

Wrocław, 16.01.2023r.

Dr hab. inż. Katarzyna Piekarska, prof. uczelni
Politechnika Wrocławska
Wydział Inżynierii Środowiska
Katedra Inżynierii Ochrony Środowiska

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Gądarowskiej
pt.: „Aktywacja komórek dendrytycznych i keratynocytów jako alternatywna
metoda oceny działania uczulającego ksenobiotyków”**

opracowana na podstawie pisma

Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny

inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka Politechniki Śląskiej

Pana prof. dr hab. inż. Andrzeja Rusina z dnia 08.11.2022r.

(Promotor pracy: dr hab. inż. Joanna Kalka, Katedra Biotechnologii Środowiskowej
Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechnika Śląska;

Promotor pomocniczy dr Anna Daniel-Wójcik, Sieć Badawcza Łukasiewicz- Instytut
Przemysłu Organicznego Oddział w Pszczynie)

1. Zasadność doboru tematyki

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Dominiki Gądarowskiej prezentuje wyniki badań, których celem było opracowanie metody *in vitro* przy pomocy której możliwe będzie określanie działania uczulającego na skórę, substancji chemicznych, związanego z dwoma etapami reakcji alergicznej: reakcji zapalnej keratynocytów (KC) oraz aktywacji komórek dendrytycznych (DC).

Tematyka badawcza jest bardzo interesująca i wnosi nowe informacje do immunotoksykologii związanej z alergicznym kontaktowym zapaleniem skóry (ang. *Allergic Contact Dermatitis*, ACD) występującym z coraz większą częstotliwością w populacji ludzkiej w odpowiedzi na coraz większe zanieczyszczenie gleby, wody i powietrza atmosferycznego. Szacuje się, że problemy skórne związane z kontaktem ze związkami chemicznymi ma około 40% osób dorosłych i 20-30% dzieci i młodzieży. Tak więc tego typu problemy skórne stały się obecnie poważnym problemem zarówno zdrowotnym jak i środowiskowym. Tym bardziej, że współcześnie przypisuje się ich częstsze występowanie właśnie czynnikom środowiskowym, a nie genetycznym, choć oczywiście predyspozycja genetyczna też ma tu duże znaczenie. Do substancji chemicznych przyczyniających się do kontaktowego zapalenia skóry możemy zaliczyć, między innymi: nikiel, chrom, kobalt, formaldehyd, substancje zapachowe czy konserwanty. Nie bez znaczenia na rozwój alergii kontaktowej mają zanieczyszczenia obecne w powietrzu atmosferycznym i powietrzu pomieszczeń. Często nie wywołują ACD bezpośrednio, ale pośrednio wpływają na produkcję mediatorów stanu zapalnego lub wzmacniają odpowiedź immunologiczną (efekt adiuwantowy). Adiuwantem są np. cząsteczki spalin z silników Diesla (ang. DEP). Szereg związków chemicznych zanieczyszczających powietrze może przyczynić się także do rozwoju postaci rozsianej alergii kontaktowej obejmującej skórę odsłoniętych części ciała (ang. *Airborne Contact Dermatitis*, ABCD). Obecny w środowisku przyrodniczym mikroplastik oraz nanoplastik może także wywoływać problemy skórne mimo, że główną drogą ekspozycji na te czynniki u człowieka jest układ pokarmowy i oddechowy.

Ze względu na narastający problem alergicznego kontaktowego zapalenia skóry podawanie informacji na temat działania uczulającego na skórę związków chemicznych dopuszczanych na rynek są wymagane przez różne akty prawne, między innymi: w *ocenie zagrożeń i ryzyka chemikaliów* Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD, 2014), Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady w *sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów* (ang. *Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals*, REACH, 2007) czy Globalny Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów ONZ (ang. *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*, UN GHS, 2021). Dzięki rozporządzeniu REACH pod kontrolą znalazły się substancje wprowadzone na rynek zarówno po, jak i przed 1981r. Z kolei Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady (EU, 2008) uregulowała negatywny wpływ na środowisko przyrodnicze wynikający z wytwarzania odpadów i gospodarowania nimi szczególnie zwracając uwagę na odpady niebezpieczne. W ocenie działania uczulającego zanieczyszczeń na skórę istnieją również wytyczne, zalecane przez te organizacje, zawierające procedury badawcze związane z testami toksykologicznymi wykorzystującymi różne systemy badawcze, głównie wykonywanymi *in vivo* (łac. na żywym). Obecnie dąży się jednak do ograniczania badań na zwierzętach. Pojawiły się więc alternatywne metody oceny ryzyka częściowo lub w pełni zastępujące eksperymenty z udziałem zwierząt. Rozporządzenie REACH zaleca cztery podejścia do takich badań toksykologicznych, są to: metody *in silico*, bazujące na modelach i obliczeniach komputerowych danego związku; modele *in chemico*, metody chemiczne badające właściwości zanieczyszczeń; metody *in vitro* (łac. w szkle), badania procesów biologicznych w warunkach sztucznych poza żywym organizmem; metody *ex vivo*, wykorzystujące izolowane tkanki i narządy zwierzęce. Zainteresowanie metodami niezwierzęcymi oceniającymi potencjał uczulający na skórę rośnie w ostatnich latach, bowiem w 2009r. wprowadzono w Europie zakaz testowania nowych składników kosmetyków na zwierzętach, z kolei aktualizacja rozporządzenia REACH z 2017r. wymaga stosowania metod *in vitro* i *in silico* jako metod pierwszego wyboru w badaniach toksykologicznych.

Metody alternatywne w badaniach alergicznego kontaktowego zapalenia skóry wykorzystują model tzw. ścieżek niekorzystnego wyniku (ang. *Adverse Outcome Pathways*, AOP), który identyfikuje sekwencję zdarzeń molekularnych i komórkowych wymaganych do wywołania efektu toksycznego w momencie narażenia organizmu na działanie związku chemicznego. Tak więc AOP jest konstruktem analitycznym opisującym sekwencyjny łańcuch przyczynowo powiązanych zdarzeń na różnych poziomach organizacji biologicznej, które prowadzą do niekorzystnych skutków zdrowotnych lub ekotoksykologicznych.

Wszystko to **potwierdza aktualność i trafność wyboru tematyki rozprawy doktorskiej przez Panią mgr Dominikę Gądarowską i Jej promotora Panią dr hab. inż. Joannę Kalkę oraz promotora pomocniczego Panią dr Annę Daniel- Wójcik**. Badania wpisują się bowiem w poszukiwanie kluczowych zdarzeń w procesie uczulenia skóry.

2. Charakterystyka pracy

Rozprawa doktorska Pani mgr Dominiki Gądarowskiej została przygotowana w ramach programu Doktorat wdrożeniowy (II edycja) Ministerstwa Edukacji i Nauki. Została zawarta na 194 stronach i jest podzielona na 10 zasadniczych części poprzedzonych wykazem skrótów oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. Na zasadniczą część pracy składa się wprowadzenie do tematyki badań, wstęp, cel i tezy pracy wraz z jej zakresem i metodyką badań, wyniki i ich dyskusja, wnioski, spis pozycji literaturowych (190 pozycji) oraz załączniki zawierające tabele z wynikami badań.

W wprowadzeniu do tematyki rozprawy Doktorantka naświetliła zasadność podjęcia badań nad opracowaniem metodyki łączącej dwa kluczowe etapy, tj. reakcje zapalną keratynocytów i aktywację komórek dendrytycznych, występujące w procesie działania uczulającego na skórę, zgodnie z AOP, obejmującego cztery kluczowe zdarzenia (ang. *key events*): KE1 wiązanie haptenu z białkami skóry, KE2/3 aktywacja keratynocytów i aktywacja komórek dendrytycznych, KE4 aktywacja i proliferacja limfocytów T w węzłach chłonnych.

We wstępie obejmującym przegląd literatury Doktorantka przedstawiła mechanizm powstawania alergicznego kontaktowego zapalenia skóry w którym kluczową rolę pełnią komórki naskórka keratynocyty oraz komórki dendrytyczne skóry wraz z charakterystyką i opisem metod badawczych stosowanych w mierzeniu kluczowych zdarzeń (KE) w ścieżkach niekorzystnych skutków (AOP). W końcowej części wstępu scharakteryzowano metody hodowli komórek naskórka porównując najczęściej stosowane metody uwzględniające tylko jeden typ komórek związany z konkretnym kluczowym zdarzeniem w procesie uczulenia skóry z możliwością zastosowania metody kokultury, w której hodowane mogą być np. dwa rodzaje komórek. Taka hodowla umożliwiła zbadanie wzajemnych oddziaływań dwóch populacji komórek. Autorka przedstawiła modele hodowli komórkowych dwuwymiarowych (2D) i trójwymiarowych (3D) w odniesieniu do stosowanych w swoich badaniach keratynocytów i komórek dendrytycznych.

Ta część rozprawy, uwzględniająca dane z najnowszego piśmiennictwa, jest bardzo dobrym wprowadzeniem do badań własnych Autorki przedstawionych w kolejnych rozdziałach.

W rozdziale 3 określono cel pracy, sformułowano tezę pracy i trzy tezy częściowe oraz w sposób syntetyczny zaprezentowano zakres badań, który obejmował cztery etapy badań eksperymentalnych. Dodatkowo, dla większej przejrzystości, Doktorantka opracowała graficzne schematy ilustrujące czynności wykonywane na poszczególnych etapach badań.

Głównym celem naukowym rozprawy doktorskiej Pani mgr Dominiki Gądarowskiej było opracowanie metody łączącej minimum dwa kluczowe etapy w zakresie działania uczulającego na skórę tj. reakcji zapalnej keratynocytów i aktywacji komórek dendrytycznych.

Doktorantka sformułowała główną **tezę badawczą rozprawy**: *możliwe jest opracowanie metody badawczej z zastosowaniem kokultury keratynocytów i komórek dendrytycznych, która będzie łączyła przynajmniej dwa kluczowe etapy w zakresie działania uczulającego na skórę, odpowiednią do oceny działania haptenu i prohaptenu oraz trzy tezy częściowe: 1) ocena potencjału uczulającego substancji badanych możliwa jest na podstawie poziomu cytokin zapalnych keratynocytów hodowanych w kokulturze z komórkami dendrytycznymi, 2) możliwa jest ocena potencjału uczulającego substancji badanych na podstawie ekspresji antygenów powierzchniowych na komórkach dendrytycznych hodowanych w kokulturze z keratynocytami, 3) kokultura keratynocytów i komórek dendrytycznych jest lepszym modelem predykcyjnym potencjału uczulającego substancji badanych niż modele monokulturowe; predykcja właściwości uczulających dokonuje się na podstawie ekspresji antygenów powierzchniowych komórek dendrytycznych oraz poziomu cytokin zapalnych keratynocytów hodowanych w kokulturze KC/DC.*

Sposób przeprowadzania badań, przygotowanie próbek do analiz, charakterystykę badanych związków oraz opis wykorzystanych metod badawczych i ich protokołów Pani mgr Dominika Gądarowska zamieściła w rozdziałach 4 i 5. Biologicznym systemem badawczym były trzy rodzaje ludzkich komórek KC oraz dwa typy komórek DC-podobnych. Wykorzystano 16 związków chemicznych o znanym działaniu uczulającym na skórę oraz substancji nie uczulających, w tym substancji o działaniu drażniącym. **Dobór metod badawczych został zaplanowany prawidłowo.** Doktorantka prowadziła hodowle komórkowe *in vitro*, dążąc do

opracowania autorskiej kokultury badanych komórek naskórka, sprawnie posługując się metodami mikrobiologicznymi, biochemicznymi i immunologicznymi zarówno podstawowymi jak i bardziej zaawansowanymi wymagającymi obsługi specjalistycznego sprzętu laboratoryjnego (np. analiza cytometryczna, analiza ELISA, mikroskopia odwrócona, analiza fluorescencji). W trakcie eksperymentów zastosowano dwa rodzaje kokultury: pośrednią i bezpośrednią w celu uwzględnienia wzajemnego oddziaływania na różnych poziomach między badanymi komórkami zaangażowanymi w proces uczulania skóry. W pierwszym etapie badań Doktorantka oznaczała profil uwalniania cytokin zapalnych przez trzy rodzaje keratynocytów (komórki pierwotne NHEK- neonatal, komórki pierwotne NHEK- adult, ustanowioną linię komórkową KeratinosensTM) hodowanych w monokulturze pod wpływem substancji uczulającej jakim był 2,4- dinitrochlorobenzen (DNCB) w celu określenia optymalnego stężenia KC i optymalnego czasu ich ekspozycji na substancję uczulającą, tak aby osiągnąć jak największe stężenie produkowanych cytokin. Etap drugi polegał na oznaczaniu profilu uwalniania cytokin zapalnych przez wybrane w pierwszym etapie dwa rodzaje KC (NHEK- neonatal i NHEK- adult) hodowane w kokulturze bezpośredniej w pięciu kombinacjach z dwoma rodzajami komórek dendrytycznych (THP-1 i MUTZ-3) w obecności trzech substancji uczulających i dwóch nieuczulających w celu weryfikacji, czy kokultura ma wpływ na stężenie cytokin zapalnych oraz czy to badanie może być markerem końcowym w opracowywanej metodyce. W trzecim etapie badań Doktorantka prowadziła eksperymenty oceniające ekspresję dwóch antygenów powierzchniowych (CD54 i CD86) komórek DC hodowanych w kokulturze bezpośredniej i pośredniej z komórkami KC w celu wybrania typu komórek DC i KC do dalszych badań. Komórki poddawano ekspozycji na trzy substancje uczulające oraz dwie nieuczulające. Z kolei celem czwartego etapu była walidacja wytypowanej metody kokulturowej KC/DC. W tym celu przeprowadzono badania na wybranych w poprzednich etapach komórkach NHEK-neonatal/ THP-1 hodowanych w postaci kokultury bezpośredniej do oceny potencjału uczulającego 14 substancji chemicznych scharakteryzowanych w tabeli 4.3. (9 substancji o znanym działaniu uczulającym i 5 substancji nieuczulających). W celu określania stężeń ekspozycyjnych badanych substancji wyznaczano wartość CV75, czyli takie stężenie związku chemicznego przy którym żywotność komórek utrzymuje się na poziomie 75%. Ponadto, w analizie uzyskanych wyników, Doktorantka przeprowadziła analizę statystyczną w programie *Statistica 10* z wykorzystaniem testu t-Studenta (analiza istotności statystycznej wyników) oraz w programie *PQStat v.1.8.4.* (krzywe ROC i ocena jakości klasyfikacji).

Następne rozdziały dysertacji to Wyniki (rozdział 6) i Dyskusja (rozdział 7). W rozdziale 6 Doktorantka dokładnie omówiła i przedstawiła, w sposób przejrzysty- graficzny zgodnie z wcześniej opisanymi etapami badań, uzyskane wyniki. Wartości liczbowe badanych parametrów zostały natomiast zebrane tabelarycznie w załączniku do pracy (rozdział 10). Każdy podrozdział kończy się syntetycznym podsumowaniem opisującym najważniejsze osiągnięcia uzyskane w kolejnych etapach badań. Szczególnie cenne informacje znalazły się w rozdziale 7 dotyczącym dyskusji otrzymanych wyników z doniesieniami innych autorów oraz w rozdziale 8 zawierającym wnioski wraz z nakreślonymi dalszymi kierunkami badań eksperymentalnych. **W tych rozdziałach Autorka porządkuje wyniki badań, dokonuje ich syntezy uwypuklając wartości poznawcze i aplikacyjne rozprawy, potwierdza realizację celu pracy wraz z jej zakresem oraz potwierdza główną tezę pracy i tezę częściowe.**

3. Ocena rozprawy

Podjęty przez Panią mgr Dominikę Gądarowską problem naukowy, jak już stwierdzono wcześniej, jest bardzo istotny i aktualny, bowiem wpisuje się w opracowywanie metod badawczych będących alternatywą do badań na zwierzętach w celu wypełnienia wymagań w zakresie informacji dotyczącej substancji chemicznych zgodnie z rozporządzeniem REACH. Metody alternatywne, opisane w tym rozporządzeniu, to między innymi metody *in vitro*, którymi zajmowała się Doktorantka, czyli badania procesów biologicznych przeprowadzane w warunkach sztucznych, poza organizmem żywym.

Podstawą próby opracowania metody alternatywnej do oceny działania uczulającego substancji na skórę, zgodnie z zasadą kluczowych zdarzeń KE1-KE4 występujących w tym procesie i wpisujących się w tzw. ścieżkę niekorzystnych skutków (AOP, OECD) było, wynikające ze studiów literaturowych Autorki, stwierdzenie, iż aktualnie zatwierdzone do celów regulacyjnych metody alternatywne obejmują tylko jedno kluczowe zdarzenie w procesie uczulenia skóry. Stąd więc, podjęte przez Doktorantkę badania nad procesami zachodzącymi w hodowli dwóch populacji komórek naskórka, keratynocytów oraz komórek dendrytycznych, pełniących kluczową rolę w immunologicznym procesie indukcji alergicznego kontaktowego zapalenia skóry w ramach kokultury. **Taki sposób hodowli pozwolił na integrację kilku kluczowych zdarzeń w jednym teście bardziej odzwierciedlającym procesy zachodzące w żywym organizmie poprzez opisanie łańcucha przyczynowo powiązanych zdarzeń na poziomie komunikacji międzykomórkowej.**

Na podkreślenie zasługuje także wybór odpowiedniego systemu badawczego. Autorka w celu wytypowania do swojej metody badawczej komórek skóry przeprowadziła badania porównawcze zarówno na komórkach keratynocytów pierwotnych pochodzących z naskórka noworodka oraz naskórka dorosłych jak i na linii komórek nieśmiertelnych. Te pierwsze charakteryzują się ograniczoną długością życia i podobieństwem fenotypowym do komórek normalnych oraz prawidłową regulacją wzrostu i różnicowania, natomiast drugie, częściej stosowane w testach, mogą być przyczyną niedokładnych wyników bowiem mogą odznaczać się większą zmiennością genotypową i fenotypową oraz zaburzonymi mechanizmami sygnałowymi i mniejszą aktywnością metaboliczną. Z kolei jeżeli chodzi o komórki dendrytyczne Doktorantka wybrała do badań nieśmiertelne linie DC-podobne: komórki THP-1, przypominające pierwotne monocyty i makrofagi oraz komórki MUTZ-3 fizjologicznie podobne do komórek dendrytycznych, bowiem w przeciwieństwie do keratynocytów, pierwotne komórki dendrytyczne są trudne do pozyskania. Występują w naskórku na poziomie 2-4% populacji komórek.

Równie istotnym zagadnieniem był wybór odpowiednich markerów aktywacji keratynocytów zachodzącej podczas procesu uczulania, a objawiającej się uwalnianiem szeregu cytokin zapalnych.

Doktorantka testowała także dwa modele prowadzenia kokultury: model bezpośredni umożliwiający kontakt bezpośredni typu komórka-komórka i model pośredni, w której dwa typy komórek znajdowały się w osobnych przedziałach. Takie podejście umożliwiło zbadanie wzajemnej komunikacji pomiędzy komórkami KC i DC związanej z ekspresją antygenów powierzchniowych na powierzchni komórek THP-1 w odpowiedzi na obecność substancji uczulających. Z jednej strony komórki THP-1 pobudzają keratynocyty do wydzielania cytokin, podczas gdy keratynocyty zwiększają aktywację komórek dendrytycznych w odpowiedzi na obecność substancji chemicznych.

W końcowej fazie eksperymentów Doktorantka przeprowadziła walidację wytypowanej przez siebie metody badawczej w obecności znanych substancji uczulających i nieuczulających

wraz z oceną efektywności tego modelu posługując się krzywymi ROC, które są graficznym jego przedstawieniem. Obliczenia te pozwoliły na wybranie modelu badań dających jak najmniej błędnych klasyfikacji w odróżnianiu substancji uczulających od nieuczulających.

Cytowana Literatura zamyka się liczbą 190 pozycji (rozdział 9) z czego przeważającą większość stanowią artykuły naukowe o zasięgu międzynarodowym opublikowane w ciągu ostatnich 10-15 lat. Dobór bogatego oraz w głównej mierze najnowszego piśmiennictwa wskazuje na dużą dojrzałość Autorki i umiejętność wykorzystania literatury źródłowej, zarówno na etapie planowania badań, jak i w ich trakcie oraz w interpretacji i dyskusji otrzymanych wyników.

Osiągnięcie celu pracy oraz potwierdzenie postawionych przez Doktorantkę tez wymagało realizacji dużego zakresu pracy, co wiązało się z przeprowadzeniem skomplikowanych i pracochłonnych prac doświadczalnych. Na podkreślenie zasługuje bardzo dobrze opanowany przez Doktorantkę warsztat badawczy obejmujący techniki badań mikrobiologicznych, biochemicznych i immunologicznych. Zakres eksperymentów laboratoryjnych został zaplanowany prawidłowo, odpowiednio do celu i zakresu dysertacji. Pod względem merytorycznym praca nie budzi zastrzeżeń. Doktorantka właściwie interpretuje wyniki eksperymentów naukowych oraz sprawnie porusza się w literaturze tematu, właściwie rozwiązując problemy badawcze, wyciągając z nich logiczne wnioski, które potwierdzają zrealizowanie celu tej pracy badawczej.

Do najważniejszych osiągnięć naukowych Doktorantki należy zaliczyć:

- Osiągnięcie głównego celu badań, tj. opracowanie autorskiej metody *in vitro* kokultury bezpośredniej łączącej minimum dwa etapy kluczowe w zakresie działania uczulającego substancji chemicznych na skórę, to jest etapu KE2 i KE3 z zastosowaniem komórek keratynocytów NHEK-neonatal i komórek dendrytycznych THP-1 oceniającej działanie substancji uczulających na podstawie ekspresji antygenu powierzchniowego CD54 na komórkach dendrytycznych oraz poziomu cytokin IL-1 alfa i IL-18 charakteryzujących reakcję zapalną keratynocytów.
- Dokonanie walidacji zaproponowanej metody badawczej wraz z weryfikacją siedmiu różnych modeli predykcyjnych w oparciu o trzy wytypowane markery stanu zapalnego (IL-1 alfa, IL-18, CD54).
- Wykazanie, iż opracowana kokultura bezpośrednia KC/DC integrująca dwa typy komórek o różnej wrażliwości na badane substancje chemiczne wykazuje większą aktywność metaboliczną oraz jest bardziej skuteczniejsza w wykrywaniu haptenu i prohaptenu w niższych stężeniach niż jest to możliwe w hodowlach monokulturowych. Ponadto w takiej hodowli możliwe jest obniżenie stężenia ekspozycyjnego substancji co daje możliwość badania związków chemicznych słabiej rozpuszczalnych w wodzie i innych rozpuszczalnikach oraz możliwe jest skrócenie czasu narażenia badanych komórek do 24h.
- Stwierdzenie, iż konieczne jest wyznaczanie za każdym razem wartości CV75 badanych substancji chemicznych w stosunku do komórek KC/ DC i stosowanie w badaniach stężenia związku właściwego dla wrażliwszych komórek.

- Opracowana metoda badawcza ma duży potencjał aplikacyjny i może być interesującą alternatywą w porównaniu z testami monokulturowymi ze względu na skrócenie czasu badania, obniżenie stężenia badanych substancji i kosztów badań przez integrację dwóch kluczowych etapów KE2/ KE3. Ponadto do jej stosowania nie konieczna zgoda komisji etycznej.

Rozprawa doktorska Pani mgr Dominiki Gądarowskiej jest dobrze przygotowana pod względem formalnym. Prowadzony przez Doktorantkę wywód jest logiczny, poparty konkretnymi danymi. Na podkreślenie zasługuje fakt zebrania, w formie wykresów i tabel, bardzo obszernej bazy danych pomiarowych, które mogą posłużyć jeszcze do obliczeń innych zależności lub mogą stanowić punkt wyjścia do planowania następnych eksperymentów. Większość zawartych w pracy danych i wyników pomiarowych zasługuje na publikację. Dysertacja nie jest wolna od drobnych błędów i nietrafnych sformułowań. W niektórych miejscach Autorka stosowała skróty myślowe, czy określenia żargonowe. Te uwagi nie mają jednak wpływu na merytoryczne walory pracy.

Kończąc moją opinie pozwolę sobie zamieścić kilka pytań będących punktem wyjścia do dyskusji na obronie pracy:

- 1) Czym kierowano się przy wyborze związków chemicznych do badań? Czy można badane substancje zaliczyć do różnych grup chemicznych pod względem ich budowy? Czy budowa chemiczna związku będzie miała wpływ na typ/ siłę odpowiedzi immunologicznej w badanym modelu?
- 2) Czy opracowana metoda znalazłaby zastosowanie w badaniu próbek środowiskowych będących mieszaniną dziesiątków substancji chemicznych o różnych stężeniach w mieszaninie?
- 3) Badanie jakich kluczowych zdarzeń w mechanizmie uczulenia skóry stanowiłoby rozwinięcie przedstawionej w dysertacji metody?

4. Wniosek końcowy

Podsumowując moją opinię stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Dominiki Gądarowskiej pt.: *„Aktywacja komórek dendrytycznych i keratynocytów jako alternatywna metoda oceny działania uczulającego ksenobiotyków”* stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w dyscyplinie *inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka* i wskazuje na wysoki poziom wiedzy teoretycznej Doktorantki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Opiniowana praca spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. z póź.zm. - *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. z 2022r. poz.574). Wobec tego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny *inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka* Politechniki Śląskiej wniosek o przyjęcie opiniowanej rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Dominiki Gądarowskiej do publicznej obrony pracy doktorskiej.

Biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny prowadzonych badań oraz ich znaczącą wartość poznawczą, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Dominiki Gądarowskiej.

Podpisała Katarzyna Piekarska