Politechnika Łódzka
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej

Dr hab. Edyta Gendaszewska-Darmach, prof. uczelni
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

Łódź, dnia 05.02.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Gądarowskiej „Aktywacja komórek dendrytycznych i keratynocytów jako alternatywna metoda oceny działania uczulającego ksenobiotyków"

wykonanej w Instytucie Przemysłu Organicznego Sieci Badawczej Łukasiewicz pod kierunkiem dr hab. inż. Joanny Kalki, prof. PŚ oraz dr Anny Daniel-Wójcik.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka prof. dr hab. inż. Andrzeja Rusina z dnia 6 listopada 2022 r.

Zasadność podjętej tematyki

W przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej jej autorka, mgr Dominika Gądarowska podjęła zadanie opracowania metody *in vitro* oceniającej potencjał uczulający 14 substancji o znanych i zróżnicowanych właściwościach uczulających skórę, która konsoliduje przynajmniej dwa kluczowe etapy reakcji alergicznej, tj. reakcję zapalną keratynocytów oraz aktywację komórek dendrytycznych.

Ocena potencjalnego działania substancji uczulających skórę przed ich wprowadzeniem do obrotu i zastosowaniem przemysłowym jest niezwykle ważna z punktu widzenia indywidualnego bezpieczeństwa zdrowotnego. Badane są zarówno substancje przeznaczone do stosowania jako składniki leków i kosmetyków, jak i użytkowania w gospodarstwach domowych lub miejscu pracy. Wprowadzone ograniczenia dotyczące wykorzystania zwierząt wiążą się z poszukiwaniem coraz doskonalszych metod *in vitro*. Istotnym bodźcem dla rozwoju metod alternatywnych w stosunku do badań *in vivo* stały się przepisy zawarte w Siódmej Poprawce do Dyrektywy Kosmetycznej UE (Dyrektywie 2003/15/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 27 lutego 2003 r.), tj. zakaz wprowadzania do obrotu produktów kosmetycznych testowanych na zwierzętach lub zawierających składniki testowane na zwierzętach (od 11 marca 2009 r.) oraz zakaz testowania na zwierzętach składników i końcowych receptur kosmetyków. Co więcej, etyczna zasada 3R (ang. Replacement, Reduction, Refinement) zakłada zmniejszenie liczby wykorzystywanych zwierząt i zastąpienie ich przez modele *in vitro*, *ex vivo* i *in silico*, a także potrzebę doskonalenia metod alternatywnych.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Dominiki Gądarowskiej doskonale wpisuje się w ten nurt badań. Zastosowane przez Doktorantkę narzędzie oparte o kokultury keratynotyców i komórek dendrytycznych stanowi zaawansowaną alternatywę dla stosowanych obecnie metod *in vitro* pozwalającą na ocenę uszkodzenia komórek skóry po zaaplikowaniu badanej substancji chemicznej. W konsekwencji takie podejście może skrócić czas potrzebny do wykonania niezbędnych analiz oraz ograniczyć koszty. Wybranie takiego celu badań jest znakomitym tematem pracy doktorskiej, który wpisuje się w najnowszy nurt wykorzystania metod *in vitro* w badaniu substancji uczulających skórę.

Charakterystyka i uwagi do pracy

Przedstawiona do recenzji dysertacja została przygotowana w sposób klasyczny dla doktorskich prac eksperymentalnych i zawiera 10 podstawowych rozdziałów. Praca składa się ze 194 stron tekstu wzbogaconego o 39 rysunków i 33 tabele. Po spisie treści pojawia się wykaz skrótów, polskie i angielskie streszczenie, wprowadzenie, wstęp, cel i tezy pracy, w którym mgr Dominika Gądarowska przedstawia powody podjętej tematyki oraz etapy mające doprowadzić do osiągnięcia założonego celu.
W części literaturowej, która obejmuje zarówno rozdział wprowadzenie oraz wstęp omówione zostały zasadnicze zagadnienia związane z rozwojem alergicznego kontaktowego zapalenie skóry, charakterystykę testów *in vivo* stosowanych w ocenie działania uczulającego oraz metod alternatywnych opierających się na metodologii tzw. ścieżek niekorzystnych skutków uwzględniających cztery kluczowe elementy w mechanizmie działania uczulającego na skórę. Pani Gądarowska przedstawiła także opisane w literaturze metody oparte na wykorzystaniu kokultur komórkowych. Zaprezentowane treści są bardzo dobrym wprowadzeniem do kolejnych rozdziałów pracy, w tym metodyki i podsumowującej pracę dyskusji wyników. Warto tutaj zauważyć, iż część teoretyczna zawiera w przeważającej części materiał ujęty w postaci artykułu „Alternative Methods for Skin-Sensitization Assessment" i opublikowany w czasopiśmie *Toxics* (doi: 10.3390/toxics10120740). Nie jest to jednak zarzut, lecz wyraz uznania, zwłaszcza że Pani Gądarowska jest pierwszym i jednocześnie korespondencyjnym autorem (wraz z prof. Joanną Kalką).

- Niemniej jednak jako recenzent pracy chciałaby zwrócić uwagę na zastosowaną w tej części pracy konwencję dotycząca nomenklatury genów. Co do zasady, nazwy genów powinny być pisane kursywą, a nazwy białek prostym krojem czcionki. Tymczasem autorka nie używa takiej konwencji w sposób konsekwentny. Przykładowo na stronie 35 nazwy genów *HMOX1, STC2, ADM i SRD1* zapisane są prawidłowo, natomiast nazwy genów ATF3, DNAJB4, GCLM w mylny sposób wskazujący, że mogą to być nazwy białek. Przykładów takich jest o wiele więcej, jak chociażby nazewnictwo genów w Tabeli 2.3

- Poza tym, na stronie 33 Autorka dysertacji pisze, iż aktywację keratynocytów można ocenić na podstawie analizy ekspresji genów i białek. Co oznacza w tym kontekście ekspresja białek (Doktorantka opisuje w tej części zastosowaniu metody RT-PCR)?

Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
ul. Stefanowskiego 2/22, 90-537 Łódź
tel.: +48 42 631 34 42
e-mail: biochem@info.p.lodz.pl, w5i51@adm.p.lodz.pl
www.p.lodz.pl, www.binoz.p.lodz.pl

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

- Natomiast w Tabeli 2.2 Autorka rozróżnia linie komórkowe transgeniczne oraz reporterowe. Na jakiej podstawie został wykonany ten podział? Czy na przykład linia komórkowa MCF7 AREc32 nie jest linią transgeniczną?

W kolejnych rozdziałach Materiały oraz Metody badawcze opisane zostały odczynniki, materiał biologiczny oraz procedury poszczególnych eksperymentów. W kilku miejscach stosowane procedury zostały opisane dość ogólnie, np. skład podłóż do hodowli komórek nie jest precyzyjny (podawane są objętości odczynników bez wskazania stężenia).

Część Wyniki stanowi bardzo interesujący element pracy doktorskiej Pani Dominiki Gądarowskiej. Należy podkreślić, że umiejętne zaplanowanie badań, sformułowanie tez pracy i konsekwentne ich realizowanie dostarczyły szeregu oryginalnych wyników istotnych pod względem poznawczym i aplikacyjnym. Na uwagę zasługuje nie tylko osiągnięcie ostatecznego celu, czyli określenie punktów końcowych metody właściwych dla keratynocytów i komórek dendrytycznych oraz określenie metody wspólnej hodowli dla tych dwóch typów komórek w celu opracowania metody *in vitro* oceniającej potencjał uczulający substancji, ale również ilość analizowanych parametrów i warunków samej hodowli komórek. Autorka dysertacji zastosowała czteroetapowe podejście, w którym weryfikowała profil uwalniania wybranych cytokin zapalnych przez 3 typy keratynocytów, w tym dwa typy należące do hodowli pierwotnej. Analizowała także w jaki sposób obecność komórek dendrytycznych (2 rodzaje) wpływa na poziom uwalniania cytokin zapalnych uwalnianych przez keratynocyty oraz testowała wpływ sposobu prowadzenia kokultury (pośrednia i bezpośrednia) keratynocytów i komórek dendrytyczych na ekspresję antygenów powierzchniowych na komórkach dendrytycznych.
Ostatecznie Pani Gądarowska sprecyzowała optymalne warunki metody kokultury keratynotytów z komórkami dendrytycznymi. Jako model keratynocytów zostały wybrane komórki NHEK-neonatal, a komórek dendrytycznych linia THP-1 w wariancie hodowli bezpośredniej. Czas ekspozycji na materiały badane został wytypowany jako 24 h, a punkty końcowe określono jako pomiar stężenia IL-1*a* oraz IL-18 w mediach pohodowlanych oraz ocena ekspresji antygenu CD54 na komórkach THP-1. O znaczeniu uzyskanych wyników świadczy fakt, że stosując model predykcyjny oparty na analizie ekspresji antygenu CD54 oraz poziomu IL-18 prawidłowo sklasyfikowano wszystkie badane substancje uczulające (9/9), oraz cztery z pięciu substancji nieuczulających (4/5).

Podsumowując, nakreślone na początku cele pracy, które stanowią złożone problemy badawcze zostały zrealizowane w sposób skrupulatny i przemyślany. Nie oznacza to jednak, że tematyka badawcza została w tym obszarze wyczerpana. Wręcz przeciwnie - otwiera nowe pola do dyskusji, a otrzymane wyniki stanowią punkt wyjścia do dalszych badań. Dlatego prosiłabym Doktorantkę o kilka zdań na temat możliwości wykorzystania w praktyce uzyskanych wyników.

Ponadto, podczas lektury pracy doktorskiej nasunęły mi się następujące pytania. Prosiłabym o ich skomentowanie

- Czy oznaczano przeżywalność komórek w kokulturach? Teoretycznie, na przykład

Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
ul. Stefanowskiego 2/22, 90-537 Łódź
tel.: +48 42 631 34 42
e-mail: biochem@info.p.lodz.pl, w5i51@adm.p.lodz.pl
www.p.lodz.pl, www.binoz.p.lodz.pl

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

inny skład podłóż hodowlanych w kokulturach w porównaniu z monokulturami może mieć wpływ na ostateczny wynik

- Jak Autorka tłumaczy zjawisko zwiększonego sygnału (> 100% w porównaniu z komórkami nie traktowanymi DNCB) przy niskich stężeniach DNCB wskazujące na indukowaną aktywność metaboliczną komórek NHEK-neonatal (Rys. 6.1). To samo pytanie dotyczy danych przedstawionych na Rysunku 6.30 i 6.31. Czy podczas oznaczania przeżywalności zmieniano podłoże przed dodaniem odczynnika AlamarBlue?

- Doktorantka na stronie 79 pisze, iż najbardziej wrażliwym na działanie DNCB typem komórek okazały się keratynocyty pochodzenia noworodkowego i że znaczący spadek żywotności obserwowano już przy stężeniach w przedziale 0,63 - 1,25 µg/ml. Tymczasem z Rysunku 6.1 wynika, że przeżywalność komórek NHEK- neonatal przy stężeniu DNCB 0,63 µg/ml jest na poziomie 100%. Co więcej, to komórki Keratinosens charakteryzowały się zmniejszoną żywotnością w obecności mniejszych dawek DNCN, gdyż statystycznie znamienny spadek zaobserwowano przy stężeniu 0,16 µg/ml. Największa wrażliwość komórek Keratinosens na DNCB stosowany w mniejszych stężeniach ma również odzwierciedlenie w wyznaczonych przez autorkę w wartościach CV75. Proszę o komentarz dotyczący tych wyników.

- Jakie stężenie DNCB stosowano w analizie stężenia cytokin w mediach pohodowlanych monokultur keratynocytów (Rysunek 6.3, 6.5, 6.7 i 6.9)? Poza tym na w/w rysunkach brak jest oznaczenia znamienności statystycznej oraz wskazania odchylenia standardowego bądź słupków błędów - czy wynika to z faktu, że dane pochodzą z jednego oznaczenia?

- Dlaczego przy ocenie przeżywalności w obecności DNCB stosowano różne stężenia substancji dla każdego typu komórek (Rysunek 6.11)? W przypadku MMP oraz EU zakres stężeń został dobrany w sposób identyczny dla każdego typu komórek (Rys. 6.12)? To samo pytanie dotyczy Rysunku 6.29.

- Z czego może wynikać różnica w wyznaczonych wartościach CV75 w przypadku komórek NHEK – adult hodowanych w obecności DNCB (Tabela 6.1 oraz 6.2 i 6.6)?

- Czy przeprowadzono porównanie modelu hodowli kokulturowej oraz monokulturowej dla panelu 14 substancji ostatecznie wybranego punktu końcowego w postaci oceny ekspresji CD54 oraz IL-1α?

W pracy nie znajduję poważniejszych błędów edytorskich czy też istotnych niedociągnięć. Kilka z nich zamieszczam poniżej

- „Udowodniono, że keratynocyty noworodkowy produkują większe ilości TNF-alfa w odpowiedzi na inaktywowane termicznie mikroorganizmy w porównaniu do keratynocytów noworodkowych"

Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
ul. Stefanowskiego 2/22, 90-537 Łódź
tel.: +48 42 631 34 42
e-mail: biochem@info.p.lodz.pl, w5i51@adm.p.lodz.pl
www.p.lodz.pl, www.binoz.p.lodz.pl

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

- Na rysunku 6.2 nie wskazano których komórek dotyczą poszczególne wykresy
- Strona 44 : TGF-b zamiast TGF-beta
- Strona 56: CaCl zamiast CaCl2

Niemniej jednak moje uwagi krytyczne i komentarze nie podważają bardzo pozytywnej oceny wartości naukowej pracy, a są jedynie uwagami do dyskusji.

Podsumowanie

Po zapoznaniu się z dysertacją doktorską Pani Dominiki Gądarowskiej stwierdzam, że Doktorantka bardzo trafnie wybrała tematykę badań, jasno sformułowała cel pracy, dobrze zaplanowała i wykonała doświadczenia, wykazała się umiejętnością interpretacji i dyskusji oraz wyciągania właściwych wniosków, a także umiejętnie sformułowała podsumowanie pracy. Przedłożona do recenzji praca doktorska jest więc kompleksowym opracowaniem stanowiącym wartościowy przyczynek do istniejącego stanu wiedzy, zawiera również elementy nowatorskie i spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 593 z późniejszymi zmianami). Na tej podstawie wnioskuję więc do Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Politechniki Śląskiej o przyjęcie rozprawy „Aktywacja komórek dendrytycznych i keratynocytów jako alternatywna metoda oceny działania uczulającego ksenobiotyków" i dopuszczenie mgr Dominiki Gądarowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Podpisała Edyta Gendaszewska-Darmach

Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
ul. Stefanowskiego 2/22, 90-537 Łódź
tel.: +48 42 631 34 42
e-mail: biochem@info.p.lodz.pl, w5i51@adm.p.lodz.pl
www.p.lodz.pl, www.binoz.p.lodz.pl

HR EXCELLENCE IN RESEARCH