

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr **Dominiki Gądarowskiej**

pt. „ **Aktywacja komórek dendrytycznych i keratynocytów jako alternatywna metoda oceny działania uczulającego ksenobiotyków**”

wykonanej pod kierunkiem Promotora dr hab. inż. Joanny Kalki, prof. PŚ

i Promotora pomocniczego dr Anny Daniel-Wójcik Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Przemysłu Organicznego Oddział w Pszczynie
procedowanej w Politechnice Śląskiej w Gliwicach
Doktorat wdrożeniowy

1. Podstawa prawna recenzji

Podstawą wykonania recenzji była uchwała Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Politechniki Śląskiej z dnia 20 października 2022 przekazana pismem Przewodniczącego Rady Dyscypliny prof. dr hab. inż. Andrzeja Rusina z dnia 8 listopada 2022r. Dokumentacja została dostarczona w dniu 13 grudnia 2022r.

2. Ogólna charakterystyka rozprawy

Rozprawa doktorska mgr **Dominiki Gądarowskiej** pt. „**Aktywacja komórek dendrytycznych i keratynocytów jako alternatywna metoda oceny działania uczulającego ksenobiotyków**” została wydana drukiem jako 194-stronicowe zwarte opracowanie. W dysertacji wyróżniono: wprowadzenie, wstęp, cel i tezy, materiały, metody badań, wyniki, dyskusję i wnioski. Całość zamyka spis literatury i załączniki, natomiast na początku pracy zamieszczono wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim.

W rozdziale zatytułowanym *Wprowadzenie* opisano problem środowiskowy i zdrowotny związany z występowaniem substancji chemicznych w środowisku. Rozdział zatytułowany *Wstęp* podzielono na sześć podrozdziałów. Opisano mechanizm powstawania reakcji uczulającej tzw. ACD oraz opisano metody badań z wykorzystaniem linii komórkowych, w tym kokultury. W części metodycznej przedstawiono cel, tezy, opisano zakres badań, opisano materiały badawcze, stosowane odczynniki, metodykę badań (prowadzenie hodowli komórek, metody kokultury, ocena żywotności komórek, wyznaczanie wartości CV75, oznaczanie stężenia cytokin, ekspresji antygenów powierzchniowych na komórkach THP-1) oraz opisano statystyczne metody obróbki wyników.

Następnie na 95 stronach opisano wyniki badań i dyskusję oraz, na podstawie wyników badań, sformułowano wnioski. W spisie literatury znajduje się 189 pozycji; w tym 99% – w języku angielskim. Większość cytowanych prac została opublikowana w ostatnich latach. Uwzględniając powyższe można stwierdzić, że układ pracy jest prawidłowy i zgodny z przyjętymi zasadami redagowania rozpraw doktorskich.

3. Ocena szczegółowa rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Dominiki Gądarowskiej została zatytułowana „*Aktywacja komórek dendrytycznych i keratynocytów jako alternatywna metoda oceny działania uczulającego ksenobiotyków*”.

We **Wprowadzeniu** opisano narażenie człowieka na substancje uczulające. To narażenie może powodować kontaktowe zapalenie skóry, raka skóry, choroby tkanki łącznej lub depigmentację. Scharakteryzowano grupy substancji alergennych oraz testy *in vivo* stosowane do oceny działania uczulającego na skórę. Opis wykonano w kontekście Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów REACH, Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady dotyczącej środków zapobiegawczych służących ochronie środowiska i zdrowia człowieka w odniesieniu do odpadów oraz testów Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju OECD opisujących ocenę działania uczulającego na skórę. Opisano klasyfikację substancji chemicznych opartą o badania z wykorzystaniem zwierząt oraz metody alternatywne. Metody te są zalecane przez REACH, stosowane do oceny cytotoksyczności i genotoksyczności zanieczyszczeń środowiskowych.

Rozdział zatytułowany **Wstęp** podzielono na sześć podrozdziałów. Opisano mechanizm powstawania reakcji uczulającej oraz opisano metody badań (kluczowe zdarzenie KE1, KE2, KE3, KE4) oraz metody z wykorzystaniem kokultury. Metoda KE1 (pierwszego kluczowego zdarzenia) została przyjęta jako wytyczna OECD i dotyczy testów *in chemico* do oceny działania uczulającego na skórę (bezpośredni test reaktywności peptydów, test reaktywności pochodnych aminokwasów, kinetyczny test bezpośredniej reaktywności peptydów. Metody KE2 polegają na ocenie aktywacji keratynocytów na podstawie: aktywacji szlaków biochemicznych, analizy ekspresji genów i białek lub oceny produkcji cytokin prozapalnych. Kluczowe zdarzenie KE3 dotyczy aktywacji komórek dendrytycznych. W ramach wytycznej nr 442E OECD przyjęto metody pozwalające zróżnicować substancje uczulające skórę od nieuczulających. Są to testy takie jak: aktywacji ludzkich linii komórkowych (h-CLAT), aktywacji linii komórkowej U937 (U-SENS), genu reporterowego interleukiny-8 (test IL-8 Luc) lub Genomic Allergen Rapid Detection (GARDTM). Metoda KE4 (czwarte kluczowe zdarzenie) zwiększa dokładność i powtarzalność predykcji wcześniej opisanych metod i opiera się na aktywacji i proliferacji limfocytów T w lokalnych węzłach chłonnych. Omówione metody alternatywne obejmujące kluczowe zdarzenia KE1-KE4 nie są pozbawione swoistych wad i ograniczeń stosowania, wśród których za najistotniejsze uważa się niezadowalającą czułość i dokładność wynikającą z tego, że testy *in vitro* reprezentują

tylko jeden lub w najlepszym przypadku kilka etapów złożonych procesów zachodzących *in vivo*. Dlatego w ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania metodami kokultury opartymi na wspólnej hodowli co najmniej dwóch populacji komórek, co pozwala na wzajemne oddziaływanie pomiędzy różnymi typami komórek biorących udział w procesie uczulenia skóry naśladując procesy w niej zachodzące. Metody te integrują głównie dwa rodzaje komórek: keratynocyty i komórki dendrytyczne i mogą być oparte na dwuwymiarowych (2D) oraz trójwymiarowych (3D) modelach hodowli komórkowych.

Uzasadnia to podjęcie tematu opracowania metody oceny narażenia na substancje uczulające z wykorzystaniem linii komórkowych. Na podstawie przeglądu literatury oraz warunków wdrożeniowych rezultatów badań opisanych w rozprawie, sformułowano **cel, tezy i zakres badań**. Celem badań było opracowanie metody łączącej minimum dwa kluczowe etapy w zakresie działania uczulającego na skórę tj. reakcji zapalnej keratynocytów i aktywacji komórek dendrytycznych. Wyróżniono tezę główną oraz tezy cząstkowe. Teza główna została sformułowana następująco: „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”. Tezy cząstkowe natomiast określono jako:

- ocena potencjału uczulającego substancji badanych możliwa jest na podstawie poziomu cytokin zapalnych keratynocytów hodowanych w kokulturze z komórkami dendrytycznymi,
- możliwa jest ocena potencjału uczulającego substancji badanych na podstawie ekspresji antygenów powierzchniowych na komórkach dendrytycznych hodowanych w kokulturze z keratynocytami,
- 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.

Zakres pracy podzielono na cztery etapy. W pierwszym oceniano profil uwalniania cytokin zapalnych przez trzy typy keratynocytów po ekspozycji na substancję uczulającą trwającą przez okres 5 h, 18 h, 24 h, 48 h dla czterech stężeń komórek. Do etapu drugiego wybrano dwa typy keratynocytów hodowanych w kokulturze bezpośredniej z komórkami dendrytycznymi (dwa rodzaje) po ekspozycji na trzy substancje uczulające i dwie substancje nieuczulające. Zastosowano stężenie keratynocytów oraz czas ekspozycji na podstawie wyników otrzymanych w pierwszym etapie badań. Trzeci etap polegał na ocenie ekspresji antygenów powierzchniowych na komórkach dendrytycznych hodowanych w kokulturze (bezpośrednia, pośrednia) z keratynocytami po ekspozycji (dwa czasy) na trzy substancje uczulające i dwie substancje nieuczulające. W czwartym etapie określono zdolność opracowanej metody kokultury do oceny

potencjału uczulającego wybranych substancji uczulających i nieuczulających. Przebieg poszczególnych etapów przedstawiono na czytelnych rysunkach.

W rozdziale czwartym opisano materiały badawcze tzn. keratynocyty, komórki dendrytyczne, opisano odczynniki stosowane podczas hodowli i analizy oraz opisano materiały badane. Wśród badanych 16 związków jeden był skrajnie uczulający, 2 – silnie, 3-umiarkowanie i 5 – słabo uczulających oraz 5 – nie wywołujących uczulenia. W punkcie piątym opisano metody badawcze, prowadzenie hodowli, sposób przygotowania pożywek i pasażowania komórek oraz metody badań kokultury a także opisano metodę liczenia komórek i ocenę żywotności komórek wraz z wyznaczaniem wartości stężenia związku chemicznego, przy którym żywotność będzie na poziomie 75% (CV75). Przedstawiono zasady oznaczania stężenia cytokin, metodykę oceny ekspresji antygenów powierzchniowych na komórkach THP-1 oraz stosowane protokoły badawcze w etapach badawczych wraz z metodyką analizy statystycznej otrzymanych wyników. Obliczenia statystyczne prowadzono z wykorzystaniem testu *t-Studenta* w programie Statistica.

W punkcie 6. zamieszczono opis wyników. Punkt ten podzielono na cztery podpunkty odpowiadające etapom badań. W opisie wyników badań przeprowadzonych w etapie pierwszym znajduje się ocena cytotoksyczności 2,4- dinitrochlorobenzenu DNCB (osiem wartości stężeń końcowych) wobec keratynocytów (trzy typy komórek). Wyznaczono żywotność komórek, które posłużyły do sporządzenia krzywych zależności dawka-odpowiedź. Na podstawie wyników cytotoksyczności wyznaczono wartości CV75. Następnie opisano wyniki analizy stężenia cytokin zapalnych keratynocytów w mediach pohodowlanych. Wyznaczono profile uwalniania interleukiny IL-1 alfa, IL-6, IL-18 oraz czynnika martwicy nowotworów TNF-alfa pod wpływem badanego związku DNCB oraz porównawczo - z zastosowaniem rozpuszczalnika dimetylosulfotlenku DMSO jako kontroli. W każdym przypadku wyznaczono indeks stymulacji SI dla badanych komórek keratynocytów.

W etapie drugim wyznaczono profil uwalniania cytokin zapalnych przez keratynocyty hodowane w kokulturze bezpośredniej z komórkami dendrytycznymi. Dokonano oceny cytotoksyczności trzech związków uczulających takich jak 2,4- dinitrochlorobenzen DNCB, kreozol MMP i eugenol EU oraz dwóch nieuczulających (kwas mlekowy - lactic acid LA, isopropanol 2PR). W każdym przypadku wyznaczono żywotność komórek dla ośmiu stężeń badanych związków dwóch rodzajów keratynocytów oraz dwóch typów komórek dendrytycznych. Wyznaczono wartość CV75 stężenia materiałów badanych w porównaniu z kontrolą prowadzoną w obecności rozpuszczalnika DMSO oraz stężenia ekspozycyjne dla różnych składników kokultury. Podobnie jak w etapie pierwszym także i w drugim dokonano analizy stężenia cytokin zapalnych keratynocytów w mediach pohodowlanych kokultur z komórkami dendrytycznymi. Charakterystykę uwalniania cytokin zapalnych (IL-1 alfa, IL-6, IL-18) w badanych układach kokultury bezpośredniej przedstawiono na wykresach gdzie przedstawiono wartości indeksu stymulacji SI dla badanych związków występujących w trzech stężeniach. Wyniki badań przeprowadzonych w etapie drugim pozwoliły na wytypowanie najlepszego układu kokultury do

oceny substancji uczulających. W przyjętych warunkach był to układ kokultury keratynocytów NHEK-neonatal z dodatkiem komórek dendrytycznych THP-1 przy czasie ekspozycji wynoszącym 48 h.

W etapie trzecim dokonano oceny ekspresji antygenów powierzchniowych komórek dendrytycznych hodowanych w różnych rodzajach kokultury z keratynocytami. Na wykresach przedstawiono efekt działania badanych związków uczulających (2,4- dinitrochlorobenzen, kreozol, eugenol) i nieuczulających (kwas mlekowy, isopropanol) na ekspresję antygenów powierzchniowych CD86 i CD54 komórek dendrytycznych THP-1 hodowanych w obecności keratynocytów lub bez ich obecności po ekspozycji wynoszącej 24 h oraz 48 h. Dla tych czasów ekspozycji określono także wpływ różnych metod hodowli (monokultura, kokultura bezpośrednia, kokultura pośrednia z narażeniem keratynocytów oraz keratynocytów i komórek dendrytycznych) na żywotność komórek dendrytycznych THP-1. Na podstawie analizy statystycznej uzyskanych wyników wytypowano jako finalny układ kokultury bezpośredniej keratynocytów NHEK – neonatal z komórkami dendrytycznymi THP-1 z ekspozycją wynoszącą 24 h.

Etap czwarty polegał na ocenie cytotoksyczności jedenastu materiałów referencyjnych wobec wybranych komórek keratynocytów i komórek dendrytycznych w kokulturze. W każdym przypadku wyznaczono żywotność komórek, wartość indeksu CV75 oraz wartość stężenia ekspozycyjnego dla w/w komórek po ekspozycji z substancjami uczulającymi (9 związków) lub nieuczulającymi (5 związków). W tym etapie oceniano także ekspresję antygenów powierzchniowych CD54 na komórkach dendrytycznych oraz oznaczano stężenie interleukiny IL-1 alfa oraz IL-18 w mediach pohodowlanych wyznaczając wartości indeksu SI. Tak jak w poprzednich etapach wyniki porównywano do wyników uzyskanych po narażeniu komórek na kontrolę rozpuszczalnikową. W celu oceny przydatności opracowanej metody kokulturowej do rozróżnienia związków uczulających od nieuczulających wykreślono krzywe które obrazują efektywność modelu. Wyznaczono trzy punkty końcowe (ekspresja antygenów CD54, poziom interleukiny IL-1 alfa, IL-18) oraz ich kombinacje i sprawdzono siedem modeli predykcyjnych pod względem takich wskaźników jak: czułość, swoistość, dokładność.

Punkt siódmy to dyskusja wyników, gdzie wyniki badań własnych odniesiono do wyników innych badaczy. W kontekście danych literaturowych opisano wyznaczony w badaniach profil uwalniania cytokin zapalnych przez różne rodzaje keratynocytów hodowanych w monokulturze, przez keratynocyty hodowane w kokulturze bezpośredniej z komórkami dendrytycznymi oraz opisano wyniki ekspresji antygenów powierzchniowych komórek dendrytycznych hodowanych w różnych rodzajach kokultury z keratynocytami. Na zakończenie opisu wyników w podrozdziale 7.4 opisano walidację opracowanej metody kokulturowej poprzez syntetyczny opis poszczególnych etapów badań oraz przedstawieniem jej zalet w porównaniu z badaniami opartymi na monokulturach. Wyznaczono podstawowe parametry metody kokultury, a zaletami metody są takie czynniki jak: prowadzenie badań bez wykorzystania modelu zwierzęcego (brak konieczności

uzyskania zgody komisji etycznej), skrócony czas trwania badań, mniejsze koszty, mniejsze stężenie ekspozycyjne materiału, możliwość badania związków słabo rozpuszczalnych oraz mieszanin związków o nieznanym składzie, wysoka czułość (100%), swoistość (80%) i dokładność (93%).

Końcowy punkt rozprawy to rozdział zatytułowany *Wnioski*. Zostały sformułowane następująco:

- Opracowana metoda kokultury bezpośredniej NHEK-neonatal/THP-1 łączy minimum dwa kluczowe etapy w zakresie działania uczulającego na skórę, to jest KE2 i KE3.
- Najbardziej wydajnym rodzajem kokultury KC/DC do oceny działania uczulającego na skórę jest kokultura bezpośrednia odzwierciedlająca w większym stopniu procesy in vivo.
- Najwyższą zdolnością predykcyjną charakteryzuje się model PM6, w którym jako metodę oceny reakcji zapalnej keratynocytów (NHEK-neonatal) wykorzystano oznaczenie IL-18 w mediach pochodowlanych, natomiast dla oceny aktywacji komórek dendrytycznych zaproponowano ocenę ekspresji antygenu CD54 na komórkach THP-1.
- Metoda kokulturowa jest bardziej wydajna w wykrywaniu prohaptenu. Zastosowanie kokultury bezpośredniej NHEK-neonatal/THP-1 pozwala na identyfikację prohaptenu w niższych stężeniach niż układ monokultury. Kokultura bezpośrednia komórek NHEK/neonatal oraz THP-1, pozwala na prawidłową klasyfikację prohaptenu jako substancji uczulających po wykonaniu jednego badania i daje statystycznie istotny wzrost produkcji cytokin zapalnych przez keratynocyty (KE2) oraz wzrost ekspresji antygenów powierzchniowych na komórkach THP-1 (KE3).
- Model badawczy kokultury bezpośredniej KC/DC wykazuje większą aktywność metaboliczną niż systemy monokulturowe.
- Cytotoksyczność badanego materiału jest specyficzna dla typu komórek dlatego konieczne jest wyznaczanie wartości CV75 dla keratynocytów i komórek dendrytycznych występujących w kokulturze i stosowanie w badaniach zasadniczych koncentracji substancji badanej, właściwej dla komórek wrażliwszych.
- Kokultura bezpośrednia KC/DC integrująca dwa typy komórek o różnej wrażliwości na materiały badane skutkuje obniżeniem stężenia ekspozycyjnego, dzięki czemu wzrasta możliwość badania substancji słabiej rozpuszczalnych w stosowanych rozpuszczalnikach.
- Optymalny czas narażenia komórek na badane materiały wynosi 24 h, ponieważ substancje uczulające silniej indukują wzrost ekspresji antygenów powierzchniowych na komórkach THP-1 po 24 h niż po 48 h ekspozycji

Badania prowadzono testując 11 wybranych związków określonych jako uczulające, więc wnioski należało sformułować dodając, że otrzymano je w przyjętych warunkach prowadzenia doświadczeń dla wybranych związków o zróżnicowanym działaniu uczulającym. Na zakończenie pracy zamieszczono kierunki dalszych badań w celu optymalizacji opracowanej metodyki.

Analizując treść pracy, opis wyników i podsumowanie należy stwierdzić, że tezy zostały udowodnione, a cele osiągnięte i udokumentowane wynikami badań. Tematyka badań jest interdyscyplinarna, gdyż łączy zagadnienia biochemiczne z inżynierią środowiska w zakresie badań ekotoksykologicznych w kontekście występowania związków toksycznych w środowisku. Przedstawiona do oceny praca doktorska prezentuje ogólną wiedzę nie tylko teoretyczną ale i praktyczną Doktorantki w tym zakresie. Potwierdzają to wykonane badania, ich interpretacja oraz wytyczne kierunki dalszych badań.

Opracowana metoda pozwala na badania właściwości uczulających związków chemicznych i stanowi alternatywę dla testów na zwierzętach. Rozprawa obejmuje wykonanie wielu serii badawczych i zawiera bardzo bogaty materiał wynikowy. Wyniki zostały opracowane w formie przejrzystych wykresów oraz w tabelach zamieszczonych w tekście oraz w formie załączników.

4. Uwagi edycyjne

Podkreślając profesjonalne podejście Doktorantki do zagadnienia, zarówno w kwestii przeglądu literatury jak i organizacji badań a także opisu wyników, w rozprawie znalazły się nieliczne niedociągnięcia edycyjne. Nie mają one jednak wpływu na ocenę strony merytorycznej rozprawy. Uwagi edycyjne to przykładowo:

- W całej pracy używane jest określenie „substancja” zamiast „związek chemiczny”
- Oznaczenia na rysunkach są w języku angielskim – rys. 1.3;
- Oznaczenia godzin ekspozycji są w tekście jak „h” lub „H” na rys. 6.22; 6.23; 6.24; 6.25; 6.26

5. Zagadnienia do wyjaśnienia:

- Wyjaśnić określenie stosowane w tezach cząstkowych „potencjał uczulający substancji badanych”
- Odnośnie wniosku 1 - wyjaśnić co oznacza sformułowanie, że „metoda łączy minimum dwa etapy w zakresie działania uczulającego na skórę”
- Odnośnie wniosku 2 – jaki jest dowód na to, że najbardziej wydajnym rodzajem kokultury KC/DC do oceny działania uczulającego na skórę jest kokultura bezpośrednia odzwierciedlająca w większym stopniu procesy *in vivo* (w porównaniu z czym?)
- Odnośnie wniosku 4 – wyjaśnić co oznacza i w odniesieniu do jakiej innej, „metoda kokulturowa jest bardziej wydajna w wykrywaniu prohaptenów”. Czy można na tym etapie badań podać takie ogólne stwierdzenie, że będzie najlepsza w odniesieniu do oceny innych związków z tej grupy
- Podać możliwości wykorzystania opracowanej metody do badań prowadzonych w dyscyplinie inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka
- Jakie konkretne działania zostały podjęte dotychczas a ewentualnie jakie są planowane w związku z wynikami zawartymi w rozprawie doktorskiej jako pracy wdrożeniowej

6. Wniosek końcowy

Uwzględniając zakres badań przedstawiony w rozprawie, stwierdzam, że opracowanie otrzymane do recenzji spełnia warunki prawne określone dla rozpraw doktorskich (Dz. U z 2018r. poz.1668). Rozprawa doktorska powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu oraz potwierdzać umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Informacje literaturowe oraz dyskusja wyników potwierdzają wiedzę teoretyczną Doktorantki, a rzeczowe sprecyzowanie celu i zakresu badań, ich zaplanowanie, opis a także wyczerpująca interpretacja wyników świadczą o umiejętności samodzielnego prowadzenia badań. Zatem wnioskuję do Rady Dyscypliny Inżynierii Środowiska, Górnictwa i Energetyki Politechniki Śląskiej o dopuszczenie mgr Dominiki Gądarowskiej do dalszego postępowania kwalifikacyjnego przewidzianego w procedurze do uzyskania stopnia doktora nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka.

Podpisała Maria Włodarczyk-Makuła