



UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Kierownik Katedry Morfologii i Embriologii Człowieka
Zakładu Histologii i Embriologii
prof. dr hab. Piotr Dzięgiel

Ocena osiągnięcia naukowego pt.: "Zastosowanie komórek skóry jako modelu do badań molekularnego podłoża chorób siatkówki wywoływanych mutacjami genu ABCA4", osiągnięć naukowo-badawczych i aktywności naukowej oraz dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego dr n. med. Anety Ścieżyńskiej w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne

OCENA FORMALNA:

Przedstawione do recenzji materiały w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego dr n. med. Anecie Ścieżyńskiej zarówno w formie drukowanej, jak również zapisane na nośniku elektronicznym, są kompletne i zawierają: wniosek, dane wnioskodawcy, kopia dyplomu doktorskiego, autoreferat, wykaz osiągnięć naukowych stanowiących znaczący wkład w rozwój w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne, analiza bibliometryczna dorobku naukowego, kopie wymaganych dokumentów.

Jako osiągnięcie naukowe rozprawy habilitacyjnej pt.: "Zastosowanie komórek skóry jako modelu do badań molekularnego podłoża chorób siatkówki wywoływanych mutacjami genu ABCA4", zaprezentowano cykl 5 zbieżnych tematycznie prac naukowych, opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym w latach 2019-2023 o łącznej wartości współczynnika IF = 21,767 (560 pkt. wg MEiN).

We wszystkich ww. publikacjach Kandydatka jest pierwszym autorem, a Jej wkład w powstanie opartego na cyklu osiągnięcia, jest dominujący i obejmuje m. in.: opracowanie koncepcji oraz metodyki badań, pozyskanie finansowania (grant Narodowego Centrum

Handwritten signature

Nauki (NCN) Preludium 12/2016/23/N/NZ5/02588), przeprowadzenie eksperymentów, opracowanie oraz analiza uzyskanych rezultatów, sformułowanie wniosków oraz przygotowanie manuskryptów do publikacji.

Ponadto, realizując badania, których efektem jest przedstawiony cykl publikacji osiągnięcia habilitacyjnego, Kandydatka uzyskała finansowanie projektu Narodowego Centrum Nauki - Preludium 12/2016/23/N/NZ5/02588, pt.: „Komórki skóry jako model do badania konsekwencji mutacji w genach powodujących dziedziczne dystrofie siatkówki”, którego była kierownikiem.

Dr Aneta Ścieżyńska podczas studiów inżynierskich i magisterskich brała udział w realizacji mini-grantów studenckich Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego finansowanych w latach 2009 – 2011 („Identyfikacja mutacji w genie *COL8A2* u pacjentów z dystrofią śródbłonkową rogówki Fuchsa i charakterystyka zależności genotypowo-genotypowych”; M15/NM4/2009) oraz w latach 2010 – 2012 („Analiza podłoża genetycznego dystrofii śródbłonkowej rogówki Fuchsa na podstawie identyfikacji polimorfizmu genu *TCF4* w polskiej populacji – potencjalne implikacje kliniczne” 1M15/NM4/2011). Z kolei, w latach 2011 – 2014 była 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). Dodatkowo, w latach 2014-2015 była kierownikiem projektu 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”. Także, w latach 2018 – 2020, we współpracy z Wojskowym Instytutem Higieny i Epidemiologii oraz z Uniwersytetem w Portsmouth, brała udział w realizacji grantu „Kościszko” finansowanego przez Ministerstwo Obrony Narodowej pt. „Genetyczno-proteomiczna analiza receptora purynergicznego P2X7 w warunkach fizjologicznych i patologicznych”. I co chyba najważniejsze, w kontekście wymogów do uzyskania stopnia doktora habilitowanego, w latach 2020 – 2022, pełniła rolę kierownika prac badawczych realizowanych na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym w ramach Grantu „Szybka ścieżka” Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR), podczas których realizowała 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).

Kandydatka jest również współautorką patentu (Pat.240830) „Sposoby wykrywania endometriozy”, który może być wykorzystywany w przygotowaniu szybkiego i bezinwazyjnego testu pomocnego w wykrywaniu endometriozy.

Jeśli chodzi o przebieg kariery zawodowej, to przedstawia się on następująco:
16.02.2010; 15.06.2011 - tytuł zawodowy inżyniera oraz magistra (specjalizacja biotechnologia) uzyskany w Międzywydziałowym Studium Biotechnologii - Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie; 25.11.2015 tytuł diagnosty laboratoryjnego; 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 *ABCA4* u pacjentów z dziedzicznymi chorobami siatkówki). W latach 2011 – 2015, Kandydatka była uczestnikiem Doktoranckiego Studium Medycyny Molekularnej w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (WUM). Od 2014 do 2017 roku była zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, a od roku 2017 (do chwili obecnej) jest adiunktem, w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii WUM w Laboratorium Zaawansowanych Biotechnologii Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii (CEPT) Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

OCENA MERYTORYCZNA:

Osiągnięcie – cykl prac

W przedstawionym autoreferacie, Kandydatka w sposób klarowny prezentuje swoje osiągnięcie naukowe, którego podstawę stanowi cykl pięciu spójnych tematycznie publikacji, dotyczących problematyki wykorzystania komórek skóry (keratynocytów, melanocytów oraz fibroblastów) jako potencjalnego modelu do badań związanych z mechanizmami mutacji w genie *ABCA4*. Od wielu lat uważano, że gen *ABCA4* może być ekspresjonowany wyłącznie w komórkach fotoreceptorowych, co związane jest z jego rolą w mechanizmie mutacji prowadzącej do różnorodnych retinopatii *ABCA4*, a w tym m. in. choroby Stargardta. Ze względu na praktycznie niemożliwe uzyskanie do badań materiału ze struktur tkankowych oka, potwierdzenie ekspresji ww. genu w komórkach skóry mogłoby okazać się doskonałą alternatywą do prowadzenia eksperymentów *in vitro*.



Stąd pierwsza publikacja z cyklu habilitacyjnego właśnie dotyczyła tego zagadnienia (*Isolation and culture of human primary keratinocytes-a methods review. Exp Dermatol.* 2019). Wnikliwy i dogłębny przegląd literatury omawia metody hodowli keratynocytów oraz ich żywotności w aspekcie zastosowanych warunków izolacji oraz jej prowadzenia. Publikacja ta stanowiła przygotowanie do dalszych prac, co zdaniem recenzenta jest jak najbardziej uzasadnione.

Kolejna publikacja została napisana na bazie autorskich doświadczeń w zakresie stworzenia optymalnego oraz wydajnego protokołu hodowli melanocytów z zastosowaniem techniki hodowli eksplantów skóry (*A Novel and Effective Method for Human Primary Skin Melanocytes and Metastatic Melanoma Cell Isolation. Cancers (Basel).* 2021). Opracowana metoda jest nowatorska i może być stosowana w szeroko pojętych badaniach w zakresie fizjologii i patologii melanocytów. Dodatkowo, opracowana metoda umożliwia uzyskanie melanocytarnych sferoidów z pigmentem, które mogą być hodowane z użyciem nowego podłoża. Jeszcze jednym efektem przeprowadzonych w tym zakresie eksperymentów było wykorzystanie opracowanej metodyki do łatwej izolacji komórek czerniaka, co może mieć szczególne znaczenie w onkologii eksperymentalnej.

Trzecia publikacja (*Role of geneticin in isolation and culturing of skin melanocytes and melanoma cells. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej.* 2023), opisuje wykorzystanie bezpiecznych stężeń genetycyny w hodowlach melanocytów oraz komórek czerniaka, a także przedstawia metodykę umożliwiającą usunięcie fibroblastów z ww. hodowli komórkowych. Można zatem stwierdzić, że publikacja ta jest niejako kontynuacją publikacji poprzedniej i pokazuje dalsze doskonalenie warsztatu badawczego przez Kandydatkę.

Mając do dyspozycji pierwotne, ludzkie linie komórkowe keratynocytów, fibroblastów oraz melanocytów, Habilitantka mogła przejść do dalszych eksperymentów, polegających na analizie ekspresji pełnej długości transkryptu genu *ABCA4* (*Molecular Analysis of the ABCA4 Gene Mutations in Patients with Stargardt Disease Using Human Hair Follicles. Int J Mol Sci.* 2020), co jest przedmiotem kolejnej i czwartej już publikacji z cyklu habilitacyjnego. Nasilenie ekspresji genu *ABCA4* zostało określone na poziomie mRNA i białka w ludzkich keratynocytach, melanocytach, fibroblastach oraz mieszkach włosowych brwi pobranych od osób z grupy kontrolnej. Występowanie pełnej długości transkryptu genu *ABCA4* została potwierdzona z wykorzystaniem metody sekwencjonowania Sangera przy użyciu starterów zaprojektowanych przez Kandydatkę. Ekspresję genu *ABCA4* potwierdzono także na poziomie białka, gdzie z wykorzystaniem metody Western Blot w badanych ww. komórkach wykazano białko o masie cząsteczkowej około 250 kDa, odpowiadające wielkości białka *ABCA4*. Co ciekawe, największe nasilenie ekspresji genu *ABCA4* stwierdzono w mieszkach

włosowych. Mając na uwadze powyższe rezultaty, Habilitantka postanowiła sprawdzić funkcjonalne konsekwencje wybranych mutacji w obrębie genu *ABCA4*, w mieszkach włosowych pacjentów z chorobą Stargardta. Analiza z zastosowaniem metody qRT-PCR ekspresji genu *ABCA4* w mieszkach włosowych badanych pacjentów pokazała obniżoną jego ekspresję w porównaniu do osób z grupy kontrolnej. Podsumowując, można stwierdzić, że wykorzystanie mieszków włosowych do badań dotyczących ekspresji genu *ABCA4*, może stać się przyczynkiem do pogłębionych i rozszerzonych eksperymentów mających na celu dokładniejsze wyjaśnienie mechanizmów związanych z mutacjami tego genu w patogenezie retinopatii *ABCA4*.

Ostatnia publikacja z cyklu osiągnięcia habilitacyjnego (*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*), dotyczy badania funkcji genu *ABCA4* w komórkach skóry. Do tej pory brak tego typu badań i Habilitantka jest prekursorką takiego podejścia do ww. problemu badawczego. W pierwszym etapie przeprowadzonych eksperymentów, określono lokalizację białka-transportera *ABCA4* na poziomie komórkowym, wykazując jego obecność w siateczce śródplazmatycznej oraz mitochondriach. Badania wykonano z wykorzystaniem metody immunofluorescencyjnej. Ze względu na rolę retinoidów w regulacji cyklu mieszków włosowych oraz transportu melanosomów z melanocytów do keratynocytów i różnicowaniu komórek, w publikacji przedstawiono wpływ all-trans retinalu na ekspresję genu *ABCA4* głównie w różnicujących się keratynocytach oraz nieróżnicujących się komórkach macierzystych mieszków w włosowych. Wykazano, że dodanie do komórek all-trans retinalu zwiększa ekspresję mRNA *ABCA4* w sposób zależny od dawki aż do dawki toksycznej. All-trans retinal zwiększa ekspresję genu *ABCA4* w keratynocytach oraz komórkach mieszków włosowych. Na podstawie uzyskanych rezultatów Kandydatka pokazała potencjalną rolę transportera *ABCA4* w komórkach skóry, co niewątpliwie stanowi podstawę do prowadzenia dalszych eksperymentów związanych z ww. tematyką.

Podsumowując, można stwierdzić, że przeprowadzone oraz opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, badania Habilitantki wykazały, że komórki skóry i mieszków włosowych pacjentów z retinopatiami genu *ABCA4*, mogą być wykorzystywane jako model w analizie konsekwencji jego mutacji. Jako szczególne nowatorskie odkrycie należy podkreślić stwierdzenie obecności transportera *ABCA4* w komórkach ludzkiej skóry. Niewątpliwie, na szczególną uwagę zasługuje również opracowanie metody izolacji oraz optymalizacji warunków hodowli komórek skóry (keratynocytów, melanocytów), co może mieć szerokie zastosowanie w różnorodnych badaniach w modelu *in vitro*.

Ocena osiągnięć naukowo-badawczych i aktywności naukowej

Dr Aneta Ścieżyńska poza cyklem publikacji przedstawionych w ramach osiągnięcia habilitacyjnego zajmowała się następującą tematyką badawczą popartą opublikowanymi pracami:

1. Molekularne podłoże chorób oczu
2. Molekularna analiza komórek macierzystych
3. Molekularne podłoże endometriozy

Publikacje realizowane w ramach współpracy z naukowcami z innych ośrodków

1. 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 - współpraca z Centrum Archeologii Śródziemnomorskiej Uniwersytetu Warszawskiego.
2. Niderla-Bielińska J, **Ścieżyńska A**, Moskalik A, Jankowska-Steifer E, Bartkowiak K, Bartkowiak M, Kiernozek 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 – współpraca z: Katedrą i Zakładem Patomorfologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego; Zakładem Biologii Medycznej Narodowego Instytutu Kardiologii - Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie.
3. Laskowska AK, Szudzik M, **Ścieżyńska A**, Komorowski M, Szücs 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 - współpraca z Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, oraz Instytutu Biochemii Centrum Badań Biologicznych Węgierskiej Akademii Nauk.

Całokształt dorobku publikacyjnego Kandydatki bez osiągnięcia habilitacyjnego (wg Biblioteki UMW) to: cztery publikacje oryginalne oraz trzy poglądowe (przed uzyskaniem stopnia doktora) oraz trzynaście prac oryginalnych i pięć poglądowych (po uzyskaniu stopnia doktora). Łączny wskaźnik IF = 77,514 oraz liczba punktów wg MEiN = 1801. Prace habilitantki były 136 razy cytowane wg WoS (156 wg Scopus), a indeks H = 6 (wg Scopus 7).



Ocena działalności dydaktycznej, organizacyjnej oraz popularyzującej naukę

Dr Aneta Ścieżyńska prowadzi 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. Od 2017 roku pełni funkcję adiunkta w WUM, a w latach 2021 – 2022 była adiunktem dydaktycznym w Collegium Medicum Uniwersytetu Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie. Od 2021 r. pełni funkcję koordynatora przedmiotu Histologia z Embriologią dla studentów Wydziału Lekarskiego. Kandydatka współpracuje ze studenckim kołem naukowym HESA, działającym przy Zakładzie Histologii i Embriologii WUM, a od 2015 roku jest jego współprowadzącą. Jest promotorem pomocniczym dwóch słuchaczy Szkoły Doktorskiej oraz promotorem pracy magisterskiej pt. „Ekspresja genów EVER w mysim modelu łuszczycy”. Kandydatka wielokrotnie była recenzentem prac publikowanych w renomowanych czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (Cells, Metabolites, Pharmaceuticals, International Journal of Health and Environmental Research and Public Health). Brała także udział w licznych konferencjach naukowych, w tym międzynarodowych oraz jest członkiem Polskiego Towarzystwa Biologii Medycznej, a od 2022 roku Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Mając na uwadze przesłaną mi dokumentację, zawierającą wyczerpujące informacje dotyczące osiągnięcia naukowego, pozostałego dorobku naukowego, współpracy naukowej, działalności dydaktycznej, organizacyjnej oraz popularyzującej naukę, wysoko oceniam dotychczasową działalność Kandydatki. Cykl prac składający się na osiągnięcie habilitacyjne, stanowi znaczący wkład w rozwój nauki w obszarze badań eksperymentalnych powiązanych z kliniką okulistyczną, a w szczególności w rozwój badań dotyczących retinopatii ABCA4. Przeprowadzone eksperymenty oraz uzyskane rezultaty mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia tego zjawiska, a co za tym idzie wdrożenia nowoczesnych terapii w tych chorobach. Opublikowane prace są licznie cytowane, co przemawia o ich rozpoznawalności w międzynarodowym środowisku naukowym. Należy również podkreślić aktywną współpracę naukową, jaką Kandydatka podjęła z ośrodkami badawczym w ramach realizowanych projektów, co stanowi niezaprzeczalny fakt Jej fachowości oraz determinacji naukowej. Również w obszarze działalności dydaktycznej, organizacyjnej oraz popularyzującej naukę dostrzegam dużą aktywność dopełniającą niezwykle pozytywną charakterystykę sylwetki dr Anety Ścieżyńskiej pretendującej do stopnia doktora habilitowanego.



W związku z powyższym jednoznacznie stwierdzam, że dr Aneta Ścieżyńska w mojej ocenie, spełnia wszystkie kryteria do nadania Jej osobie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne, zawarte w Ustawie - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (art. 219), z dnia 20 lipca 2018 roku z późniejszymi zmianami i rekomenduję Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Warszawie, poparcie wniosku o nadanie dr Anecie Ścieżyńskiej stopnia doktora habilitowanego.

Prof. dr hab. Piotr Dziegiel,

Wrocław, dn. 14.03.2024