystrofiami siatkówki*; X Ogólnopolska Konferencja Postępy w Badaniach Biomedycznych, Warszawa, Polska

30.11.2019: **Ścieżyńska A.**, Sobiepanek A., Kowalska P. D., Komorowski M., Grzywa T. M., Krześniak N., Włodarski P., Galus R., Kobiela T., Malejczyk J.; *Nowa metoda nieenzymatycznej izolacji melanocytów oraz komórek czerniaka do zastosowań biomedycznych*; X Ogólnopolska Konferencja Postępy w Badaniach Biomedycznych, Warszawa, Polska

20-21.11.2020: Sobiepanek A., Kowalska P.D., Milner-Krawczyk M., **Ścieżyńska A.**, Grzywa T.M., Włodarski P., Galus R. Lekka M., Kobiela T.; *New melanoma prognostic markers and therapy monitoring by means of label-free methods*; XXIV Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, Polska

21-23.05.2021: Musolf P., Soszyńska M., **Ścieżyńska A.**, Sobiepanek A.; *Optimizing the multi-cell isolation process to approach the real-life interactions of skin cells in vitro*; IX Międzyuczelniane Sympozjum Biotechnologiczne "Symbioza", Warszawa, Polska

26-28.02.2021: Musolf P., Baran J., **Ścieżyńska A.**, Staniszevska M., Sobiepanek A.; *Rola mastocytów w nadzorze odpornościowym procesów fizjologicznych i patologicznych skóry*; Nowe Trendy w Badaniach Naukowych, Kraków, Polska

19-20.11.2021: Piasek A. M., Musolf P., Soszyńska M., **Ścieżyńska A.** Sobiepanek A.; *Establishing skin cell spheroids as a model of the artificial skin*; XXV Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, Polska

04.03.2023: Levkovych I., Piasek A. M., Musolf P., Chmielewska H., Soszyńska M., **Ścieżyńska A.**, Sobiepanek A.; *Od monokultur 2D do ekwiwalentu skóry: wytwarzanie i stosowalność w badaniach in vitro*; XIV Ogólnopolska Konferencja Postępy w Badaniach Biomedycznych, Warszawa, Polska

04.03.2023: Łuszczynski K., Radziszewski M., Soszyńska M., Komorowski M., **Ścieżyńska A.**; *Rola genu ABCA4 w fizjologii i patologii komórek naskórka*; XIV Ogólnopolska Konferencja Postępy w Badaniach Biomedycznych, Warszawa, Polska

AUTOREFERAT | dr n. med. Aneta Ścieżyńska

21.04.2023: Łuszczynski K., Radziszewski M., Soszyńska M., Komorowski M., **Ścieżyńska A.**; *Importance of the ABCA4 gene in physiology and pathology of skin epithelial cells*; 18th Warsaw International Medical Congress, Warszawa, Polska

4.2.3. Udział w towarzystwach naukowych

Chęć pogłębiania zdobytej wiedzy i możliwość wymiany wzajemnych doświadczeń naukowych z ekspertami w danej dziedzinie sprawiły, że od 2015 r. jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Biologii Medycznej, natomiast od 2022 r. należę do Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików.

4.2.4. Inna działalność

Dnia 26.05.2020 roku uczestniczyłam w posiedzeniu komisji doktorskiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM w charakterze sekretarza podczas obrony rozprawy doktorskiej lek. Alicji Krejner-Bienias.

4.3. UZYSKANE NAGRODY I WYRÓŻNIENIA

W latach 2012/2013, 2013/2014 oraz 2014/2015 otrzymałam stypendium Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego dla 10% najlepszych doktorantów, oraz stypendium z dotacji projakościowej dla 30% najlepszych doktorantów WUM.

Prace nagrodzone przez Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, w konkursach na najlepsze publikacje:

Nagrodę naukową drugiego stopnia za współautorstwo pracy pt: „**Ścieżyńska A.**, Sobiepanek A, Kowalska PD, Soszyńska M, Łuszczynski K, Grzywa TM, Krześniak N, Góźdz A, Włodarski PK, Galus R, Kobiela T, Malejczyk J. *A Novel and Effective Method for Human Primary Skin Melanocytes and Metastatic Melanoma Cell Isolation*. *Cancers* (Basel). 2021 Dec 13;13(24):6244. doi: 10.3390/cancers13246244”

Nagrodę naukową drugiego stopnia za współautorstwo pracy pt: „**Ścieżyńska A.**, Komorowski M, Soszyńska M, Malejczyk J. *NK Cells as Potential Targets for Immunotherapy in Endometriosis*. *J. Clin. Med.* 2019, 8, 1468”

Nagrodę naukową drugiego stopnia za współautorstwo pracy pt: „**Ścieżyńska A.**, Soszyńska M, Szpak P, Krześniak N, Malejczyk J, Kalaszczyńska; *Influence of Hypothermic Storage Fluids on Mesenchymal Stem Cell Stability: A Comprehensive Review and Personal Experience*. *Cells*. 2021 Apr 28;10(5):1043.”

Nagrodę naukową drugiego stopnia za współautorstwo pracy pt: „Ścieżyńska A, Nogowska A, Sikorska M, Konys J, Karpińska A, Komorowski M, Ołdak M, Malejczyk J. *Isolation and culture of human primary keratinocytes-a methods review*. Exp Dermatol. 2019 Feb;28(2):107-112.

Nagrodę naukową trzeciego stopnia za współautorstwo pracy pt: „Ścieżyńska A, Ruszkowska E, Szulborski K, Rydz K, Wierzbowska J, Kosińska J, Rękas M, Płoski R, Szaflik JP, Ołdak M. *Processing of OPA1 with a novel N-terminal mutation in patients with autosomal dominant optic atrophy: Escape from nonsense-mediated decay*. PLoS One. 2017 Aug 25;12(8)”

Nagrodę naukową trzeciego stopnia za współautorstwo pracy pt: „Ścieżyńska A, Oziębło D, Ambroziak AM, Korwin M, Szulborski K, Krawczyński M, Stawiński P, Szaflik J, Szaflik JP, Płoski R, Ołdak M. *Next-generation sequencing of ABCA4: High frequency of complex alleles and novel mutations in patients with retinal dystrophies from Central Europe*. Exp Eye Res. 2016 Apr;145:93-99”

5. ANALIZA BIBLIOMETRYCZNA

	Przed doktoratem		Po doktoracie	
	IF	MEiN	IF	MEiN
Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe	12,848	125	53,697	1360
Opisy przypadków	-	-	-	-
Prace poglądowe	-	26	10,969	290
RAZEM	12,848	151	64,666	1650

ŁĄCZNIE (przed i po doktoracie):

IF: 77,514

MEiN: 1801 pkt

LICZBA CYTOWAŃ:

Źródło danych (baza)	LICZBA CYTOWAŃ		INDEKS HIRSHA
	Z autocytowaniem	Bez autocytoowań	
Web of Science	142	136	6
Scopus	164	156	7

Podsumowując, na podstawie uzyskanej analizy bibliometrycznej współczynnik IF po obronie doktoratu osiągnął wartość ponad pięciokrotnie wyższą niż przez uzyskaniem stopnia

AUTOREFERAT| dr n. med. Aneta Ścieżyńska

doktora. Liczba punktów MEiN zwiększyła się ponad 10 razy względem punktacji osiągniętej przed uzyskaniem stopnia doktora. Przed obroną rozprawy doktorskiej byłam pierwszym autorem 4 publikacji naukowych, natomiast po obronie doktoratu byłam pierwszym autorem 7 publikacji oraz autorem korespondencyjnym 2 publikacji naukowych. Na dzień 11.09.2023 r. liczba cytowań prac opublikowanych przed obroną rozprawy doktorskiej (bez autocytowań) wynosi 55 według bazy Web of Science i 63 wg bazy Scopus, natomiast liczba cytowań prac opublikowanych po doktoracie jest wyższa i wynosi 81 według bazy Web of Science oraz 93 według bazy Scopus.

