



**Politechnika
Śląska**

ROZPRAWA DOKTORSKA

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

Dominika Gądarowska

Dyscyplina naukowa: Inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka

PROMOTOR

dr hab. inż. Joanna Kalka

Katedra Biotechnologii Środowiskowej

PROMOTOR POMOCNICZY

dr Anna Daniel-Wójcik

Sieć Badawcza Łukasiewicz - Instytut Przemysłu Organicznego

Oddział w Pszczynie

GLIWICE 2022

Rozprawa doktorska została przygotowana w ramach programu

Ministerstwa Edukacji i Nauki

Doktorat wdrożeniowy II edycja

Składam serdeczne podziękowania

*Promotorowi niniejszej pracy, Pani dr hab. inż. Joannie Kalce, prof. PŚ
za opiekę merytoryczną, cenne wskazówki oraz pomoc w realizacji doktoratu
wdrożeńiowego*

oraz

*Promotorowi Pomocniczemu dr Annie Daniel-Wójcik
za wsparcie oraz poświęcony czas*

*Dziękuję Kierownictwu Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytutu Przemysłu
Organicznego*

za umożliwienie realizacji niniejszych badań

Dziękuję

Pracownikom Sekcji Diagnostyki i Metod Alternatywnych

Łukasiewicz - IPO

za życzliwość i wsparcie w trakcie realizacji pracy

oraz

*wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania niniejszej
rozprawy doktorskiej*

Dziękuję

Moim Najbliższym

za wiarę we mnie, wsparcie i pomoc w trudnych chwilach

Spis treści

Wykaz skrótów:	11
Streszczenie.....	13
Abstract	15
1. Wprowadzenie.....	17
2. Wstęp	27
2.1. Mechanizm powstawania ACD.....	27
2.2. KE1. Charakterystyka metod	29
2.3. KE2. Charakterystyka metod	33
2.3.1. KE2. Metody oceniające aktywację szlaków biochemicznych	33
2.3.2. KE2. Metody oceniające ekspresję genów	35
2.3.3. KE2. Metody oceniające produkcję cytokin zapalnych	36
2.4. KE3. Charakterystyka metod	38
2.5. KE4. Charakterystyka metod	43
2.6. Metody z wykorzystaniem kokultur.....	44
2.6.1. modele 2D	44
2.6.2. Modele 3D.....	46
3. Cel i tezy pracy.....	51
4. Materiały	55
4.1. Biologiczny system badawczy	55
4.1.1. Keratynocyty (KC).....	55
4.1.2. Komórki dendrytyczne (DC).....	56
4.2. Odczynniki	56
4.2.1. Odczynniki do hodowli komórek <i>in vitro</i>	56
4.2.2. Barwniki do oceny żywotności komórek	57
4.2.3. Odczynniki do analizy cytometrycznej	57
4.2.4. Odczynniki do analizy cytokin.....	57
4.2.5. Sprzęt.....	57
4.2.6. Materiały zużywalne	58

4.3.	Materiały badane	58
5.	Metody badawcze.....	60
5.1.	Hodowla komórkowa	60
5.1.1.	Przygotowanie pożywek hodowlanych	60
5.1.2.	Pasażowanie komórek	62
5.1.3.	Liczenie komórek przy użyciu automatycznego licznika komórek.....	62
5.2.	Metody kokultury	63
5.3.	Ocena żywotności komórek.....	65
5.3.1.	Test alamarBlue.....	65
5.3.1.1.	Wysiewanie komórek	66
5.3.1.2.	Przygotowanie materiałów badanych.....	66
5.3.1.3.	Ekspozycja komórek	66
5.3.1.4.	Odczyt fluorescencji.....	67
5.3.2.	Ocena żywotności komórek z użyciem jodku propidyny (PI).....	67
5.4.	Wyznaczanie wartości CV75.....	68
5.5.	Oznaczanie stężenia cytokin metodą ELISA - xMAP.....	68
5.5.1.	Zasada oznaczenia	68
5.5.2.	Procedura oznaczania cytokin	69
5.6.	Ocena ekspresji antygenów powierzchniowych na komórkach THP-1	71
5.7.	Zastosowane protokoły badawcze	72
5.7.1.	Etap I - profil uwalniania cytokin zapalnych przez różne rodzaje keratynocytów hodowanych w monokulturze.....	72
5.7.2.	Etap II - profil uwalniania cytokin zapalnych przez keratynocyty hodowane w kokulturze bezpośredniej z komórkami dendrytycznymi.....	73
5.7.3.	Etap III - ocena ekspresji antygenów powierzchniowych komórek dendrytycznych hodowanych w różnych rodzajach kokultury z keratynocytami	75
5.7.4.	Etap IV - walidacja metody kokulturowej KC/DC.....	77
5.8.	Statystyka	78
6.	Wyniki	79
6.1.	Etap I - profil uwalniania cytokin zapalnych przez różne rodzaje keratynocytów hodowanych w monokulturze.....	79

6.1.1.	Ocena cytotoksyczności DNCB wobec keratynocytów	79
6.1.2.	Wyznaczenie wartości CV75 dla keratynocytów	80
6.1.3.	Analiza stężenia cytokin zapalnych keratynocytów w mediach pochodzących z kultur KC	82
6.1.3.1.	Profil zewnątrzkomórkowego uwalniania IL-1 alfa	82
6.1.3.2.	Profil zewnątrzkomórkowego uwalniania IL-6	85
6.1.3.3.	Profil zewnątrzkomórkowego uwalniania IL-18	87
6.1.3.4.	Profil zewnątrzkomórkowego uwalniania TNF-alfa oraz IL-12 (p40), IL-12 (p70)	89
6.1.4.	Etap I - podsumowanie	91
6.2.	Etap II - profil uwalniania cytokin zapalnych przez keratynocyty hodowane w kokulturze bezpośredniej z komórkami dendrytycznymi	92
6.2.1.	Ocena cytotoksyczności materiałów badanych wobec KC i DC	92
6.2.2.	Wyznaczenie wartości CV75 oraz stężenia ekspozycyjnego	97
6.2.3.	Analiza stężenia cytokin zapalnych keratynocytów w mediach pochodzących z kultur KC/DC	104
6.2.3.1.	Kokultura bezpośrednia NHEK-neonatal z komórkami THP-1 oraz MUTZ-3 ..	104
6.2.3.2.	Kokultura bezpośrednia NHEK-adult z komórkami THP-1 i MUTZ-3	107
6.2.4.	Etap II - podsumowanie	110
6.3.	Etap III - ocena ekspresji antygenów powierzchniowych komórek dendrytycznych hodowanych w różnych rodzajach kokultury z keratynocytami	112
6.3.1.	DNCB	112
6.3.2.	MMP	114
6.3.3.	EU	116
6.3.4.	LA	118
6.3.5.	2PR	118
6.3.6.	Ocena wpływu różnych metod hodowli na żywotność komórek THP-1	121
6.3.7.	Etap III - podsumowanie	124
6.4.	Etap IV - walidacja metody kokulturowej KC/DC	126
6.4.1.	Ocena cytotoksyczności materiałów referencyjnych wobec KC i DC	126
6.4.2.	Wyznaczenie wartości CV75 oraz stężenia ekspozycyjnego	131

6.4.3.	Analiza ekspresji antygenu CD54 na komórkach THP-1 oraz IL-1 alfa i IL-18 w mediach pochodowlanych.....	137
6.4.4.	Ocena poprawności klasyfikatora oraz wybór optymalnej wartości odcięcia dla antygenu CD54, IL-1 alfa oraz IL-18 na podstawie analizy krzywych ROC.....	140
6.4.5.	Klasyfikacja materiałów badanych.....	143
7.	Dyskusja	146
7.1.	Profil uwalniania cytokin zapalnych przez różne rodzaje keratynocytów hodowanych w monokulturze	148
7.2.	Profil uwalniania cytokin zapalnych przez keratynocyty hodowane w kokulturze bezpośredniej z komórkami dendrytycznymi	151
7.3.	Ocena ekspresji antygenów powierzchniowych komórek dendrytycznych hodowanych w różnych rodzajach kokultury z keratynocytami	153
7.4.	Walidacja metody kokulturowej KC/DC.....	157
8.	Wnioski	162
9.	Bibliografia.....	164
10.	Załączniki	176
10.1.	Etap I - profil uwalniania cytokin zapalnych przez różne rodzaje keratynocytów hodowanych w monokulturze - dane źródłowe	176
10.2.	Etap II - profil uwalniania cytokin zapalnych przez keratynocyty hodowane w kokulturze bezpośredniej z komórkami dendrytycznymi - dane źródłowe	180
10.3.	Etap III - ocena ekspresji antygenów powierzchniowych komórek dendrytycznych hodowanych w różnych rodzajach kokultury z keratynocytami - dane źródłowe	185
10.4.	Etap IV - walidacja metody kokulturowej - dane źródłowe	191

Wykaz skrótów:

ABCD (ang. *Airborne Contact Dermatitis*) – kontaktowe zapalenie skóry wywołane alergenami rozprzestrzeniającymi się drogą powietrza

ACD (ang. *Allergic Contact Dermatitis*) – alergiczne zapalenie skóry

AOP (ang. *Adverse Outcome Pathways*) – ścieżki niekorzystnych skutków

APC (ang. *Antigen Presenting Cells*) – komórki prezentujące antygen

ATP – adenozyntrifosforan

AUC (ang. *Area Under Curve*) – pole pod krzywą ROC

BSA (ang. *Bovine Serum Albumin*) – bydlęca albumina surowicy

CYP (ang. *Cytochrome P450*) – cytochrom P450

DC (ang. *Dendritic Cells*) – komórki dendrytyczne

DCYA (ang. *Dansyl Cysteamine*) – cysteamina dansylu

DEP (ang. *Diesel Exhaust Particulate*) – cząsteczki spalin z silników Diesla

DPBS (ang. *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) – buforowana fosforanem sól fizjologiczna Dulbecco

EDTA (ang. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*) – kwas etylenodiaminotetraoctowy

FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*) – płodowa surowica bydlęca

GPMT (ang. *Guinea Pigs Maximisation Test*) – Test maksymalizacji na świnkach morskich

HaCaT (ang. *Immortalized Human Keratinocytes*) – nieśmiertelna linia keratynocytów człowieka

HPLC (ang. *High Performance Liquid Chromatography*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa

HPLC/MS-MS (ang. *High Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometer*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas

ICD (ang. *Irritant Contact Dermatitis*) – kontaktowe zapalenie skóry z podrażnienia

IFN γ – interferon-gamma

IgM – immunoglobuliny klasy M

IL – interleukina

KC (ang. *Keratinocytes*) – keratynocyty

KE (ang. *Key Event*) – kluczowe zdarzenie

LC (ang. *Langerhans Cells*) – komórki Langerhansa

LLNA (ang. *Local Lymph Nodes Assay*) – test lokalnych węzłów chłonnych

LLOQ (ang. *Lower Limit of Quantification*) – dolna granica oznaczalności

mBrB (ang. *monobromobimane*) – monobromobiman

MFI (ang. *Mean Fluorescence Intensity*) – średnia intensywność fluorescencji

MIE (ang. *Molecular Initiating Event*) – faza inicjacji molekularnej

moDC (ang. *Monocyte Derived Dendritic Cells*) – komórki dendrytyczne różnicowane z monocytów

MP (ang. *Microplastics*) – mikroplastik

MUTZ-3 – linia komórkowa ludzkiej ostrej białaczki szpikowej

MTT (ang. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) – bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy

NAC – N-(2-(1-naftylo)acetylo)-L-cysteina

NAL – α -N-(2-(1-naftylo)acetylo)-L-lizyna

NHEK (ang. *Normal Human Epidermal Keratinocytes*) – ludzkie keratynocyty naskórka

NK (ang. *Natural Killer*) – nieswoiste komórki limfoidalne, które wykazują spontanicznie właściwości cytotoksyczne („naturalni zabójcy”)

NMR (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*) – magnetyczny rezonans jądrowy

NP (ang. *Nanoplastics*) – nanoplastik

OECD (ang. *Organisation for Economic Cooperation and Development*) – Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju

PBS (ang. *Phosphate Buffered Saline*) – buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) – reakcja łańcuchowa polimazy

pDC (ang. *Plasmacytoid Dendritic Cells*) – plazmocytoidalne komórki dendrytyczne

PM (ang. *Prediction Model*) – model predykcyjny

QSAR (ang. *Quantitative Structure-Activity Relationship*) – ilościowa zależność między strukturą a reaktywnością

REACH (ang. *Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals*) – Rozporządzenie w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów

RFI (ang. *Relative Fluorescence Intensity*) – względna intensywność fluorescencji

RhE (ang. *Reconstructed Human Epidermis*) – zrekonstruowany ludzki naskórek

ROC (ang. *Receiver Operating Characteristic*) – krzywa ROC

SI (ang. *Stimulation Index*) – indeks stymulacji

ROS (ang. *Reactive Oxygen Species*) – reaktywne formy tlenu

RT-PCR – (ang. *Real Time Polymerase Chain Reaction*) – reakcja łańcuchowa polimazy w czasie rzeczywistym

THP-1 – linia komórkowa ludzkiej białaczki monocytowej

TNF-alfa (ang. *Tumor Necrosis Factor alpha*) – czynnik martwicy nowotworów alfa

TTC (ang. *Threshold of Toxicological Concern*) – próg zagrożenia toksykologicznego

U937 – ludzka promonocytarna linia komórkowa

UN GHS (ang. *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*) – Globalny Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów ONZ

Streszczenie

Alergiczne kontaktowe zapalenie skóry (ACD) uznawane jest za najbardziej rozpowszechnioną formę immunotoksyczności u ludzi, dlatego jest ważnym parametrem brany pod uwagę w ocenie zagrożenia i ryzyka chemikaliów. ACD może być wywoływane przez substancje chemiczne, substancje zapachowe i konserwanty, wzrost występowania chorób alergicznych skorelowany jest również ze wzrostem uprzemysłowienia i zanieczyszczenia środowiska. Do typowych substancji i czynników zanieczyszczających środowisko o działaniu uczulającym należą: cząsteczki spalin z silników Diesla (DEP); elementy z tworzyw sztucznych, gumy i kleju; konserwanty; metale; leki; mikroplastik (MP) i nanoplastik (NP).

Tradycyjnie, identyfikacja i charakterystyka substancji chemicznych uczulających skórę wymagała zastosowania testów *in vivo*. Obecnie w celu ograniczenia doświadczeń przeprowadzanych na zwierzętach stosuje się metody alternatywne opierające się na metodologii tzw. ścieżek niekorzystnych skutków (ang. *Adverse outcome pathways*, AOP), które stanowią kluczowy element oceny ryzyka u ludzi stosowany w toksykologii predykcyjnej. Obecnie wykorzystywane metody alternatywne zatwierdzone przez Organizację Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD) uwzględniają cztery kluczowe elementy (ang. *Key event*, KE) w mechanizmie działania uczulającego na skórę: i) molekularną interakcję z białkami skóry; ii) reakcję zapalną keratynocytów (KC); iii) aktywację komórek dendrytycznych (DC); iv) proliferację limfocytów. Każdemu z kluczowych elementów odpowiada odrębna metoda badawcza. W związku z tym konieczne jest wykonanie kombinacji kilku testów w celu uzyskania informacji równoważnych do testów *in vivo*, pozwalających na klasyfikację badanej substancji jako uczulającej lub nieuczulającej.

Celem rozprawy było opracowanie metody *in vitro* oceniającej potencjał uczulający badanych substancji, która konsoliduje przynajmniej dwa kluczowe etapy reakcji alergicznej, tj. etap reakcji zapalnej keratynocytów (KC) oraz aktywacji komórek dendrytycznych (DC).

Przeprowadzone badania miały na celu określenie punktów końcowych metody właściwych dla keratynocytów i komórek dendrytycznych oraz określenie metody wspólnej hodowli dla tych dwóch typów komórek. W pierwszym etapie prac weryfikowano profil uwalniania wybranych cytokin zapalnych przez 3 typy keratynocytów po ekspozycji na substancję uczulającą. Stwierdzono, że produkcja cytokin jest uzależniona od typu komórek, stężenia komórek oraz czasu ekspozycji komórek. W kolejnym etapie prac weryfikowano, czy na poziom cytokin zapalnych uwalnianych przez keratynocyty ma wpływ obecność komórek

dendrytycznych. Efektem pierwszych etapów badań był wybór dwóch typów komórek tj, keratynocytów noworodkowych (NHEK-neonatal) oraz komórek DC-podobnych THP-1 jako najlepszego układu komórek hodowanych w kokulturze. Wyselekcjonowano również dwie cytokiny zapalne tj. IL-1 alfa oraz IL-18 jako potencjalne punkty końcowe finalnej metody. W trzecim etapie badań oceniono wpływ sposobu prowadzenia wspólnej hodowli (kokultura pośrednia, kokultura bezpośrednia) keratynocytów i komórek dendrytycznych na ekspresję antygenów powierzchniowych na komórkach dendrytycznych. Wyniki tego etapu wykazały, że optymalnym rodzajem kokultury keratynocytów i komórek dendrytycznych jest kokultura bezpośrednia oraz antygen powierzchniowy CD54 może być stosowany jako punkt końcowy w finalnej metodzie kokulturowej.

Na podstawie przeprowadzonych prac określono następujące warunki finalnej metody kokultury KC/DC:

- keratynocyty: NHEK-neonatal,
- komórki dendrytyczne: THP-1,
- rodzaj kokultury: bezpośrednia,
- czas ekspozycji na materiały badane: 24 h,
- punkty końcowe: pomiar stężenia IL-1 alfa oraz IL-18 w mediach pohodowlanych metodą ELISA-xMAP oraz ocena ekspresji antygeny CD54 na komórkach THP-1 metodą cytometrii przepływowowej.

W ostatnim etapie prac weryfikowano zdolność opracowanej metody do oceny potencjału uczulającego 14 substancji o znanym działaniu uczulającym i nieuczulającym. Wykazano, że najlepszym modelem predykcyjnym oceniającym potencjał uczulający jest model stosujący ocenę ekspresji antygeny CD54 oraz poziomu IL-18 w mediach pohodowlanych. Stosując ten model predykcyjny prawidłowo sklasyfikowano wszystkie badane substancje uczulające (9/9), oraz cztery z pięciu substancji nieuczulających (4/5).

Wyniki badań potwierdziły tezę główną rozprawy o możliwości zastosowania metody integrującej dwa kluczowe elementy tj. reakcję zapalną keratynocytów oraz aktywację komórek dendrytycznych do oceny potencjału uczulającego na skórę. Dodatkowo, stwierdzono większą zdolność metody kokulturowej do wykrywania substancji wymagających aktywacji metabolicznej (prohaptenów) w porównaniu do metody monokulturowej.

Abstract

Allergic contact dermatitis (ACD) is considered to be the most prevalent form of immunotoxicity in humans, therefore it is an important endpoint taken into account in the assessment of the hazard and risk of chemicals. ACD may be induced by chemicals, fragrances and preservatives, the increase in the incidence of allergic diseases is also correlated with the increase in industrialization and environmental pollution. Common environmental sensitizing substances and pollutants include: diesel exhaust particulate (DEP); plastic, rubber and glue components; preservatives; metals; medicines; microplastic (MP), and nanoplastic (NP).

Traditionally, the identification and characterization of skin sensitizing chemicals has required the use of *in vivo* testing. Currently, in order to limit animal experiments, alternative methods are used based on the so-called Adverse outcome pathways (AOPs), which are currently a key component of human risk assessment in predictive toxicology. Currently used alternative methods approved by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) address four key elements in the mechanism of skin sensitization: i) molecular interaction with skin proteins; ii) keratinocyte inflammatory response (KC); iii) activation of dendritic cells (DC); iv) lymphocyte proliferation. Each of the key elements has a separate test method. Therefore, it is necessary to perform a combination of several tests to obtain information equivalent to *in vivo* tests allowing the classification of the test substance as sensitizing or non-sensitizing.

The aim of the dissertation was to develop an *in vitro* method assessing the sensitizing potential of the tested substances, which consolidates at least two key events of the allergic reaction, i.e. the keratinocyte inflammatory reaction (KC) and the activation of dendritic cells (DC).

The aim of the research was to determine the endpoints of the method appropriate for keratinocytes and dendritic cells and to define the method of co-culture for these two types of cells. In the first stage of the work, the profile of the release of selected inflammatory cytokines by 3 types of keratinocytes after exposure to a sensitizing substance was verified. The production of cytokines was found to be dependent on cell type, cell concentration and the duration of cell exposure. In the next stage of work, it was verified whether the level of inflammatory cytokines released by keratinocytes was influenced by the presence of dendritic cells. The result of the first stages of the research was the selection of two types of cells, i.e. neonatal keratinocytes (NHEK-neonatal) and DC-like THP-1 cells as the most appropriate system of cells cultured in a co-culture. Two inflammatory cytokines, i.e. IL-1 alpha and IL-

18, were also selected as potential endpoints of the final method. In the third stage of the study, the influence of the method of co-culturing (indirect co-culture, direct co-culture) keratinocytes and dendritic cells on the expression of surface antigens on dendritic cells was assessed. The results of this step showed that the optimal type of keratinocyte and dendritic cell co-culture is direct co-culture and the CD54 surface antigen can be used as the end point in the final co-culture method.

Based on the experiments carried out, the following conditions of the final KC/DC co-culture method were determined:

- keratinocytes: NHEK-neonatal,
- dendritic cells: THP-1,
- type of co-culture: direct,
- exposure time to the tested substances: 24 h,
- endpoints: measurement of IL-1 alpha and IL-18 concentration in post-culture media by ELISA-xMAP method and evaluation of CD54 antigen expression on THP-1 cells by flow cytometry.

In the last stage of the works, the ability of the developed method to assess the sensitizing potential of 14 substances known to be sensitizing and non-sensitizing was verified. It has been shown that the best predictive model for assessing sensitization potential is the model using the assessment of CD54 antigen expression and the level of IL-18 in post-culture media. Using this predictive model, all sensitizing substances tested (9/9) and four of the five non-sensitizing substances (4/5) were correctly classified.

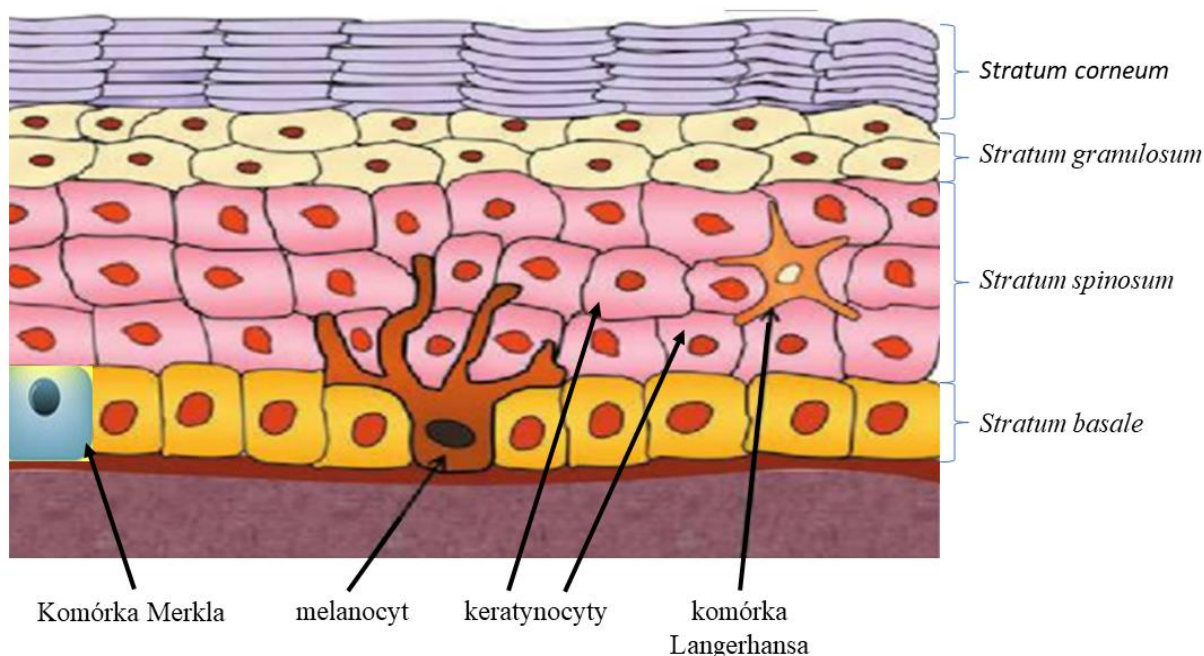
The results of the research confirmed the main thesis of the dissertation on the possibility of using a method that integrates two key events, i.e. the inflammatory reaction of keratinocytes and activation of dendritic cells for the assessment of skin sensitization potential. Additionally, a greater potential of the co-culture method for the detection of substances requiring metabolic activation (prohaptens) was found compared to the monoculture method.

1. Wprowadzenie

Skóra jako największy organ ciała pokrywający jego całą zewnętrzną powierzchnię stanowi pierwszą barierę przeciw patogenom, promieniowaniu UV oraz chemikaliom. Zbudowana jest z trzech warstw: naskórka, skóry właściwej i tkanki podskórnej (Rysunek 1.1.). Tkanka podskórna składa się z tkanki tłuszczowej i łącznej. Skóra właściwa utworzona jest z włókien kolagenowych, elastyny oraz komórek: fibroblastów, mastocytów, komórek krwi, w tej warstwie skóry znajdują się naczynia i nerwy. Najbardziej zewnętrzną warstwą skóry, narażoną bezpośrednio na działanie czynników zewnętrznych, jest naskórek zbudowany z następujących warstw, zaczynając od najbardziej zewnętrznej warstwy:

- a) warstwa rogowa (łac. *stratum corneum*),
- b) warstwa jasna (łac. *stratum lucidum*) – występująca tylko w miejscach gdzie skóra jest gruba np. na podeszwach stóp,
- c) warstwa ziarnista (łac. *stratum granulosum*),
- d) warstwa kolczysta (łac. *stratum spinosum*),
- e) warstwa podstawna (łac. *stratum basale*).

Głównymi komórkami naskórka są keratynocyty, melanocyty, komórki Langerhansa (komórki dendrytyczne) oraz komórki Merkla.



Rysunek 1.1. Schemat budowy skóry (na podstawie (Visscher i in., 2014)).

Problemy skórne związane z kontaktem z chemikaliami to stale rosnący problem środowiskowy i zdrowotny. Ekspozycja środowiskowa na substancje chemiczne w miejscu pracy oraz podczas zwykłych, codziennych aktywności może prowadzić do wystąpienia takich schorzeń skóry jak:

- a) kontaktowe zapalenie skóry,
- b) choroby tkanki łącznej,
- c) depigmentacja chemiczna,
- d) rak skóry (English i in., 2003).

Dwa główne rodzaje kontaktowego zapalenia skóry uwzględniające mechanizm patofizjologiczny to: kontaktowe zapalenie skóry z podrażnienia (ang. *Irritant Contact Dermatitis*, ICD) oraz alergiczne kontaktowe zapalenie skóry (ang. *Allergic Contact Dermatitis*, ACD).

ICD stanowi większość przypadków kontaktowego zapalenia skóry spowodowanego ekspozycją na czynniki chemiczne, fizyczne i mechaniczne występujące w miejscu pracy. Rozwija się w wyniku bezpośredniego uszkodzenia naskórka przez czynniki drażniące, co prowadzi do rozwoju zapalnej, nieimmunologicznej reakcji naskórka (Novak-Bilić i in., 2018; Tan i in., 2014). Po przeniknięciu do warstwy rogowej naskórka, substancja drażniąca działa cytotoksycznie na keratynocyty prowadząc do uwalniania cytokin i chemokin zapalnych i aktywacji wrodzonej odpowiedzi immunologicznej (Rustemeyer i in., 2011). Aktywacja i migracja do naskórka komórek zapalnych takich jak neutrofile, limfocyty, makrofagi i komórki tuczne przyczynia się do intensyfikacji stanu zapalnego (Bains i in., 2019). Do najczęstszych przyczyn ICD można zaliczyć powtarzający się kontakt z wodą oraz ekspozycję na detergenty/środki czyszczące, rozpuszczalniki, kleje, chemikalia kwaśne i zasadowe, sole metali i środki dezynfekujące (Nguyen i in., 2021).

Alergiczne kontaktowe zapalenie skóry, jest najczęściej występującą formą immunotoksyczności w populacji ludzkiej (Kimber i in., 2002). Szacuje się, że 15-20% populacji ogólnej cierpi na ACD spowodowane przez jedną lub więcej substancji chemicznych, najczęściej nikiel, substancje zapachowe i konserwanty (Peiser i in., 2012; Thyssen i in., 2007). Wykazano również, że w dużych aglomeracjach miejskich wzrasta częstość występowania chorób alergicznych, w tym ACD, w populacji dzieci i młodzieży, co prawdopodobnie związane jest z dorastaniem w warunkach nasilonego zanieczyszczenia powietrza (Czarnobilska, 2017). Zanieczyszczenia występujące w powietrzu mogą wywoływać ACD nie tylko bezpośrednio, ale również pośrednio poprzez zaburzenie równowagi immunologicznej organizmu, wpływ na produkcję mediatorów zapalnych oraz efekt adiuwantowy (Jenerowicz

i in., 2012). Efektem adiuwantowym charakteryzują się cząsteczki spalin z silników Diesla (ang. *diesel exhaust particulate* - DEP), które stanowią główną składową pyłu zawieszonego w dużych aglomeracjach miejskich, dodatkowo, DEP wzmacniają objawy alergiczne u osób uczulonych (Chehregani i in., 2008). Obecność alergenu w powietrzu może wywołać postać rozsiaaną ACD obejmującą skórę odsłoniętych części ciała (ang. *airborne contact dermatitis* - ABCD) (Kieć-Świerczyńska 1998). W literaturze opisano szereg czynników zanieczyszczających powietrze (Tabela 1.1.), mogących przyczynić się do rozwoju ABCD. Substancje te można podzielić na pochodzenia roślinnego i nie pochodzące ze źródeł roślinnych. W przypadku alergenów pochodzenia roślinnego, głównymi substancjami odpowiedzialnymi za wywołanie reakcji alergicznej po ekspozycji są laktony seskwiterpenowe, którymi pokryte są kwiaty, liście, łodygi i pyłki tych roślin. Narażenie w powietrzu może nastąpić poprzez bezpośredni kontakt z laktonami seskwiterpenowymi pokrywającymi pyłek lub poprzez uwolnienie tych chemikaliów do powietrza poprzez spalanie (Schloemer i in., 2015).

Tabela 1.1. Alergeny występujące w powietrzu mogące wywołać ABCD (Schloemer i in., 2015; Handa i in., 2011; Bonamonte i in., 2020).

<i>Grupa substancji</i>	<i>Przykłady</i>
Konserwanty	metyloizotiazolinon, formaldehyd, chlorek benzalkoniowy
Elementy z tworzyw sztucznych, gumy i kleju	żywica epoksydowa, żywica formaldehydowa, żywica fenolowo-formaldehydowa, akrylany, izocyjaniany, dibutyliomocznik
Rośliny, żywice naturalne i alergeny drzewne	Partenium ambrozjowate (<i>Parthenium hysterophorus</i>), rodzina Compositae (ambrozja, nawłóć, słonecznik), kalafonia sosnowa, propolis, drzewa tropikalne, wrotycz maruna (<i>Tanacetum parthenium</i>)
Leki	budezonid, omeprazol, olanzapina, tetrazepam, statyny
Metale	złoto, rtęć, nikiel

Narastającym problemem w ostatnich latach jest powszechna obecność mikroplastiku (ang. *microplastics* - MP) i nanoplastiku (ang. *nanoplastics* – NP) w środowisku wodnym, atmosferze i glebie. Wykazano, negatywny wpływ MP i NP na organizm w modelu zwierzęcym, zależny od wielkości i kształtu cząstek, stężenia, ładunku oraz drogi ekspozycji.

Stwierdzono między innymi toksyczność żołądkowo-jelitową, hepatotoksyczność oraz neurotoksyczność (da Silva Brito i in., 2022). Wpływ MN i NP na organizm człowieka jest obecnie przedmiotem intensywnych badań. Głównym źródłem ekspozycji na MP i NP u człowieka jest droga pokarmowa i inhalacyjna, może wystąpić również ekspozycja skórna, jednak obecnie dostępnych jest niewiele danych na ten temat (Rubio i in., 2020). Najnowsze badania jednak wskazują, że internalizacja MP przez tkankę nabłonkową może prowadzić do ekspozycji komórek takich jak komórki dendrytyczne (DC), makrofagi/monocyty czy komórki T. W badaniach *in vitro*, stwierdzono zwiększone uwalnianie reaktywnych form tlenu (ROS ang. *reactive oxygen species*) przez komórki DC-podobne takie jak THP-1, U937, oraz uwalnianie cytokin zapalnych przez linię nieśmiertelnionych, ludzkich keratynocytów HaCaT, a więc dwa główne typy komórek, które zaangażowane są w rozwój alergicznego kontaktowego zapalenia skóry (Gautam i in., 2022).

Ze względu na wysoką częstość występowania ACD w populacji ludzkiej, działanie uczulające na skórę (ang. *skin sensitization*) stanowi punkt końcowy dla zdrowia człowieka, który jest uwzględniany w ocenie zagrożeń i ryzyka chemikaliów (OECD 2014). Informacje na temat potencjału działania uczulającego na skórę są wymagane przez różne akty prawne, szczególnie Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (ang. *Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals*, REACH). Celem rozporządzenia REACH jest zapewnienie wysokiego poziomu ochrony zdrowia ludzkiego i środowiska (Clouet i in., 2017). Rozporządzenie weszło w życie 1 czerwca 2007 r. zastępując dotychczasowe przepisy, które nie zapewniały wystarczających danych na temat wpływu znacznej części substancji na zdrowie człowieka i ekosystem. Zgodnie z wcześniejszym systemem kontroli chemikaliów, istniały odrębne zasady dla „istniejących” substancji (substancji, które były obecne na rynku europejskim w latach 1971-1981) i „nowych” substancji (substancji, które pojawiły się na rynku europejskim po 19 września 1981 r.). Obowiązek szczegółowych badań dotyczący tylko „nowych” substancji uniemożliwiał skuteczną kontrolę ryzyka stwarzanego przez substancje wprowadzone na rynek europejski przed 1981 rokiem. Dzięki wprowadzeniu REACH wszystkie substancje zostały objęte wspólnym systemem oceny ryzyka, REACH dotyczy wszystkich substancji chemicznych, zarówno tych wykorzystywanych w procesach przemysłowych, jak i stosowanych na co dzień, np. w farbach, środkach czystości, odzieży, meblach czy sprzęcie elektrycznym. Substancje niezarejestrowane nie mogą być wprowadzane do obrotu ani stosowane w Unii Europejskiej. Podstawowymi celami systemu stworzonego przez rozporządzenie REACH są:

- a) ochrona zdrowia ludzi i środowiska,
- b) zapewnienie wysokiego poziomu bezpieczeństwa w miejscu pracy,
- c) utrzymanie i wzmocnienie konkurencyjności europejskiego przemysłu chemicznego,
- d) integracja działań europejskich z działaniami międzynarodowymi,
- e) promowanie alternatywnych metod oceny ryzyka substancji chemicznych w celu zmniejszenia liczby badań przeprowadzanych na zwierzętach.

Rozporządzenie REACH uregulowało kwestie bezpieczeństwa stosowania chemikaliów w UE, natomiast niezwykle istotne dla bezpieczeństwa człowieka i środowiska jest również postępowanie z odpadami. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/98/WE z dnia 19 listopada 2008 r. ustanowiła środki służące ochronie środowiska i zdrowia ludzkiego poprzez zapobieganie i zmniejszanie negatywnego wpływu wynikającego z wytwarzania odpadów i gospodarowania nimi. Szczególne postępowanie dotyczy odpadów niebezpiecznych. Produkcja, zbieranie, przewóz, magazynowanie i przetwarzanie odpadów niebezpiecznych należy przeprowadzać w warunkach gwarantujących ochronę środowiska i zdrowia ludzkiego (EU, 2008). Za odpady niebezpieczne uznawane są również odpady posiadające właściwości uczulające skórę. Zgodnie z ustawą z dnia 14 grudnia 2012 r. o odpadach, można dokonać zmiany klasyfikacji odpadów niebezpiecznych na odpady inne niż niebezpieczne, po wykazaniu, że nie posiadają one właściwości odpadów (Dz. U. 2013 poz. 21). Zatem ocena działania drażniącego i uczulającego jest istotnym badaniem w kontekście bezpieczeństwa środowiskowego zarówno substancji wprowadzanych do obrotu i stosowania, jak również odpadów powstających w procesach produkcyjnych.

Standardowa ocena działania uczulającego na skórę obejmowała badania z wykorzystaniem systemów badawczych *in vivo*. W ramach Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (ang. *Organization for Economic Cooperation and Development*, OECD) istnieją 4 główne wytyczne opisujące testy oceniające działanie uczulającego na skórę:

- a) OECD TG 406: Test maksymalizacji na świnkach morskich (GPMT) i test Buehlera,
- b) OECD TG 429: Działanie uczulające na skórę – Test lokalnych węzłów chłonnych (LLNA),
- c) OECD TG 442A: Działanie uczulające na skórę - Test lokalnych węzłów chłonnych: DA (LLNA:DA),
- d) OECD 442B: Działanie uczulające na skórę – Test lokalnych węzłów chłonnych: BrdU-ELISA lub FCM Tabela 1.2.).

Tabela 1.2. Charakterystyka testów *in vivo* stosowanych w ocenie działania uczulającego na skórę (OECD 2021b; 2010a; 2010b; 2018a).

Nazwa testu	OECD TG 406	OECD TG 429	OECD TG 442A	OECD 442B
System badawczy	Świnka morska	Mysz (CBA/J)		
Liczba zwierząt w grupach	GPMT: min. 10 zwierząt w grupie narażanej, 5 zwierząt w grupie kontrolnej, test Buehlera: min. 20 zwierząt w grupie narażanej, 10 zwierząt w grupie kontrolnej	minimum 4 zwierzęta/grupę minimum trzy grupy narażane + dwie grupy kontrolne		
Czas trwania badania	23-25 dni	6 dni	minimum 8 dni	minimum 6 dni
Wskaźnik proliferacji limfocytów	Nie dotyczy	inkorporacja 3H-metylotymidyny	Zawartość adenosynotrifosforanu (ATP)	Zawartość 5-bromo-2-dezoksyurydyny (BrdU)
Metoda pomiaru	Ocena reakcji skórnych i objawów klinicznych	radioaktywna	nieradioaktywna	
		Zliczanie impulsów β -scyntylicacji	Pomiar bioluminescencji	Metoda ELISA (BrdU-ELISA)/ Cytometria przepływową (BrdU-FCM)
Wynik	Nie dotyczy	Wskaźnik stymulacji (SI) przy dawkach wielokrotnych: stosunek średniej proliferacji w grupie badanej do średniej proliferacji w grupie kontrolnej.		

W wytycznej OECD TG 406 stosowanej przez dziesięciolecia, jako system badawczy stosuje się kawię domową, jako gatunek preferowany do testów uczuleniowych. Pozostałe wytyczne są przeznaczone do stosowania u myszy (OECD 2021b). Test LLNA *in vivo* w dużej mierze zastąpił testy oparte na świnkach morskich (Gwaltney-Brant, 2014) oferując wiele korzyści, zwłaszcza ograniczenie i udoskonalenie wykorzystania zwierząt (Williams i in., 2015). W teście LLNA ocenia się indukcję proliferacji limfocytów w lokalnych węzłach chłonnych okolicy ucha, które stanowi miejsce aplikacji badanej substancji. Proliferacja limfocytów wywołana przez substancję uczulającą jest proporcjonalna do zastosowanej dawki, a zastosowanie znaczonego radioaktywnie materiału (np. tymidyny) pozwala na pomiar stopnia uczulenia za pomocą licznika scyntylicyjnego. Pozostałe dwie metody to nieradioaktywne modyfikacje testu LLNA, które mierzą aktywację limfocytów za pomocą metody bioluminescencyjnej (LLNA:DA) lub testu ELISA (BrdU-ELISA) oraz cytometrii przepływową (BrdU-FCM) (Tabela 1.2.).

Globalny Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów ONZ (ang. *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*, UN GHS) definiuje czynnik uczulający skórę jako substancję lub mieszaninę, która prowadzi do reakcji

alergiczej występującej po kontakcie ze skórą. System GHS klasyfikuje substancje jako substancje uczulające (kategoria 1) jeśli istnieją dowody, że substancja może wywołać uczulenie przez kontakt ze skórą u znacznej liczby osób lub jeśli odpowiednie testy na zwierzętach dały pozytywne wyniki. Substancje, które uzyskały wyniki negatywne uznaje się za substancje niesklasyfikowane, czyli nieuczulające (brak kategorii). Jeżeli dostępne są wystarczające dane, należy dokonać subklasyfikacji substancji kategorii 1 według siły działania uczulającego na podkategorię 1A lub 1B (Tabela 1.3.). Subkategoryzacja opiera się głównie na analizie danych dotyczących zwierząt lub ludzi (UN 2021 lb United Nations 2021).

Tabela 1.3. Subkategoryzacja substancji uczulających wg UN GHS na podstawie testów przeprowadzanych na zwierzętach (UN 2021 lb United Nations 2021)

Subkategoria	Definicja	Kryteria <i>in vivo</i>
1A	Substancje wykazujące wysoką częstość występowania u ludzi i/lub charakteryzujące się znaczną siłą działania u zwierząt i mogące wywoływać uczulenia u ludzi. Można również wziąć pod uwagę nasilenie reakcji.	<ul style="list-style-type: none"> • LLNA: wartość EC3 $\leq 2\%$ • Test maksymalizacji na świnkach morskich: odsetek odpowiedzi $\geq 30\%$ zwierząt uważa się za pozytywny przy śródskórnej dawce indukcyjnej $\leq 0.1\%$, lub odsetek odpowiedzi $\geq 60\%$ zwierząt uważa się za pozytywny przy śródskórnej dawce indukcyjnej $> 0.1\%$ do $\leq 1\%$ • Test Buehlera: odsetek odpowiedzi $\geq 15\%$ zwierząt uważa się za pozytywny przy dawce indukcyjnej aplikowanej naskórkowo $\leq 0.2\%$, lub odsetek odpowiedzi $\geq 60\%$ zwierząt uważa się za pozytywny przy dawce indukcyjnej aplikowanej naskórkowo $> 0.2\%$ do $\leq 20\%$
1B	Substancje wykazujące niską do umiarkowanej częstość występowania u ludzi i/lub niską do umiarkowanej siłę działania u zwierząt i można przypuszczać, że mogą powodować uczulenie u ludzi. Można również wziąć pod uwagę nasilenie reakcji.	<ul style="list-style-type: none"> • LLNA: wartość EC3 $> 2\%$ • Test maksymalizacji na świnkach morskich: Odsetek odpowiedzi pomiędzy $\geq 30\%$ a $< 60\%$ zwierząt przy śródskórnej dawce indukcyjnej $> 0.1\%$ do $\leq 1\%$, lub Odsetek odpowiedzi $\geq 30\%$ zwierząt przy śródskórnej dawce indukcyjnej $> 1\%$ • Test Buehlera: Odsetek odpowiedzi pomiędzy $\geq 15\%$ z $< 60\%$ zwierząt przy dawce indukcyjnej aplikowanej naskórkowo $> 0.2\%$ do $\leq 20\%$ lub, Odsetek odpowiedzi $\geq 15\%$ przy dawce indukcyjnej stosowanej naskórkowo $> 20\%$
EC3: stężenie substancji chemicznej wymagane do wywołania trzykrotnego wzrostu aktywności proliferacyjnej komórek węzłów chłonnych (SI ≥ 3)		

Obecnie istnieje konieczność ograniczania badań na zwierzętach wynikająca z aspektów regulacyjnych i etycznych, zgodnie z wprowadzoną po raz pierwszy w 1959 roku przez zasadą 3R (Russell i in., 1959), której celem jest:

- a) redukcja (ang. *Reduction*), czyli zmniejszenie liczby zwierząt wykorzystywanych w eksperymentach,

- b) udoskonalenie (ang. *Refinement*), czyli stosowanie metod ograniczających cierpienie i niepokój zwierząt,
- c) zastąpienie (ang. *Replacement*), czyli stosowanie metod, w których zastępują się zwierzęta innymi systemami badawczymi.

Alternatywne metody oceny ryzyka promowane przez REACH stały się niezbędne we współczesnej toksykologii i ekotoksykologii. Istnieją 4 podstawowe systemy stosowane w celu częściowego lub pełnego zastąpienia zwierząt w eksperymentach toksykologicznych:

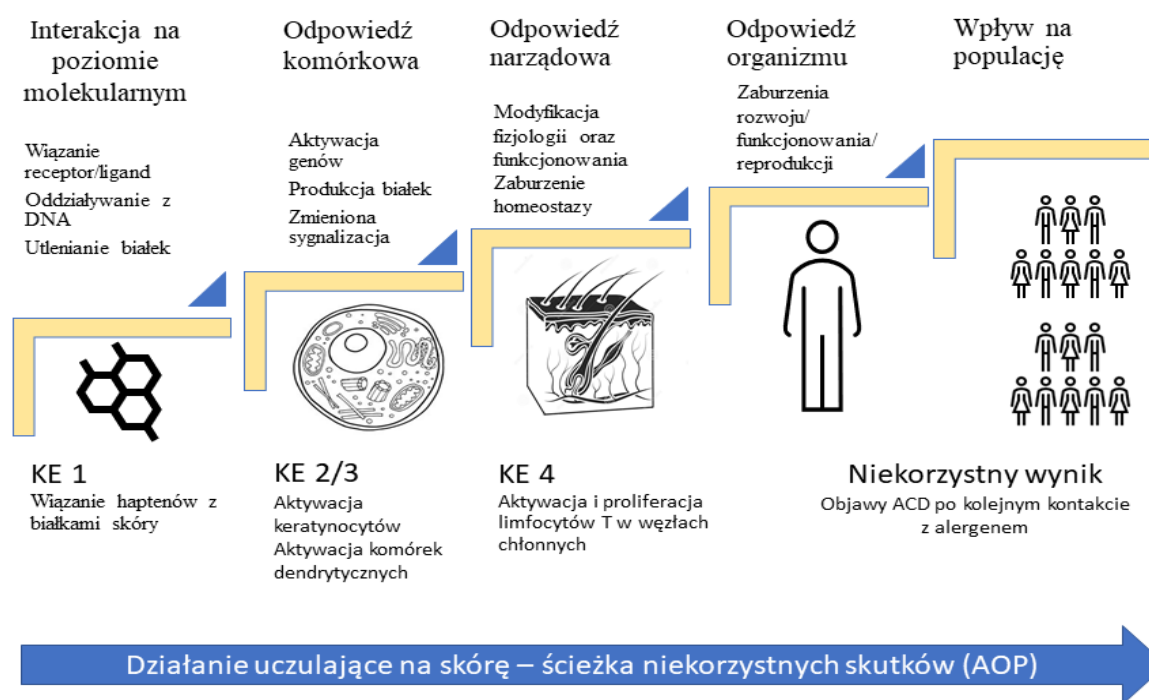
- a) metody *in silico*, czyli symulacje komputerowe i modele matematyczne, takie jak Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR), Threshold of Toxicological Concern (TTC) i inne,
- b) metody *in chemico*, metody chemiczne oceniające właściwości badanej substancji poprzez reakcję z odpowiednim materiałem, bez użycia komórek ludzkich lub zwierzęcych,
- c) metody *in vitro* takie jak: hodowle pierwotne, pierwotne linie komórkowe, ustanowione linie komórkowe, zrekonstruowane tkanki 3D,
- d) metody *ex vivo* czyli metody wykorzystujące izolowane tkanki i narządy zwierzęce (Kandárová i in., 2011).

Wprowadzanie metod alternatywnych w obszarze oceny działania uczulającego na skórę stało się możliwe dzięki zastosowaniu metodologii tzw. ścieżek niekorzystnych skutków (ang. *Adverse outcome pathways*, AOP), które stanowią obecnie kluczowy element oceny ryzyka u ludzi, stosowany w toksykologii predykcyjnej (Vinken 2013). Koncepcja AOP opiera się na założeniu, że toksyczność danej substancji jest wynikiem jej pierwszego kontaktu oraz interakcji z początkowym kluczowym elementem w organizmie. Zgodnie z tą koncepcją, AOP jest sekwencją zdarzeń obejmującą fazę inicjacji molekularnej (ang. *Molecular Initiating Event*, MIE) oraz zdarzenia pośrednie prowadzące do niepożądanego efektu na poziomie jednostki lub populacji (OECD 2014). W przypadku uczulenia skóry metody alternatywne mierzą lub przewidują kluczowe zdarzenia (ang. *key events*, KE) w ścieżkach niekorzystnych skutków. W mechanizmie uczulenia skóry można wyróżnić następujące kluczowe zdarzenia (Rysunek 1.2.):

- a) KE1 - molekularne zdarzenie inicjujące, kowalencyjne wiązanie substancji elektrofilowych z centrami nukleofilowymi w białkach skóry,
- b) KE2 - aktywacja keratynocytów,

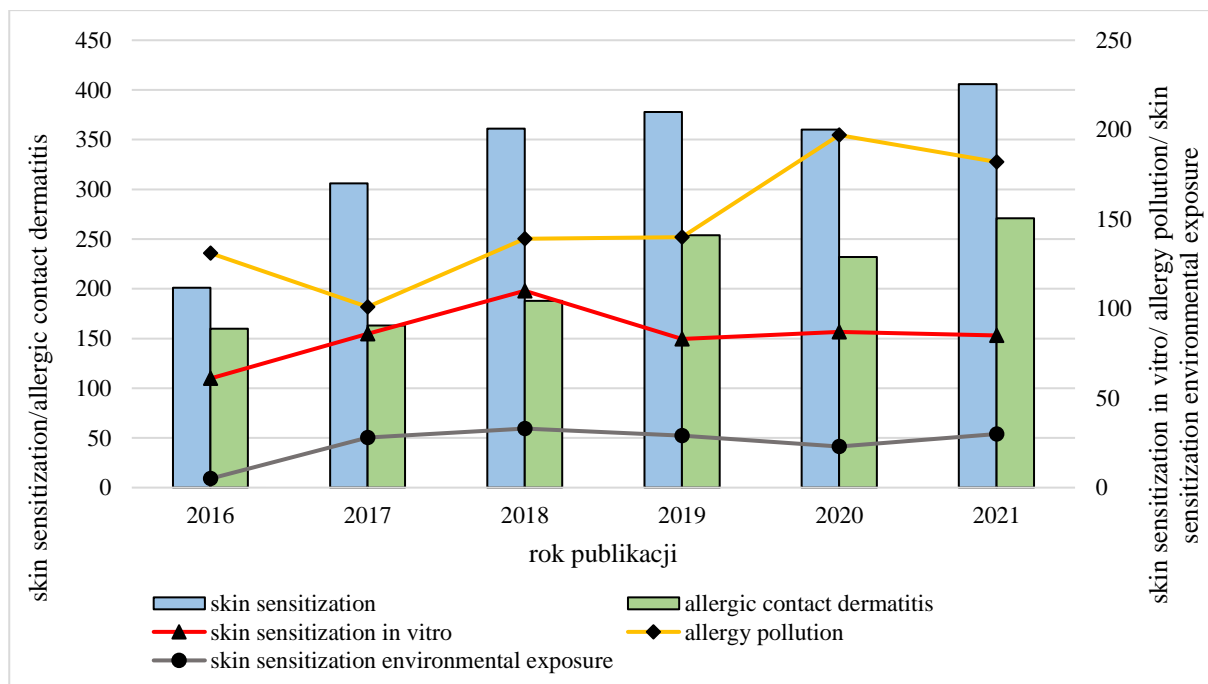
c) KE3 - aktywacja komórek dendrytycznych,

d) KE4 - proliferacja komórek T.



Rysunek 1.2. Działanie uczulające na skórę – ścieżka niekorzystnych skutków (na podstawie (OECD 2014)).

Zainteresowanie metodami niezwierzęcymi oceniającymi potencjał uczulający na skórę rośnie w ostatnich latach (Rysunek 1.3.). Z jednej strony jest to związane z regulacjami prawnymi obowiązującymi w Europie (Ezendam i in., 2016). W 2009 roku wprowadzono w Europie zakaz testowania nowych składników kosmetycznych na zwierzętach (EU, 2009). W 2013 roku siódma poprawka do dyrektywy kosmetycznej Unii Europejskiej wprowadziła całkowity zakaz testowania na zwierzętach wszystkich składników kosmetyków (Basketter i in., 2022). Dodatkowo, aktualizacja rozporządzenia REACH z 2017 r. wymaga stosowania metod *in vitro* i *in silico* jako metod pierwszego wyboru (Sauer i in., 2016; EC 2016). Do rozwoju tych metod przyczynia się również wzrost występowania chorób alergicznych skorelowany ze wzrostem uprzemysłowienia i zanieczyszczenia środowiska.



Rysunek 1.3. Liczba publikacji zawierających słowa kluczowe: skin sensitization, allergic contact dermatitis, skin sensitization in vitro, allergy pollution, skin sensitization environmental exposure w latach 2016-2021 (SCOPUS).

2. Wstęp

2.1. Mechanizm powstawania ACD

Keratynocyty oraz komórki dendrytyczne skóry zwane komórkami Langerhansa pełnią kluczową rolę w immunologicznym procesie indukcji ACD.

ACD to zapalna dermatoza rozwijająca się w wyniku wielokrotnego kontaktu skóry z drobnocząsteczkowymi związkami chemicznymi zwanymi alergenami kontaktowymi lub haptenami, które mają zdolność aktywacji układu odpornościowego w mechanizmie nadwrażliwości typu opóźnionego. ACD przebiega w dwóch fazach: fazie indukcji (faza aferentna) oraz fazie pełnoobjawowej (faza eferentna). Faza indukcji obejmuje wszystkie etapy, począwszy od pierwszego kontaktu z alergenem do rozwoju uczulenia. Faza pełnoobjawowa rozpoczyna się po kolejnym kontakcie z haptenem u wcześniej uczulonej osoby i prowadzi do wystąpienia objawów ACD (Rysunek 2.1.) (Martins i in., 2011).

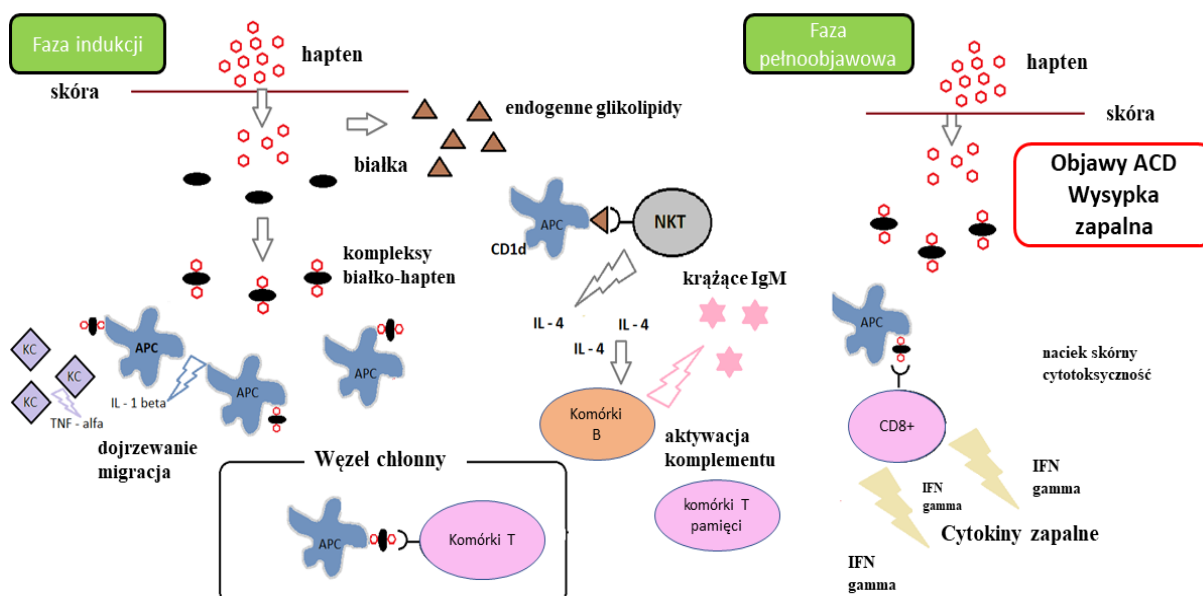
Pierwszym etapem fazy aferentnej jest oddziaływanie alergenu z białkami skóry. Hapteny to małe reaktywne cząsteczki o masie cząsteczkowej poniżej 500 Da, które same w sobie nie są immunogenne, ale wiążą się z peptydami i białkami, dzięki czemu są rozpoznawane przez układ odpornościowy (Bos i in., 2000). Dane literaturowe wskazują, że rozmiar cząsteczki haptenu nie jest parametrem decydującym o właściwościach uczulających, ale jej reaktywność związana z zdolnością do interakcji elektrofil-nukleofil (Roberts i in., 2018). Hapteny to akceptory elektronów (elektrofile), które reagują z bogatymi w elektrony aminokwasami (nukleofilami) poprzez wiązanie kowalencyjne, co prowadzi do stabilizacji cząsteczki. Aminokwasy będące celem haptenu to lizyna, cysteina, histydyna, metionina czy tyrozyna (Martins i in., 2011; Martin i in., 2018). Wiązanie kowalencyjne może powstawać również w reakcjach z udziałem wolnych rodników. Hapteny mogą wiązać się z białkami również niekowalencyjnie czego przykładem są jony metali tworzące z białkami stabilne chelaty za pośrednictwem wiązań koordynacyjnych (Karlberg i in., 2008).

Nie wszystkie hapteny mają zdolność bezpośredniego reagowania z białkami skóry. Część z nich, tzw. prohapteny i prehapteny wymagają wstępnej aktywacji do produktów pośrednich mających zdolność wiązania z białkami skóry. Prehapteny to substancje aktywowane poza skórą na drodze przemian abiotycznych takich jak utlenianie czy fotoaktywacja, bez udziału układów enzymatycznych (Karlberg i in., 2013). Prohapteny wymagają natomiast aktywacji metabolicznej (enzymatycznej), która zachodzi w obrębie skóry (Aptula i in., 2007). Enzymy skórne obejmują układ cytochromu P450 (CYP) wykazujący aktywność oksydazową (Karlberg i in., 2013) monooksygenazy, dehydrogenazy, esterazy, amidazy oraz transferazy (Chipinda

i in., 2011). Za pośrednictwem tych układów enzymatycznych, skóra aktywnie uczestniczy w procesie detoksykacji ksenobiotyków. Modyfikacja ich struktury chemicznej zwiększa hydrofilność i ułatwia eliminację z organizmu. Jednak, w trakcie tego procesu mogą powstawać wysoce reaktywne związki pośrednie, pozostające w skórze wystarczająco długo, aby utworzyć kompleksy haptenu-białko (Vocanson i in., 2009). Większość haptenu posiada reszty lipofilowe umożliwiające penetrację warstwy rogowej naskórka (*stratum corneum*) (Lepoittevin i in., 2000).

Pierwszy kontakt haptenu ze skórą wywołuje szereg reakcji o charakterze immunologicznym. Po związaniu haptenu z białkami skóry powstają kompleksy, które są wchłaniane przez komórki prezentujące antygen (ang. *antigen presenting cells*, APC). Głównymi komórkami APC dla alergenów kontaktowych są naskórkowe komórki Langerhansa (ang. *Langerhans cells*, LC) i skórne komórki dendrytyczne zlokalizowane w skórze właściwej (ang. *Dendritic cells*, DC) (Romani, 2012). Aplikacja haptenu na skórę aktywuje również keratynocyty (ang. *Keratinocytes*, KC), które poprzez uwalnianie czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF-alfa), pobudzają dojrzewanie APC i ich migrację do lokalnych węzłów chłonnych. W lokalnych węzłach chłonnych komórki prezentujące antygen aktywują limfocyty T CD4+/CD8+, które proliferują do limfocytów T pamięci (Xu i in., 1996). Kontakt haptenu ze skórą prowadzi również do uwolnienia endogennych glikolipidów, które są prezentowane komórkom NK (ang. *Natural Killer*) przez skórne komórki dendrytyczne, co prowadzi do uwalniania interleukiny 4 (IL-4). W obecności IL-4 dochodzi do aktywacji limfocytów B, które rozpoczynają produkcję immunoglobuliny klasy M (IgM) (Gober i in., 2008).

Faza pełnoobjawowa następuje po kolejnym kontakcie z tym samym alergenem. Komórki T efektorowe i pamięci wytwarzają wysoki poziom cytokin. Aktywowane limfocyty T migrują z węzłów chłonnych do krwi, a następnie do obszaru skóry, który miał kontakt z alergenem. Migracja limfocytów do odpowiedniego miejsca jest regulowana przez chemokiny i cząsteczki adhezyjne (Xu i in., 2000). Efektorowe limfocyty T uwalniają prozapalne cytokiny, takie jak interferon-gamma (IFN-gamma) i promują eliminację haptenuzowanych komórek, co prowadzi do rozwoju klasycznej wysypki zapalnej (Kaplan i in., 2012).



Rysunek 2.1. Mechanizm powstawania ACD (na podstawie (Gober i in., 2008)). KC: keratynocyty, APC: komórki prezentujące antygen, NKT: komórki natural killer T, IFN: interferon

2.2. KE1. Charakterystyka metod

Stosowana powszechnie wytyczna OECD TG 442C dotycząca pierwszego kluczowego zdarzenia (KE1) w zakresie działania uczulającego na skórę tj. zdarzenia inicjacji molekularnej zostały przyjęte przez OECD i obejmują trzy metody *in chemico*:

- bezpośredni test reaktywności peptydów (DPRA),
- test reaktywności pochodnych aminokwasów (ADRA),
- kinetyczny test bezpośredniej reaktywności peptydów (kDPRA) (OECD 2022a).

W metodzie **DPRA** stosowane są syntetyczne peptydy zawierające lizynę i cysteinę, które są inkubowane przez 24 godziny z nadmiarem substancji chemicznej. Podczas inkubacji następuje niekwalencyjne wiązanie peptydów i badanej substancji. Następnie, stężenie peptydów ocenia się za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV (HPLC-UV). Substancje klasyfikuje się do jednej z czterech klas reaktywności na podstawie ubytku peptydów cysteiny i lizyny. DPRA wykorzystuje peptydy o niskiej absorpcji UV (Yamamoto i in., 2015), aby uzyskać odpowiednią czułość detekcji, końcowe stężenie badanej substancji chemicznej musi być wysokie (100 mM), co uniemożliwia analizę substancji słabo rozpuszczalnych. Wadą tej metody jest możliwość nieprecyzyjnego pomiaru stężenia peptydów ze względu na występowanie zjawiska koelucji, czyli wymywania dwóch lub większej liczby związków z kolumny chromatograficznej w tym samym czasie (Natsch i in., 2008).

Wady metody DPRA zostały zniwelowane w metodzie **ADRA**. Zastosowanie pochodnych aminokwasów tj. N-(2-(1-naftylo)acetylo)-L-cysteiny (NAC) i α -N-(2-(1-naftylo)acetylo)-L-lizyny (NAL) (Yamamoto i in., 2015; Fujita i in., 2014) pozwoliło zredukować stężenie końcowe badanej substancji chemicznej 100 razy (1 mM) (Akimoto i in., 2020) co daje możliwość badania substancji słabo rozpuszczalnych. W metodzie ADRA zastosowano detekcję przy długości fali = 281nm, więc nawet jeśli testowana substancja chemiczna jest współeluowana z NAC lub NAL, nie będzie to miało wpływu na oznaczenie ilościowe peptydów, o ile sama testowana substancja chemiczna nie absorbuje promieniowania UV przy 281 nm. Wadą metody ADRA jest podatność NAC na utlenianie, zwłaszcza w obecności nawet niewielkiej koncentracji jonów metali. Można temu zapobiec poprzez dodanie kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) w niskim stężeniu, który będzie kompleksował obecne w podłożu jony metali (Fujita i in., 2018). Ostatnie badania potwierdziły możliwość wykorzystania ADRA do oceny mieszanin stosowanych w składnikach kosmetycznych, dzięki zastosowaniu stężenia wagowego, a nie molowego (Yamamoto i in., 2019). Analizę substancji wieloskładnikowych umożliwia również metoda **ADRA-FL**. Zastosowanie detekcji fluorescencji zredukowało liczbę pików na chromatogramie, dzięki czemu uzyskano pojedynczy ostry pik oraz stabilną linię bazową (Fujita i in., 2019).

W metodzie **kDPRA**, zastosowano tylko peptyd cysteinowy, w związku z czym substancje uczulające reagujące wyłącznie z lizyną, takie jak niektóre halogenki acylu, fenole lub aldehydy, nie mogą być analizowane tą metodą. W kDPRA stosuje się równolegle pięć stężeń materiału badanego (5; 2,5; 1,25; 0,625 oraz 0,3125 mM) oraz 6 czasów inkubacji materiału badanego z peptydem cysteinowym (10, 30, 90, 150, 210 i 1440 min). W celu określenia resztkowego stężenia cysteiny stosuje się monobromobiman (mBrB), który reaguje z niezwiązanymi ugrupowaniami cysteinowymi tworząc fluorescencyjny kompleks (OECD 2022a).

W metodach *in chemico* znalazły zastosowanie różne metody detekcji, a także typy substancji nukleofilowych (Tabela 2.1.). W metodzie spektroskopii NMR zaproponowano N-butyloaminę i 1-butanotiol jako substytuty nukleofilowych grup aminowych i tiolowych odpowiednio, lizyny i cysteiny. Metoda ta zapewnia szybką wstępną ocenę reaktywności substancji chemicznej i pozwala na zastosowanie roztworów wodnych i niewodnych (Sanderson i in., 2016). W innej metodzie opartej na NMR, zastosowano tioldansylocysteaminę (**NMR-DCYA**) ze względu na jej charakterystyczne widmo NMR i minimalną interferencję z większością elektrofilów (Chittiboyina i in., 2015). DCYA zastosowano również w metodzie opartej na fluorescencji – High Throughput Screening method (**HTS-DCYA**), w której addukt

reakcji jest oznaczany ilościowo w sposób bezpośredni (Avonto i in. 2015). Dzięki tej metodzie możliwa jest ocena reaktywności całej mieszaniny nawet wtedy, gdy udział poszczególnych składników jest nieznan (emisję fluorescencji można ekstrapolować jako całkowitą liczbę adduktów DCYA w roztworze). Oszacowano, że metoda HTS-DCYA jest wystarczająco czuła, aby umożliwić detekcję wysokoreaktywnych związków występujących w łącznym stężeniu 2–3% w/w (Avonto i in., 2018). Z kolei wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (**HPLC/MS-MS**) zwiększyła możliwość identyfikacji substancji niekowalencyjnie wiążących się z peptydami lub substancji chemicznych z nakładającymi się pikami z każdym z peptydów. Metoda HPLC/MS-MS jest skuteczniejsza w ocenie związków słabo rozpuszczalnych w wodzie (Zhang i in., 2018).

W przeciwieństwie do metod wymagających drogiego sprzętu, w metodzie **spektro-DPRA** nieprzereagowany peptyd zawierający cysteinę i grupę aminową nieprzereagowanego peptydu zawierającego lizynę wykrywa się odpowiednio za pomocą spektrofotometru UV-VIS i fluorymetru. Główną zaletą tej metody jest skrócenie czasu pomiaru do 10 minut w porównaniu z DPRA (22-26 h), jednak wadą tej metody są trudności w szacowaniu potencjału uczulającego pre/prohaptenów oraz substancji wysoce lipofilnych (Jeong i in., 2013; Cho i in., 2014; Cho i in., 2019). Problem z prawidłowym oszacowaniem prohaptenów pojawia się również w metodzie wykorzystującej **glutation i cysteaminę** zamiast syntetycznych peptydów (Nepal i in. 2018). Pozostałości cysteaminy i glutationu po inkubacji z badanymi substancjami przeprowadza się do pochodnych przy użyciu chlorku 4-(4-dimetyloaminofenyloazo)benzenosulfonylu (DABS-Cl), w wyniku tej reakcji powstają bardzo stabilne kompleksy (do 48 h). Ponieważ w metodzie tej używany jest bufor octanowy o pH 4,5 istnieje ryzyko uzyskania nieprawidłowych wyników dla silnie zasadowych chemikaliów. Aby zwiększyć potencjał wykrywania prohaptenów, zastosowano system utleniania peroksydazy chrzanowej i nadtlenu wodoru (HRP/P) w metodzie **PPRA** (Peroxidase Peptid Reactivity Assay) (Gerberick i in., 2009). Metoda PPRA została również sprawdzona pod kątem wykrywania alergenów oddechowych, jednak nie wykazuje w tej kwestii przewagi nad metodą DPRA (Lalko i in., 2013).

Przykładem metody spełniającej element szlaku związanego z ekspresją białek jest test interakcji alergen-peptyd/białko (**APIA**). APIA koncentruje się na początkowych procesach haptencji w ludzkiej skórze i ocenia interakcje między potencjalnymi alergenami a białkami lub peptydami związanymi ze skórą (Bauer i in., 2011).

Tabela 2.1. KE1. Zestawienie metod

Metoda	Rodzaj detekcji	Stosowany nukleofil	Liczba danych	Dokładność [%]	Swoistość [%]	Czułość [%]	Źródło
				w porównaniu do LLNA			
DPRA	HPLC-UV	syntetyczny peptyd zawierający cysteinę i lizynę	157	80	77	80	(OECD 2022a)
ADRA	HPLC-UV	NAC, NAL	124	79	92	74	(OECD 2022a)
kDPRA	detekcja fluorescencji	peptyd cysteinowy	180	85	86	84	(OECD 2022a)
ADRA-FL	HPLC-FL	NAC, NAL	47	-	-	-	(Fujita i in., 2019)
NMR	spektroskopia NMR	n-butylamina, 1-butanotiol	8	-	-	-	(Sanderson i in., 2016)
NMR-DCYA	spektroskopia NMR	DCYA	17	-	-	-	(Chittiboyina i in., 2015)
HTS-DCYA	detekcja fluorescencji	DCYA	33	82	90	78	(Avonto i in., 2015)
HPLC/MS-MS	HPLC/MS-MS	peptyd cysteinowy peptyd lizynowy	18	-	-	-	(Zhang i in., 2018)
PPRA	HPLC/MS-MS	peptyd cysteinowy	15	-	-	-	(Gerberick i in., 2009)
APIA	spektrometria masowa MALDI-TOF	peptyd-21, peptyd-20	3	-	-	-	(Dietz i in., 2013)
Spectro-DPRA	UV-VIS spektrofotometria/fluorymetria	peptyd cysteinowy peptyd lizynowy	40	82,5	86,7	80	(Cho i in., 2014)
Metoda z użyciem małych endogennych substancji	HPLC – PDA	cysteamina glutation	30	93	82	100	(Nepal i in., 2018)

„-”, brak danych

2.3. KE2. Charakterystyka metod

W ramach KE2 oceniana jest aktywacja keratynocytów. Keratynocyty stanowią dominujący typ komórek naskórka, które w procesie keratynizacji stopniowo przekształcają się, tworząc różne warstwy, każda o odmiennej specyfice.

Aktywację keratynocytów można ocenić na podstawie:

- a) aktywacji szlaków biochemicznych,
- b) analizy ekspresji genów i białek,
- c) oceny produkcji cytokin prozapalnych.

2.3.1. KE2. Metody oceniające aktywację szlaków biochemicznych

Kilka metod opiera się na pomiarze aktywacji szlaku Nrf2 (Tabela 2.2.). Aktywność czynnika transkrypcyjnego Nrf2, głównego regulatora stresu oksydacyjnego i elektrofilowego, jest ujemnie regulowana przez białko Keap1 (Helou i in., 2019), które jest celem dla haptenów (Dinkova-Kostova i in., 2017). Zmiany konformacyjne w Keap1 prowadzą do akumulacji czynnika transkrypcyjnego Nrf2, powodując jego translokację do jądra i aktywację genów zależnych od elementu odpowiedzi antyoksydacyjnej (ARE) (Natsch, 2009; Emter i in., 2010; Dinkova-Kostova i in., 2005; Kansanen i in., 2013).

Dwa testy opisane w wytycznych OECD nr 442D, tj. ARE-Nrf2 luciferase **KeratinoSens**TM i ARE-Nrf2 luciferase **LuSens**, wykorzystują unieśmiertelnione adherentne linie komórkowe pochodzące z ludzkich keratynocytów (KC). Gen reporterowy lucyferazy został stabilnie wstawiony do keratynocytów pod kontrolą elementu ARE ludzkiego genu AKR1C2 (KeratinoSensTM) (Emter i in., 2010) lub szczurzego genu Nqo1 (LuSens) (Ramirez i in., 2014). Ilościowy pomiar luminescencji wynikającej z indukcji genu lucyferazy w komórkach po ekspozycji na badaną substancję jest wskaźnikiem aktywności czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (OECD 2022b). Równolegle ocenia się żywotność komórek za pomocą bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowego (MTT). Jako alternatywny pomiar lub zamiast testu MTT zaproponowano ocenę żywotności opartą na resazuryinie, niewymagającą lizy komórek (Emter i in., 2015).

Aby zwiększyć możliwość wykrywania prohaptenów, w teście KeratinosensTM zastosowano frakcję S9 pochodzącą z wątroby szczura (Natsch i in., 2013a) lub frakcję S9 uzupełnioną enzymami ludzkiego cytochromu P450 (Huth i in., 2017).

Do wykrywania czynników uczulających skórę w wyrobach medycznych opracowano reporterową linię komórkową **MDA-ARE** charakteryzującą się wysoką ekspresją Nrf2 i Keap1. Pozwoliło to na skrócenie czasu inkubacji i zastosowanie soli fizjologicznej z buforem fosforanowym (PBS) jako pożywki indukcyjnej bez wpływu na żywotność i proliferację komórek (Mertl i in., 2019). Z kolei w celu zwiększenia czułości zastosowano linię komórkową **MCF7 AREc32** pochodzącą z linii komórek ludzkiego raka sutka MCF7, zawierającą ośmiokrotne powtórzenie sekwencji ARE. Test z użyciem tej linii komórkowej charakteryzuje się dobrą czułością w identyfikacji umiarkowanych, silnych i skrajnych alergenów oraz wysoką swoistością (Natsch i in., 2007).

Tabela 2.2. KE2. Zestawienie metod oceniających aktywację szlaków biochemicznych.

Metoda	Linia Komórkowa	Liczba danych	Dokładność [%]	Swoistość [%]	Czułość [%]	Źródło
			w porównaniu do LLNA			
ARE-Nrf2 Luciferase KeratinoSens™ Test	Transgeniczna linia komórkowa KeratinoSens™	145	77	72	79	(OECD 2022b)
ARE-Nrf2 Luciferase LuSens test	Transgeniczna linia komórkowa LuSens	72	74	74	74	(OECD 2022b)
MCF7 AREc32	Reporterowa linia komórkowa MCF7 AREc32	102	83	86,6	81,4	(Natsch i in., 2007)
MDA-ARE	Reporterowa linia komórkowa MDA-ARE	22	-	100	92	(Mertl i in., 2019)
Keratinosens™ – modyfikacja z resazuryną	Transgeniczna linia komórkowa KeratinoSens™	35	-	-	-	(Emter i in., 2015)
Keratinosens-S9	Transgeniczna linia komórkowa KeratinoSens™	77	-	-	-	(Natsch i in., 2013a)
Keratinosens-S9/P450	Transgeniczna linia komórkowa KeratinoSens™	2	-	-	-	(Huth i in., 2017)

„-”, brak danych

2.3.2. KE2. Metody oceniające ekspresję genów

Do oceny aktywacji keratynocytów stosowane są również metody oceniające ekspresję genów (Tabela 2.3.).

Ludzka linia komórkowa HaCaT została zastosowana do analizy genów metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) w metodzie **HaCaT cell model assay**. Głównym ograniczeniem tej metody jest brak możliwości oddzielenia substancji nieuczulających od bardzo słabych substancji uczulających (McKim i in., 2010).

Ten sam system testowy zastosowano również w **metodzie profilowania genów HaCaT** (Veen i in., 2013). Ekspresję genów odpowiedzi na stres oksydacyjny (*HMOX1*, *STC2*, *ADM* i *SRD1*) oraz genów związanych z odpowiedzią zapalną (*cFOS* i *FosLI*) analizuje się za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR) po 4 godzinach ekspozycji komórek HaCaT.

W metodzie **SenCeeTox** komórki HaCaT zastąpiono modelem 3D – zrekonstruowanym ludzkim naskórkiem (RhE) (McKim i in., 2012). RhE naśladuje strukturę i organizację skóry, ma zróżnicowany naskórek i warstwę rogową (*stratum corneum*), umożliwia ocenę siły działania uczulającego (Galbiati i in., 2018), stosowanie miejscowe i wykazuje właściwości metaboliczne. Natomiast model Episkin 3D jest wykorzystywany w teście **SENS-IS** opartym na analizie dwóch grup genów istotnych dla procesu uczulenia: redoks i SENS-IS (Cottrez i in., 2015).

Wczesna faza uczulenia skóry (indukcja cytokin zapalnych i szlaki genów cytoprotekcyjnych) oceniana jest w teście **EpiSensA** za pomocą RT-PCR. Początkowo mierzono ekspresję trzech genów (*ATF3*, *DNAJB4* i *GCLM*) (Saito i in., 2013). Następnie, test został zmodyfikowany poprzez włączenie analizy ekspresji czwartego genu dla IL-8. Ogólna czułość i dokładność EpiSensA jest relatywnie wyższe niż w istniejących testach *in vitro* (DPRA, KeratinoSens i h-CLAT) (Saito i in., 2016).

Tabela 2.3. KE2. Metody oparte na analizie ekspresji genów

Metoda	Gen markerowy	Model	Liczba danych	Dokładność [%]	Swoistość [%]	Czułość [%]	Źródło
				w porównaniu do LLNA			
EpiSensA	ATF 3; GCLM DNAJB4	3D	16	87,5 - 100	75-100	83,3-100	(Saito i in., 2013)
modyfikacja EpiSensA	ATF 3; GCLM DNAJB4; IL-8	3D	72	90	78	94	(Saito i in., 2017)
SENS-IS	REDOX: 17 genów, SENS-IS: 21 genów	3D	150	96,6	95,2	97,7	(Cottrez i in., 2016)
HaCaT cell model assay	NQO1, AKR1C2, TXN, IL8, ALDH3A, HMOX1, MafF, GCLC, CYP1A1, MT1, MT2	2D	58	84	92	81	(McKim, i in., 2010)
SenCeeTox	Nrf2/ARE, AhR/XRE, Nrf1/MRE	3D	11	-	-	-	(McKim, i in., 2012)
Profilowanie genów HaCaT	<i>HMOX1, STC2, ADM, SRD1, cFOS, FosL1, DNMT3b, RBM5, CDK12, ARD37</i>	2D	39	96,2	100	95	(Veen i in., 2013)

„-”, brak danych

2.3.3. KE2. Metody oceniające produkcję cytokin zapalnych

Ostatni typ metod KE2 opiera się na ocenie cytokin prozapalnych, głównie IL-18, IL-6 oraz IL-1alfa (Tabela 2.4.).

Interleukina 18 odgrywa kluczową rolę w indukcji ACD poprzez promowanie odpowiedzi immunologicznej typu Th-1, wzmacniając wydzielanie mediatorów prozapalnych, takich jak TNF-alfa, IL-8 i IFN-c (Cumberbatch i in., 2001). Do identyfikacji alergenów kontaktowych na podstawie stężenia IL-18 ocenianego w lizacie komórkowym metodą ELISA zastosowano linię komórek skóry podobnych do nabłonka, pochodzącą z normalnej ludzkiej skóry, **NCTC 2544** (Corsini i in., 2009). Wszystkie testowane substancje uczulające, w tym prohapteny, wywoływały zależny od dawki wzrost stężenia IL-18. Punktem krytycznym okazało się wykorzystanie komórek w odpowiednim czasie, od 3 tygodni do 5 miesięcy po rozmrożeniu (Corsini i in., 2012). Natomiast zastosowanie linii komórkowej **HaCaT**, dało dużą liczbę wyników fałszywie ujemnych (19 z 24 substancji uczulających zostało błędnie

zidentyfikowanych), uzyskano następującą dokładność, czułość i swoistość dla 41 substancji: 57,2%; 22,2%; 91,7% (Veen i in., 2014). Model RhE pochodzący z prawidłowych ludzkich keratynocytów został wykorzystany w teście ekwiwalentu naskórka IL-18 (**EE**) (Galbiati i in., 2012). Stężenie IL-18 w supernatantach pochodzących po 24 godzinach inkubacji z badaną substancją chemiczną oznacza się ilościowo za pomocą specyficznego testu ELISA. Wyniki przedstawia się jako wskaźnik stymulacji (SI), tj. stosunek uwolnionej IL-18 do podstawowej IL-18 znajdującej się na naskórku kontrolnym z naniesionym obojętnym rozpuszczalnikiem (diluentem). Poziom IL-18 stosuje się do odróżnienia substancji uczulających od nieuczulających, natomiast na podstawie żywotności komórek ocenia się siłę działania uczulającego.

W teście **HaCaSens** mierzy się poziom IL-6 oraz IL-1 alfa metodą ELISA w supernatantach po 24 h inkubacji z badanymi substancjami chemicznymi (Jung i in., 2016). Klasyfikacja substancji jest dokonywana również za pomocą wskaźnika stymulacji (SI). Substancje nieuczulające charakteryzują się $SI < 3$ zarówno w przypadku IL-1 α , jak i IL-6. Jeśli dla przynajmniej jednej z cytokin $SI \geq 3$ substancje określa się jako uczulające. Dla testu HaCaSens potwierdzona została czułość 75%, swoistość 83% i dokładność 77% przy użyciu 22 zakodowanych substancji. Podczas badania walidacyjnego czułość testu potwierdzono na poziomie 81,8%, swoistość na poziomie 87,5 %, a dokładność na poziomie 83,3% w identyfikacji substancji uczulających skórę (Chung i in., 2018). Dla **zoptymalizowanego testu HaCaSens**, w którym zredukowano liczbę dawek substancji badanej z czterech do trzech wykazano czułość 83,3%, swoistość 80,0% i dokładność 81,8% (Jeon i in., 2019).

Do oceny KE2 na podstawie analizy IL-1 alfa oraz makrofagowego białka zapalnego 2 (MIP-2) zastosowano linię komórek mysich **HEL-30** (Son i in., 2013). Połączenie tych punktów końcowych dało najbardziej wiarygodny wynik, tj. ogólną dokładność: 86% (19 z 22). W innym badaniu z użyciem linii HEL-30 wykazano spójną zależność dawka–odpowiedź dla IL-1 alfa oraz IL-18 w przeciwieństwie do linii komórkowej HaCaT, gdzie nie można było ocenić 3 z 4 badanych substancji chemicznych (Och i in., 2005).

Tabela 2.4. KE2. Metody oparte na ocenie produkcji cytokin

Metoda	Oznaczana cytokina	System testowy	Liczba danych	Dokładność [%]	Swoistość [%]	Czułość [%]	Źródło
				W porównaniu do LLNA			
NCTC 2544 IL-18	IL-18	2D/ NCTC 2544	33	97	94,1	100	(Galbiati i in., 2012)
HaCaT IL-18	IL-18	2D/ HaCaT	41*	57,2	91,7	22,2	(Veen i in., 2014)
IL-18 EE	IL-18	3D/ RhE	27	95	-	-	(Gibbs i in., 2013)
HaCaSens	IL-1 α , IL-6	2D/ HaCaT	20	83,3	87,5	81,8	(Chung i in., 2018)
Zoptymalizowany HaCaSens	IL-1 α IL-6	2D/ HaCaT	22	81,8	80	83,3	(Jeon i in., 2019)
HaCaT/HEL30	IL-1 α IL-18	2D/ HEL-30 /HaCaT	4	-	-	-	(Och i in., 2005)
HEL-30 IL-1 α , MIP-2	IL-1 α MIP-2	2D/ HEL-30	22	86	-	-	(Son i in., 2013)

*w porównaniu do badań na człowieku

„-”, brak danych

2.4. KE3. Charakterystyka metod

Kluczowe zdarzenie KE3 dotyczy aktywacji komórek dendrytycznych (DC), które specjalizują się w przetwarzaniu i prezentacji antygenów limfocytom za pomocą głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC). DC prezentują peptydy głównie za pośrednictwem MHC klasy II rozpoznawanego przez limfocyty T CD4+. Możliwa jest również prezentacja peptydów limfocytom T CD8+ za pomocą MHC klasy I (Zeromski i in., 2007). Tylko komórki dendrytyczne mogą prezentować antygen naiwnym limfocytom T (bez uprzedniego kontaktu z antygenem). Po ekspozycji na hapten DC migrują z naskórka do lokalnych węzłów chłonnych przez naczynia limfatyczne skóry (Lukas i in., 1996) i dojrzewają, aby stać się bardziej wydajną komórką prezentującą antygen (Gober i in., 2008), co skutkuje zwiększoną ekspresją różnych markerów błony komórkowej, takich jak CD40, CD54, CD80, CD83, CD86 (Stępnik i in., 2003) oraz wytwarzaniem prozapalnych cytokin m.in. TNF-alfa, IL-6, IL-8, IL-1 beta. Zestawienie metod KE3 przedstawiono w Tabeli nr 2.5.

Następujące metody przyjęte przez OECD w ramach wytycznej nr 442E pozwalają odróżnić substancje uczulające skórę tj. kategorię 1 GHS ONZ od nieuczulających:

- test aktywacji ludzkich linii komórkowych (h-CLAT),
- Test aktywacji linii komórkowej U937 (U-SENS),

- Test genu reporterowego interleukiny-8 (test IL-8 Luc),
- Genomic Allergen Rapid Detection (GARD™)

Metoda **h-CLAT** wykorzystuje zdolność komórek dendrytycznych i monocytów do ekspresji markerów powierzchniowych, tj. CD86 i CD54, po 24 godzinach ekspozycji na badaną substancję chemiczną. Do tego celu stosuje się linię komórkową ludzkiej białaczki monocytowej THP-1 pochodzącą z krwi obwodowej mężczyzny z ostrą białaczką monocytową (Tsuchiya i in., 1980), która służy jako surogat komórek dendrytycznych (Saito i in., 2013). Z kolei w metodzie **U-SENS**, znanej dawniej jako MUSST (Myeloid U937 Skin Sensitization Test), wykorzystuje się ludzką linię komórek chłoniaka histiocytarnego, U937. Ten typ komórek reaguje na kontakt z substancjami uczulającymi poprzez zwiększenie ekspresji CD86 w sposób zależny od dawki po 48 godzinach narażenia (Python i in., 2007). Poziom markerów powierzchniowych mierzy się metodą cytometrii przepływowej po wybarwieniu komórek przeciwciałami znakowanymi fluorochromem. Oblicza się względną intensywność fluorescencji (RFI) markerów powierzchniowych w porównaniu z kontrolą rozpuszczalnikową (OECD 2022c). Linię komórkową U937 wykorzystuje się również w **teście aktywacji U-937**. Komórki hoduje się w obecności IL-4 w celu indukcji fenotypu podobnego do komórek dendrytycznych (Python i in., 2007). Następnie komórki poddaje się działaniu testowanych substancji chemicznych i analizuje metodą cytometrii przepływowej pod kątem ekspresji CD86 oraz analizuje się ekspresję genów IL-1 beta i IL-8 przy użyciu qRT-PCR. Pojedynczy marker nie jest wystarczający do wiarygodnej oceny aktywacji DC. Najlepsze rezultaty uzyskuje się oznaczając ekspresję antygenu CD86 i żywotność komórek po 24 godzinach i 72 godzinach inkubacji, a poziom IL-8 metodą ELISA tylko po 72 godzinach. W przypadku wątpliwych wyników można zastosować dodatkową analizę ekspresji genu IL-1 beta i IL-8 po 24 godzinach ekspozycji.

Ze względu na możliwość uzyskania wyników fałszywie ujemnych dla substancji nierozpuszczalnych w wodzie (zwłaszcza substancji o $\log K_{ow} > 2$), zmodyfikowano test h-CLAT poprzez zastosowanie innej metody ekspozycji, tj. krótkotrwałej ekspozycji na medium dyspersyjne ciekłej parafiny (**LP h-CLAT**) (Narita i in., 2018). Komórki THP-1 krótko (przez 5 minut) naraża się na badane substancje chemiczne rozproszone i rozcieńczone w parafinie (LP). Następnie komórki są przemywane, ponownie zawieszane w pożywce hodowlanej i inkubowane przez 24 godziny w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂). Zastosowanie wielopoziomowej strategii łączącej oryginalny test h-CLAT ze zmodyfikowanym testem h-CLAT zapewnia wysoką czułość i dokładność, odpowiednio 95% i 88%. Jednak metoda

wykorzystująca LP może być nieodpowiednia dla prohaptenów i substancji nierozpuszczalnych w LP (Narita i in., 2018).

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 wprowadziło zakaz testowania produktów i składników kosmetycznych na zwierzętach, w związku z tym, w standardowym teście h-CLAT zastąpiono składniki pochodzenia zwierzęcego produktami niezwierzęcymi. Zastąpiono płodową surowicę bydlęcą (FBS) ludzką surowicą (HS), bydlęcą albuminę surowicy (BSA) ludzką albuminą surowicy (HSA) oraz zastosowano przeciwciała pochodzenia niezwierzęcego (Edwards i in., 2018). Stosując metodę wolną od produktów pochodzenia zwierzęcego (**animal free h-CLAT**) uzyskano prawidłowe wyniki substancji walidacyjnych. Obecnie autorzy metody dążą do włączenia modyfikacji niezwierzęcej do wytycznej OECD 442E. Inni badacze zaproponowali hodowlę komórek THP-1 przy użyciu pożywki wolnej od FBS pochodzenia zwierzęcego, tj. pożywki RPMI-1640 z dodatkiem HL-1™ lub pożywki X-VIVO™ 10 (**serum free h-CLAT**). Jednak zastosowanie pożywki X-VIVO™ 10 wymagało modyfikacji kryteriów akceptacji testu biegłości, ponieważ komórki THP-1 hodowane bez FBS były bardziej podatne na siły hydrodynamiczne, w tym naprężenia ścinające podczas kilkukrotnego wirowania próbek i ponownego zawieszania osadu. Pomimo niewielkich korekt oryginalnego protokołu, możliwe było prawidłowe przewidzenie potencjału uczulającego dziesięciu substancji walidacyjnych (Marigliani i in., 2018).

Powyższe metody wykorzystują linie komórkowe o wydłużonym okresie namnażania, pochodzące głównie z nowotworów krwiotwórczych, co może mieć pewne wady. Ustanowione linie komórkowe mogą charakteryzować się niestabilnością genomową oraz niedoborem metabolicznym lub sygnalizacyjnym, dlatego też w metodach oceniających ekspresję antygenów powierzchniowych indukowanych przez substancje uczulające wykorzystuje się również komórki pierwotne (pępowinowe lub z krwi obwodowej) (Santos i in., 2009). Zastosowanie znalazły plazmocytoidalne komórki dendrytyczne (**pDC**) uzyskane z ludzkich DC wytworzonych z komórek progenitorowych CD34+ pochodzących z krwi pępowinowej (Ayehunie i in., 2009) oraz komórki dendrytyczne pochodzące z monocytów krwi obwodowej (**PBMDC**) (Reuter i in., 2011). Jako punkt końcowy, stosuje się cytometryczny pomiar ekspresji antygeny CD86. Kluczową kwestią w metodach wykorzystujących komórki pierwotne jest wstępna ocena ekspresji antygeny CD86, komórki z podwyższoną ekspresją tego antygeny (CD86 > 50%) powinny być wykluczone z analizy. Dobre wyniki w przewidywaniu alergenów kontaktowych uzyskuje się oznaczając poziom IL-8 oraz oceniając ekspresję antygeny CD83 i CD86 (**moDC IL-8 assay**) (Toebak i in., 2006). Do tego celu wykorzystuje się komórki dendrytyczne pochodzące z monocytów (**moDC**) wyizolowane

z heparynizowanych, wzbogaconych w leukocyty kożuszków leukocytarnych od różnych dawców metodą wirowania w gradiencie gęstości. Stwierdzono, że stężenie IL-8 wzrasta po ekspozycji komórek na czynniki uczulające i spada po ekspozycji na czynniki drażniące.

Oprócz komórek pochodzenia ludzkiego, stosuje się również mysie komórki pierwotne tj. komórki dendrytyczne pochodzące ze szpiku kostnego (**BMDC**) (Pépin i in., 2007). Przy użyciu cytometrii przepływowej ocenia się zmiany w ekspresji antygenów MHCII, CD40, CD54 i CD86. Dla 20 badanych substancji chemicznych uzyskano czułość 69% i dokładność 75% (Battais i in., 2017).

Ilościowe zmiany w ekspresji IL-8 związane z aktywacją komórek dendrytycznych oznacza się w teście **IL-8 Luc** wykorzystującym stabilną reporterową linię komórkową pochodzącą z THP-1, THP-G8. THP-G8 charakteryzuje się ekspresją genów Stable Luciferase Orange (SLO) i Stable Luciferase Red (SLR) pod kontrolą IL-8 i dehydrogenazy gliceraldehydo-3-fosforanu (promotor kontroli wewnętrznej GAPDH). Pomiar ilościowy indukcji genu lucyferazy przeprowadza się przez wykrywanie luminescencji. Po reakcji z D-lucyferyną, dwie lucyferazy emitują różne kolory (OECD 2022b; Takahashi i in., 2011). Mechanizm nadprodukcji IL-8 przez komórki THP-1 po ekspozycji na czynniki uczulające jest związany ze szlakami MAPK (kinaza białkowa aktywowana mitogenem) i jest silnie indukowany subtoksycznym (60-90% żywotności) stężeniem substancji uczulających skórę (Nukada i in., 2008).

Stosuje się również wykrywanie antygenów powierzchniowych z jednoczesną analizą cytokin w supernatantach z hodowli (**CD86 and IL-8 release assay**). Połączenie analizy ekspresji antygeny CD86 oraz wydzielania IL-8 pozwala na przewidywanie działania uczulającego z dokładnością 95,2% i czułością 93,5% (Parise i in., 2015).

Tabela 2.5. KE3. Podsumowanie metod.

Metoda	Punkt końcowy	Typ komórek	Liczba danych	Dokładność [%]	Swoistość [%]	Czułość [%]	Źródło
				W porównaniu do LLNA			
h-CLAT	ekspresja CD86/CD54	THP-1	142	85	66	93	(OECD 2022c)
LP h-CLAT	ekspresja CD86/CD54	THP-1	132	88	70	95	(Narita i in., 2018)
animal free h-CLAT	ekspresja CD86/CD54	THP-1	10	-	-	-	(Edwards i in., 2018)
serum free h-CLAT	ekspresja CD86/CD54	THP-1	10	-	-	-	(Marigliani i in., 2018)
U-SENS	ekspresja CD86	U-937	166	86	65	91	(OECD 2022c)
PBMDC assay	ekspresja CD86	PBMDC	12	-	-	-	(Reuter i in., 2011)
BMCDs assay	ekspresja MHC II/CD40/CD54/CD86	BMCD	20	75	-	69	(Battais i in., 2017)
pDC assay	ekspresja CD86	pDC	45	91	86	96	(Ayeahunie i in., 2009)
IL-8 LUC	poziom IL-8	THP-G8	113	89	53	96	(OECD 2022c)
GARD™ skin	ekspresja genów – 196 transkryptów	SenzaCell	75	87,6	89,9	87,2	(OECD 2022c)
Vitosens	ekspresja genów: <i>CREM</i> , <i>CCR2</i>	CD34-DC	73	89	97	82	(Hooyberghs i in., 2008)
FSDC assay	ekspresja genów: <i>Trxr1</i> , <i>Hmox1</i> , <i>Nqo1</i> , <i>Cxcl10</i> -szlaki sygnałowe p38 MAPK oraz JNK	FSDC	18	94	100	92	(Neves i in., 2013)
CD86/IL-8 release assay	poziom IL-8, ekspresja CD86	THP-1	31	95,2	-	93,5	(Parise i in., 2015)
Test aktywacji U-937	poziom IL-8, ekspresja CD86	U-937	16	-	-	-	(Python i in., 2007)
moDC IL-8 assay	poziom IL-8, ekspresja CD86 oraz CD83	moDC	12	-	-	-	(Toebak i in., 2006)
IL-8 Luc	poziom IL-8	THP-1	23	-	-	-	(Nukada i in., 2008)

Aktywację komórek dendrytycznych można oceniać na podstawie analizy ekspresji genów. W metodzie Genomic Allergen Rapid Detection (**GARD**) badana jest ekspresja genów komórek linii SenzaCells, która ma ludzkie pochodzenie mieloidalne o cechach zbliżonych do komórek dendrytycznych. Mierzonych jest 196 transkryptów uczestniczących w szlakach

sygnałowych zaangażowanych w rozpoznawanie obcych substancji i dojrzewanie DC (sygnatura predykcji GARD) (Johansson i in., 2011). Metoda GARD pozwala na ocenę siły działania uczulającego (kategorie 1A, 1B i brak kategorii) (Zeller i in., 2017). W innej metodzie, **VITOSENS** oceniana jest ilościowo ekspresja dwóch genów za pomocą qPCR w komórkach DC34+. Test VitoSens skutecznie odróżnia chemikalia uczulające od nieuczulających na podstawie ekspresji modulatora elementu reagującego na cykliczny monofosforan adenozyiny (CREM) i receptora białka chemotaktycznego monocytów 1 (CCR2) po 6 godzinach ekspozycji (Hooyberghs i in., 2008). Do analizy ekspresji genów i profili sygnalizacji wewnątrzkomórkowej można również wykorzystać linię komórek dendrytycznych pochodzenia płodowego ze skóry myszy (**FSDC**) (Neves i in., 2013).

2.5. KE4. Charakterystyka metod

Współczesne alternatywne metody oceniające uczulenie skóry skupiają się na analizie KE1-KE3. Uważa się, że włączenie metod KE4 zwiększy dokładność i powtarzalność predykcji (Nagahata i in., 2022). Czwarte kluczowe zdarzenie opiera się na aktywacji i proliferacji limfocytów T w lokalnych węzłach chłonnych. Ta końcowa faza uczulania jest oceniana za pomocą testów lokalnych węzłów chłonnych (**LLNA**) opisanych we wcześniej wspomnianych wytycznych OECD 429, 442A, 442B.

Niezawierająca alternatywa dla KE4, test pobudzania ludzkich limfocytów T *in vitro* (**hTCPA**) jest metodą, w której wyeliminowano główne ograniczenia, tj. niską częstotliwość naiwnych limfocytów T o specyficzności dla danej substancji chemicznej we krwi obwodowej oraz potencjalnie wysoki próg aktywacji tych limfocytów. Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC) (np. z kożuszka leukocyтарно-пłytkowego lub 300–500 ml świeżej heparynizowanej krwi) od jednego zdrowego dawcy są wykorzystywane jako źródło komórek dendrytycznych pochodzących z monocytów (moDC) i naiwnych limfocytów T. MoDC inkubuje się przez noc z badaną substancją chemiczną w nietoksycznym stężeniu (żywołność komórek $\geq 80\%$) w obecności lipopolisacharydów (LPS) lub TNF-alfa, co umożliwia generowanie epitopów komórek T. Naiwne limfocyty T i zmodyfikowane chemicznie moDC są hodowane wspólnie, opcjonalnie w obecności komórek odżywczych, kostymulującego przeciwciała CD28 i cytokin. Po 10 dniach wytwarzanie IFN-c i TNF-alfa przez komórki T jest wykrywane po ponownej prowokacji przez chemicznie zmodyfikowane moDC (Richter i in., 2013). Wykazano, że pobudzanie komórek T swoistych dla alergenu jest ograniczone przez kilka subpopulacji komórek odpornościowych obejmujących komórki dendrytyczne CD1a^{neg}, komórki T CD25⁺ i komórki regulatorowe CD56⁺. Eliminacja tych subpopulacji komórek może znacznie

poprawić czułość metody hTCPA do wykrywania słabych substancji uczulających (Vocanson i in., 2014).

W testach dotyczących aktywacji ludzkich limfocytów powszechnie wykorzystuje się linię komórkową Jurkat. Jest ona również stosowana do wykazania wczesnej aktywacji komórek T wywoływanej przez substancje uczulające na podstawie indukcji antygenu CD69 oznaczanego metodą cytometrii przepływową. W metodzie tej nie stosuje się komórek prezentujących antygen, co znacznie upraszcza procedurę wykonania testu (Hou i in., 2020).

2.6. Metody z wykorzystaniem kokultur

Obecnie stosowane metody uwzględniają tylko jeden typ komórek związany z konkretnym kluczowym zdarzeniem w procesie uczulenia skóry, nie uwzględniają interakcji międzykomórkowych zachodzących *in vivo*. Zastosowanie metody kokultury, w której hodowane są co najmniej dwie populacje komórek pozwala na wzajemne oddziaływanie pomiędzy różnymi typami komórek biorących udział w procesie uczulenia skóry naśladując procesy w niej zachodzące (Goers i in., 2014). Metody wspólnej hodowli integrują głównie dwa rodzaje komórek: keratynocyty i komórki dendrytyczne i są stosowane w różnych formatach hodowli, mogą być oparte na dwuwymiarowych (2D) oraz trójwymiarowych (3D) modelach hodowli komórkowych.

2.6.1. modele 2D

W metodzie **LCSA (loose-fit co-culture-based sensitisation assay)** stosuje się pojedynczą warstwę ludzkich adherentnych KC oraz nieprzylegające monocyty (Schreiner i in., 2007). Keratynocyty uzyskuje się ze skóry otrzymanej jako materiał resztkowy po zabiegach chirurgii plastycznej, podczas gdy monocytów izoluje się z krwi dorosłych lub z koncentratu leukocytów, stosując koktajle cytokin indukujące różnicowanie komórek prekursorowych do niedojrzałych komórek podobnych do komórek dendrytycznych. Następnie, te dwa typy komórek hoduje się wspólnie w pożywce bez surowicy w obecności interleukiny-4 (IL-4), czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) oraz transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- β). Po 48 godzinnej inkubacji komórek z materiałem badanym, komórki nieprzylegające analizuje się metodą cytometrii przepływową w celu oceny ekspresji CD86. Metoda LCSA pozwala na kategoryzację siły działania uczulającego na podstawie wartości EC50, tj. stężenia substancji, które wywołuje wzrost ekspresji antygenu CD86 \geq połowie maksymalnego wzrostu. Ustalono następujące kategorie siły działania uczulającego:

<12,5 μ M: skrajne;

<50 μM : silne;

<100 μM : umiarkowane;

>100 μM : słabe.

Substancje, które nie wywołują znaczącego wzrostu ekspresji antygeny CD86 do maksymalnego testowanego stężenia, uznaje się za substancje nieuczulające. Ważną zaletą tego testu jest aktywność metaboliczna zapewniana przez keratynocyty w porównaniu z innymi metodami, które opierają się wyłącznie na komórkach dendrytycznych (Sonnenburg i in., 2015).

Podczas gdy metodą LCSA mierzy się aktywację komórek dendrytycznych, za pomocą innej metody, **LCSA-ly**, możliwy jest jednoczesny pomiar dodatkowego punktu końcowego dla limfocytów (Frombach i in., 2018). Metoda LCSA-ly obejmuje trzy kluczowe zdarzenia w AOP (KE2, KE3, KE4) dla uczulenia skóry przez zastosowanie systemu trójkulturowego składającego się z pierwotnych keratynocytów, komórek dendrytycznych pochodzących z monocytów oraz limfocytów. Analizowano przydatność kilku markerów powierzchniowych limfocytów (CD44, CD119, CD124 i IL-23R) oraz cytokin (IFN-gamma, IL-4, IL-17) w supernatantach z hodowli komórkowych mierzonych odpowiednio metodą cytometrii przepływową i metodą ELISA. Ponieważ markery CD44 i CD124 oraz cytokina IL-4 były stale wykrywane w limfocytach od wszystkich dawców, wydają się one być najbardziej obiecującymi parametrami odczytu dla przyszłych testów uczuleniowych (Frombach i in., 2018). W celu uzyskania optymalnie reagujących limfocytów, które są również częścią jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC), obowiązkowe jest stosowanie świeżych, nie kriokonserwowanych PBMC.

W przeciwieństwie do metody LCSA, w której stosuje się komórki pierwotne, zaproponowano współhodowlę komórek THP-1 i NCTC 2544 (Meloni i in., 2010). NCTC 2544 wysiewa się na 24-studzienkowej płytce i hoduje się do konfluencji. Następnie, na tę samą płytkę wysiewa się komórki THP-1 i poddaje ekspozycji na substancje badane przez 24 h. Przy użyciu metody RT-PCR ocenia się ilościowo ekspresję genów CD86, CD54, IL-8 oraz beta-aktyny. Geny CD86, CD54, IL-8 stanowią biomarkery uczulenia skóry, natomiast ekspresja genu beta-aktyny stanowi endogenną kontrolę. Metoda ta pozwala tylko na identyfikację silnych substancji uczulających na podstawie ekspresji genu IL-8. Dlatego istnieje potrzeba optymalizacji warunków eksperymentalnych w celu wykrywania słabiej reagujących substancji chemicznych (Meloni i in., 2010).

Inną metodą, która proponuje zastosowanie ustalonych linii komórkowych, jest test aktywacji wspólnej hodowli (**COCAT**) z komórkami HaCaT i THP-1 (Hennen i in., 2017). Komórki THP-

1 umieszcza się na konfluentnych keratynocytach HaCaT, hodowane wspólnie komórki są poddawane ekspozycji na substancje badane. Aktywację komórek dendrytycznych ocenia się przez pomiar ekspresji CD54 i CD86 w komórkach THP-1 przy użyciu cytometrii przepływowej. Kokultura potencjalnie zwiększa reakcję komórek na uczulające substancje chemiczne, umożliwiając wykrywanie prohaptenów i wspierając identyfikację siły działania uczulającego na skórę.

Istnieje również kilka metod wykorzystujących zarówno komórki pierwotne, jak i ustalone linie komórkowe. W metodzie wykorzystującej ludzkie keratynocyty pochodzące z pozostałości tkanek po operacjach plastycznych oraz komórki THP-1 mierzy się ekspresję CD86 i CD54 na komórkach THP-1 za pomocą cytometrii przepływowej po 24h ekspozycji kokultury (Cao i in., 2012). W metodzie tej zastosowano kokulturę pośrednią z wykorzystaniem insertów, których dno wykonano z membrany poliestrowej grubości 10 μm z porami 0,4 μm . Keratynocyty znajdują się w górnej komorze, natomiast komórki THP-1 znajdują się w dolnej komorze płytki 12-dołkowej. Zastosowanie wspólnej hodowli keratynocytów i komórek dendrytycznych wzmocniło ekspresję antygeny CD86 na komórkach THP-1. W porównaniu z monokulturowymi komórkami THP-1, zwiększona ekspresja antygenów wystąpiła również przy nietoksycznym stężeniu substancji uczulających. Jest to przykład segregowanej wspólnej hodowli, w której komórki nie kontaktują się ze sobą bezpośrednio, ale poprzez czynniki rozpuszczalne (Thélu i in., 2020).

Aby poprawić wykrywanie haptenów i prohaptenów, zaproponowano metodę wykorzystującą wspólną hodowlę składającą się z komórek Langerhansa (LC) pochodzących z MUTZ-3, keratynocytów HaCaT i pierwotnych fibroblastów (FB) (Lee i in., 2018). Zastosowanie fibroblastów, będących źródłem wielu cytokin i chemokin, może zwiększać ekspresję cytochromu P450 w keratynocytach, a w konsekwencji zwiększać możliwość wykrycia substancji uczulających wymagających aktywacji metabolicznej (Luu-The i in., 2009). Pomiar trzech markerów tj. zewnątrzkomórkowego poziomu IL-8, MIP-1 β i GM-CSF pozwolił na uzyskanie 91% dokładności. Metoda ta umożliwia również oszacowanie siły działania uczulającego z ogólną dokładnością 83%.

2.6.2. Modele 3D

Zaletą zastosowania modelu 3D jest możliwość miejscowego stosowania substancji chemicznej oraz integracja wszystkich zdarzeń zachodzących w początkowej fazie uczulenia (funkcja bariery, biodostępność, interakcja komórek nabłonka KC/DC, dojrzewanie DC)

(Ouwehand i in., 2011a). Tego rodzaju metody wykorzystują trójwymiarowe modele naskórka tj. zrekonstruowany ludzki naskórek (RhE) lub ekwiwalent skóry (SE).

Trójwymiarowy model RhE, który składa się z normalnych keratynocytów naskórka pochodzących od człowieka (NHEK) ma kilka zalet w porównaniu z tradycyjnymi hodowlami komórkowymi:

- RhE naśladują strukturę i organizację naskórka, ponieważ są oparte na keratynocytach, mają zróżnicowany naskórek i warstwę rogową naskórka,
- model RhE może być również wykorzystany do oceny siły działania uczulających skórę (Galbiati i in. 2018),
- modele RhE umożliwiają nanoszenie badanej substancji chemicznej na „skórę” z mniejszymi ograniczeniami dla substancji badanej i wykazują zdolność metaboliczną podobną do ludzkiej.

SE to bardziej zaawansowane modele ekwiwalentu skóry o pełnej grubości, składające się z RhE zawierającego dodatkowo fibroblasty i inne typy komórek, takie jak komórki odpornościowe (Thélu i in., 2020). W modelach 3D wykorzystywane są komórki dendrytyczne z różnych źródeł. Opisano różne subpopulacje DC o różnych funkcjonalnościach, w zależności od poziomu ekspresji określonych markerów powierzchniowych, ich statusu aktywacji i lokalizacji anatomicznej. Dwie główne podgrupy komórek dendrytycznych to plazmocytoidalne DC (pDC) i mieloidalne DC (mDC) (Vittorakis i in., 2014).

Plazmocytoidalne DC zastosowano z ludzkim naskórkowym modelem RhE (EpiDerm™, MatTek) w metodzie wspólnej hodowli oceniającej uczulenie skóry. W pierwszym etapie testu inserty tkanek RhE umieszcza się na granicy faz powietrze-ciecz nad pDC zawieszonymi w pożywce, a następnie poddaje ekspozycji na badaną substancję chemiczną przez 4 godziny wspólnej inkubacji. Drugim etapem testu jest oddzielne hodowanie tkanek RhE i pDC przez dodatkowe 20 godzin. Metoda ta wykorzystuje dwa punkty końcowe: pomiar ekspresji antygenu CD86 na komórkach dendrytycznych metodą cytometrii przepływowej oraz pomiar stężenia IL-18 w pożywce RhE. Z trzech niezależnych eksperymentów badacze uzyskali średnią dokładność 89%, czułość 100% i swoistość 67% (Troese i in., 2015).

Istnieje kilka metod wykorzystujących komórki Langerhansa uzyskane przez różnicowanie komórek MUTZ-3 (MUTZ-LC).

Model RhE Episkin® (SkinEthic, Francja) - rekonstruowana hodowla organotypowa ludzkich keratynocytów tworzących wielowarstwowy zróżnicowany naskórek na macierzy kolagenowej i MUTZ-LC są hodowane jako dwie populacje komórek oddzielone porowatą

bloną (Ouwehand i in., 2011a). Po 48 godzinach narażenia RhE ocenia się żywotność RhE przy użyciu testu MTT i mierzy się ekspresję antygenów CD54 i CD86 na komórkach MUTZ-3, jak również żywotność DC metodą cytometrii przepływowej z jodkiem propidyny.

Komórki MUTZ-3, które są zróżnicowane do LC (MUTZ-LC) za pomocą koktajlu cytokin (GM-CSF + TNF-alfa + TGF-beta1) są również wykorzystywane z modelem ekwiwalentu naskórka (VUMC-EE). Substancje chemiczne w subtoksycznych stężeniach (żywotność \geq 70%) nakłada się miejscowo na EE przez nasycony krążek bibuły filtracyjnej przez 24 godziny. Po usunięciu dysku, hodowlę zbiera się 24 godziny później (łącznie czas 48 godzin). Pośrednio traktowane komórki MUTZ-LC sprawdza się pod kątem ekspresji antygenów powierzchniowych CD86 i CD54, a także mierzy się żywotność z użyciem jodku propidyny. Żywotność EE po 48 godzinach jest określana w teście MTT. Wstępne wyniki nie wykazały zwiększonej ekspresji antygenów powierzchniowych na MUTZ-3 i MUTZ-LC w modelu kokultury w porównaniu z modelem monokultury. Jednak zaletą stosowania kokultury jest uwzględnienie funkcji bariery naskórkowej oraz możliwość zastosowania związków hydrofobowych (Ouwehand i in., 2011a).

W innej metodzie MUTZ-LC łączy się z odpowiednikiem pełnej grubości skóry (RealSkin), jednak zestaw powszechnie stosowanych antygenów powierzchniowych (CD86, CD54) i cytokin (IL-18) został rozszerzony o 27-cytokinowy screening i funkcjonalny test chemotaksji uwzględniający złożoność mechanizmu uczulenia skóry (Lee i in., 2014). RealSkin, model skóry o pełnej grubości z EpiSkin™, składa się z odpowiednika skóry z siecią kolagenu rozpuszczalnego w kwasach i normalnymi ludzkimi fibroblastami, pokrytymi uwarstwowaną, dobrze zróżnicowaną warstwą naskórka pochodzącą od normalnego dorosłego człowieka. Po 48 godzinach narażenia RealSkin, w supernatancie ocenia się 27 ludzkich cytokin przy użyciu testu Bio-plex. Dodatkowo, ekspresję antygenów CD86 i CD54 analizuje się za pomocą cytometrii przepływowej, jak również zdolność migracji MUTZ-LC w obecności CCL19 za pomocą hemocytometru. Przeprowadzone badania wykazały, że metoda z wykorzystaniem pełnego panelu cytokin uzyskała jedynie 75% dokładność przy niskiej czułości 67% i swoistości 83% w kategoryzacji substancji uczulających. Aby poprawić wydajność metody, dokonano selekcji cech. Zawężenie liczby cytokin do: IL-12, IL-9, VEGF, IFN- γ dało najlepszą skuteczność klasyfikacji, gdzie dokładność, czułość i swoistość wyniosły 92%.

Nie tylko linia komórkowa MUTZ-3 jest wykorzystywana w modelach wspólnej hodowli 3D, linia komórkowa THP-1 znalazła również zastosowanie jako źródło komórek dendrytycznych.

Model łączący RhE z THP-1 w segregowanej kokulturze pozwala na ocenę dojrzewania komórek dendrytycznych w ich naturalnym środowisku, ponieważ komórki THP-1 są wysiewane pod zrekonstruowanym ludzkim naskórkiem (Schellenberger i in., 2019). Natychmiast po wysianiu komórek THP-1 na modele skóry nakłada się rosnące stężenia testowanych substancji chemicznych i inkubuje przez 24 godziny. Po inkubacji RhE są usuwane, a komórki THP-1 są zbierane i ekspresja powierzchniowa CD86, CD54, CD40 i HLA-DR na żywych komórkach THP-1 jest analizowana przy użyciu cytometrii przepływowej. Wzrost ekspresji antygenów CD86, CD54, CD40 i HLA-DR na komórkach THP-1 oblicza się jako krotność zmiany średnich intensywności fluorescencji (MFI) między komórkami ekspozycyjnymi na substancje badane i rozpuszczalnik. Zaletą tej metody jest możliwość badania słabo rozpuszczalnych w wodzie substancji i mieszanin po zastosowaniu miejscowym oraz ocena aktywacji DC z uwzględnieniem wrodzonej odpowiedzi keratynocytów indukowanej przez zastosowane związki i ewentualnie produkty wtórne generowane przez uwarstwione keratynocyty.

Komercyjnie dostępne modele 3D skóry w dużej mierze nie zawierają komórek immunokompetentnych (Bock i in., 2018). Istnieje kilka metod kokultury 3D, w których MUTZ-LC są integrowane z odpowiednikiem ludzkiej skóry.

W pełni uwarstwiony naskórek ze wszystkimi charakterystycznymi warstwami naskórka został uzyskany przez wysiewanie na wierzch macierzy kolagenowej zawierającej fibroblasty, mieszaninę pierwotnych ludzkich keratynocytów i MUTZ-3-LC przez 24 godziny, a następnie model hoduje się w układzie powietrze-ciecz (ALI). Ocena histologiczna po 10 dniach wykazała, że obecność MUTZ-3-LCs nie miała wpływu na różnicowanie naskórka (Laubach i in., 2011).

Zachowanie komórek dendrytycznych pod wpływem substancji uczulających i drażniących zweryfikowano za pomocą systemu testowego SE-LC. Krążki nasączone substancjami badanymi nakładano miejscowo na warstwę rogową SE-LC na 16 godzin. Migrację MUTZ-LC z naskórka SE oceniano metodą cytometrii przepływowej. Na podstawie wyników stwierdzono, że dojrzewanie i migracja MUTZ-LC do kompartmentu skórno SE po ekspozycji na alergen zależy od chemokiny CXCL12 i nie jest zależna od chemokiny CCL5. Po miejscowej ekspozycji na substancje drażniące MUTZ-LC migrują w sposób zależny od CCL5 i CXCL12 i podlegają zmianie fenotypowej zależnej od IL-10 w komórki podobne do makrofagów w kompartmentcie skóry (Kosten i in., 2015).

Migracja pochodzących z MUTZ komórek podobnych do LC z przedziału naskórka do skóry została potwierdzona w innych badaniach, w których komórki Langerhansa zostały

włączone do zrekonstruowanej ludzkiej skóry (RhS). Dodatkowo w badaniu porównano dwa typy immunokompetentnych modeli skóry: MUTZ-LC-RHS oraz MoLC-RHS (komórki podobne do LC pochodzenia monocytowego) (Bock i in., 2018). Oceniano zewnątrzkomórkowe uwalnianie IL-6, IL-8 i IL-18 metodą ELISA, oraz ekspresję genów ATF3, CD83, CXCR4, IL-1 β , IL-18, PD-L1 metodą RT-PCR. Porównanie MUTZ-LC-RHS i MoDC-RHS wykazało, że integracja MUTZ-LC lub MoLC z RHS nie zmieniła normalnego różnicowania naskórka i są one wysoce porównywalne z ludzką skórą *ex vivo*. Stwierdzono, że produkcja IL-6 i IL-8 w odpowiedzi na skrajnie uczulający skórę 2,4-dinitrochlorobenzen (DNCB) jest wyższa w porównaniu z referencyjnym modelem RhS bez komórek LC, jednak w MUTZ-LC-RHS wartość IL-6 nie była istotna, dlatego MoLC-RHS wydają się lepszym modelem do oceny wydzielania cytokin. Ocena poziomu IL-18 jest szeroko stosowana, ponieważ wykazano, że odgrywa kluczową rolę w wywoływaniu alergicznego kontaktowego zapalenia skóry (Cumberbatch i in., 2001). Nie stwierdzono jednak podwyższonego stężenia tej interleukiny w supernatancie, jak również zwiększonej ekspresji tego genu, dlatego powinna ona być przedmiotem dalszych badań.

Badano również naskórek zawierający LC pochodzące z MUTZ-3 oraz komórek krwi pępowinowej CD34⁺. Uzyskano model 3D zawierający MUTZ-LC bez uprzedniej indukcji różnicowania prekursorów MUTZ-3. Odkrycia te sugerują, że środowisko keratynocytów jest wystarczającym źródłem sygnału do różnicowania komórek. Model RhE-LC zawierający LC pochodzące z CD34⁺ wykazał wzrost ekspresji genów kodujących markery dojrzewania komórek DC (CCR-7, CD80 i CD83) po 24 lub 48 godzinach od ekspozycji na substancje uczulające. Jednak odpowiedź zależała od rodzaju narażenia (miejscowo – substancje badane były rozprowadzone za pomocą nylonowego dysku lub ogólnoustrojowo – substancje badane były rozpuszczone w pożywce) i rodzaju substancji uczulającej, dlatego model ten także wymaga dodatkowych badań (Ouwehand i in., 2011b).

3. Cel i tezy pracy

Celem pracy było opracowanie metody łączącej minimum dwa kluczowe etapy w zakresie działania uczulającego na skórę tj. reakcji zapalnej keratynocytów i aktywacji komórek dendrytycznych.

Po zapoznaniu się z doniesieniami literaturowymi sformułowano następujące tezy pracy:

Teza główna: 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:

- a) ocena potencjału uczulającego substancji badanych możliwa jest na podstawie poziomu cytokin zapalnych keratynocytów hodowanych w kokulturze z komórkami dendrytycznymi,
- b) możliwa jest ocena potencjału uczulającego substancji badanych na podstawie ekspresji antygenów powierzchniowych na komórkach dendrytycznych hodowanych w kokulturze z keratynocytami,
- c) 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 rozprawy obejmował:

- a) Etap I – ocena profilu uwalniania cytokin zapalnych przez trzy typy keratynocytów (keratynocyty pierwotne pochodzące od dawców noworodkowych (NHEK- neonatal), keratynocyty pierwotne pochodzące od dawców dorosłych (NHEK-adult) oraz komórki uniesmiertelnionej linii komórkowej pochodzące z ludzkich keratynocytów) po ekspozycji na substancję uczulającą w zależności od czasu ekspozycji (5 h, 18 h, 24 h, 48 h) oraz stężenia komórek (0,5x, 1x, 2,5x, 5x 10⁵/ml).

Celem tego etapu, było określenie optymalnych warunków (czas ekspozycji oraz stężenie komórek) do uzyskania jak najwyższej produkcji cytokin zapalnych w porównaniu do

kontroli rozpuszczalnikowej po ekspozycji na substancję uczulającą. Na podstawie uzyskanych wyników zawężono liczbę cytokin zapalnych oznaczanych w drugim etapie pracy oraz wykluczono z kolejnego etapu badań keratynocyty, które produkowały cytokiny zapalne na niewystarczającym poziomie. Ustalono warunki eksperymentalne (czas ekspozycji, stężenie keratynocytów), w których produkcja cytokin była największa (Rysunek 3.1.).

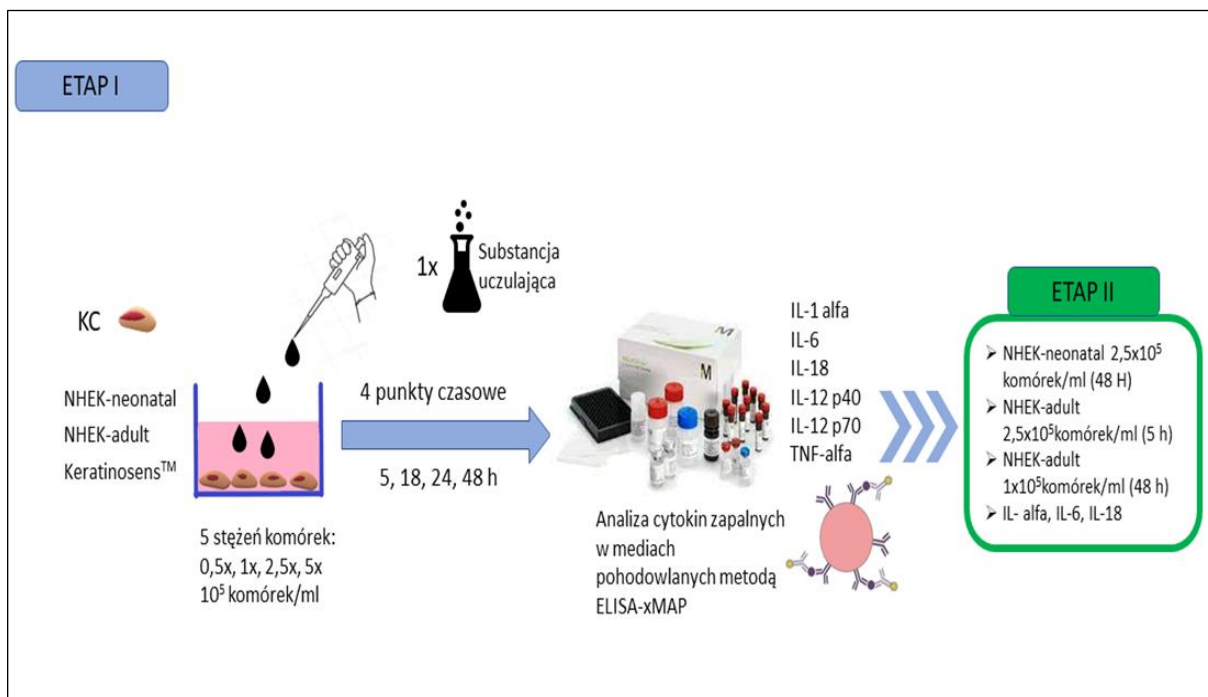
b) Etap II - ocena profilu uwalniania cytokin zapalnych przez dwa typy keratynocytów (keratynocyty pierwotne pochodzące od dawców noworodkowych (NHEK- neonatal), keratynocyty pierwotne pochodzące od dawców dorosłych (NHEK-adult) hodowanych w kokulturze bezpośredniej z komórkami dendrytycznymi (THP-1 lub MUTZ-3) po ekspozycji na trzy substancje uczulające i dwie substancje nieuczulające. W tym etapie zastosowano stężenie keratynocytów oraz czas ekspozycji wyznaczone na podstawie pierwszego etapu badań. Celem etapu II badań, była ocena wpływu komórek dendrytycznych na uwalnianie cytokin zapalnych przez keratynocyty. Do trzeciego etapu projektu wybrano optymalne zestawienie typu komórek KC/DC spośród wszystkich testowanych kokultur, pozwalające na rozróżnienie substancji uczulających od nieuczulających na podstawie poziomu wybranych cytokin. Wybrano najlepiej rokujące cytokiny do finalnej metody kokulturowej (Rysunek 3.2.).

c) Etap III – ocena ekspresji antygenów powierzchniowych na komórkach dendrytycznych hodowanych w kokulturze z keratynocytami po ekspozycji na trzy substancje uczulające i dwie substancje nieuczulające.

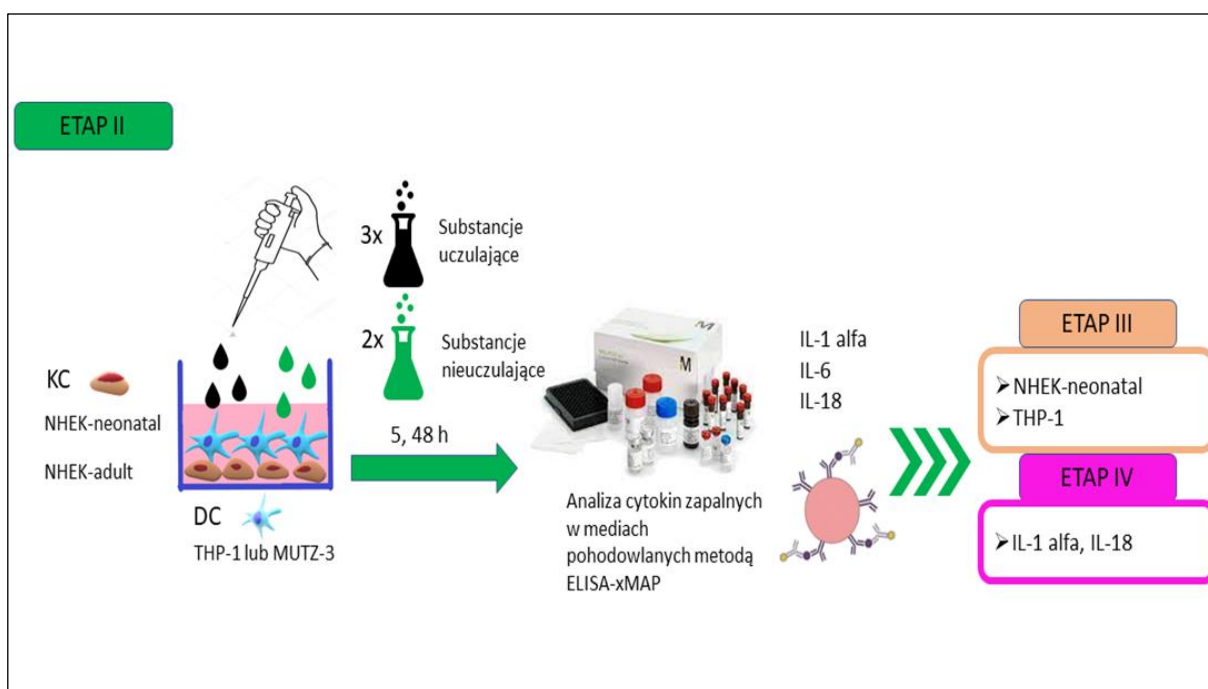
Celem tego etapu była weryfikacja możliwości oceny potencjału uczulającego materiałów badanych na podstawie ekspresji antygenów powierzchniowych komórek dendrytycznych hodowanych w różnych rodzajach kokultury z keratynocytami. Oceniono wpływ rodzaju kokultury (kokultura bezpośrednia, kokultura pośrednia) oraz czasu ekspozycji (24 h, 48 h) na ekspresję antygenów powierzchniowych. W celach porównawczych zastosowano również monokulturę komórek dendrytycznych. Wybrano optymalny rodzaj kokultury (bezpośrednia, pośrednia), czas ekspozycji oraz antygen powierzchniowy do oceny właściwości uczulających (Rysunek 3.3.).

d) Etap IV – celem etapu była ocena zdolności opracowanej metody kokultury do oceny potencjału uczulającego wybranych materiałów badanych o znanych właściwościach uczulających i nieuczulających. W etapie IV jako punkty końcowe metody zastosowano analizę cytokin zapalnych w mediach pochodowlanych oraz analizę antygenu powierzchniowego na komórkach dendrytycznych.

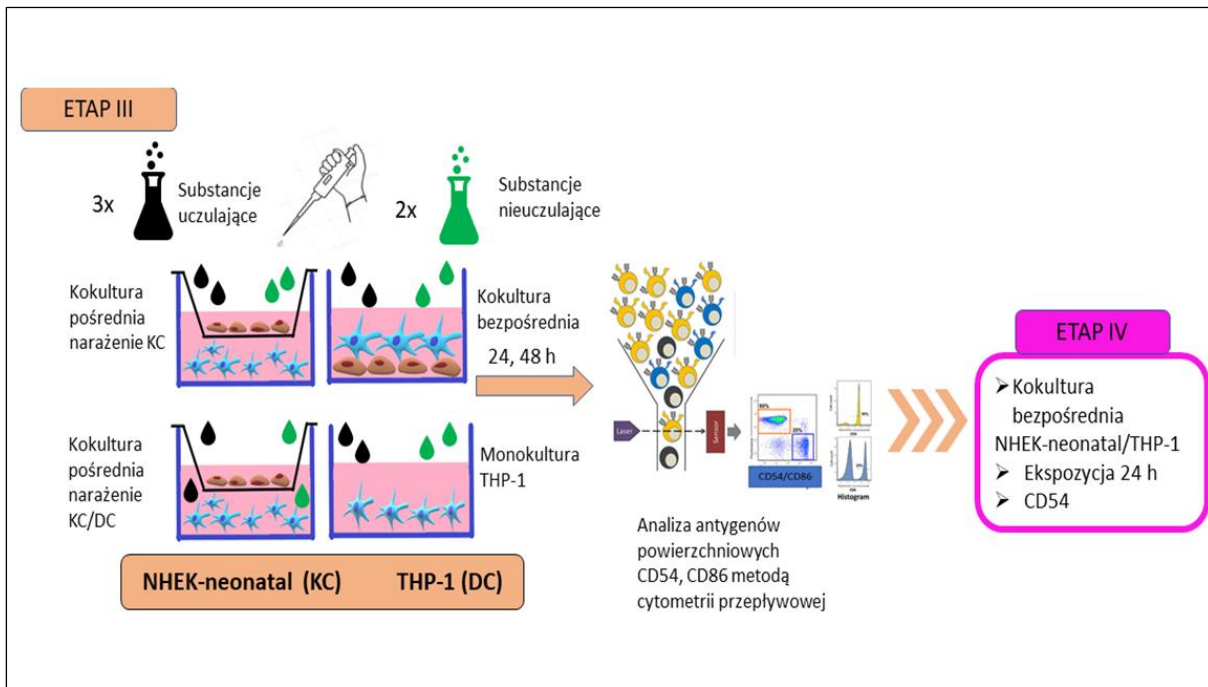
Na podstawie uzyskanych w IV etapie wyników określono optymalne wartości odcięcia dla wybranych punktów końcowych metody. Oceniono zdolność metody do poprawnej klasyfikacji potencjału uczulającego 14 substancji badanych stosując siedem modeli predycyjnych.



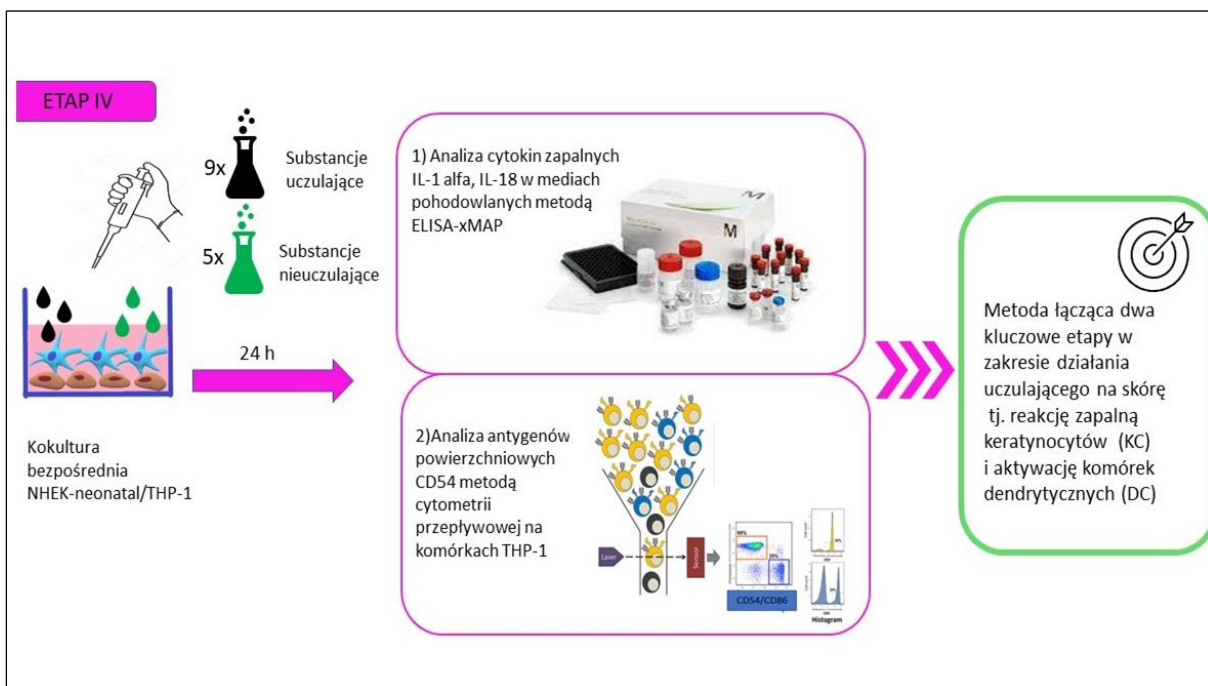
Rysunek 3.1. Schemat eksperymentów przeprowadzonych w etapie I badań



Rysunek 3.2. Schemat eksperymentów przeprowadzonych w etapie II badań



Rysunek 3.2. Schemat eksperymentów przeprowadzonych w etapie III badań



Rysunek 3.3. Schemat eksperymentów przeprowadzonych w etapie IV badań

4. Materiały

4.1. Biologiczny system badawczy

4.1.1. Keratynocyty (KC)

W pracy zastosowano następujące systemy badawcze:

- a) Unieśmiertelniona linia komórkowa pochodząca z ludzkich keratynocytów.
- b) Normal Human Epidermal Keratinocytes neonatal (NHEK-neonatal) – ludzkie keratynocyty naskórka noworodka, pulowane.
- c) Normal Human Epidermal Keratinocytes adult (NHEK-adult) – ludzkie keratynocyty naskórka dorosłych, pulowane.

Charakterystykę keratynocytów przedstawiono w Tabeli 4.1.

Tabela 4.1 Keratynocyty zastosowane w projekcie badawczym – podstawowe informacje

<i>System badawczy</i>	<i>Charakterystyka</i>
Unieśmiertelniona linia komórkowa pochodząca z ludzkich keratynocytów	Typ komórek: unieśmiertelnione ludzkie keratynocyty Pochodzenie: linia HaCaT Właściwości wzrostu: komórki adherentne Dostawca: Givaudan (Szwajcaria)
NHEK-neonatal	Typ komórek: keratynocyty Pochodzenie: naskórek noworodka, komórki pulowane od dawców Właściwości wzrostu: komórki adherentne Dostawca: Lonza (Szwajcaria)
NHEK-adult	Nazwa: NHEK-adult, Typ komórek: keratynocyty Pochodzenie: naskórek dorosłych, komórki pulowane od dawców Właściwości wzrostu: komórki adherentne Dostawca: PromoCell (Niemcy)

4.1.2. Komórki dendrytyczne (DC)

Podczas badań stosowano dwa typy komórek DC-podobnych:

- a) linia komórkowa THP-1 - linia komórkowa ludzkiej białaczki monocytowej,
- b) linia komórkowa MUTZ-3 - linia komórkowa ludzkiej ostrej białaczki szpikowej.

Charakterystykę komórek DC-podobnych przedstawiono w Tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Charakterystyka komórek dendrytycznych

Nazwa	THP-1	MUTZ-3
Pochodzenie	krew obwodowa 1-rocznego dawcy płci męskiej z ostrą białaczką monocytową	Krew obwodowa mężczyzny z ostrą białaczką mielomonocytową (AML FAB M4)
Typ komórek	Monocyty	okrągłe, blastopodobne komórki
Właściwości wzrostu:	komórki rosnące w zawieszynie	
Dostawca:	CLS (Niemcy)	DSMZ (Niemcy)

4.2. Odczynniki

4.2.1. Odczynniki do hodowli komórek *in vitro*

Zastosowano następujące odczynniki do hodowli komórek:

- pożywka hodowlana KBMTM Gold Keratinocyte Growth Basal Medium (Lonza, Basel, Szwajcaria);
- suplementy KGMTM GoldTM SingleQuotsTM (Lonza, Szwajcaria);
- pożywka hodowlana Keratinocyte Growth Medium 2 (PromoCell, Niemcy);
- suplementy Keratinocyte Growth Medium 2 SupplementMix (PromoCell, Niemcy);
- roztwór CaCl (PromoCell, Niemcy);
- pożywka hodowlana MEM (ang. *Minimum Essential Medium*) (Sigma-Aldrich, USA);
- pożywka hodowlana RPMI 1640 (ang. *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*), (Corning, USA);
- płodowa surowica bydlęca FBS (ang. *Fetal bovine serum*) (Sigma-Aldrich, USA);
- roztwór penicylina/streptomycyna/L-glutamina: (Sigma Aldrich, USA);
- L-glutamina (ScienCell, USA);

- trypsina (Sigma Aldrich, USA);

4.2.2. Barwniki do oceny żywotności komórek

- trypan blue (Sigma Aldrich, USA);
- alamarBlue (Thermo Fisher Scientific, USA);
- jodek propidyny PI (ang. *propidium iodide*) (Sigma Aldrich, USA);

4.2.3. Odczynniki do analizy cytometrycznej

- kulki kalibracyjne guava easyCheck™ Kit (Merck, Niemcy);
- buforowana fosforanem sól fizjologiczna Dulbecco bez dodatku jonów wapnia i magnezu DPBS (ang. *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) (Sigma-Aldrich, USA);
- albumina bydlęca, frakcja V (BSA) (ang. *Bovine serum albumin*) (Merck, Niemcy);
- ludzkie globuliny frakcja Cohna II, III (Sigma-Aldrich, USA);
- mysie, monoklonalne przeciwciała skierowane przeciw ludzkiemu antygenowi CD86, sprzężone z izotiocyanianem fluoresceiny (BD Pharmingen, USA);
- mysie, monoklonalne przeciwciała skierowane przeciw ludzkiemu antygenowi CD54, sprzężone z izotiocyanianem fluoresceiny (Agilent Dako, USA);
- mysie przeciwciała IgG sprzężone z izotiocyanianem fluoresceiny (BD Pharmingen, USA).

4.2.4. Odczynniki do analizy cytokin

- Zestaw Milliplex® Ludzkie cytokiny/chemokiny/czynniki wzrostu (Millipore Corporation, USA),
- 0,1 N NaOH (Avantor, Polska).

4.2.5. Sprzęt

- inkubator: Binder C170 E3 (Tuttlingen, Niemcy);
- komora laminarna: BioTectum GR8 (Bielsko-Biała, Polska);
- licznik komórek: Countess II FL (LifeTechnologies, Carlsbad, Kalifornia, USA);
- wirówka: LMC-4200R (BioSan, Józefów, Polska);
- mikroskop odwrócony: MW50 (Opta-Tech, Warszawa, Polska);
- waga analityczna: RadWag AS62.R2 Plus (RadWag, Radom, Polska);
- autoklaw: Stern Weber SW22 (Stern Weber, Warszawa, Polska);
- automatyczne pipety: 0,5 – 10µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, pipeta 8-kanałowa 20-200 µL (HTL, Warszawa, Polska/ Eppendorf, Hamburg, Niemcy);

- myjka ultradźwiękowa model PS:30A (Adverti, Łódź, Polska);
- czytnik mikropłytek FluoStar Omega (BMG LabTech, Ortenberg, Niemcy);
- cytometr przepływowy GUAVA (Luminex Corporation, Austin, TX, USA);
- czytnik Magpix (Luminex Corporation, Austin, TX, USA);

4.2.6. Materiały zużywalne

- płytki 96-dołkowe ze stożkowym dnem;
- płytki 96-dołkowe z płaskim dnem;
- płytki 24-dołkowe z płaskim dnem;
- butelki hodowlane 75 cm², probówki 1,5 / 2 ml;
- sterylne zbiorniki na odczynniki (do pipet wielokanałowych);
- inserty ThinCert™ Greiner nr kat. 662641;
- filtry strzykawkowe 0,22 μm (Bionovo, Legnica, Polska);
- probówki typu Falcon (15, 50 ml);
- probówki typu Eppendorf 1,5 ml.

4.3. Materiały badane

Wykorzystano szereg materiałów charakteryzujących się znanym działaniem uczulającym na skórę oraz substancji nieuczulających, w tym substancje o działaniu drażniącym. Zastosowane materiały badane reprezentują różne nasilenie działania uczulającego, są dostępne komercyjnie oraz charakteryzują się danymi referencyjnymi uzyskanymi w badaniu *in vivo* tj. The local lymph node assay (LLNA) (Tabela 4.3.). Jako rozpuszczalniki do materiałów badanych stosowano:

- dimetylosulfotlenek (DMSO) (vWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, USA)
- sól fizjologiczna 0.9% (Fresenius Kabi Polska Sp.z.o.o., Warszawa, Polska)

Tabela 4.3. Charakterystyka materiałów badanych (na podstawie (OECD 2022a; 2022b))

Nazwa	Nr CAS	Stan skupienia	Prognoza <i>in vivo</i> (LLNA)	Rozpuszczalnik	Czystość [%]	Producent
eugenol ^{2,3} (EU)	97-53-0	ciecz	subst. uczulająca (słaba)	DMSO	99	Sigma-Aldrich, USA
creosol ^{2,3} (MMP)	93-51-6	ciecz	subst. uczulająca (umiarkowana)	DMSO	≥ 98	
4-phenylenediamine ⁴ (pPD)	106-50-3	ciało stałe	subst. uczulająca (silna)	sól fizjologiczna	98	
metylamino-fenol sulfate (metol) ⁴ (ME)	55-55-0	ciało stałe	subst. uczulająca (silna)	sól fizjologiczna	≥98	
nickel sulfate ⁴ (NiSO ₄)	10101-97-0	ciało stałe	subst. uczulająca (umiarkowana)	sól fizjologiczna	≥98	
2-mercaptobenzothiazole ⁴ (2MBT)	149-30-4	ciało stałe	subst. uczulająca (umiarkowana)	DMSO	97	
R(+) – Limonene ⁴ (DL)	5989-27-5	ciecz	subst. uczulająca (słaba)	DMSO	97	
cinnamyl alcohol ⁴ (CA)	104-54-1	ciało stałe	subst. uczulająca (słaba)	DMSO	98	
lactic acid ^{2,3,4} (LA)	50-21-5	ciecz	subst. nieuczulająca	sól fizjologiczna	~ 90	
4-aminobenzoic acid ⁴ (PABA)	150-13-0	ciało stałe	subst. nieuczulająca	DMSO	≥ 99	
2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) ^{1,2,3,4}	97-00-7	ciało stałe	subst. uczulająca (skrajnie uczulająca)	DMSO	≥ 98	Acros Organics, Belgia
imidazolidyl urea ⁴ (IMZ)	39236-46-9	ciało stałe	subst. uczulająca (słaba)	sól fizjologiczna	BD	Merck, Niemcy
ethylene glycol dimethacrylate ⁴ (EGDMA)	97-90-5	ciecz	subst. uczulająca (słaba)	DMSO	98	
salicylic acid ⁴ (SA)	69-72-7	ciało stałe	subst. nieuczulająca	DMSO	BD	Avantor, Polska
glycerol ⁴ (GL)	56-81-5	ciecz	subst. nieuczulająca	sól fizjologiczna	BD	
isopropanol ^{2,3,4} (2PR)	67-63-0	ciecz	subst. nieuczulająca	sól fizjologiczna	BD	

1, 2, 3, 4 – etapy projektu w którym zastosowano materiał badany

BD – brak danych

5. Metody badawcze

5.1. Hodowla komórkowa

Hodowlę keratynocytów (unieśmiertelniona linia komórkowa pochodząca z ludzkich keratynocytów, NHEK-adult, NHEK-neonatal), komórek dendrytycznych (THP-1, MUTZ-3), prowadzono w inkubatorze Binder w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5 ± 1% CO₂ oraz wilgotności 90 ± 10%.

5.1.1. Przygotowanie pożywek hodowlanych

Wszystkie media hodowlane przygotowywano w warunkach sterylnych z wykorzystaniem komory laminarnej BioTectum.

- a) Pożywka do hodowli unieśmiertelnionej linii komórkowej pochodzącej z ludzkich keratynocytów

Do przygotowania 100 ml pożywki hodowlanej stosowano:

- 9,1 ml FBS,
- 1 ml L-glutaminy,
- 89,9 ml DMEM.

Po przygotowaniu, pożywkę przechowywano w temperaturze 2-8°C do 28 dni.

- b) Pożywka do hodowli NHEK-adult

Skład pożywki do hodowli NHEK adult przedstawiono w Tabeli 5.1. Do 500 ml Keratinocyte Growth Medium 2 dodawano 60 µl CaCl solution oraz 12,3 ml roztworu suplementów Keratinocyte Growth Medium 2 SupplementMix. Po przygotowaniu, pożywkę hodowlaną przechowywano w temperaturze 2-8°C do 6 tygodni.

Tabela 5.1. Stężenie końcowe suplementów w pożywce do hodowli NHEK-adult.

Suplement	Stężenie końcowe w pożywce
ekstrakt z przysadki bydlęcej	0,004 ml/ml
hydrokortyzon	0,33 µg/ml
transferyna	10 µg/ml
adrenalina	0,39 µg/ml
CaCl ₂	0,06 mM
rekombinowany hEGF	0,125 ng/ml
ludzka, rekombinowana insulina	5µg/ml

c) Pożywka do hodowli NHEK-neonatal

Do 500 ml KBM™ Gold Keratinocyte Growth Basal Medium dodawano suplementy KGM™ Gold™ SingleQuots™ w następującej objętości:

- hydrokortyzon - 0,50 ml
- transferyna - 0,50 ml
- adrenalina - 0,25 ml
- GA-1000 - 0,50 ml
- ekstrakt z przysadki bydlęcej - 2,00 ml
- hEGF - 0,50 ml
- insulina - 0,50 ml

Po przygotowaniu, pożywkę przechowywano w temperaturze 2-8°C do 4 tygodni.

d) Pożywka hodowlana dla komórek THP-1

Do przygotowania 100 ml pożywki hodowlanej stosowano:

- 10 ml FBS inaktywowanego termicznie,
- 1 ml roztworu antybiotyków penicylina/streptomycyna oraz L-glutaminy,
- 89 ml RPMI.

FBS inaktywano 30 minut w temperaturze 56°C. Po przygotowaniu, pożywkę przechowywano w temperaturze 2-8°C do 4 tygodni.

e) Pożywka hodowlana dla komórek MUTZ-3

Do przygotowania 100 ml pożywki hodowlanej stosowano:

- 68 ml MEM,
- 20 ml FBS inaktywowanego termicznie,
- 10 ml pożywki kondycjonującej pochodzącej z hodowli komórek nowotworu pęcherza moczowego linii 5637. Komórki 5637 hodowano w pożywce hodowlanej RPMI zawierającej 10% FBS, 1% L-glutaminy. Uzyskane medium kondycjonujące filtrowano przy użyciu filtra strzykawkowego o średnicy porów około 0,2µm. Medium przechowywano w temp. -80°C.
- 1 ml roztworu antybiotyków penicylina/streptomycyna,
- 1 ml L-glutaminy.

5.1.2. Pasażowanie komórek

Komórki adherentne (KC) tj. unieśmiertelniona linia komórkowa pochodząca z ludzkich keratynocytów, NHEK-adult oraz NHEK-neonatal pasażowano po uzyskaniu konfluencji 70-80%. W celu przeniesienia komórek do nowego naczynia hodowlanego, przy użyciu pompy próżniowej usuwano medium, następnie płukano warstwę komórek DPBS, po czym dodawano 0,25% roztworu trypsyny w ilości umożliwiającej pokrycie całej powierzchni naczynia hodowlanego, około 1 ml/ 25 cm² (objętości 1 ml w przypadku butelki T25 i 3 ml – T75), inkubowano w 37°C przez 2-10 minut. Odklejanie komórek od podłoża monitorowano przy użyciu mikroskopu odwróconego. Gdy większość komórek przybrała kulisty kształt, neutralizowano działanie trypsyny przez dodanie surowicy (minimum 300 µl na 1 ml trypsyny). Następnie wirowano komórki (220 g, 5 minut, 20°C). Osad zawieszano w 1 ml medium hodowlanego, z czego pobierano 20 µl zawiesiny komórek do liczenia przy użyciu automatycznego licznika komórek.

Komórki rosnące w zawieszynie (DC) tj. THP-1, MUTZ-3 były zbierane z naczynia hodowlanego do probówki wirówkowej i wirowane (250 g, 5 minut, 20°C). Osad zawieszano w 1 ml medium hodowlanego, z czego pobierano 20 µl zawiesiny komórek do liczenia przy użyciu automatycznego licznika komórek.

Po określeniu stężenia, komórki wysiewano w stężeniach zalecanych przez dostawcę linii komórkowej lub przez metodę badawczą (Tabela 5.2.), następnie umieszczano w inkubatorze i prowadzono dalszą hodowlę.

Tabela 5.2. Zalecana gęstość hodowli komórkowej

Rodzaj komórek	Zalecana gęstość hodowli
NHEK-adult	5000 komórek/cm ²
NHEK-neonatal	3,500 komórek/cm ²
unieśmiertelniona linia komórkowa pochodząca z ludzkich keratynocytów	5000 komórek/cm ²
THP-1	0,1 – 0,8 x 10 ⁶ komórek/ml
MUTZ-3	0,4 – 1 x 10 ⁶ komórek/ml

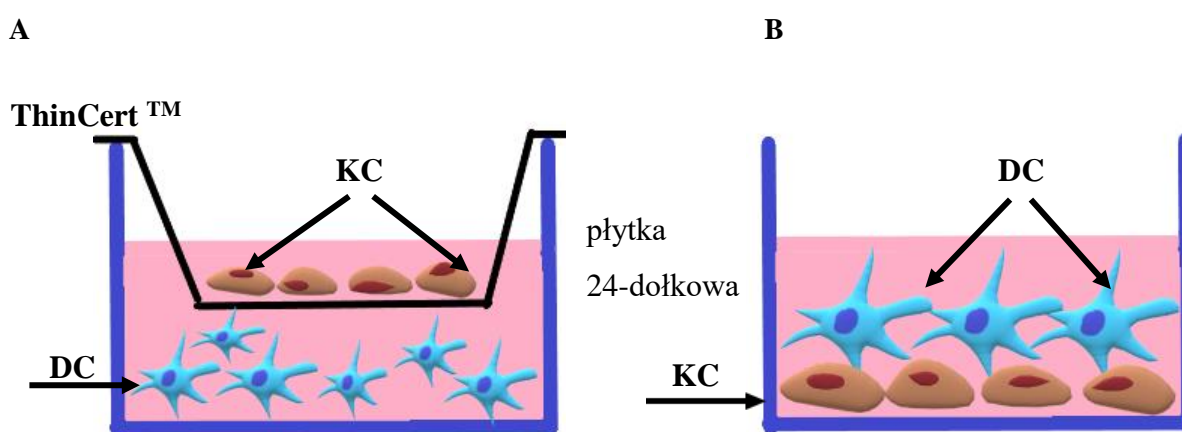
5.1.3. Liczenie komórek przy użyciu automatycznego licznika komórek

Do liczenia komórek w świetle widzialnym używano automatycznego licznika komórek Countess II FL. Korzystano z komory wielokrotnego użytku (komora Bürkera) oraz roztworu błękitu trypanu 0,4% wybarwiającego martwe komórki.

Pobierano 20 μl z zawiesiny komórek po wirowaniu (zawieszonych w 1 ml pożywki hodowlanej) i mieszano z 20 μl 0,4% błękitu trypanu, nakładano połowę objętości mieszaniny na komorę Bürkera a następnie wykonywano analizę na liczniku komórek.

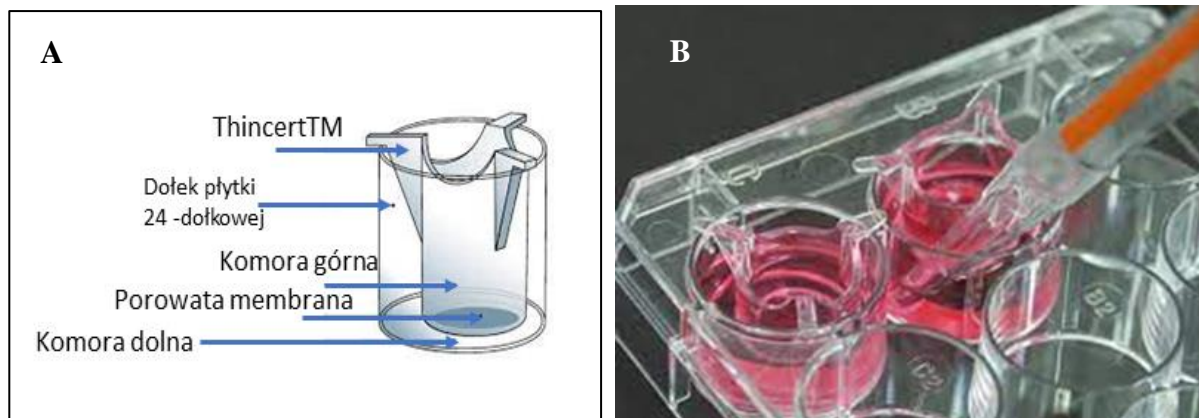
5.2. Metody kokultury

Celem rozprawy było opracowanie metody wspólnej hodowli, czyli kokultury dwóch rodzajów komórek pełniących kluczową rolę w procesie uczulenia skóry, czyli keratynocytów i komórek dendrytycznych. Metody w których hodowane są co najmniej dwie populacje komórek z możliwością kontaktu na różnych poziomach uwzględniają wzajemne oddziaływanie pomiędzy różnymi typami komórek zaangażowanych w proces uczulenia skóry. W projekcie zastosowano dwa rodzaje kokultury, kokulturę pośrednią oraz kokulturę bezpośrednią (Rysunek 5.1.).



Rysunek 5.1. Schemat kokultury pośredniej (A) oraz kokultury bezpośredniej (B) (KC – keratynocyty, DC – komórki dendrytyczne)

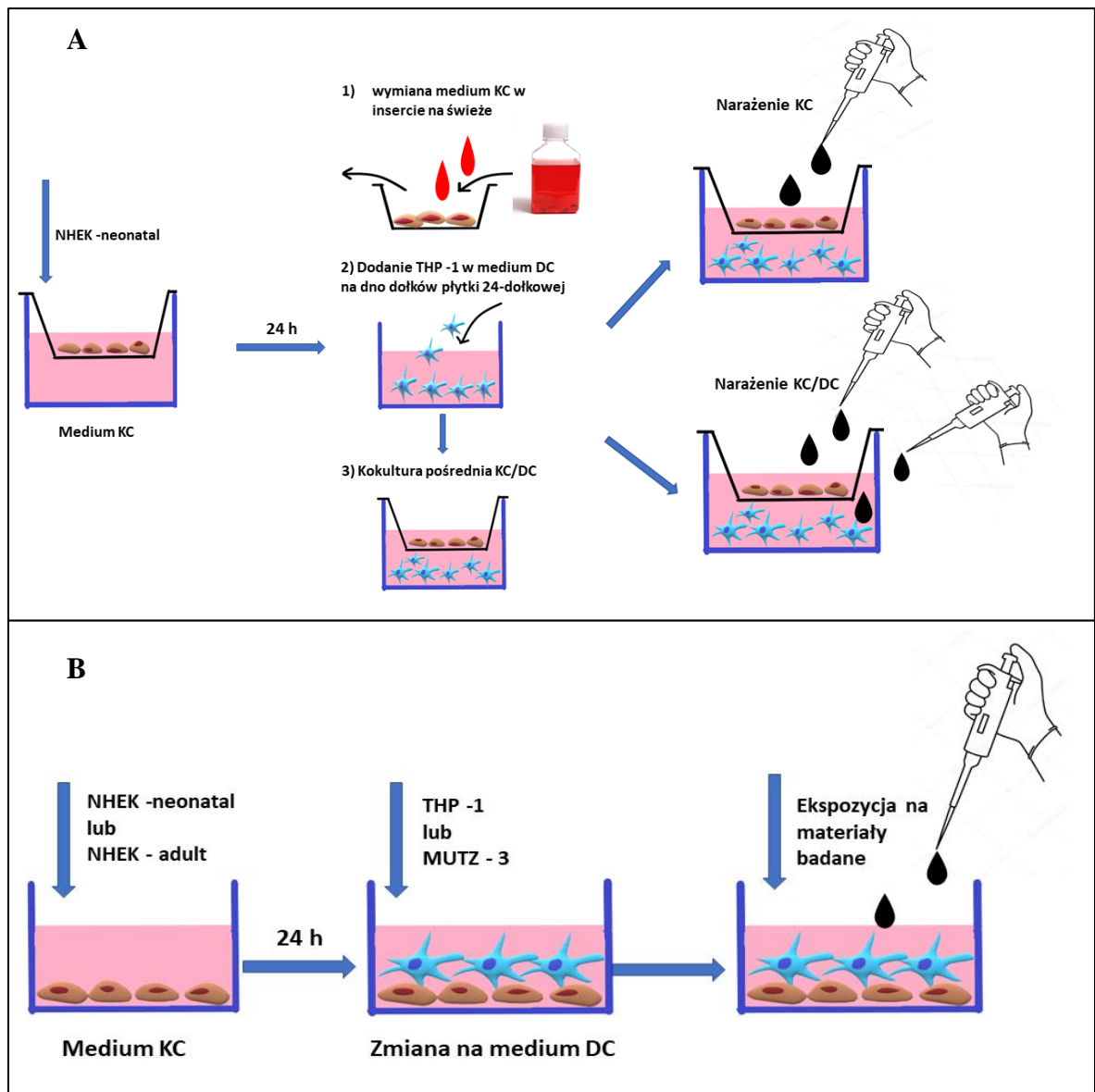
W układzie kokultury pośredniej stosowano inserty zawierające błonę półprzepuszczalną, która pozwalała na swobodny przepływ uwalnianych przez komórki substancji, natomiast ze względu na rozmiar porów, komórki nie miały możliwości przemieszczania pomiędzy dwoma przedziałami. Stosowano inserty typu ThinCert™ charakteryzujące się dużym zagęszczeniem porów ($2 \times 10^6 \times \text{cm}^{-2}$) o średnicy $0,4 \mu\text{m}$ przedstawione na Rysunku 5.2.



Rysunek 5.2. Schemat dolka płytki z insertem Thincert™ wykorzystywanym do utworzenia kokultury pośredniej (A) oraz zdjęcie płytki 24-dolkowej z insertami (B) (<https://biokom.com.pl>)

W górnej komorze wysiewano keratynocyty w specyficznej dla nich pożywce, do dolnej komory dodawano tej samej pożywki. Po 24 h inkubacji, w górnej komorze wymieniano pożywkę hodowlaną na świeżą, z dolnej komory usuwano pożywkę keratynocytową i dodawano komórki dendrytyczne w specyficznej dla nich pożywce. W przypadku kokultury pośredniej, stosowano dwa typy ekspozycji tj. jednoczesną ekspozycję keratynocytów oraz komórek dendrytycznych (zwane dalej narażeniem KC/DC) lub tylko ekspozycję keratynocytów (zwane dalej narażeniem KC). W pierwszym typie ekspozycji, materiały badane były dodawane zarówno do komory górnej, w której znajdowały się keratynocyty, jak i do komory dolnej, w której znajdowały się komórki dendrytyczne. W drugim typie ekspozycji, materiały badane były nakładane tylko na keratynocyty znajdujące się w górnej komorze (Rysunek 5.3.A).

Kokulturę bezpośrednią uzyskiwano hodując dwa typy komórek w jednym dołku płytki 24-dolkowej. Najpierw na płytkę wysiewano keratynocyty w specyficznej dla nich pożywce hodowlanej a następnie inkubowano 24 h. Po 24 h usuwano pożywkę i dodawano komórki dendrytyczne w specyficznej dla nich pożywce (Rysunek 5.3.B).



Rysunek 5.3. Schemat wykonania kokultury pośredniej (A) oraz kokultury bezpośredniej (B)

5.3. Ocena żywotności komórek

5.3.1. Test alamarBlue

Test alamarBlue jest testem metabolicznym wykorzystującym zdolność żywych komórek do redukcji niebieskiego, niefluoryzującego barwnika resazuryny, do różowego, fluoryzującego barwnika, resorufiny. Test alamarBlue stosowano do oceny żywotności komórek adherentnych oraz komórek zawiesinowych.

5.3.1.1. Wysiewanie komórek

Komórki adherentne - komórki wysiewano na czarną płytkę 96-dołkową w gęstości $1,5 \times 10^4$ komórek/dołek, w objętości 200 μl . Ze względu na to, że keratynocyty są komórkami adherentnymi, płytki z komórkami inkubowano wstępnie 24 h w celu przyczepienia komórek do podłoża ($37 \pm 1^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\% \text{CO}_2$, $\text{RH} = 90 \pm 10\%$).

Komórki zawieszinowe - komórki w stężeniu 2×10^6 komórek/ml wysiewano na czarną płytkę 96-dołkową w dniu narażenia w objętości 90 μl komórek/dołek ($1,8 \times 10^5$ komórek/dołek).

5.3.1.2. Przygotowanie materiałów badanych

Materiały badane rozpuszczalne w DMSO: Przygotowywano roztwór podstawowy materiału badanego w stężeniu 500 razy wyższym od stężenia ekspozycyjnego. Następnie przygotowano odpowiednie stężenia robocze poprzez rozcieńczanie roztworu podstawowego w DMSO. Każde stężenie robocze rozcieńczano 250 razy (w celu narażenia DC) lub 125 razy (w celu narażenia KC) pożywką wzrostową odpowiednią dla typu narażanych komórek uzyskując stężenia aplikacyjne.

Materiały badane rozpuszczalne w soli fizjologicznej: Przygotowywano roztwór podstawowy materiału badanego w stężeniu 100 razy wyższym od stężenia ekspozycyjnego. Następnie przygotowano odpowiednie stężenia robocze poprzez rozcieńczanie roztworu podstawowego w soli fizjologicznej. Każde stężenie robocze rozcieńczano 50 razy (w celu narażenia DC) lub 25 razy (w celu narażenia KC) pożywką wzrostową właściwą dla narażanych komórek uzyskując stężenia aplikacyjne.

5.3.1.3. Ekspozycja komórek

W przypadku KC, po 24 godzinnym okresie wstępnej inkubacji usuwano pożywkę hodowlaną z płytki 96-dołkowej i dodawano 135 μl świeżej pożywki hodowlanej właściwej dla narażanych komórek oraz 45 μl każdego stężenia aplikacyjnego do dołka płytki 96-dołkowej (końcowa objętość: 180 μl /dołek). W przypadku DC, do dołków zawierających 90 μl zawiesiny komórkowej dodawano 90 μl materiału badanego w stężeniu aplikacyjnym (końcowa objętość: 180 μl /dołek). Jako kontrolę rozpuszczalnikową stosowano DMSO w stężeniu 0,2% lub pożywkę hodowlaną.

Płytki 96-dołkowe mieszano ręcznie a następnie inkubowano 24 h ($37 \pm 1^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\% \text{CO}_2$, $\text{RH} = 90 \pm 10\%$). Wszystkie stężenia materiałów badanych oraz kontroli rozpuszczalnikowej stosowano w tripletach. Eksperymenty wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach.

5.3.1.4. Odczyt fluorescencji

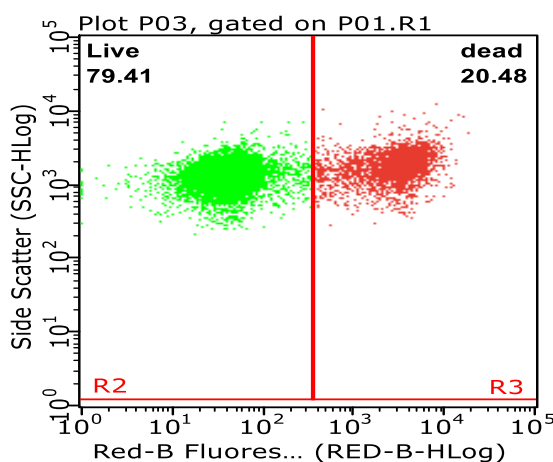
Po 24 h ekspozycji, do każdego dołka dodawano 20 μl odczynnika alamarBlue (stężenie końcowe 10%). Komórki inkubowano 2 h w temperaturze 37°C, po czym mierzono poziom fluorescencji, przy użyciu czytnika FluoStar. przy długościach fal: $\lambda_{\text{wzb.}} = 544 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 590 \text{ nm}$. Żywotność komórek obliczano z poniższego wzoru:

$$\text{żywotność [\%]} = \frac{\text{średnia fluorescencja komórek narażanych}}{\text{średnia fluorescencja kontroli rozpuszczalnikowej}} \times 100 \quad (1)$$

5.3.2. Ocena żywotności komórek z użyciem jodku propidyny (PI)

Jodek propidyny jest barwnikiem fluorescencyjnym przenikającym przez naruszoną błonę komórkową martwych lub uszkodzonych komórek wiążąc się następnie z DNA i RNA. Ocena żywotności komórek przy użyciu jodku propidyny przeprowadzano z wykorzystaniem cytometru przepływowego Guava. W tym celu, bezpośrednio przed pomiarem cytometrycznym, komórki zawieszano w 190 μl buforu (DPBS z 0,1% (w/v) BSA) a następnie dodawano 10 μl jodku propidyny o stężeniu 12,5 $\mu\text{g/ml}$ uzyskując stężenie końcowe jodku propidyny równe 0,625 $\mu\text{g/ml}$. Podczas analizy cytometrycznej, PI wzbudzany był niebieskim laserem (488nm). Żywotność komórek oceniano na podstawie intensywności fluorescencji PI wychwyconego przez martwe komórki (Rysunek 5.4.). Żywotność komórek była automatycznie obliczana przez cytometr zgodnie z poniższym wzorem:

$$\text{żywotność [\%]} = \frac{\text{liczba żywych komórek}}{\text{liczba wszystkich komórek}} \times 100 \quad (2)$$



Rysunek 5.4. Cytometryczna analiza żywotności komórek na podstawie wychwytu jodku propidyny

5.4. Wyznaczanie wartości CV75

Na podstawie wyników oceny żywotności komórek wyznaczano wartość CV75. Jest to stężenie substancji chemicznej, które umożliwia utrzymanie żywotności komórek na poziomie 75%. Wartość CV75 obliczano z krzywej zależności dawka-odpowiedź (Rysunek 5.5.) za pomocą interpolacji log-liniowej przy użyciu następującego równania:

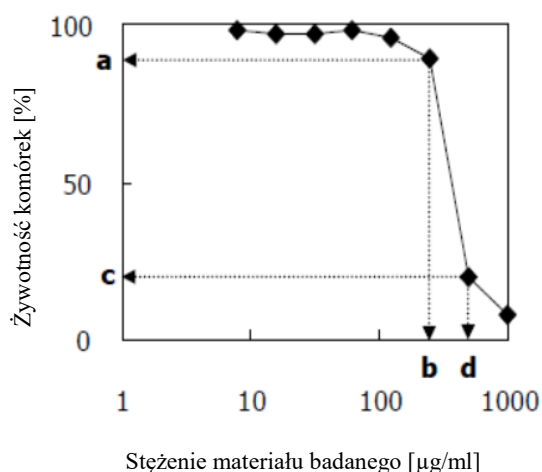
$$\log CV75 = \frac{(75-c)x \log b - (75-a)x \log d}{a-c} \quad (3)$$

Gdzie:

a - jest minimalną wartością żywotności komórek powyżej 75%

c - jest maksymalną wartością żywotności komórek poniżej 75%

b i d - to stężenia przy których żywotność komórek osiąga wartość a oraz c



Rysunek 5.5. Krzywa zależności dawka – odpowiedź dla żywotności komórek

Wartość CV75 była istotnym parametrem służącym do określenia stężeń ekspozycyjnych (TC) badanych substancji.

5.5. Oznaczanie stężenia cytokin metodą ELISA - xMAP

5.5.1. Zasada oznaczenia

Cytokiny zapalne mierzono w mediach pohodowlanych przy użyciu aparatu Magpix w technologii xMAP z zastosowaniem kulek magnetycznych. Dzięki zastosowaniu kulek magnetycznych o odmiennych kodach kolorystycznych możliwe jest jednoczesne badanie wielu analitów w pojedynczym dołku 96-dołkowej mikropłytki. Zasada oznaczania jest

podobna jak w metodzie „kanapkowej” ELISA (Keith, 2020). Przeciwciała wychytujące, specyficzne względem danego antygeny są kowalencyjnie związane z powierzchnią określonych kulek magnetycznych barwionych fluorescencyjnie różnymi stosunkami dwóch fluoroforów. Dzięki takiemu sposobowi barwienia kulki są klasyfikowane do jednego ze 100 unikalnych regionów. Antygeny obecne w próbce wiążą się ze specyficznymi przeciwciałami (związanymi z kulkami magnetycznymi). Po serii płukań, w celu usunięcia niezwiązanych białek dodaje się specyficznych biotynylowanych przeciwciał detekcyjnych. Na końcu dodawany jest koniugat streptoawidyny i fikoerytryny, w wyniku czego powstaje finalny kompleks. Streptoawidyna łączy się z biotynylowanymi przeciwciałami. Fikoerytryna jest barwnikiem, który pełni rolę znacznika fluorescencyjnego. Detekcja fluorescencji odbywa się za pośrednictwem diod elektroluminescencyjnych i systemu optycznego do rozpoznawania kulek magnetycznych (klasyfikowania ich na podstawie adresów spektralnych) i następnie detekcji promieniowania emitowanego przez fikoerytrynę związaną z analitem. Intensywność sygnału stanowi podstawę analizy ilościowej.

5.5.2. Procedura oznaczania cytokin

Media pochodzące przechowywane w temperaturze $-20^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ przed analizą rozmrażano, worteksowano a następnie wirowano (250 g, 5 minut). Przygotowano odczynniki w następujący sposób:

a) Kulki magnetyczne związane z przeciwciałami:

Kulki magnetyczne sonikowano w łaźni wodnej ultradźwiękowej przez 30 s a następnie worteksowano 1 minutę. Następnie wymieszano po 60 μl każdego rodzaju kulek magnetycznych i dodano diluentu do końcowej objętości 3 ml.

b) Materiały kontrolne:

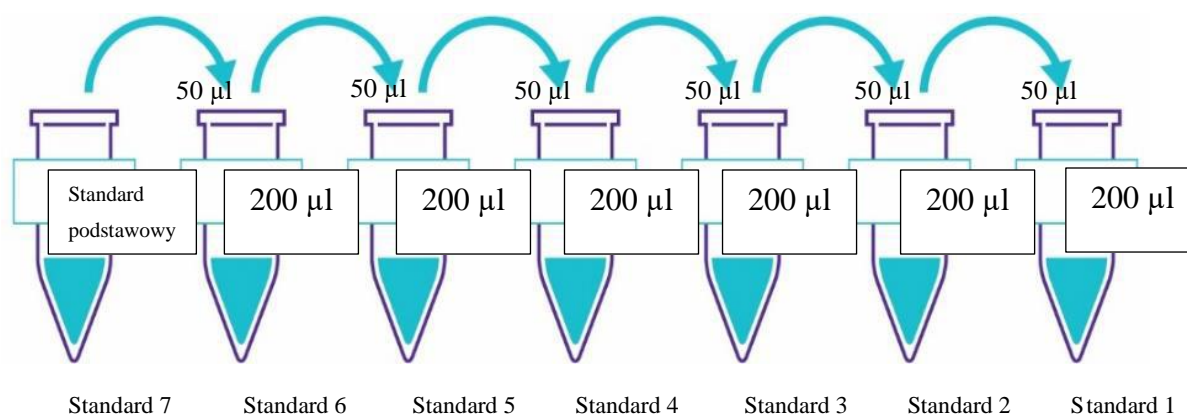
Rozpuszczono materiały kontrolne 1 i 2 dostępne w zestawie w 250 μl wody dejonizowanej, następnie wymieszano i zworteksowano. Pozostawiono fiolkę na 5 – 10 minut w temperaturze pokojowej.

c) Bufor płuczący:

Stężony 10x bufor rozcieńczono poprzez dodanie 540 ml wody dejonizowanej do 60 ml buforu.

d) Standardy:

Dodano 250 μl wody dejonizowanej do standardu podstawowego Human Cytokine Standard (Standard 7), worteksowano. Po około 10 minutach przygotowano seryjne rozcieńczenia standardu podstawowego przy użyciu buforu (Rysunek 5.6.):



Rysunek 5.6. Schemat przydotowywania standardów do badań

Następnie przeprowadzono analizę w poniższy sposób:

- a) Dodano 200 µl buforu do każdego dołka płytki 96-dołkowej, zakleiono folią, wytrząsano przez 10 minut w temperaturze pokojowej.
- b) Zlano bufor, dodano po 25 µl standardów, materiałów kontrolnych do odpowiednich dołków.
- c) Dodano 25 µl buforu do dołków przeznaczonych na badane próbki.
- d) Do dołków zawierających standardy, materiały kontrolne dodano 25 µl właściwego medium hodowlanego.
- e) Do dołków przeznaczonych na materiały badane dodano po 25 µl próbek (medium pohodowlane).
- f) Do każdego dołka dodano 25 µl kulek magnetycznych, płytkę zakleiono folią i inkubowano około 18 h w temperaturze 2-8°C wytrząsając.
- g) Po inkubacji usunięto zawartość dołków i trzykrotnie płukano buforem. Czynności wykonywano przy użyciu magnesu w celu unieruchomienia kulek magnetycznych na dnie płytki.
- h) Po płukaniu, do każdego dołka dodano po 25 µl przeciwciała detekcyjnego, zakleiono folią, inkubowano 1 h w temperaturze pokojowej wytrząsając.
- i) Następnie dodano do każdego dołka po 25 µl kompleksu streptoawidyna-fikoerytryna, zakleiono folią, inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej wytrząsając.
- j) Po inkubacji, usunięto zawartość dołków a następnie trzykrotnie płukano przy użyciu magnesu w celu unieruchomienia kulek magnetycznych na dnie płytki.
- k) Po płukaniu, do każdego dołka dodano 150 µl płynu okrywowego, wytrząsano 5 minut.

- l) Wykonano pomiar średniej intensywności fluorescencji (MFI) na analizatorze MAGPIX, na podstawie krzywej standardowej obliczono stężenie poszczególnych cytokin w mediach pochodowlanych.
- m) Na podstawie stężenia cytokin produkowanych przez komórki pod wpływem ekspozycji na materiały badane oraz kontrolę rozpuszczalnikową obliczano indeks stymulacji (SI), czyli wskaźnik określający procentową produkcję cytokin przez narażane komórki w porównaniu z kontrolą rozpuszczalnikową.

$$SI [\%] = \frac{\text{stężenie cytokiny po narażeniu na materiał badany}}{\text{stężenie cytokiny po narażeniu na kontrolę rozpuszczalnikową}} \times 100 \quad (4)$$

5.6. Ocena ekspresji antygenów powierzchniowych na komórkach THP-1

Ekspresję antygenów powierzchniowych CD54 oraz CD86 badano przy użyciu cytometru przepływowego na komórkach THP-1. Eksperyment wykonywano zgodnie z poniższym protokołem:

- a) zebranie komórek:

Po inkubacji z materiałem badanym, komórki THP-1 przeniesiono z płytki 24-dołkowej do probówek i przepłukano dwukrotnie 1000 μ l buforu (DPBS z 0,1% (w/v) BSA). Po przemyciu komórek, do każdej probówki dodano 600 μ l roztworu blokującego (0,01% (w/v) roztwór globulin (frakcja Cohna) w buforze) i inkubowano 15 minut w 4°C, w ciemności. Następnie, z każdej probówki przygotowano 3 porcje zawiesiny komórkowej po 180 μ l, które umieszczono na płytce 96-dołkowej ze stożkowym dnem.

- b) Przygotowanie roztworów przeciwciał:

Przygotowano odpowiednią objętość roztworów przeciwciał w buforze zgodnie z tabelą 5.3.

Tabela 5.3. Przygotowywanie roztworów przeciwciał

Przeciwciało	Objętość przeciwciała/dolek	Całkowita objętość roztworu przeciwciała/dolek
Anty-CD86	6 μ l	50 μ l
Anty-CD54	3 μ l	50 μ l
IgG	3 μ l	50 μ l

- c) Inkubacja z przeciwciałami:

Płytkę 96-dołkową odwirowano (250 g, 4°C, 5 minut), odlano supernatant, a do każdej peletki komórkowej dodano 50 μ l roztworu odpowiedniego przeciwciała. Po delikatnym wymieszaniu

płytkę inkubowano w 4°C, w ciemności przez 30 minut.

Po inkubacji, komórki przepłukano dwukrotnie buforem (150 µl buforu/dołek) a następnie zawieszono w 190 µl buforu. Bezpośrednio przed pomiarem cytometrycznym dodano 10 µl jodku propidyny o stężeniu 12,5 µg/ml.

d) Analiza cytometryczna:

Ekspresja antygenów CD86 oraz CD54 analizowana była cytometrycznie. Żywotność komórek oceniano na podstawie wychwytu jodku propidyny. 10 000 żywych komórek (PI-negatywne) analizowano pod kątem ekspresji antygeny CD54 oraz CD86. Zmiany w ekspresji antygenów powierzchniowych były wyrażane jako wskaźnik stymulacji SI obliczany zgodnie z poniższym wzorem:

$$SI [\%] = \frac{MFIa - MFib}{MFIc - MFId} \times 100 \quad (5)$$

Gdzie:

A – średnia intensywność fluorescencji (MFI) komórek traktowanych materiałem badanym

B – średnia intensywność fluorescencji (MFI) kontroli izotypowej traktowanej materiałem badanym

C – średnia intensywność fluorescencji (MFI) kontroli rozpuszczalnikowej

D – średnia intensywność fluorescencji (MFI) kontroli izotypowej traktowanej rozpuszczalnikiem

5.7. Zastosowane protokoły badawcze

5.7.1. Etap I - profil uwalniania cytokin zapalnych przez różne rodzaje keratynocytów hodowanych w monokulturze

W pierwszym etapie badań wykonano oznaczenie uwalniania cytokin zapalnych przez keratynocyty hodowane jako monokultura, pod wpływem substancji uczulającej - DNCB. Zastosowano trzy rodzaje keratynocytów:

- a) komórki pierwotne NHEK-neonatal,
- b) komórki pierwotne NHEK-adult,
- c) komórki unieśmiertelnionej linii komórkowej pochodzącej z ludzkich keratynocytów.

Keratynocyty wysiewano na płytki 24-dołkowe w stężeniach 0,5x; 1x; 2,5x; 5x10⁵ komórek/ml w objętości 500 µl. Inkubowano 24 h (37 ± 1°C, 5 ± 1% CO₂, RH = 90 ± 10%) w celu adhezji komórek do podłoża. Po 24 h godzinach usuwano pożywkę i dodawano do dołek po 500 µl DNCB w stężeniu końcowym równym CV75 (wartość CV75 wyznaczono zgodnie z punktem 5.4. na podstawie wyników żywotności keratynocytów w teście alamarBlue przeprowadzonym zgodnie z punktem 5.3.1. Najpierw przygotowano roztwór podstawowy DNCB w DMSO, a następnie rozcieńczano roztwór podstawowy w pożywce wzrostowej właściwej dla danego

typu keratynocytów, tak aby stężenie końcowe DMSO nie przekraczało 0,2%. Jako kontrolę rozpuszczalnikową stosowano DMSO w stężeniu końcowym 0,2%. Komórki inkubowano z DNCB przez okres: 5 h, 18 h, 24 h, 48 h ($37 \pm 1^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\% \text{CO}_2$, $\text{RH}=90 \pm 10\%$). Eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach. Po zakończeniu ekspozycji, zbierano medium pochodowlane, które przechowywano w temperaturze $-20^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$ do momentu wykonania oznaczenia cytokin. W dniu oznaczenia, po rozmrożeniu, trzy próbki medium pochodowlanego dla określonego warunku eksperymentalnego były łączone w celu oceny stężenia cytokin. Oznaczano w mediach pochodowlanych cytokiny: IL-1 alfa, IL-6, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-18 oraz TNF-alfa metodą ELISA-xMAP zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 5.5.

Eksperyment ten miał na celu:

- a) określenie optymalnego stężenia keratynocytów oraz optymalnego czasu ekspozycji keratynocytów na substancję uczulającą w celu uzyskania jak największej produkcji cytokin,
- b) wstępną selekcję keratynocytów do II etapu badań z zastosowaniem kokultury bezpośredniej KC/DC.

5.7.2. Etap II - profil uwalniania cytokin zapalnych przez keratynocyty hodowane w kokulturze bezpośredniej z komórkami dendrytycznymi

W drugim etapie projektu, cytokiny zapalne oznaczane były w mediach pochodzących z kokultury bezpośredniej keratynocytów i komórek dendrytycznych w celu weryfikacji, czy kokultura ma wpływ na poziom cytokin zapalnych oraz czy ten marker może być wykorzystany jako punkt końcowy w finalnej metodzie kokulturowej. Eksperyment ten miał również na celu określenie najlepszej kombinacji keratynocytów z komórkami dendrytycznymi w układzie kokultury bezpośredniej KC/DC, pozwalającej na ocenę działania uczulającego na podstawie poziomu cytokin zapalnych. Stosowano kokultury bezpośrednie keratynocytów NHEK-neonatal oraz NHEK-adult w 5 kombinacjach z komórkami dendrytycznymi THP-1 oraz MUTZ-3 (Tabela 5.4).

Tabela 5.4. Schemat kokultury bezpośredniej KC/DC

Nr kokultury	Keratynocyty/ Komórki dendrytyczne	stężenie komórek/ml KC/DC	Czas ekspozycji
1	NHEK-neonatal/THP-1	$2,5 \times 10^5/2 \times 10^6$	48h
2	NHEK-neonatal/MUTZ-3	$2,5 \times 10^5/2 \times 10^6$	48h
3	NHEK-adult/THP-1	$2,5 \times 10^5/2 \times 10^6$	5h
4	NHEK-adult/THP-1	$1 \times 10^5/2 \times 10^6$	48h
5	NHEK-adult/MUTZ-3	$1 \times 10^5/2 \times 10^6$	48h

Wszystkie układy kokulturowe były poddawane ekspozycji na 3 substancje o znanym działaniu uczulającym (DNCB, MMP, EU) oraz dwie substancje nieuczulające (2PR, LA).

Materiały badane stosowane były w trzech stężeniach (0,1x; 0,5x; 1xTC – treatment concentration) wyznaczonych na podstawie obliczonej wartości CV75 dla poszczególnych typów komórek, zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 5.3.1. oraz 5.4.

Materiały badane przygotowywano w następujący sposób:

- **materiały badane rozpuszczalne w soli fizjologicznej:**

Przygotowano roztwory wyjściowe materiałów badanych w stężeniu 100-krotnie wyższym niż stężenie TC.

- **materiały badane rozpuszczalne w DMSO:**

Przygotowano roztwory wyjściowe materiałów badanych w stężeniu 500-krotnie wyższym niż stężenie TC.

- **przygotowanie roztworów roboczych:**

Poprzez rozcieńczenia roztworu wyjściowego, przygotowano odpowiednie stężenia materiału badanego (0,1x; 0,5x; 1x TC); odpowiednio w soli fizjologicznej lub DMSO. Następnie każde stężenie materiału badanego rozpuszczalnego w soli fizjologicznej rozcieńczono 50x w pożywce wzrostowej a każde stężenie materiału badanego rozpuszczalnego w DMSO rozcieńczono 250x w pożywce wzrostowej w celu uzyskania stężenia aplikacyjnego.

Na płytkę 24-dołkową wysiewano po 500 μ l keratynocytów na dołek (NHEK-neonatal, NHEK-adult) w stężeniach przedstawionych w Tabeli 5.4. a następnie inkubowano 24 h ($37 \pm 1^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\%$ CO₂, RH = $90 \pm 10\%$). Po 24 h, usuwano medium hodowlane i nakładano po 500 μ l/dołek komórek dendrytycznych THP-1 lub MUTZ-3 w stężeniach przedstawionych w Tabeli 5.4., a następnie po 500 μ l odpowiednich stężeń aplikacyjnych materiałów badanych. Stosowano kontrolę rozpuszczalnikową tj. DMSO w stężeniu końcowym 0,2% lub medium hodowlane.

Przeprowadzono dwie niezależne serie eksperymentów, w każdej z nich stosowano po trzy powtórzenia dla każdego stężenia materiału badanego. Po zakończeniu ekspozycji, zbierano medium pohodowlane, łączono z trzech powtórzeń a następnie przechowywano w temperaturze $-20^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ do momentu wykonania oznaczenia cytokin. Oznaczano w mediach pohodowlanych cytokiny: IL-1 alfa, IL-6 oraz IL-18 metodą ELISA-xMAP zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 5.5.

5.7.3. Etap III - ocena ekspresji antygenów powierzchniowych komórek dendrytycznych hodowanych w różnych rodzajach kokultury z keratynocytami

W trzecim etapie projektu przeprowadzono eksperymenty oceniające ekspresję antygenów powierzchniowych CD54 oraz CD86 na komórkach dendrytycznych hodowanych w różnych rodzajach kokultury, bezpośredniej i pośredniej z keratynocytami. Konkretny typy komórek dendrytycznych i keratynocytów zostały wybrane na podstawie wyników uzyskanych w etapie II. Stosowano następujące układy:

- a) kokultura pośrednia z zastosowaniem insertów ThinCert™ z jednoczesnym narażeniem keratynocytów oraz komórek dendrytycznych (narażenie KC/DC),
- b) kokultura pośrednia z zastosowaniem insertów ThinCert™ z narażeniem keratynocytów (narażenie KC),
- c) kokultura bezpośrednia KC/DC,
- d) monokultura DC.

Komórki przygotowywano w następujący sposób:

- Komórki THP-1 odwirowano (250g, 20°C , 5 min.), zawieszono w świeżej pożywce wzrostowej w stężeniu 2×10^6 komórek/ml.
- Komórki NHEK-neonatal 24 h przed badaniem wysiewano w stężeniu $2,5 \times 10^5$ komórek/ml na odpowiednią ilość dołków płytki 24-dołkowej lub inserty ThinCert™ w objętości 500 μl . W przypadku stosowania insertów, dodawano 500 μl pożywki właściwej dla KC do dołka w którym znajdował się insert.

Komórki poddawano ekspozycji na 3 substancje o znanym działaniu uczulającym (DNCB, MMP, EU) oraz dwie substancje nieuczulające (2PR, LA). Materiały badane stosowane były w czterech stężeniach (1,2x; 1x; 0,5x; 0,1x TC). Wartości TC dla materiałów badanych zostały wyznaczone w etapie II badań. Materiały badane przygotowywano w następujący sposób:

- **materiały badane rozpuszczalne w soli fizjologicznej:**

Przygotowano roztwory wyjściowe materiałów badanych w stężeniu 100-krotnie wyższym niż stężenie TC.

- **materiały badane rozpuszczalne w DMSO:**

Przygotowano roztwory wyjściowe materiałów badanych w stężeniu 500-krotnie wyższym niż stężenie TC.

- **przygotowanie roztworów roboczych:**

Poprzez rozcieńczenia roztworu wyjściowego, przygotowano odpowiednie stężenia materiału badanego (0,1x; 0,5x; 1x; 1,2x TC); odpowiednio w soli fizjologicznej lub DMSO. Następnie każde stężenie materiału badanego rozpuszczalnego w soli fizjologicznej rozcieńczono 50x w pożywce wzrostowej a każde stężenie materiału badanego rozpuszczalnego w DMSO rozcieńczono 250x w pożywce wzrostowej w celu uzyskania stężenia aplikacyjnego.

Ekspozycję komórek przeprowadzano w następujący sposób:

- Kokultura pośrednia – narażenie KC/DC. Na dno czystej płytki 24-dołkowej płaskodennej wysiewano 500 μ l zawiesiny komórkowej THP (liczba komórek: 1×10^6 /dołek) a następnie dodano 500 μ l roztworu materiału badanego w pożywce właściwej dla komórek THP-1. Do dołka przekładano insert z wysianymi dzień wcześniej KC do którego następnie dodawano 250 μ l pożywki właściwej dla KC oraz 250 μ l materiału badanego w pożywce właściwej dla KC.
- Kokultura pośrednia – narażenie KC. Na dno czystej płytki 24-dołkowej płaskodennej wysiewano 500 μ l zawiesiny komórkowej THP (liczba komórek: 1×10^6 /dołek) a następnie dodawano 500 μ l pożywki właściwej dla komórek THP-1. Do dołka przekładano insert z wysianymi dzień wcześniej KC do którego dodawano 250 μ l pożywki właściwej dla KC oraz 250 μ l materiału badanego w pożywce właściwej dla KC.
- Kokultura bezpośrednia - na dno płytki 24-dołkowej płaskodennej zawierającej wysiane dzień wcześniej KC wysiewano 500 μ l zawiesiny komórkowej THP-1 w pożywce właściwej dla THP-1 (liczba komórek: 1×10^6 /dołek), a następnie dodawano 500 μ l materiału badanego w pożywce właściwej dla DC.
- Monokultura THP: 500 μ l zawiesiny komórkowej wprowadzano do odpowiedniej liczby dołków w czystej płytce 24-dołkowej płaskodennej (liczba komórek: 1×10^6 /dołek), a następnie dodawano 500 μ l roztworu materiału badanego w pożywce właściwej dla DC.

Dodatkowo, stosowano kontrolę rozpuszczalnikową tj. DMSO w stężeniu końcowym 0,2% lub medium hodowlane. Płytki mieszano ręcznie a następnie inkubowano 24 h oraz 48 h ($37 \pm 1^\circ\text{C}$,

$5 \pm 1\%$ CO₂, RH = $90 \pm 10\%$). Przeprowadzono trzy niezależne serie eksperymentów. Po zakończeniu ekspozycji, zbierano komórki THP-1, a następnie wykonywano analizę cytometryczną antygenów powierzchniowych CD86 oraz CD54 zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 5.6.

5.7.4. Etap IV - walidacja metody kokulturowej KC/DC

Celem ostatniego etapu badań była weryfikacja zdolności ustalonej metody kokultury bezpośredniej NHEK-neonatal/THP-1, do oceny potencjału uczulającego 14 substancji. Komórki NHEK-neonatal wysiewano w stężeniu $2,5 \times 10^5$ komórek/ml na odpowiednią liczbę dołków płytki 24-dołkowej w objętości 500 μ l. Po 24 h z dołków usuwano pożywkę hodowlaną. Komórki THP-1 odwirowano (250g, 20°C, 5 min.), zawieszono w świeżej pożywce wzrostowej w stężeniu 2×10^6 komórek/ml. Na dno płytki 24-dołkowej płaskodennej zawierającej wysiane dzień wcześniej KC wysiewano 500 μ l zawiesiny komórkowej THP-1 w pożywce właściwej dla THP-1 (liczba komórek: 1×10^6 /dołek) a następnie dodawano 500 μ l materiału badanego w pożywce właściwej dla DC.

Komórki poddawano ekspozycji na 9 substancji o znanym działaniu uczulającym (DNCB, pPD, ME, CA, DL, 2MBT, IMZ, EGDMA, NiSO₄ – Tabela 4.3.) oraz pięć substancji nieuczulających (2PR, LA, SA, PABA, GL – Tabela 4.3.). Materiały badane stosowane były w czterech stężeniach końcowych (0,1x; 0,5x; 1x; 1,2x TC) wyznaczonych na podstawie wyników cytotoksyczności wartości CV75 dla poszczególnych typów komórek, zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 5.3.1 oraz 5.4. Materiały badane przygotowywano w następujący sposób:

- **materiały badane rozpuszczalne w soli fizjologicznej:**

Przygotowano roztwory wyjściowe materiałów badanych w stężeniu 100-krotnie wyższym niż stężenie TC.

- **materiały badane rozpuszczalne w DMSO:**

Przygotowano roztwory wyjściowe materiałów badanych w stężeniu 500-krotnie wyższym niż stężenie TC.

- **przygotowanie roztworów roboczych:**

Poprzez rozcieńczenia roztworu wyjściowego, przygotowano odpowiednie stężenia materiału badanego (0,1x; 0,5x; 1x; 1,2x TC); odpowiednio w soli fizjologicznej lub DMSO. Następnie każde stężenie materiału badanego rozpuszczalnego w soli fizjologicznej rozcieńczono 50x w pożywce wzrostowej a każde stężenie materiału badanego rozpuszczalnego w DMSO rozcieńczono 250x w pożywce wzrostowej w celu uzyskania stężenia aplikacyjnego.

Dodatkowo, stosowano kontrolę rozpuszczalnikową tj. DMSO w stężeniu końcowym 0,2% lub medium hodowlane.

Płytki mieszano ręcznie, a następnie inkubowano 24 h oraz 48 h ($37 \pm 1^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\%$ CO_2 , $\text{RH} = 90 \pm 10\%$). Przeprowadzono dwie niezależne serie eksperymentów. Po zakończeniu ekspozycji, zbierano komórki THP-1 oraz medium pochodzące. Oznaczano ekspresję antygenu powierzchniowego CD54 na komórkach THP-1 zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 5.6. W mediach pochodzących oznaczano poziom IL-1 alfa oraz IL-18 metodą ELISA-xMAP zgodnie z punktem 5.5.

5.8. Statystyka

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono w programie *Statistica 10* z wykorzystaniem testu t-Studenta. Wartości $p \leq 0,05$ uznawano za statystycznie istotne.

Ocenę jakości klasyfikatora oraz ustalenie wartości odcięcia wykonano na podstawie krzywych ROC przy użyciu metody stycznej w programie PQStat v. 1.8.4.

Oceny modeli predykcyjnych dokonywano na podstawie następujących parametrów:

- Czulość - opisuje zdolność metody do wykrywania przypadków posiadających daną cechę, czyli do wykrywania substancji uczulających:

$$\text{czulość (ang. sensitivity)} = \frac{TP}{TP+FN} \quad (6)$$

- Swoistość – opisuje zdolność metody do wykrywania przypadków nie posiadających danej cechy, czyli do wykrywania substancji nieuczulających:

$$\text{swoistość (ang. specificity)} = \frac{TN}{TN+FP} \quad (7)$$

- Dokładność - opisuje prawdopodobieństwo uzyskania prawidłowego wyniku przy wykorzystaniu danej metody.

$$\text{dokładność (ang. accuracy)} = \frac{TP+TN}{N} \quad (8)$$

Gdzie:

TP – liczba wyników prawdziwie dodatnich (ang. *true positive*)

FN – liczba wyników fałszywie ujemnych (ang. *false negative*)

TN – liczba wyników prawdziwie ujemnych (ang. *true negative*)

FP – liczba wyników fałszywie dodatnich (ang. *false positive*)

N – liczba materiałów badanych

6. Wyniki

6.1. Etap I - profil uwalniania cytokin zapalnych przez różne rodzaje keratynocytów hodowanych w monokulturze.

6.1.1. Ocena cytotoksyczności DNCB wobec keratynocytów

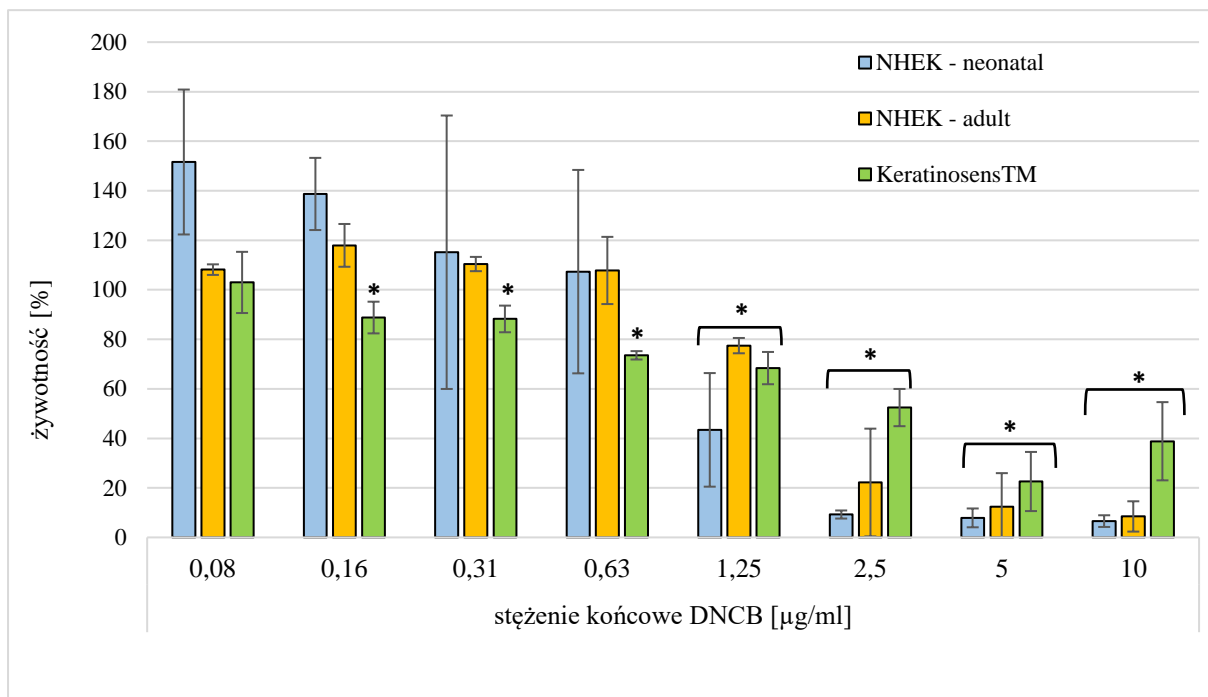
Pierwszym etapem badań była ocena cytotoksyczności DNCB w stosunku do trzech różnych rodzajów keratynocytów. W tym celu zastosowano test alamarBlue oceniający żywotność komórek. Test przeprowadzono po 24 h inkubacji keratynocytów z DNCB stosowanym w ośmiu stężeniach końcowych.

DNCB, substancja klasyfikowana jako skrajnie uczulająca charakteryzowała się wysoką cytotoksycznością w stosunku do wszystkich badanych typów keratynocytów, nie stosowano w analizie cytotoksyczności stężeń DNCB wyższych niż 10 µg/ml.

Najbardziej wrażliwym na działanie DNCB typem komórek okazały się keratynocyty pochodzenia noworodkowego NHEK-neonatal. Znaczący spadek żywotności obserwowano już przy stężeniach końcowych DNCB w przedziale 0,63 – 1,25 µg/ml, przy stężeniu DNCB równym 2,50 µg/ml stwierdzono żywotność komórek poniżej 10%. Statystycznie istotny spadek żywotności w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej stwierdzono już przy stężeniu DNCB równym 1,25 µg/ml.

Mniejszą wrażliwością na działanie DNCB charakteryzowały się keratynocyty pochodzące od dawców dorosłych tj. NHEK-adult, które odznaczały się znaczącym spadkiem żywotności przy stężeniach końcowych DNCB w przedziale 1,25 – 2,50 µg/ml osiągając średnią żywotność na poziomie 20% przy stężeniu DNCB równym 2,50 µg/ml. Statystycznie istotny spadek żywotności w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej stwierdzono od stężenia DNCB równego 2,5 µg/ml.

Komórki unieśmiertelnionej linii komórkowej pochodzącej z ludzkich keratynocytów charakteryzowały się najmniejszą dynamiką spadku żywotności w obecności wzrastających stężeń DNCB wśród stosowanych keratynocytów. Przy stężeniu końcowym 2,50 µg/ml odznaczały się ponad dwukrotnie wyższą żywotnością niż komórki NHEK-adult oraz pięciokrotnie wyższą żywotnością w porównaniu do komórek NHEK-neonatal. Statystycznie istotny spadek żywotności keratynocytów unieśmiertelnionej linii komórkowej obserwowano dopiero przy stężeniu DNCB równym 5 µg/ml (Rysunek 6.1.).

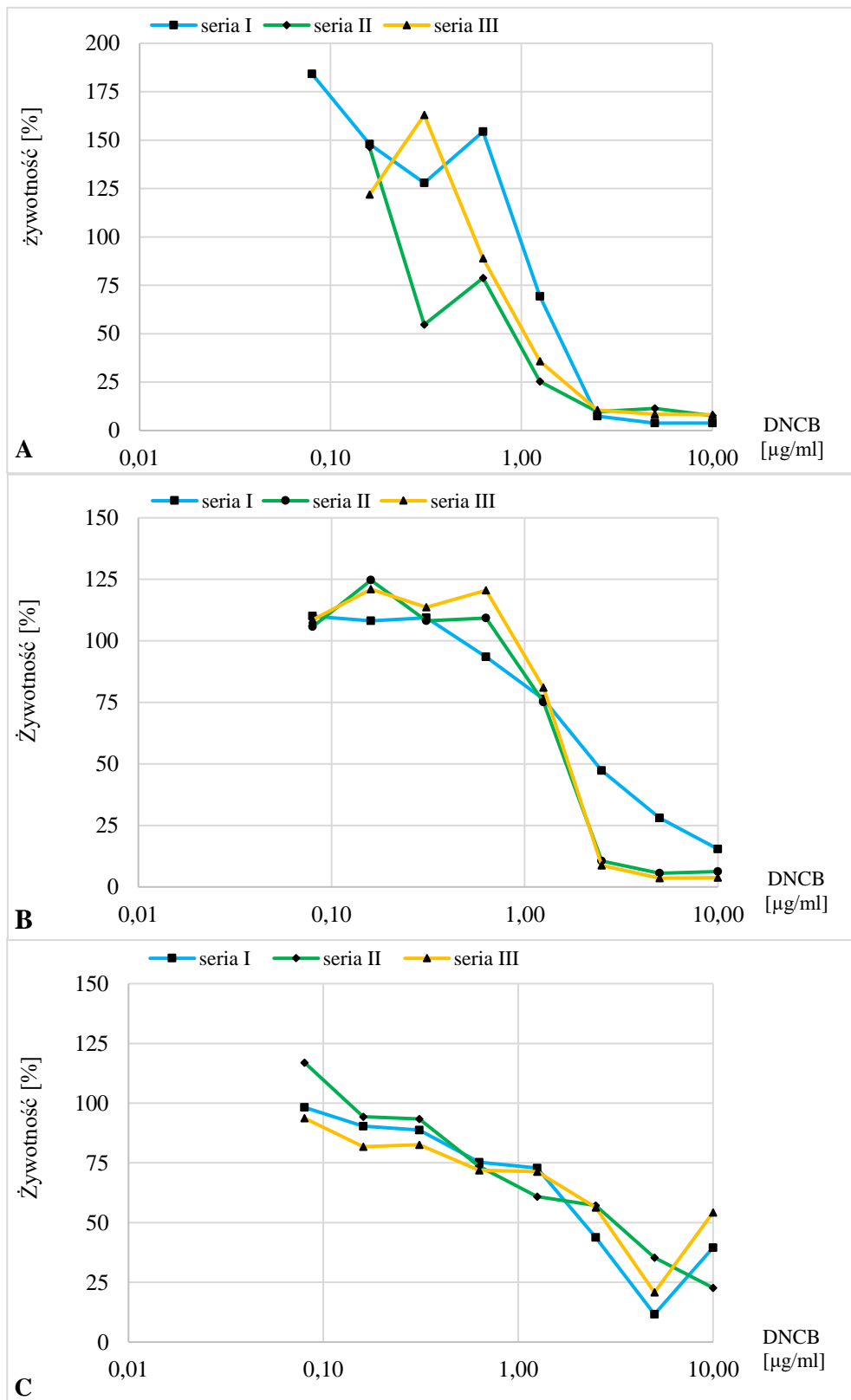


Rysunek 6.1. Żywotność komórek po 24 h ekspozycji na wzrastające stężenia DNCB wyznaczona przy użyciu testu alamarBlue. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego z trzech niezależnych pomiarów. Do oceny istotności statystycznej zastosowano test t-Studenta, * oznacza wartości statystycznie istotne w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej (0,2% DMSO) $p \leq 0,05$

6.1.2. Wyznaczenie wartości CV75 dla keratynocytów

Na podstawie wyników cytotoksyczności DNCB wobec keratynocytów wyznaczono wartości CV75, które obliczano z krzywej zależności dawka – odpowiedź metodą interpolacji log – liniowej. Wartość CV75 oznacza stężenie DNCB przy którym stwierdza się 75% żywotność komórek w porównaniu do żywotności komórek w obecności kontroli rozpuszczalnikowej tj. 0,2% DMSO (Rysunek 6.2.).

Najwyższą średnią wartość CV75 tj. 1,29 µg/ml uzyskano w przypadku komórek NHEK-adult. Średnie stężenie DNCB, które spowodowało śmierć 25% tych komórek było około dwukrotnie wyższe niż w przypadku komórek nieśmiertelnej linii komórkowej pochodzącej z ludzkich keratynocytów, które uzyskały najniższą średnią wartość CV75 wśród wszystkich ocenianych keratynocytów tj. 0,65 µg/ml (Tabela 6.1.).



Rysunek 6.2. Krzywe zależności dawka – odpowiedź na podstawie których wyznaczano wartość CV75 metodą interpolacji log-liniowej. Żywotność keratynocytów po 24 h inkubacji z DNCB określona przy użyciu testu alamarBlue. Keratynocyty narażano na DNCB w stężeniach końcowych 0,04 – 10 µg/ml. Wykonano trzy serie pomiarowe, w każdej z nich wykonano trzy powtórzenia

Tabela 6.1. Podsumowanie wartości CV75 wyznaczonych na podstawie wyników cytotoksyczności DNCB (n=3)

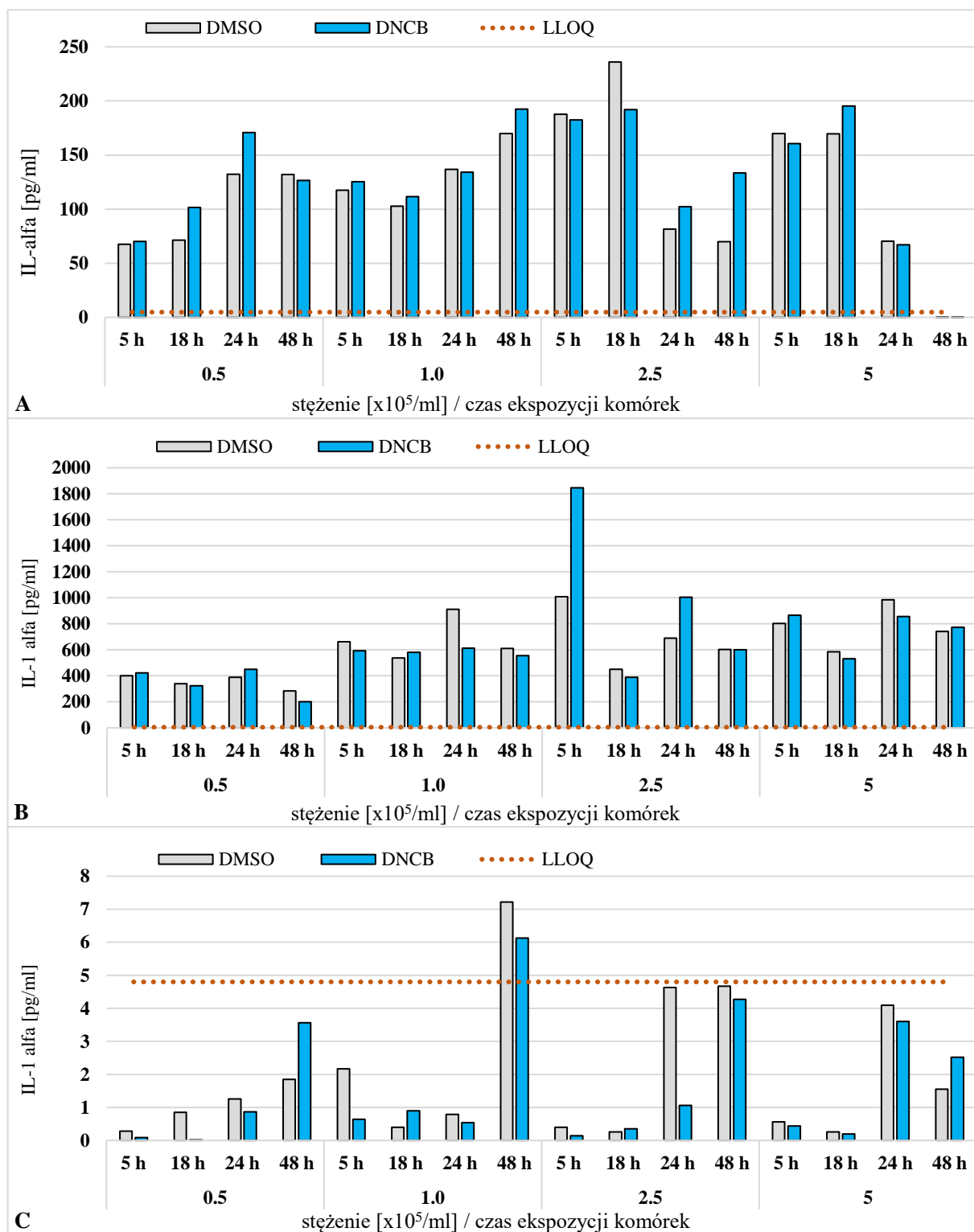
Seria pomiarowa	CV75 [%]		
	NHEK - neonatal	NHEK - adult	Unieśmiertelniona linia komórkowa pochodząca z ludzkich keratynocytów
Seria I	1,19	1,29	0,67
Seria II	0,66	1,25	0,62
Seria III	0,75	1,32	0,51
CV 75 $\bar{x} \pm SD$	0,87 \pm 0,28	1,29 \pm 0,04	0,65 \pm 0,08

6.1.3. Analiza stężenia cytokin zapalnych keratynocytów w mediach pochodowlanych monokultur KC

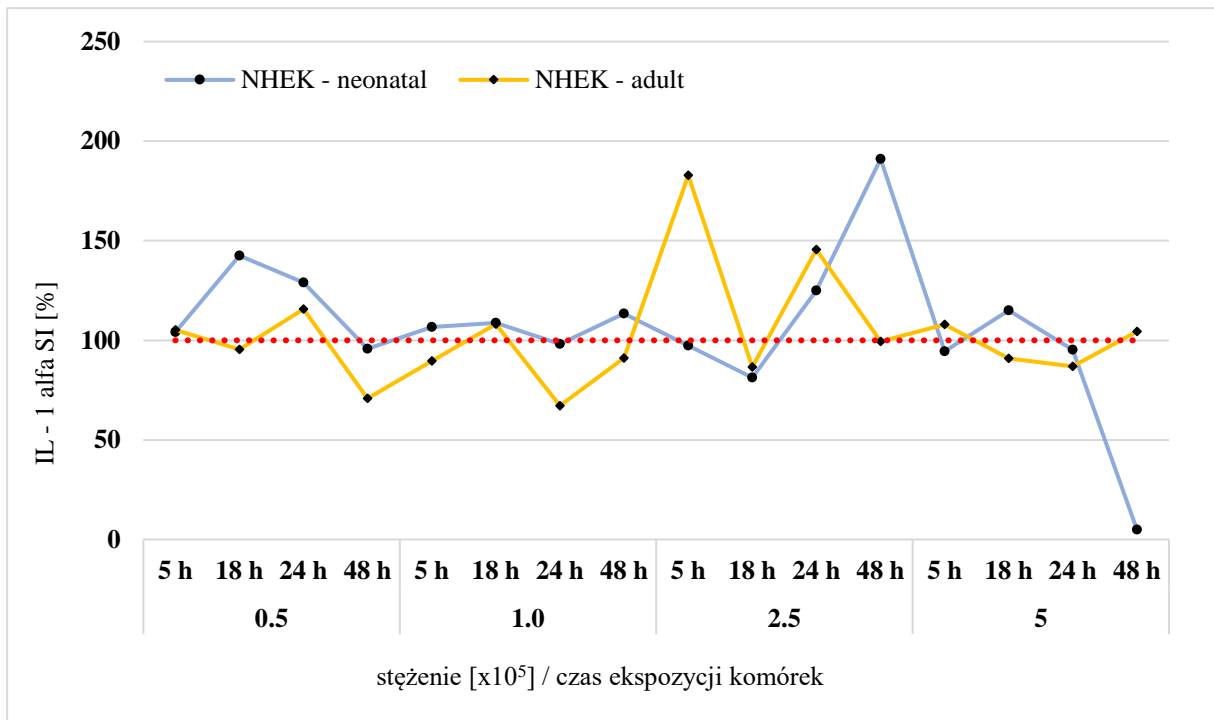
6.1.3.1. Profil zewnątrzkomórkowego uwalniania IL-1 alfa

Na podstawie analizy wyników IL-1 alfa w mediach pochodowlanych można zauważyć, że stężenia interleukiny różnią się w znaczący sposób pomiędzy stosowanymi modelami komórkowymi już na poziomie podstawowego wydzielania tj. w obecności kontroli rozpuszczalnikowej DMSO. Najbardziej reaktywne okazały się keratynocyty NHEK-adult, które w warunkach spoczynkowych produkowały IL-1 alfa w stężeniach przekraczających 200 pg/ml we wszystkich stężeniach komórek jak również punktach czasowych osiągając wartości przekraczające nawet 1000 pg/ml. Keratynocyty NHEK-neonatal charakteryzowały się niższą produkcją podstawową IL-1 alfa. Z wyjątkiem jednego protokołu eksperymentalnego (czas ekspozycji 18 h, stężenie komórek $2,5 \times 10^5$ /ml), obserwowano stężenia podstawowe IL-1 alfa poniżej 200 pg/ml. W przypadku keratynocytów NHEK-neonatal oraz NHEK-adult, wszystkie oznaczone stężenia IL-1 alfa przekraczały wartość LLOQ, czyli dolną granicę oznaczalności równą 4,80 pg/ml. Natomiast w przypadku komórek unieśmiertelnionej linii komórkowej pochodzącej z ludzkich keratynocytów, z wyjątkiem jednego protokołu eksperymentalnego (czas ekspozycji 48 h, stężenie komórek 1×10^5 /ml), nie stwierdzono produkcji IL-1 alfa zarówno w warunkach podstawowych jak i w przypadku ekspozycji na substancję uczulającą (Rysunek 6.3.).

W przypadku keratynocytów, które po ekspozycji na substancję uczulającą wyprodukowały zewnątrzkomórkowo IL-1 alfa w stężeniu przekraczającym wartość LLOQ (NHEK – neonatal, NHEK – adult) obliczono wartości SI wg wzoru (4). Zarówno keratynocyty pochodzące od dawców noworodkowych jak i od dawców dorosłych wykazały zbliżony profil uwalniania IL-1 alfa w odpowiedzi na ekspozycję na substancję uczulającą. Nie obserwowano znaczącego wzrostu stężenia tej cytokiny w porównaniu z kontrolą rozpuszczalnikową stosując keratynocyty w dwóch najniższych stężeniach $0,5x$ oraz $1x10^5$ komórek/ml. Komórki stosowane w stężeniu $2,5x10^5$ /ml wyprodukowały najwięcej IL-1 alfa w stosunku do kontroli rozpuszczalnikowej, NHEK-neonatal po 48h ekspozycji, NHEK-adult już po 5 h ekspozycji na DNCB. W najwyższym stężeniu komórek produkcja IL-1 alfa po ekspozycji na substancję uczulającą gwałtownie maleje osiągając wartości zbliżone do stężenia uzyskanego w kontroli rozpuszczalnikowej (Rysunek 6.4.).



Rysunek 6.3. Profil uwalniania interleukiny IL-1 alfa pod wpływem substancji uczulającej DNCB i kontroli rozpuszczalnikowej DMSO przez keratynocyty NHEK-neonatal (A), NHEK-adult (B) oraz komórki nieśmiertelnej linii komórkowej pochodzącej z ludzkich keratynocytów (C) w zależności od stężenia komórek oraz czasu ekspozycji na DNCB i DMSO. Stężenie interleukiny IL-1 alfa oznaczane było w mediach pochodowlanych pulowanych z trzech niezależnych eksperymentów metodą ELISA-xMAP

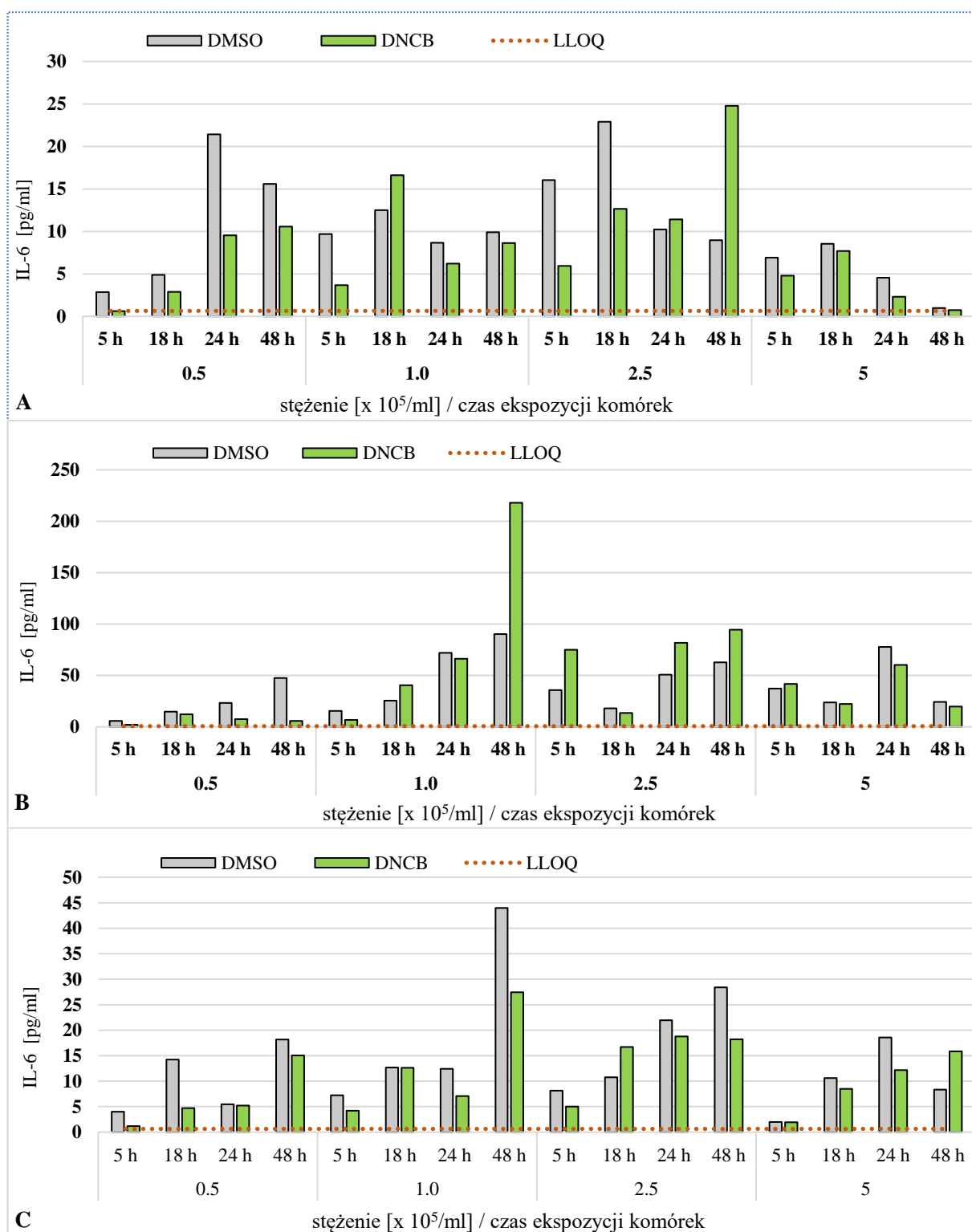


Rysunek 6.4. Wartości wskaźnika stymulacji SI dla keratynocytów NHEK-neonatal oraz NHEK-adult uzyskanych w różnych przedziałach czasowych i przy różnych stężeniach komórek. Linia przerywana ustawiona jest na poziomie wartości kontroli rozpuszczalnikowej

6.1.3.2. Profil zewnątrzkomórkowego uwalniania IL-6

Na podstawie analizy wyników IL-6 w mediach pochodzących można zauważyć, że stężenia interleukiny różnią się pomiędzy stosowanymi modelami komórkowymi na poziomie podstawowego wydzielania tj. w obecności kontroli rozpuszczalnikowej DMSO, jednak w mniejszym stopniu niż w przypadku IL-1 alfa. Stwierdzono zewnątrzkomórkowe uwalnianie IL-6 przez wszystkie typy keratynocytów, we wszystkich protokołach eksperymentalnych (Rysunek 6.5.).

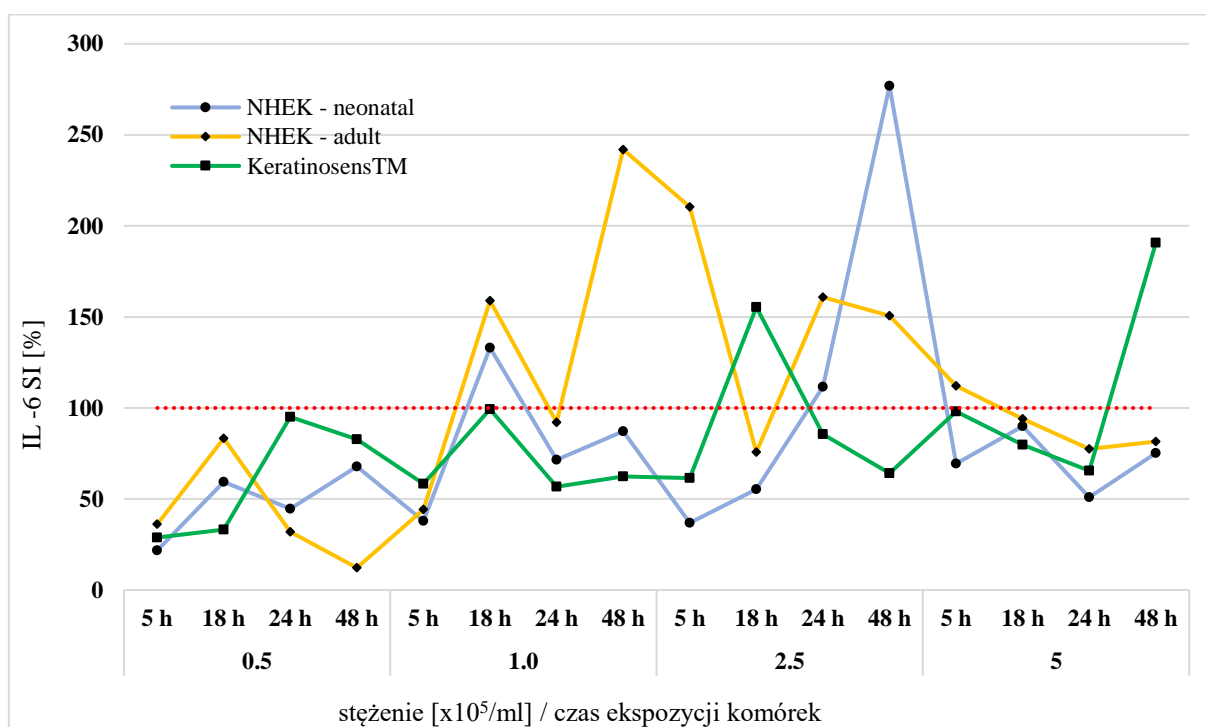
Analizując wartości SI, nie stwierdzono produkcji IL-6 powyżej poziomu produkowanego przez komórki narażane na kontrolę rozpuszczalnikową w stężeniu najniższym tj. $0,5 \times 10^5$ komórek/ml we wszystkich modelach badawczych. Zewnątrzkomórkowe wydzielanie IL-6 przez keratynocyty NHEK-adult było najbardziej zróżnicowane. Stwierdzono wzrost stężenia IL-6 w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej w kilku punktach czasowych przy stężeniu komórek 1×10^5 oraz $2,5 \times 10^5$ /ml. W najwyższym stężeniu komórek nie obserwowano wzrostu wartości SI powyżej wartości kontroli rozpuszczalnikowej (Rysunek 6.6.).



Rysunek 6.5. Profil uwalniania interleukiny IL-6 pod wpływem substancji uczulającej DNCB i kontroli rozpuszczalnikowej DMSO przez keratynocyty NHEK-neonatal (A), NHEK-adult (B) oraz komórki nieśmiertelnej linii komórkowej pochodzącej z ludzkich keratynocytów (C) w zależności od stężenia komórek oraz czasu ekspozycji na DNCB i DMSO. Stężenie interleukiny IL-6 oznaczane było w mediach pochodowlanych pulowanych z trzech niezależnych eksperymentów metodą ELISA-xMAP

W przypadku keratynocytów NHEK-neonatal stwierdzono jeden ostry pik produkcji IL-6 po 48 h ekspozycji komórek stosowanych w stężeniu $2,5 \times 10^5$ /ml, uzyskana wartość SI = 276,8% była najwyższą wartością SI dla IL-6 stwierdzoną wśród wszystkich modeli badawczych.

Z kolei komórki unieśmiertelnionej linii komórkowej pochodzącej z ludzkich keratynocytów okazały się najmniej reaktywne spośród wszystkich modeli badawczych, w ich przypadku uzyskano najniższe wartości SI (Rysunek 6.6.).



Rysunek 6.6. Wartości wskaźnika stymulacji SI dla keratynocytów NHEK-neonatal oraz NHEK-adult uzyskanych w różnych przedziałach czasowych i przy różnych stężeniach komórek. Linia przerywana ustawiona jest na poziomie wartości kontroli rozpuszczalnikowej

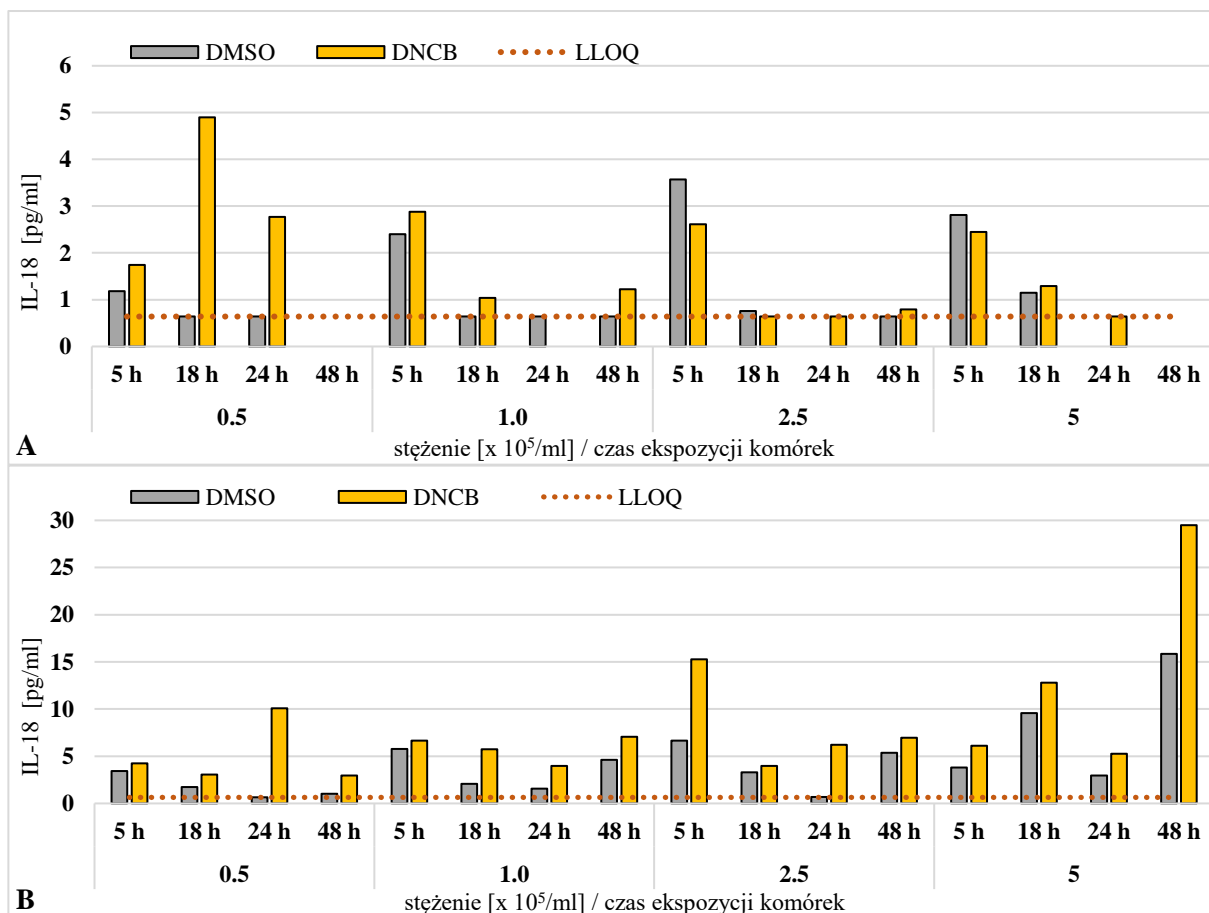
6.1.3.3. Profil zewnątrzkomórkowego uwalniania IL-18

W przypadku IL-18, stwierdzono zewnątrzkomórkową produkcję interleukiny tylko w przypadku NHEK-neonatal oraz NHEK-adult. Nie stwierdzono produkcji IL-18 przez komórki unieśmiertelnionej linii komórkowej pochodzącej z ludzkich keratynocytów powyżej wartości LLOQ tj. 0,64 pg/ml w żadnych warunkach eksperymentalnych. Obserwowano podstawowe wydzielanie IL-18 w obecności kontroli rozpuszczalnikowej na bardzo niskim poziomie, często poniżej wartości LLOQ w przypadku komórek NHEK-neonatal. Komórki NHEK-adult okazały się bardziej reaktywne w warunkach podstawowych (Rysunek 6.7.).

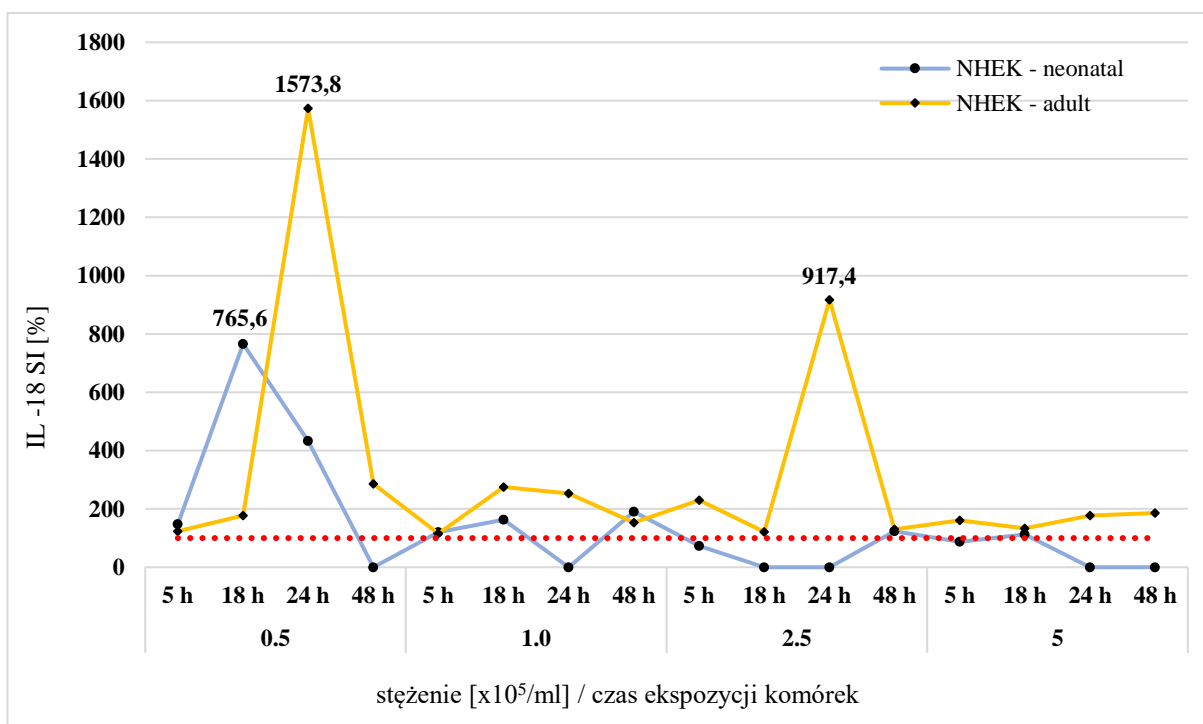
Najwyższą produkcję IL-18 przez komórki NHEK-neonatal stwierdzono w najniższym stosowanym stężeniu $0,5 \times 10^5$ komórek/ml po 24h ekspozycji na substancję uczulającą. Wraz

ze wzrostem stężenia komórek produkcja IL-18 wyraźnie maleje, a w wyższych stężeniach komórek tj. 1x; 2,5x oraz 5x10⁵ komórek/ml zewnątrzkomórkowa produkcja IL-18 ulega zahamowaniu w porównaniu z kontrolą rozpuszczalnikową.

W przypadku komórek NHEK-adult, stwierdzono stężenia przewyższające stężenie obserwowane w kontroli rozpuszczalnikowej we wszystkich czasach inkubacji oraz wszystkich stężeniach wysiewanych komórek. Najwyższe stężenia IL-18 oraz wartość SI obserwowane były po 24 h inkubacji w przypadku komórek wysiewanych w stężeniu 0,5x10⁵ komórek/ml; 5h inkubacji w przypadku komórek wysiewanych w stężeniu 2,5x10⁵ komórek/ml. Dla tych stężeń i czasów inkubacji uzyskano najwyższe wartości SI wśród wszystkich badanych rodzajów komórek oraz cytokin zapalnych (Rysunek 6.8.).



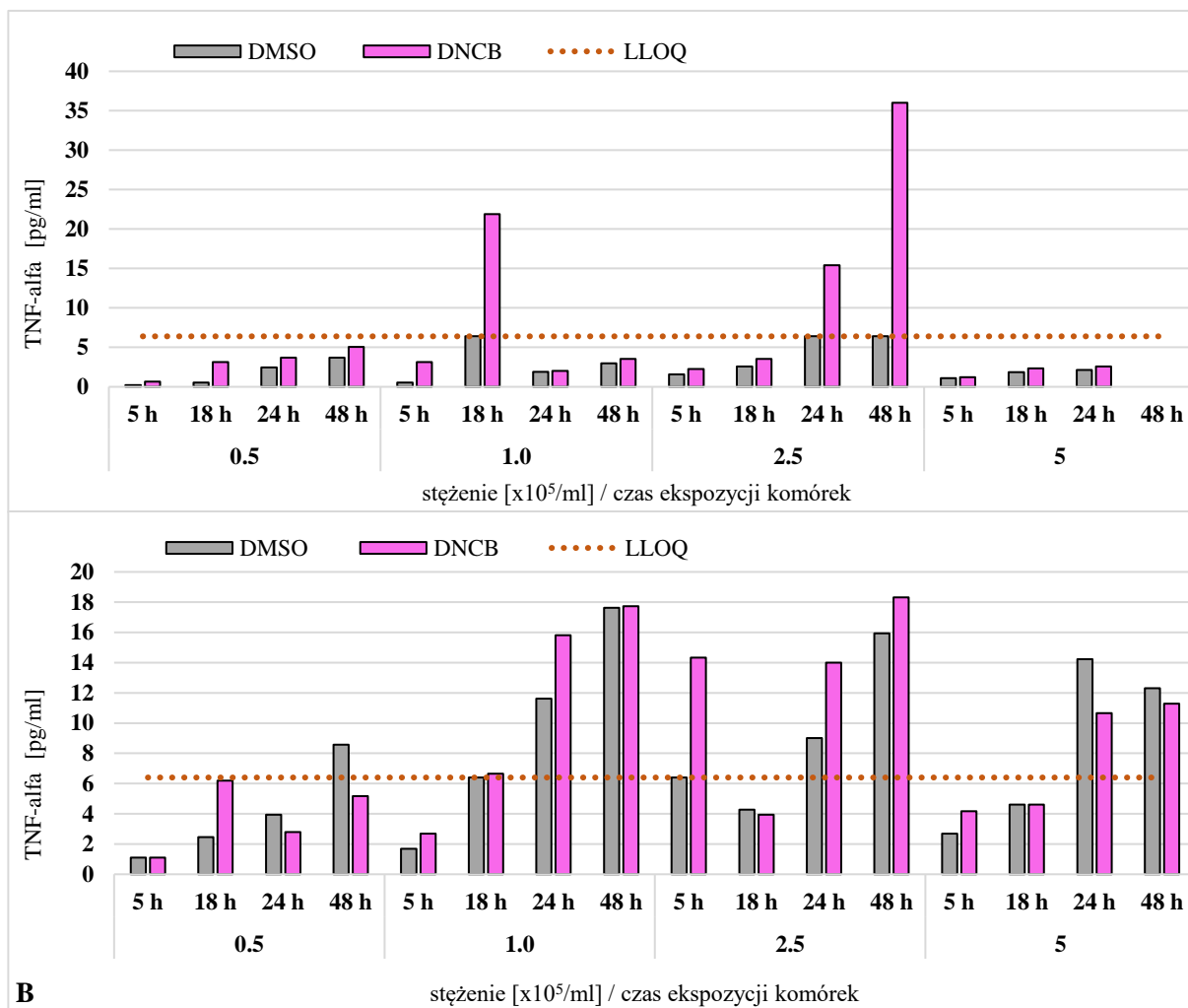
Rysunek 6.7. Profil uwalniania interleukiny IL-18 pod wpływem substancji uczulającej DNCB i kontroli rozpuszczalnikowej DMSO przez keratynocyty NHEK-neonatal (A), NHEK-adult (B) w zależności od stężenia komórek oraz czasu ekspozycji na DNCB i DMSO. Stężenie interleukiny IL-18 oznaczane było w mediach pochodowlanych pulowanych z trzech niezależnych eksperymentów metodą ELISA-xMAP



Rysunek 6.8. Wartości wskaźnika stymulacji SI dla keratynocytów NHEK-neonatal oraz NHEK-adult uzyskanych w różnych przedziałach czasowych i przy różnych stężeniach komórek. Linia przerywana ustawiona jest na poziomie wartości kontroli rozpuszczalnikowej

6.1.3.4. Profil zewnątrzkomórkowego uwalniania TNF-alfa oraz IL-12 (p40), IL-12 (p70)

Na podstawie analizy wyników TNF-alfa w mediach pochodowlanych można zauważyć, że jego stężenia różnią się w znaczący sposób pomiędzy stosowanymi modelami komórkowymi już na poziomie podstawowego wydzielania tj. w obecności kontroli rozpuszczalnikowej DMSO. Najbardziej reaktywne okazały się keratynocyty NHEK-adult, które w warunkach spoczynkowych produkowały TNF-alfa przy dłuższej ekspozycji, wzrost stężenia obserwowano po 24 i 48 h od rozpoczęcia inkubacji z kontrolą rozpuszczalnikową. Przy krótszym czasie ekspozycji tj. 5 i 18 h podstawowe uwalnianie TNF-alfa było niższe od wartości LLOQ równej 6,40 pg/ml. Podstawowe uwalnianie TNF-alfa przez komórki NHEK-neonatal we wszystkich protokołach eksperymentalnych nie przekraczało wartości LLOQ (Rysunek 6.9.). W przypadku komórek nieśmiertelnej linii komórkowej pochodzącej z ludzkich keratynocytów nie stwierdzono produkcji TNF-alfa powyżej wartości LLOQ zarówno w warunkach podstawowych jak i po ekspozycji na substancję uczulającą.



Rysunek 6.9. Profil uwalniania interleukiny TNF alfa pod wpływem substancji uczulającej DNCB i kontroli rozpuszczalnikowej DMSO przez keratynocyty NHEK-neonatal (A), NHEK-adult (B) w zależności od stężenia komórek oraz czasu ekspozycji na DNCB i DMSO. Stężenie TNF-alfa oznaczane było w mediach pochodzących pulowanych z trzech niezależnych eksperymentów metodą ELISA-xMAP.

Biorąc pod uwagę keratynocyty NHEK-neonatal, tylko w trzech przypadkach stwierdzono stężenie przekraczające wartość dolnej granicy oznaczalności tj. w przypadku komórek wysianych w stężeniu 1×10^5 komórek/ml po 18 h ekspozycji oraz komórek wysiewanych w stężeniu $2,5 \times 10^5$ komórek/ml po 24 i 48h ekspozycji. Wartości SI w tych przypadkach osiągnęły wysokie wartości, odpowiednio:

SI= 341,9% dla komórek wysianych w stężeniu 1×10^5 kom./ml po 18h ekspozycji,

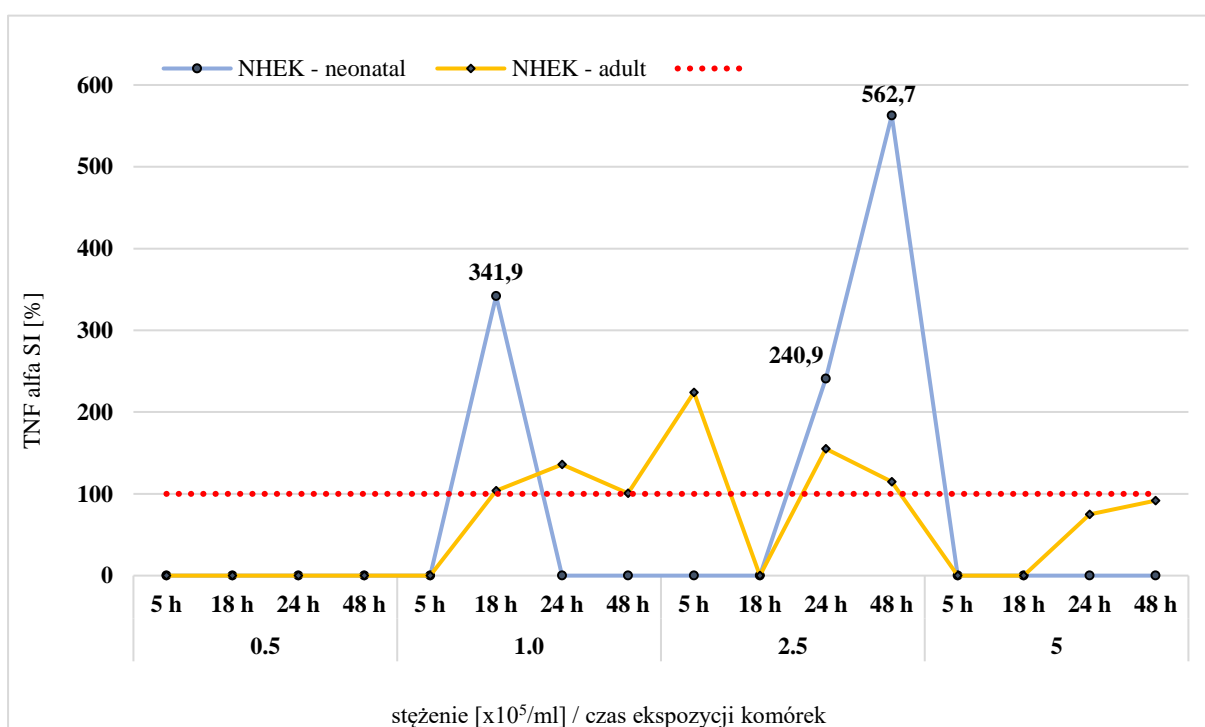
SI= 240,9% dla komórek wysianych w stężeniu $2,5 \times 10^5$ kom./ml po 24h ekspozycji,

SI= 562,7% dla komórek wysianych w stężeniu $2,5 \times 10^5$ kom./ml po 48h ekspozycji.

Keratynocyty NHEK-adult uzyskały niższe wartości SI w porównaniu z keratynocytami NHEK-neonatal. Po 24h inkubacji komórek wysianych w stężeniu 1×10^5 komórek/ml

uzyskano wartość SI na poziomie 136,1%. Wyższe wartości SI uzyskano po 5h inkubacji, SI=224,1% oraz po 24h inkubacji, SI=155,2% w przypadku komórek wysianych w stężeniu $2,5 \times 10^5$ komórek/ml (Rysunek 6.10.).

Nie stwierdzono produkcji zewnątrzkomórkowej IL-12 (p40) oraz IL-12 (p70) przez żaden z trzech typów stosowanych keratynocytów. We wszystkich warunkach eksperymentalnych stężenie tych interleukin było nieoznaczalne lub poniżej wartości LLOQ = 6,40 pg/ml dla IL - 12 (p40) oraz LLOQ = 0,88 pg/ml dla IL -12 (p70).



Rysunek 6.10. Wartości wskaźnika stymulacji SI dla keratynocytów NHEK-neonatal oraz NHEK-adult uzyskanych w różnych przedziałach czasowych i przy różnych stężeniach komórek. Linia przerywana ustawiona jest na poziomie wartości kontroli rozpuszczalnikowej.

6.1.4. Etap I - podsumowanie

Na podstawie uzyskanych wyników, do etapu II badań zakwalifikowano keratynocyty NHEK- neonatal i keratynocyty NHEK-adult. Ze względu na minimalną zewnątrzkomórkową produkcję cytokin zapalnych nie stosowano komórek linii komórkowej pochodzącej z ludzkich keratynocytów.

Spośród oznaczanych w etapie I cytokin zapalnych, do etapu II badań wybrano IL-1 alfa, IL-6 oraz IL-18.

Spośród wszystkich stosowanych w etapie I protokołów eksperymentalnych wybrano następujące do etapu II badań:

- a) NHEK-neonatal – stężenie $2,5 \times 10^5$ komórek/ml, czas ekspozycji 48 h;
- b) NHEK-adult - stężenie $2,5 \times 10^5$ komórek/ml, czas ekspozycji 5 h;
- c) NHEK-adult - stężenie 1×10^5 komórek/ml, czas ekspozycji 48h.

6.2. Etap II - profil uwalniania cytokin zapalnych przez keratynocyty hodowane w kokulturze bezpośredniej z komórkami dendrytycznymi

6.2.1. Ocena cytotoksyczności materiałów badanych wobec KC i DC

W kolejnym etapie badań oceniono cytotoksyczność 5 substancji badanych wobec dwóch rodzajów keratynocytów tj. NHEK-neonatal, NHEK-adult oraz komórek dendrytycznych, czyli THP-1, MUTZ-3. Zastosowano trzy substancje o znanym działaniu uczulającym:

- DNCB - substancja o skrajnym działaniu uczulającym,
- MMP – substancja o umiarkowanym działaniu uczulającym,
- EU – substancja o słabym działaniu uczulającym,

oraz dwie substancje nieuczulające tj, LA oraz 2PR. Do oceny cytotoksyczności zastosowano test alamarBlue oceniający żywotność komórek. Test przeprowadzono po 24 h inkubacji komórek z badanymi substancjami stosowanymi w ośmiu stężeniach końcowych.

Najbardziej wrażliwe na działanie DNCB okazały się keratynocyty pochodzenia noworodkowego NHEK-neonatal. Statystycznie istotny spadek żywotności w porównaniu z kontrolą rozpuszczalnikową tj. 0,2% DMSO obserwowano przy wszystkich zastosowanych stężeniach DNCB. Począwszy od stężenia DNCB równego $1,56 \mu\text{g/ml}$, żywotność komórek NHEK – neonatal obniżyła się istotnie do wartości poniżej 20%.

Keratynocyty NHEK-adult charakteryzowała niższa wrażliwość na działanie DNCB, statystycznie istotny spadek żywotności obserwowano w stężeniu DNCB równym $1,25 \mu\text{g/ml}$.

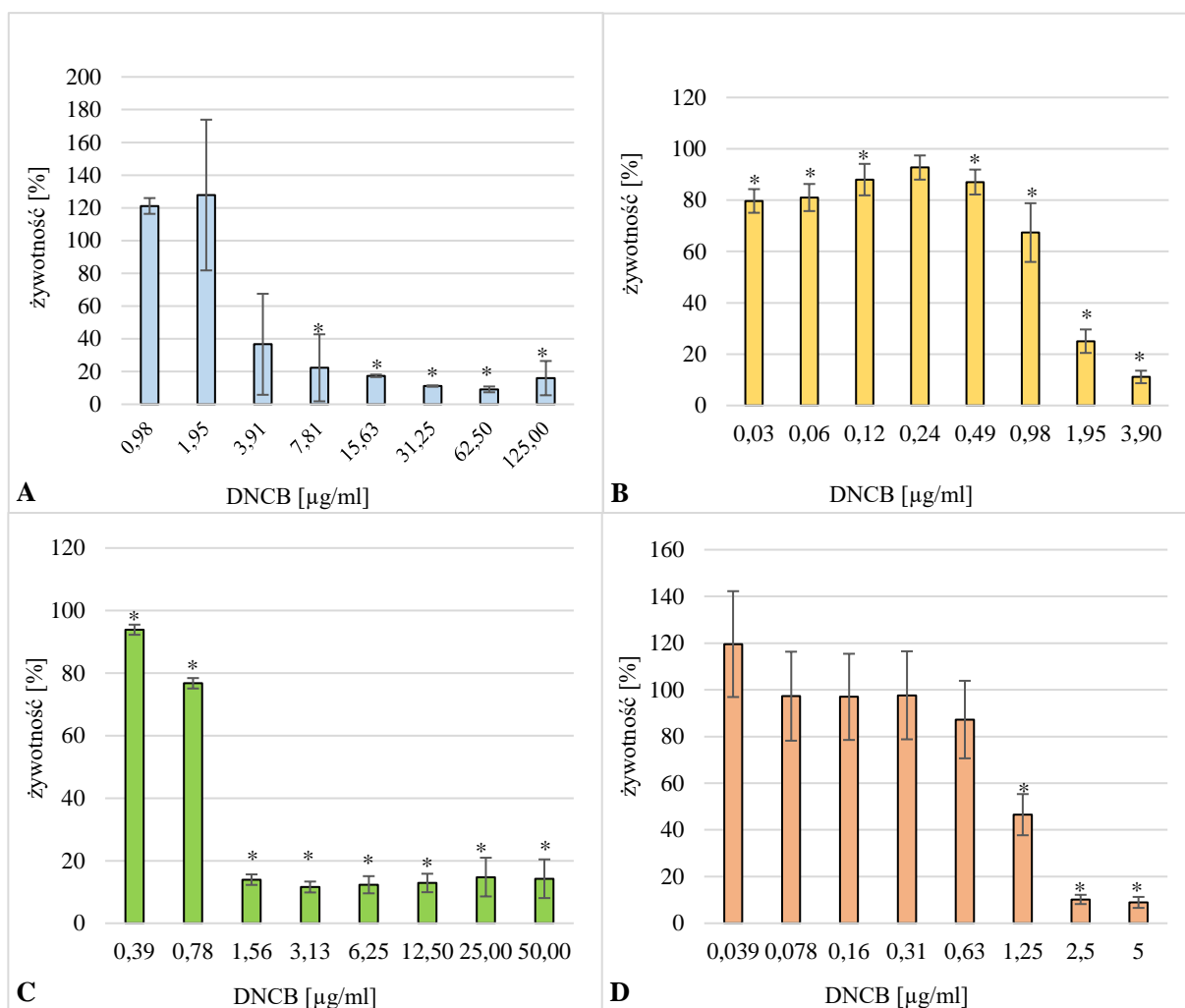
W przypadku komórek MUTZ-3 obserwowano statystycznie istotną, niewielką redukcję żywotności we wszystkich zastosowanych stężeniach, jednak znaczący spadek żywotności komórek MUTZ-3 nastąpił po ekspozycji na DNCB w stężeniu $1,95 \mu\text{g/ml}$, osiągając wartości poniżej 20% przy stężeniu równym $3,90 \mu\text{g/ml}$. Najmniejszą cytotoksyczność wykazał DNCB w stosunku do komórek THP-1. Statystycznie istotny spadek żywotności komórek poniżej 20% obserwowano dopiero przy stężeniu równym $7,81 \mu\text{g/ml}$ (Rysunek 6.11.).

W przypadku narażenia komórek na substancję o umiarkowanym działaniu uczulającym tj. MMP najbardziej wrażliwym typem komórek ponownie były keratynocyty NHEK-neonatal, w przypadku których obserwowano statystycznie istotny spadek żywotności w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej (0,2% DMSO) we wszystkich zastosowanych stężeniach. Nieco

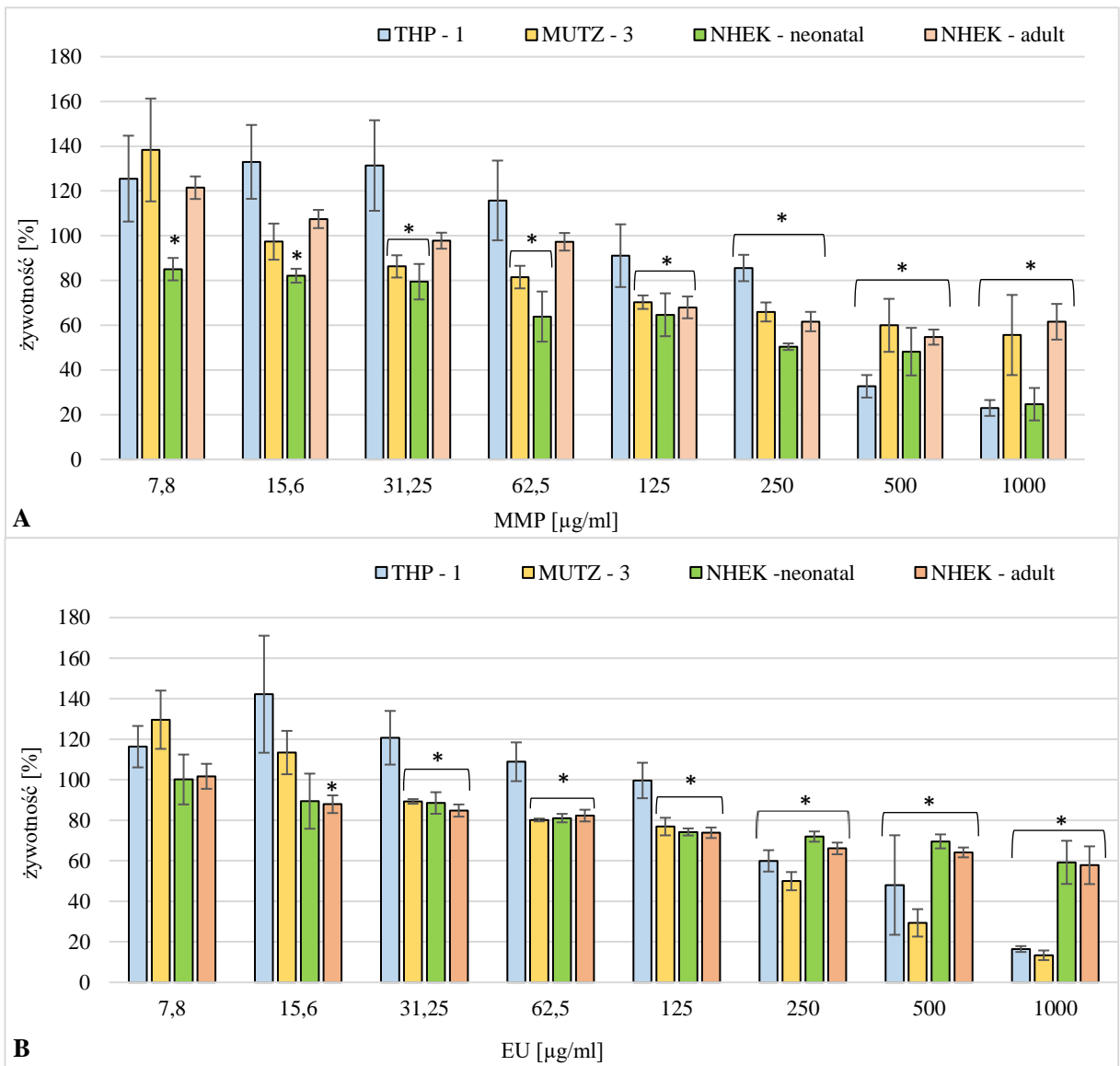
mniej wrażliwe na działanie MMP okazały się komórki MUTZ-3, w przypadku których do statystycznego obniżenia żywotności doszło przy stężeniu MMP równym 31,25 µg/ml. W przypadku komórek NHEK-adult, statystyczną istotność uzyskano przy stężeniu 125 µg/ml. Najmniej wrażliwe ponownie były komórki THP-1, statystycznie istotny spadek ich żywotności stwierdzono dopiero w stężeniu MMP równym 250 µg/ml.

Dynamika zmian żywotności komórek po ekspozycji na EU była podobna do zmian obserwowanych po narażeniu na MMP. Począwszy od stężenia EU 31,25 µg/ml obserwowano statystycznie istotny spadek żywotności wszystkich typów komórek z wyjątkiem THP-1, w przypadku których dopiero stężenie EU równe 250 µg/ml wywołało taki efekt (Rysunek 6.12.).

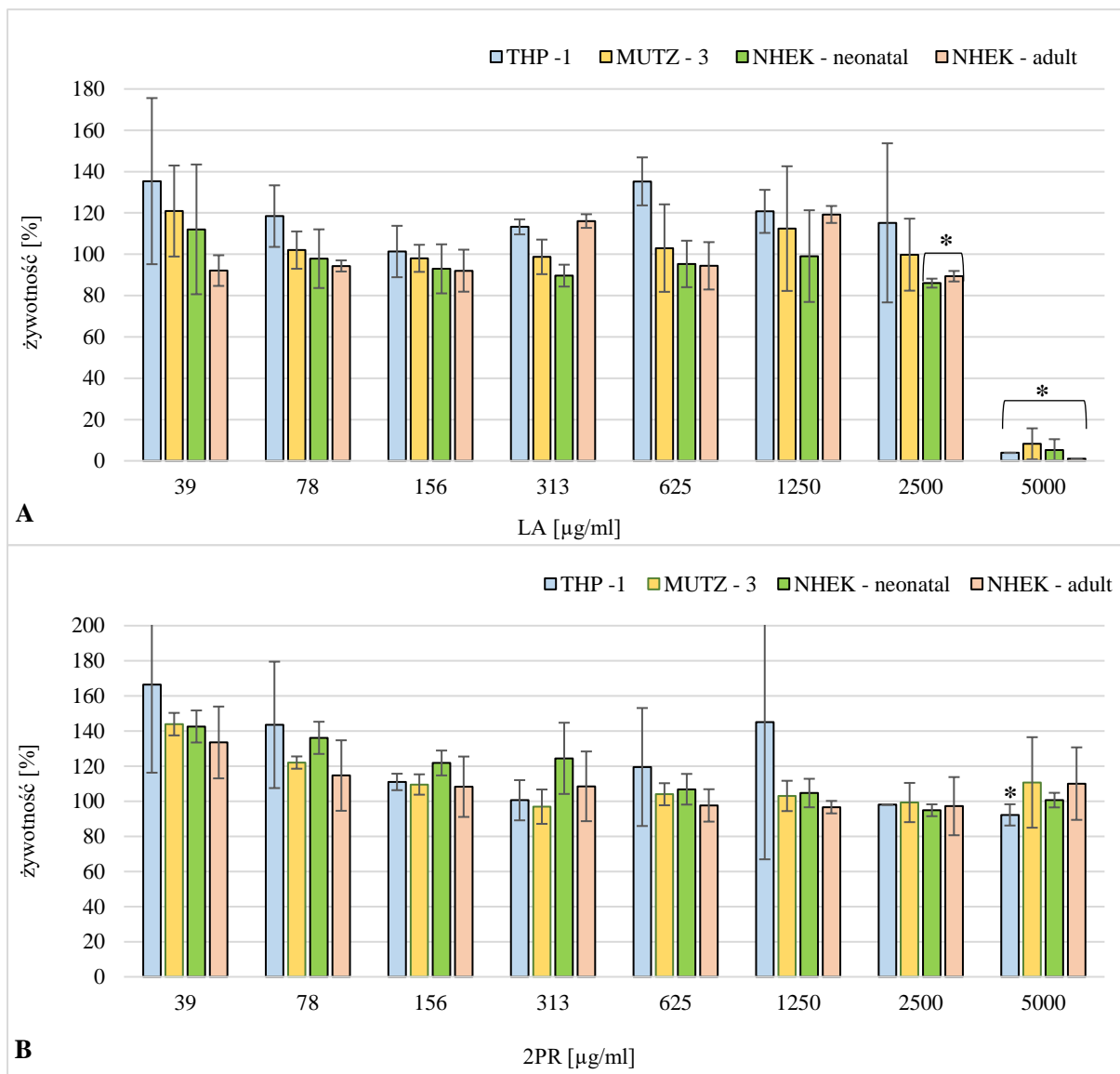
Substancja nieuczulająca, 2PR nie wykazała cytotoksyczności nawet w maksymalnym stężeniu użytym w teście tj. 5000 µg/ml, stwierdzono przy tym stężeniu żywotność wszystkich typów komórek powyżej 80% w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej (medium hodowlane). Druga z substancji nieuczulających tj. LA, która jest materiałem o znanym działaniu drażniącym wywołała statystycznie istotny spadek żywotności wszystkich komórek w maksymalnym stężeniu tj. 5000 µg/ml do wartości poniżej 20% w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej tj. medium hodowlanego (Rysunek 6.13.).



Rysunek 6.11. Żywotność komórek THP-1 (A), MUTZ-3 (B), NHEK-neonatal (C) oraz NHEK-adult (D) po 24 h ekspozycji na wzrastające stężenia DNCB wyznaczona przy użyciu testu alamarBlue. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego z trzech (NHEK-adult, MUTZ-3) lub dwóch (NHEK-neonatal, THP-1) niezależnych pomiarów. Do oceny istotności statystycznej zastosowano test t-Studenta. * oznacza wartości statystycznie istotne w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej (0,2% DMSO), $p \leq 0,05$



Rysunek 6.12. Żywotność komórek po 24 h ekspozycji na wzrastające stężenia MMP (A) oraz EU (B) wyznaczona przy użyciu testu alamarBlue. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego z trzech niezależnych pomiarów. Do oceny istotności statystycznej zastosowano test t-Student. * oznacza wartości statystycznie istotne w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej (0,2% DMSO); $p \leq 0,05$



Rysunek 6.13. Żywotność komórek po 24 h ekspozycji na wzrastające stężenia LA (A) oraz 2PR (B) wyznaczona przy użyciu testu alamarBlue. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego z trzech (2PR) lub dwóch (LA) niezależnych pomiarów. Do oceny istotności statystycznej zastosowano test t Studenta. * oznacza wartości statystycznie istotne w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej (medium hodowlane), $p \leq 0,05$

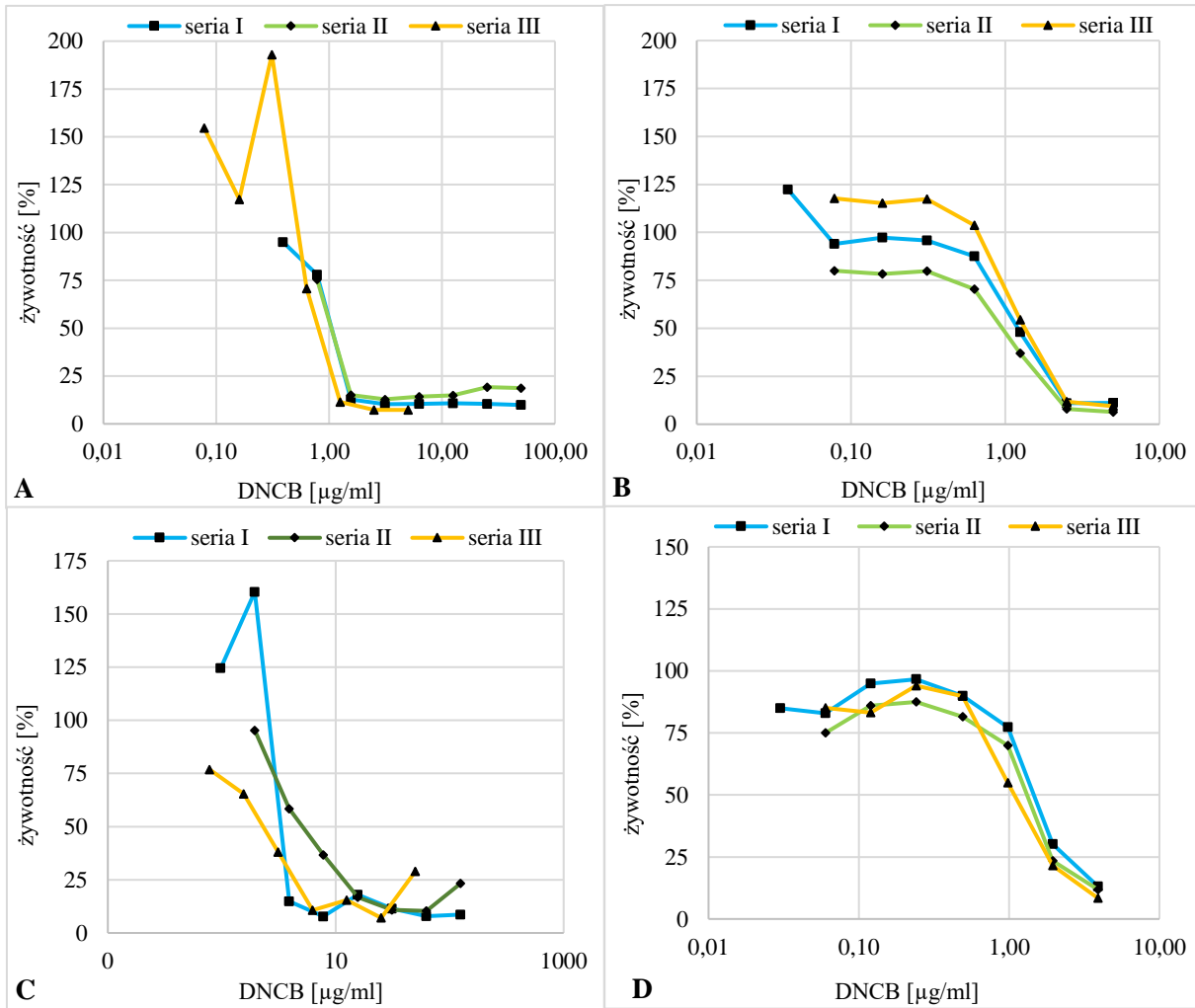
6.2.2. Wyznaczenie wartości CV75 oraz stężenia ekspozycyjnego

Na podstawie wyników cytotoksyczności materiałów badanych wobec keratynocytów NHEK-neonatal, NHEK-adult i komórek dendrytycznych THP-1, MUTZ-3 wyznaczono wartości CV75, które obliczano z krzywej zależności dawka – odpowiedź metodą interpolacji log – liniowej. Wartość CV75 oznacza stężenie materiałów badanych przy którym stwierdza się 75% żywotność komórek w porównaniu do żywotności komórek w obecności kontroli rozpuszczalnikowej tj. 0,2% DMSO w przypadku DNCB, MMP, EU lub medium hodowlanego w przypadku LA oraz 2PR (Rysunek 6.14 – 6.18).

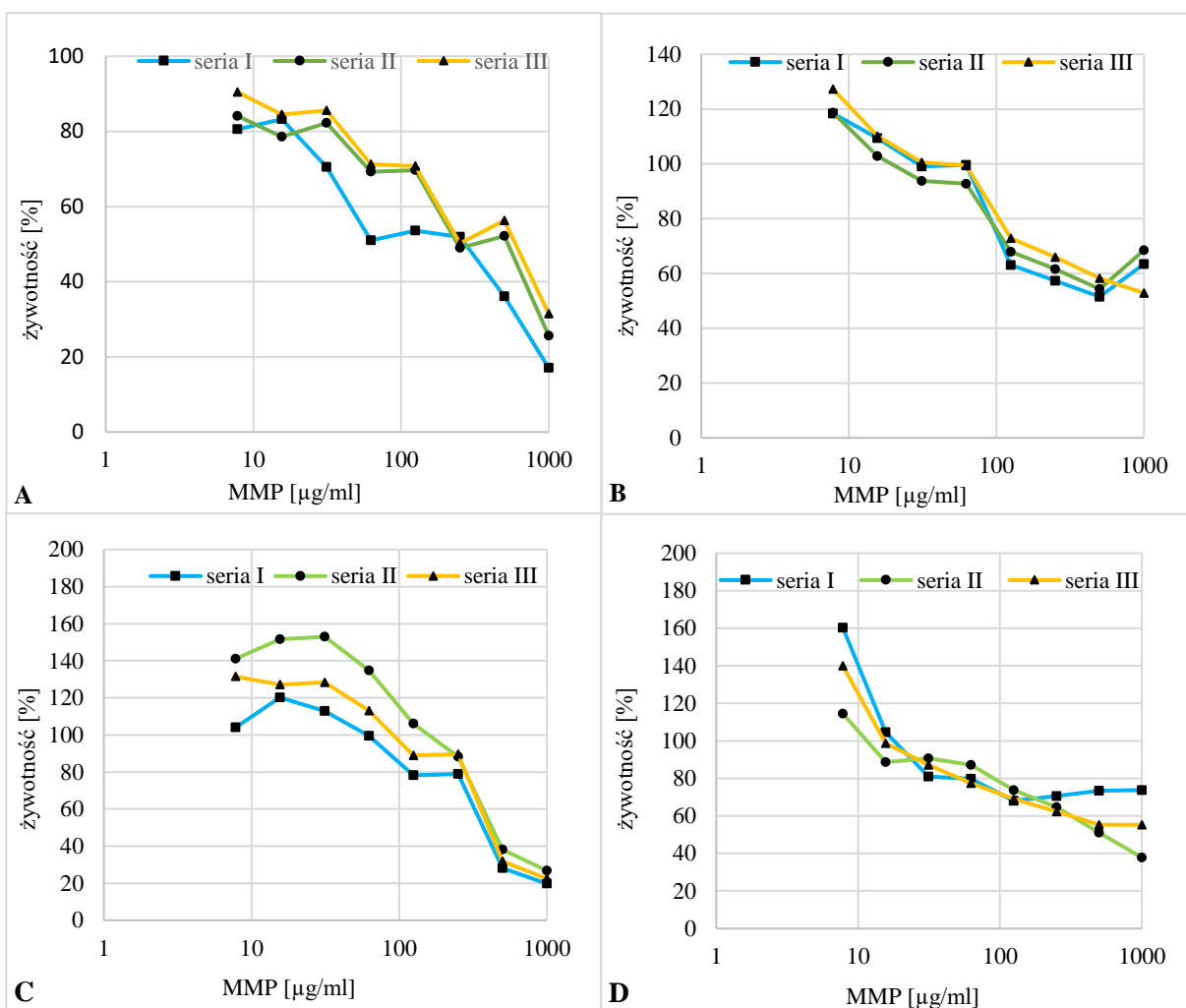
Najwyższą średnią wartość CV75 dla wszystkich substancji uczulających uzyskały komórki THP-1. W przypadku DNCB było to stężenie 2,22 $\mu\text{g/ml}$, prawie trzykrotnie wyższe niż w przypadku pozostałych rodzajów komórek, dla których wartość CV75 mieściła się w granicach 0,72 – 0,80 $\mu\text{g/ml}$. W przypadku MMP, stężenie powodujące śmierć 25% komórek THP-1 (287,23 $\mu\text{g/ml}$) było ponad pięciokrotnie wyższe w stosunku do najwrażliwszego typu komórek tj. NHEK – neonatal (40,91 $\mu\text{g/ml}$). Komórki MUTZ-3 oraz NHEK-adult charakteryzowały się zbliżoną wartością CV75 po narażeniu na MMP. Mniejszą zmienność obserwowano w przypadku EU. Wartości CV75 w przypadku obydwu typu keratynocytów są bardzo zbliżone, natomiast najwyższa wartość CV75 obserwowana w przypadku komórek THP-1 nie przekracza dwukrotnej wartości stężenia wyznaczonego dla keratynocytów.

W przypadku substancji nieuczulającej LA, wyznaczone wartości CV75 są zbliżone we wszystkich typach komórek osiągając wartość około 3000 $\mu\text{g/ml}$. Podobnie w przypadku 2PR, dla którego nie ma możliwości wyznaczenia stężenia CV75 ze względu na brak cytotoksyczności w zastosowanym przedziale stężeń (Tabela 6.2.).

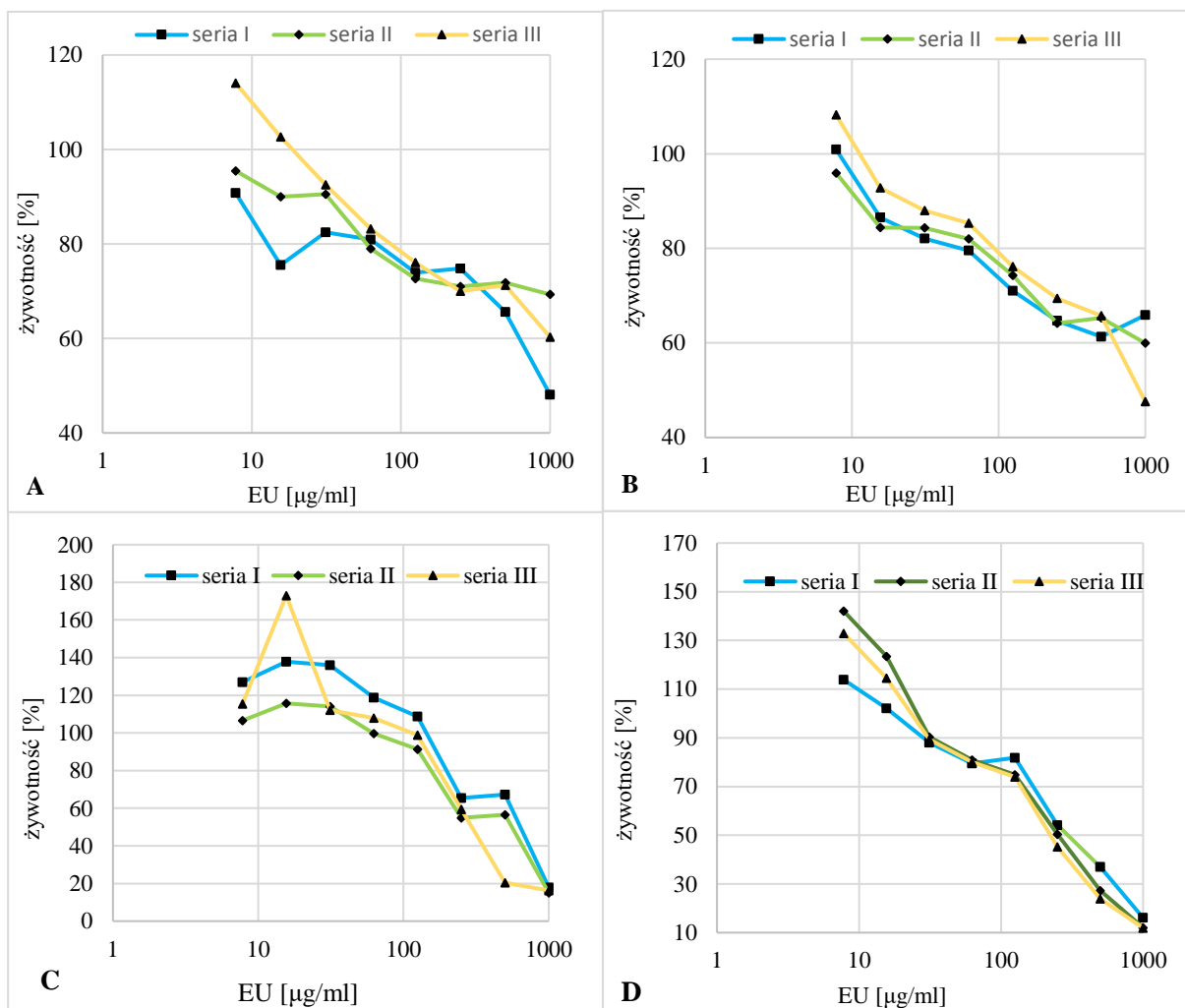
Wyznaczone wartości CV75 posłużyły do wyznaczenia stężeń ekspozycyjnych (TC) stosowanych w dalszym etapie badań, tj. analizie wpływu kokultury bezpośredniej keratynocytów z komórkami dendrytycznymi na uwalnianie cytokin zapalnych przez keratynocyty oraz analizy wpływu różnych rodzajów kokultury KC/DC na ekspresję antygenów powierzchniowych na komórkach dendrytycznych. Jako stężenie ekspozycyjne, które było bazą do wyznaczania kolejnych stężeń materiałów badanych wyznaczono wartość CV75 wrażliwszego typu komórek w danym układzie kokulturowym. Takie podejście miało na celu zapobieganie nadmiernej cytotoksyczności w stosunku do jednego rodzaju komórek, szczególnie w układach kokulturowych, w których obserwowano dużą różnicę w wartościach CV75 pomiędzy komórkami (Tabela 6.3.).



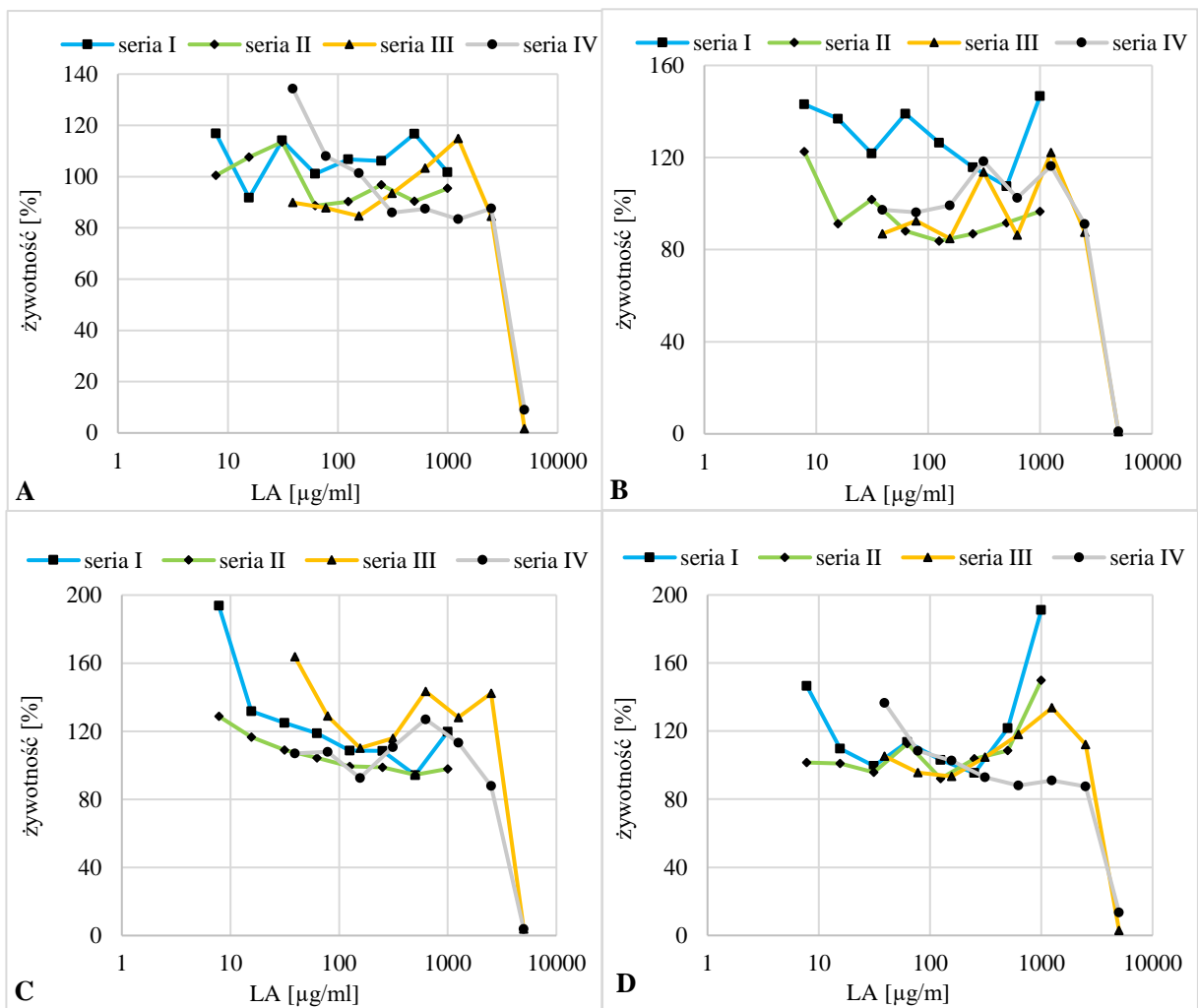
Rysunek 6.14. Żywotność keratynocytów NHEK-neonatal (A), NHEK-adult (B) oraz komórek dendrycznych THP-1 (C) i MUTZ-3 (D) po 24 h inkubacji z DNCB w stężeniach końcowych 0,03 – 250 µg/ml określona przy użyciu testu alamarBlue. Wykonano trzy serie pomiarowe, w każdej z nich wykonano trzy powtórzenia



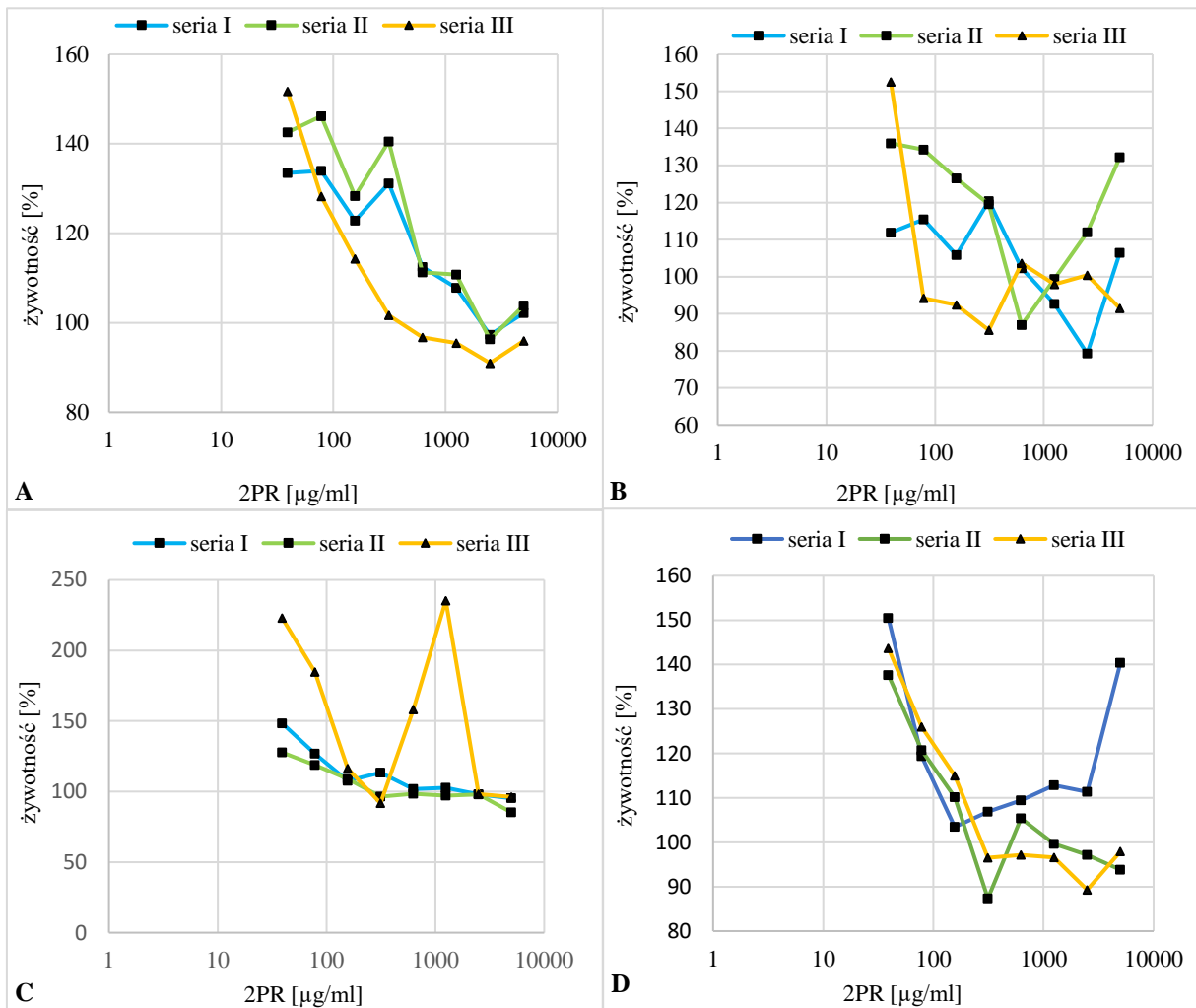
Rysunek 6.15. Żywotność keratynocytów NHEK-neonatal (A), NHEK-adult (B) oraz komórek dendrytycznych THP-1 (C) i MUTZ-3 (D) po 24 h inkubacji z MMP w stężeniach końcowych 3,90 – 1000 $\mu\text{g/ml}$ określona przy użyciu testu alamarBlue. Wykonano trzy serie pomiarowe, w każdej z nich wykonano trzy powtórzenia



Rysunek 6.16. Żywotność keratynocytów NHEK-neonatal (A), NHEK-adult (B) oraz komórek dendrytycznych THP-1 (C) i MUTZ-3 (D) po 24 h inkubacji z EU w stężeniach końcowych 3,90 – 1000 μg/ml określona przy użyciu testu alamarBlue. Wykonano trzy serie pomiarowe, w każdej z nich wykonano trzy powtórzenia



Rysunek 6.17. Żywotność keratynocytów NHEK-neonatal (A), NHEK-adult (B) oraz komórek dendrytycznych THP-1 (C) i MUTZ-3 (D) po 24 h inkubacji z LA w stężeniach końcowych 7,80 – 1000 μg/ml określona przy użyciu testu alamarBlue. Wykonano trzy serie pomiarowe, w każdej z nich wykonano trzy powtórzenia



Rysunek 6.18. Żywotność keratynocytów NHEK-neonatal (A), NHEK-adult (B) oraz komórek dendrytycznych THP-1 (C) i MUTZ-3 (D) po 24 h inkubacji z 2PR w stężeniach końcowych 7,80 – 5000 $\mu\text{g/ml}$ określona przy użyciu testu alamarBlue. Wykonano trzy serie pomiarowe, w każdej z nich wykonano trzy powtórzenia

Tabela 6.2. Wyznaczone wartości CV75 dla badanych materiałów

Materiał badany	Seria pomiarowa	CV75 [$\mu\text{g/ml}$]			
		Keratynocyty		Komórki dendrytyczne	
		NHEK - neonatal	NHEK - adult	THP -1	MUTZ - 3
DNCB	I	0,61	0,78	2,93	1,01
	II	0,80	0,45	2,86	0,72
	III	0,79	0,94	0,87	0,66
	CV 75 $\bar{x} \pm \text{SD}$	0,73 \pm 0,10	0,72 \pm 0,25	2,22 \pm 1,17	0,80 \pm 0,19
MMP	I	24,45	99,73	263,39	82,97
	II	46,01	106,60	300,41	117,02
	III	52,56	118,16	297,88	76,89
	CV 75 $\bar{x} \pm \text{SD}$	40,91 \pm 14,59	106,83 \pm 9,92	287,23 \pm 20,68	92,29 \pm 21,63
EU	I	114,45	90,54	214,52	148,42
	II	141,54	117,00	170,52	122,33
	III	96,73	140,88	190,13	110,77
	CV 75 $\bar{x} \pm \text{SD}$	116,91 \pm 22,74	116,14 \pm 25,18	192,52 \pm 22,05	127,17 \pm 19,29
LA	I	>1000	>1000	>1000	>1000
	II	>1000	>1000	>1000	>1000
	III	2706,36	2765,03	3503,39	3164,37
	IV	2792,62	2831,09	2781,88	2810,06
	CV 75 $\bar{x} \pm \text{SD}$	2749,49 \pm 61,00	2798,06 \pm 46,71	3142,63 \pm 510,19	2987,21 \pm 250,53
2PR	I	>1000	>1000	>1000	>1000
	II	>1000	>1000	>1000	>1000
	III	>5000	>5000	>5000	>5000
	CV 75 $\bar{x} \pm \text{SD}$	>5000	>5000	>5000	>5000

Tabela 6.3. Stężenia ekspozycyjne dla różnych układów kokultury

Rodzaj kokultury	Stężenie ekspozycyjne TC [$\mu\text{g/ml}$]				
	DNCB	MMP	EU	LA	2PR
NHEK – neonatal/THP -1	0,73	41	117	2750	5000
NHEK – neonatal/MUTZ -3	0,73	41	117	2750	5000
NHEK – adult/THP- 1	0,72	107	116	2800	5000
NHEK – adult/MUTZ - 3	0,72	92	116	2800	5000

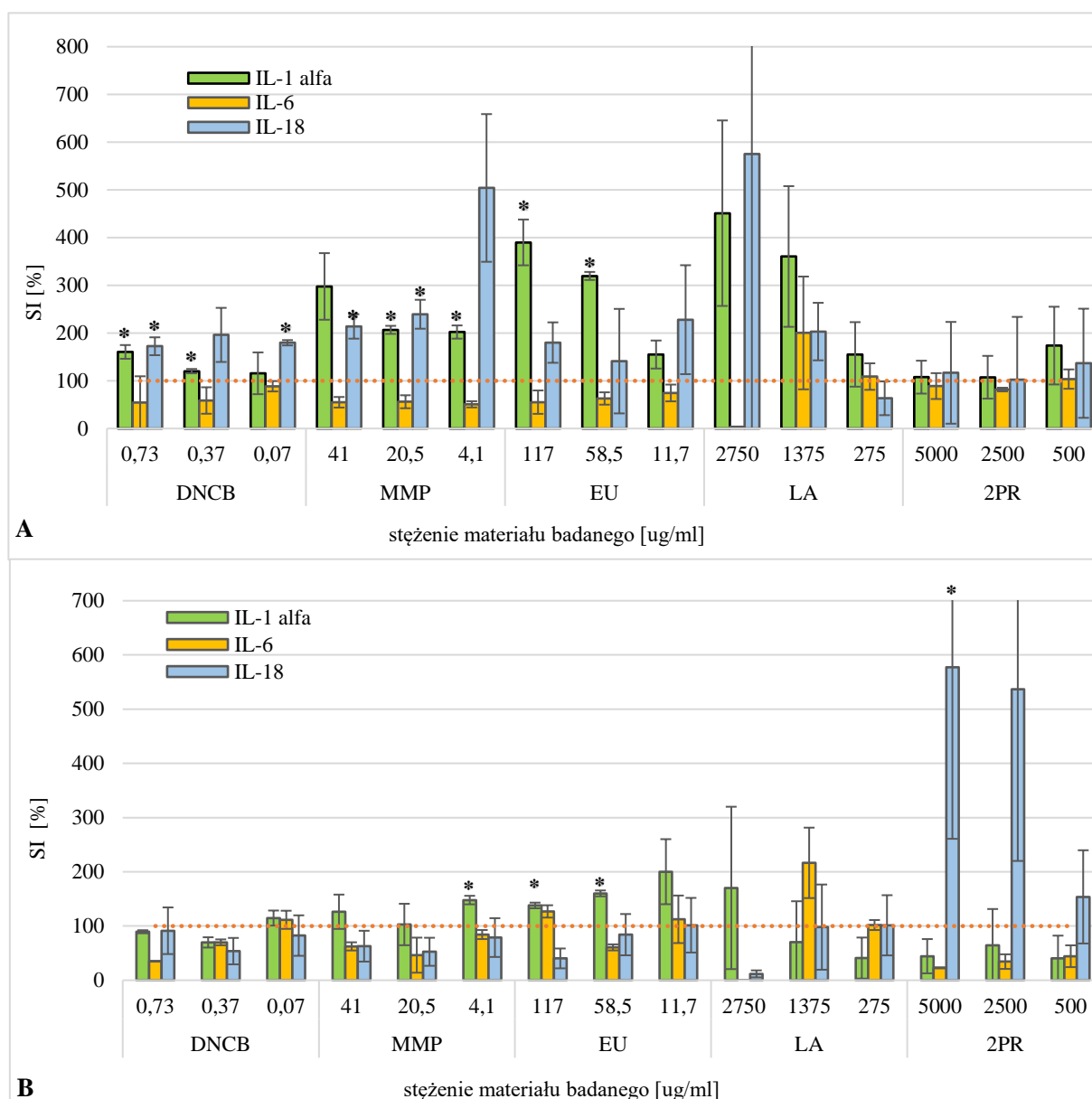
6.2.3. Analiza stężenia cytokin zapalnych keratynocytów w mediach pohodowlanych kokultur KC/DC

6.2.3.1. Kokultura bezpośrednia NHEK-neonatal z komórkami THP-1 oraz MUTZ-3

W układzie monokultury, kiedy zastosowano komórki NHEK-neonatal w stężeniu $2,5 \times 10^5$ komórek/ml, stwierdzono po 48 h ekspozycji na substancję uczulającą wzrost wartości SI w przypadku IL-1 alfa oraz IL-6 w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej (Rysunek 6.4., 6.6.). Z kolei największy wzrost IL-18 odnotowano przy niższym stężeniu komórek, $0,5 \times 10^5$ komórek/ml po 18 h ekspozycji na substancję uczulającą (Rysunek 6.8.). Na podstawie wyników przedstawionych na Rysunku 6.19. można stwierdzić, że wspólna hodowla komórek NHEK-neonatal z komórkami dendrytycznymi oraz rodzaj komórek dendrytycznych mają wpływ na profil uwalniania cytokin przez komórki NHEK-neonatal.

Dodatek komórek dendrytycznych THP-1 do hodowli spowodował zahamowanie produkcji IL-6 pod wpływem substancji uczulających po 48 h ekspozycji. Stwierdzono tylko wzrost wartości SI w przypadku substancji drażniącej tj. LA w stężeniu 1375 $\mu\text{g/ml}$. Natomiast, stwierdzano statystycznie istotny wzrost wartości SI dla IL-1 alfa w przypadku wszystkich substancji uczulających. Ciekawe jest uzyskanie najwyższych wartości SI dla substancji o słabym działaniu uczulającym (EU) i najniższych wartości SI dla substancji o silnym działaniu uczulającym (DNCB). Wysokie wartości SI dla IL-1 alfa (bez istotności statystycznej) uzyskano w przypadku substancji nieuczulającej tj. LA w dwóch najwyższych stężeniach: 2750, 1375 $\mu\text{g/ml}$. Analogiczna sytuacja występuje w przypadku IL-18. W związku z tym można zastanowić się nad zastosowaniem niższych stężeń np. $\leq 1000 \mu\text{g/ml}$ aby zapobiec nieprawidłowej klasyfikacji LA jako substancji uczulającej na podstawie uwalniania IL-1 alfa i IL-18 w tym systemie badawczym. Nie uzyskano statystycznie istotnego wzrostu wartości SI w przypadku substancji nieuczulającej 2PR dla żadnej z oznaczanych cytokin. W odróżnieniu do monokultury NHEK-neonatal, w układzie NHEK-neonatal/THP-1 stwierdzono statystycznie istotny wzrost SI dla IL-18 w przypadku substancji o silnym oraz umiarkowanym działaniu uczulającym. W przypadku monokultury NHEK-neonatal stosowanej w stężeniu $2,5 \times 10^5$ komórek/ml, nie stwierdzono wzrostu wartości SI dla IL-18 w żadnym punkcie czasowym (Rysunek 6.8.).

Profil uwalniania cytokin w kokulturze NHEK-neonatal z komórkami MUTZ-3 różni się od kokultury keratynocytów z komórkami THP-1. Nie stwierdzono wartości SI przekraczających wartość kontroli rozpuszczalnikowej dla IL-6 oraz IL-18 po ekspozycji komórek na wszystkie substancje uczulające. Znaczący wzrost wartości SI dla IL-18 obserwowano z kolei w przypadku substancji nieuczulającej 2PR. Statystycznie istotny wzrost SI, ale przy zdecydowanie niższych wartościach niż w kokulturze z komórkami THP-1, obserwowano w przypadku umiarkowanej (MMP) i słabej (EU) substancji uczulającej (Rysunek 6.19.).



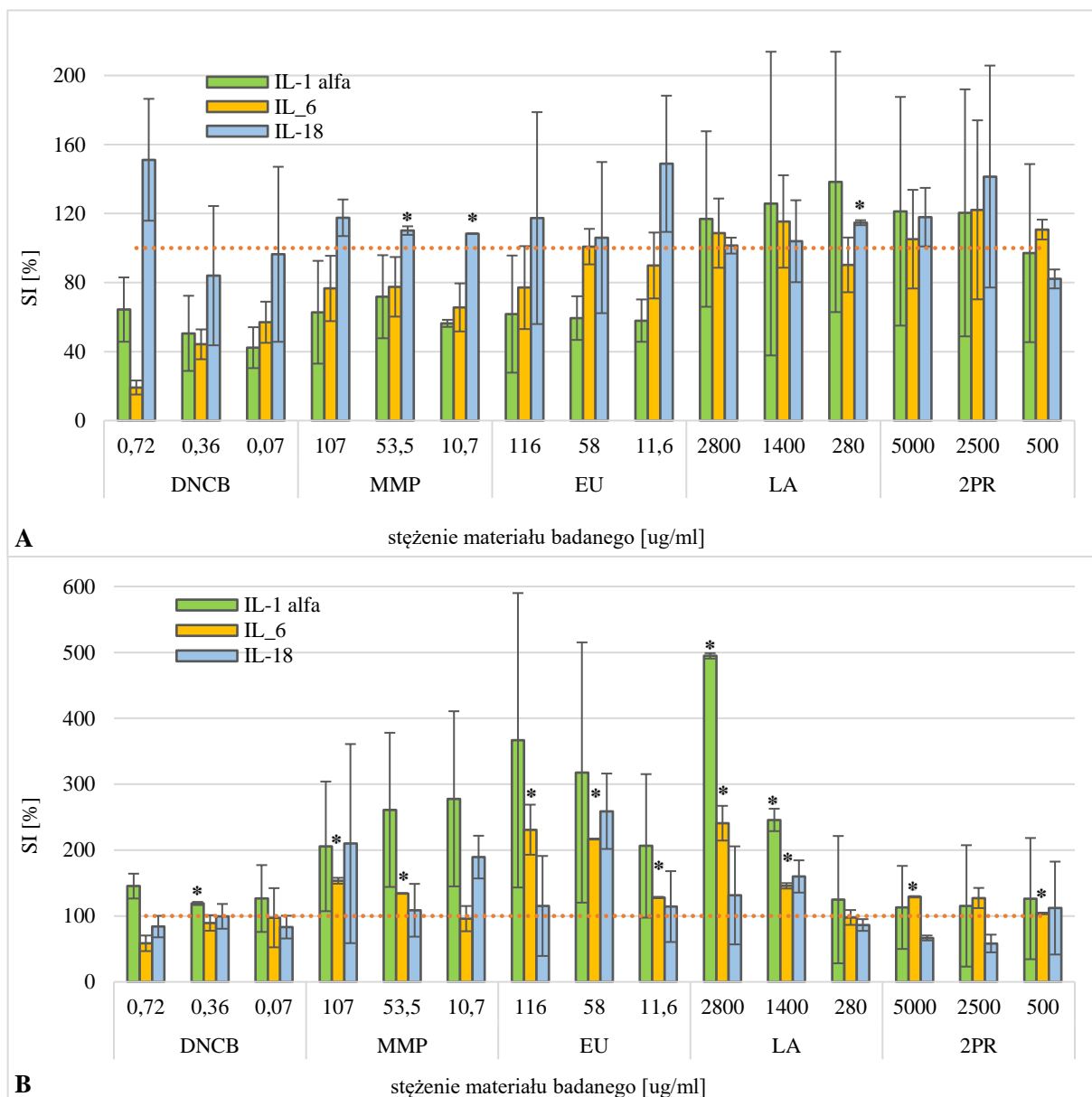
Rysunek 6.19. Charakterystyka uwalniania cytokin zapalnych w układzie kokultury bezpośredniej NHEK-neonatal/THP-1 (A) oraz NHEK-neonatal/MUTZ-3 (B). Komórki narażano przez 48 h na wybrane substancje uczulające oraz substancje nieuczulające. Stosowano komórki NHEK-neonatal w stężeniu $2,5 \times 10^5$ komórek/ml oraz THP-1/MUTZ-3 w stężeniu 2×10^6 /ml. Cytokiny oznaczano w mediach pochodowlanych metodą ELISA-xMAP. Przeprowadzono dwa niezależne eksperymenty, w każdym z nich pulowano medium pochodowlane z trzech powtórzeń dla każdego stężenia materiału badanego. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego. Linia przerywana wskazuje wartość odniesienia tj. kontroli rozpuszczalnikowej. Uzyskane wartości SI porównywano do kontroli rozpuszczalnikowej przy użyciu testu t-Studenta przy $p \leq 0,05^*$

6.2.3.2. Kokultura bezpośrednia NHEK-adult z komórkami THP-1 i MUTZ-3

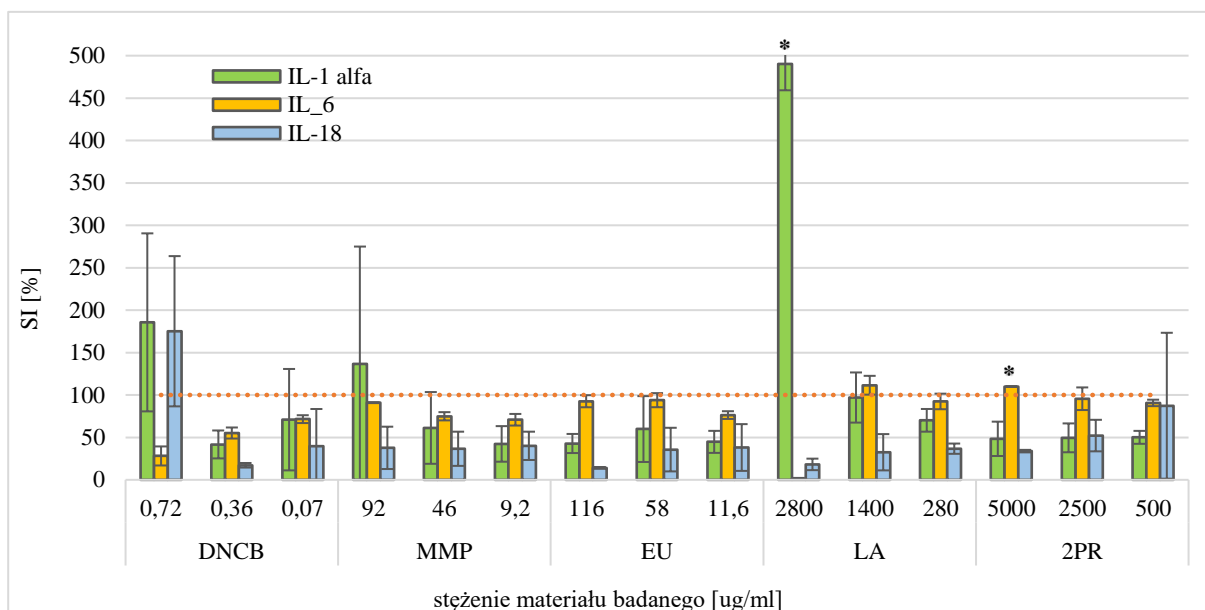
Po ekspozycji komórek NHEK-adult na substancje uczulającą DNCB obserwowano różnicowane w czasie i zależne od stężenia komórek zewnątrzkomórkowe uwalnianie cytokin. Zastosowanie komórek NHEK-adult w stężeniu $2,5 \times 10^5$ komórek/ml we wspólnej hodowli z komórkami dendrytycznymi THP-1 spowodowało zmianę profilu uwalniania cytokin po 5 h ekspozycji na substancje uczulające i nieuczulające. W przypadku IL-1 alfa, która była dominującą cytokiną stwierdzaną w monokulturze NHEK-adult, nie stwierdzono wartości SI powyżej wartości uzyskanych w kontroli rozpuszczalnikowej dla żadnego materiału uczulającego. Analogiczna sytuacja miała miejsce w przypadku IL-6. Stwierdzono tylko niewielki wzrost wartości SI dla IL-18 po narażeniu na substancje uczulające. 5 h ekspozycja na substancje nieuczulające wywołała niewielki wzrost wartości SI dla wszystkich cytokin (Rysunek 6.20. A).

Zastosowanie w kokulturze z komórkami THP-1, komórek NHEK-adult w niższym stężeniu 1×10^5 komórek/ml oraz wydłużenie czasu ekspozycji do 48 h przyczyniło się do wzrostu wydzielania cytokin (Rysunek 6.20. B). Stwierdzono wzrost wartości SI dla IL-1 alfa dla wszystkich substancji uczulających, statystycznie istotny w przypadku DNCB. W przypadku IL-6 stwierdzono statystycznie istotnie wzrost SI po ekspozycji na substancję umiarkowanie (MMP) i słabo uczulającą (EU). Nie stwierdzono statystycznie istotnego wzrostu dla IL-18 po narażeniu na substancje uczulające, pomimo uzyskania wartości SI przekraczających wartość kontroli rozpuszczalnikowej. Podobnie jak w kokulturze NHEK-neonatal/THP-1 stwierdzono statystycznie istotny wzrost wartości SI dla IL-1 alfa dla substancji nieuczulającej (w stosunku do kontroli) tj. LA w dwóch najwyższych stężeniach: 2800, 1400 $\mu\text{g/ml}$. Analogiczna sytuacja występuje w przypadku IL-6. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość zastosowania niższych stężeń w kolejnych badaniach np. $\leq 1000 \mu\text{g/ml}$, aby zapobiec nieprawidłowej klasyfikacji LA jako substancji uczulającej na podstawie uwalniania IL-1 alfa i IL-6 w tym systemie badawczym.

Zastosowanie kokultury bezpośredniej NHEK-adult z komórkami MUTZ nie daje możliwości odróżnienia substancji uczulających od substancji nieuczulających. Nie stwierdzono statystycznie istotnego wzrostu wartości SI żadnej z cytokin po ekspozycji na substancje uczulające, natomiast obserwowano znaczny wzrost wartości SI w przypadku ekspozycji na substancję nieuczulającą LA (Rysunek 6.21.).



Rysunek 6.20. Charakterystyka uwalniania cytokin zapalnych w układzie kokultury bezpośredniej NHEK-adult/THP-1. Komórki narażano przez 5 h (A) oraz 48 h (B) na wybrane substancje uczulające oraz substancje nieuczulające. Komórki NHEK-adult stosowano w stężeniu $2,5 \times 10^5$ komórek/ml (A) lub 1×10^5 komórek/ml, komórki THP-1 stosowano w stężeniu 2×10^6 komórek/ml. Cytokiny oznaczano w mediach pochodowlanych metodą ELISA-xMAP. Przeprowadzono dwa niezależne eksperymenty, w każdym z nich pulowano medium pochodowlane z trzech powtórzeń dla każdego stężenia materiału badanego. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego. Linia przerywana wskazuje wartość odniesienia tj. kontroli rozpuszczalnikowej. Uzyskane wartości SI porównywano do kontroli rozpuszczalnikowej przy użyciu testu t-Studenta przy $p \leq 0,05^*$



Rysunek 6.21. Charakterystyka uwalniania cytokin zapalnych w układzie kokultury bezpośredniej NHEK-adult/MUTZ-3. Komórki NHEK-adult stosowano w stężeniu 1×10^5 komórek/ml, komórki MUTZ-3 stosowano w stężeniu 2×10^6 komórek/ml. Komórki narażano przez 48 h na wybrane substancje uczulające oraz substancje nieuczulające. Cytokiny oznaczano w mediach pochodowlanych metodą ELISA-xMAP. Przeprowadzono dwa niezależne eksperymenty, w każdym z nich pulowano medium pochodowlane z trzech powtórzeń dla każdego stężenia materiału badanego. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego. Linia przerywana wskazuje wartość odniesienia tj. kontroli rozpuszczalnikowej. Uzyskane wartości SI porównywano do kontroli rozpuszczalnikowej przy użyciu testu t-Studenta przy $p \leq 0,05^*$

6.2.4. Etap II - podsumowanie

Na podstawie oceny uwalniania IL-1 alfa można stwierdzić, że zastosowanie systemu badawczego NHEK-neonatal/THP-1 umożliwia identyfikację zarówno skrajnych (DNCB), umiarkowanych (MMP) jak i słabych substancji uczulających (EU) oraz prawidłową identyfikację substancji jako nieuczulające (LA, 2PR). Kokultura keratynocytów noworodkowych z komórkami MUTZ-3 umożliwiła identyfikację umiarkowanej i słabej substancji uczulającej. Natomiast w przypadku kokultury komórek NHEK-adult z komórkami THP-1 oraz MUTZ-3 stwierdzono nieprawidłową klasyfikację substancji nieuczulającej LA jako uczulającą, uzyskując statystycznie istotny wzrost wartości SI w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej.

Statystycznie istotny wzrost wartości SI dla IL-6 obserwowany w przypadku kokultury NHEK-adult/THP-1 występuje zarówno w przypadku substancji uczulających jak i nieuczulających, dlatego IL-6 w tym systemie badawczym nie jest odpowiednim markerem do oceny właściwości uczulających. Również w pozostałych systemach badawczych nie jest możliwa identyfikacja substancji uczulających na podstawie poziomu IL-6, ponieważ nie stwierdzono statystycznie istotnego wzrostu jej stężenia po narażeniu na badane materiały w porównaniu z kontrolą rozpuszczalnikową.

Na podstawie uwalniania IL-18 możliwa jest identyfikacja substancji uczulającej skrajnie oraz umiarkowanie w systemie kokultury NHEK-adult/THP-1, nie uzyskano podwyższonego poziomu IL-18 w przypadku substancji o słabym działaniu uczulającym tj. EU, natomiast substancje nieuczulające zostały prawidłowo zidentyfikowane. Statystycznie istotny wzrost stężenia IL-18 stwierdzono również po 5 h inkubacji z MMP w systemie kokultury NHEK-adult/THP-1, jednak w przypadku tego zestawu komórek uzyskano również nieprawidłowy wzrost IL-18 w przypadku substancji nieuczulającej.

Reasumując, na podstawie zestawienia łącznych wyników statystycznie istotnych uzyskanych w kokulturze bezpośredniej z różnymi typami KC/DC można stwierdzić, że najlepszym systemem badawczym do oceny substancji uczulających jest układ kokultury NHEK-neonatal/THP-1 z 48 h ekspozycją. Najmniej wydajna okazała się integracja keratynocytów NHEK-adult z komórkami MUTZ-3, gdzie uzyskano tylko wzrost cytokin zapalnych w przypadku substancji nieuczulających. Natomiast integracja keratynocytów NHEK-adult z komórkami THP-1 dała najbardziej zróżnicowane wyniki (Tabela 6.4.). Do etapu III badań zostały wybrane komórki NHEK-neonatal oraz THP-1. Ustalono, że w finalnej metodzie kokulturowej będzie oznaczana IL-1 alfa oraz IL-18.

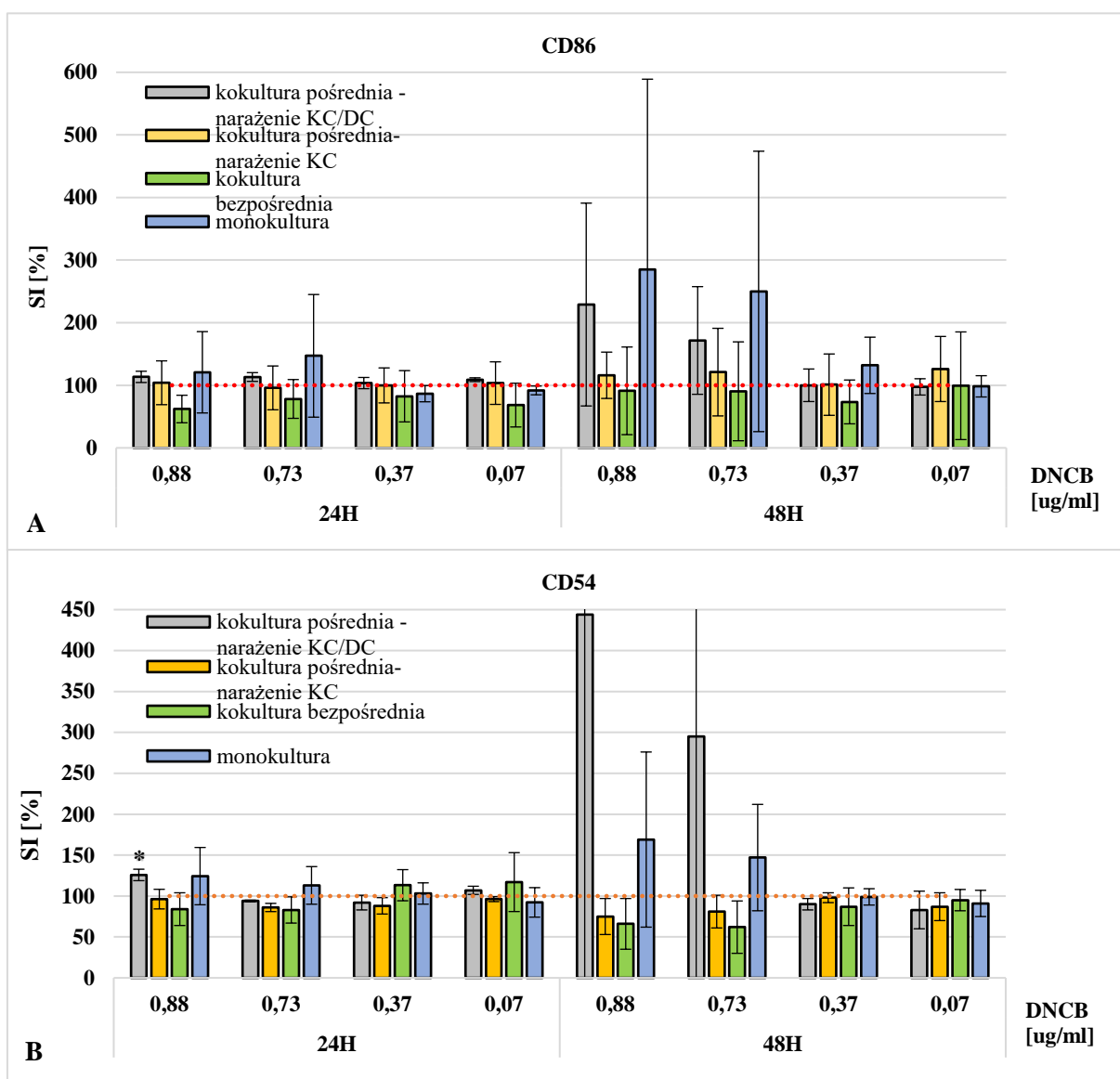
Tabela 6.4. Zestawienie statystycznie istotnych wyników wartości SI ($p \leq 0,05$) uzyskanych w kokulturze bezpośredniej różnych typów KC/DC. Wartości SI statystycznie istotne (+), wartości SI bez istotności statystycznej (-)

Rodzaj IL	Czas ekspozycji/ Rodzaj systemu badawczego	Substancja badana / stężenie [xTC]														
		DNCB			MMP			EU			LA			2PR		
		1 x TC	0,5 x TC	0,1 x TC	1 x TC	0,5 x TC	0,1 x TC	1 x TC	0,5 x TC	0,1 x TC	1 x TC	0,5 x TC	0,1 x TC	1 x TC	0,5 x TC	0,1 x TC
IL - 1alfa	48 h /NHEK- neonatal/THP-1	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	48 h/NHEK- neonatal/MUTZ-3	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	5 h/NHEK-adult /THP-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h/NHEK-adult /THP - 1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	48 h/NHEK-adult /MUTZ-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
IL - 6	48 h/NHEK- neonatal /THP-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h /NHEK- neonatal /MUTZ-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5 h/NHEK-adult /THP-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h/NHEK-adult /THP -1	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+
	48 h/NHEK-adult /MUTZ -3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IL - 18	48 h/NHEK- neonatal /THP-1	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h/NHEK- neonatal /MUTZ-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	5 h/NHEK-adult /THP-1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	48 h/NHEK- adult /THP-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h/NHEK-adult /MUTZ -3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

6.3. Etap III - ocena ekspresji antygenów powierzchniowych komórek dendrytycznych hodowanych w różnych rodzajach kokultury z keratynocytami

6.3.1. DNCB

W przypadku najsilniejszej substancji uczulającej, stwierdzono statystycznie istotny wzrost ekspresji antygeny CD54 tylko po 24 h (kokultura pośrednia – narażenie KC/DC). W przypadku antygeny CD86 nie stwierdzono istotności statystycznej w żadnym protokole eksperymentalnym, co w głównej mierze spowodowane było znacznym rozrzutem wyników w obrębie testowanego wariantu eksperymentu. Jednak pomimo braku istotności statystycznej, można zwrócić uwagę na wzrost ekspresji antygeny CD54 oraz CD86 po 48 h ekspozycji w przypadku kokultury pośredniej KC/DC oraz monokultury (Rysunek 6.22.).



Rysunek 6.22. Efekt działania DNCB na ekspresję antygenów powierzchniowych CD86 (A) i CD54 (B) komórek THP-1 hodowanych w obecności keratynocytów NHEK-neonatal w różnych układach kokultury lub bez obecności keratynocytów NHEK-neonatal przez 24 h oraz 48 h. Eksperymenty przeprowadzono w trzech niezależnych seriach pomiarowych, wyniki analizy cytometrycznej przedstawiono w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego. Linia przerywana wskazuje wartość odniesienia tj. kontrolę rozpuszczalnikową. Uzyskane wartości SI porównywano do kontroli rozpuszczalnikowej tj. DMSO przy użyciu testu t-Studenta przy $p \leq 0,05^*$. Stosowano stężenia końcowe DNCB równe 0,1x, 0,5x, 1x, 1,2x TC

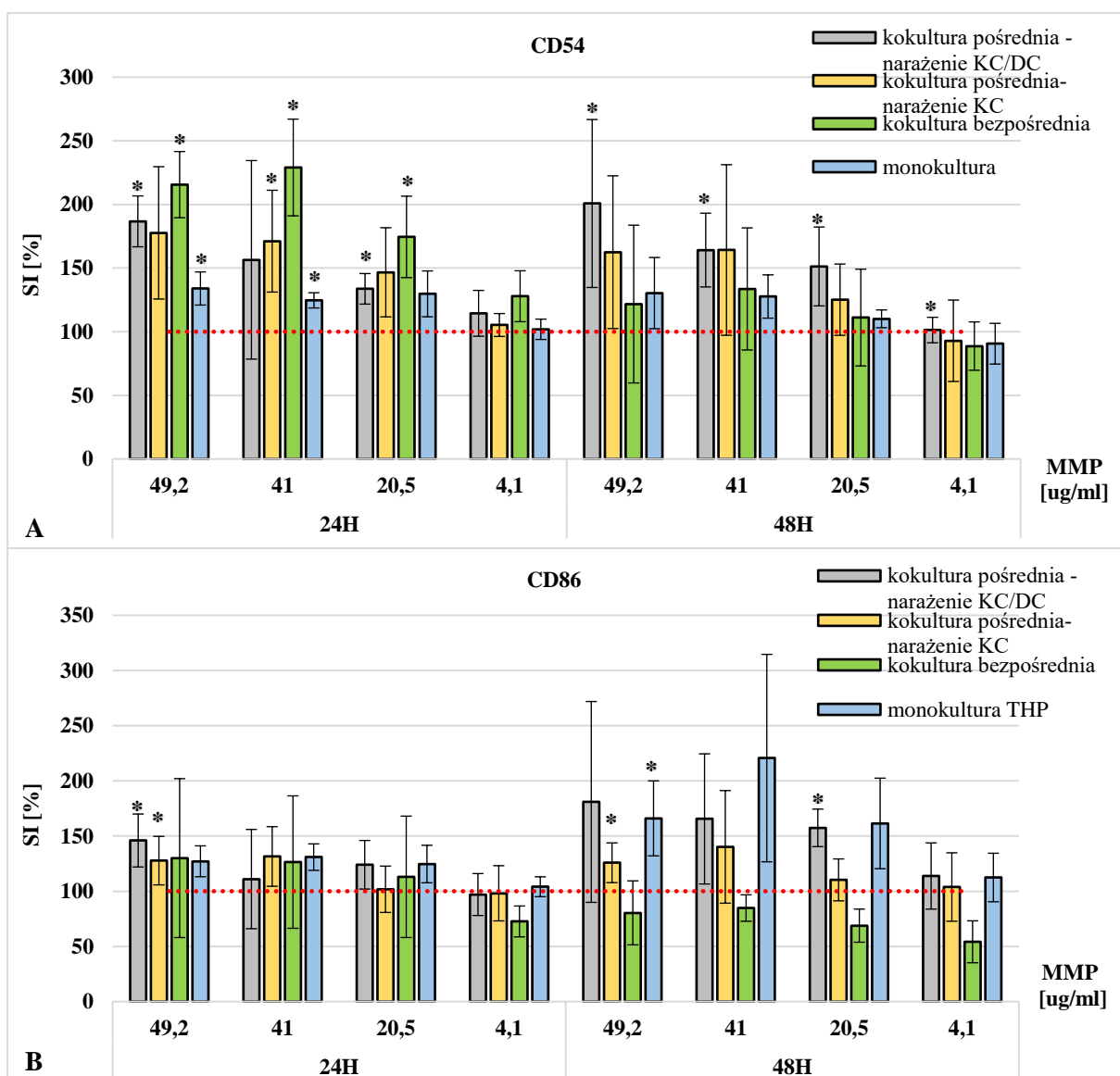
6.3.2. MMP

W przypadku MMP, substancji uczulającej o umiarkowanej sile działania stwierdzono statystycznie istotny wzrost ekspresji antygeny CD54 zarówno po 24 h jak i 48 h ekspozycji. Najsilniej wyrażony wzrost wartości SI obserwowano w układzie kokultury bezpośredniej po 24 h ekspozycji, w trzech najwyższych stężeniach MMP uzyskano wyniki statystycznie istotne. Najniższą ekspresję antygeny CD54 po 24 h ekspozycji odnotowano w układzie monokultury THP-1. W przypadku kokultur pośrednich otrzymano zróżnicowane wyniki po 24 h ekspozycji.

Po 48 h ekspozycji wyższe wartości SI uzyskano w przypadku dwóch systemów kokultury pośredniej. Statystycznie istotny wzrost SI obserwowano w przypadku kokultury pośredniej z jednoczesną ekspozycją keratynocytów i komórek dendrytycznych, jednak wartości te były niższe niż w przypadku kokultury bezpośredniej po 24 h ekspozycji. W przypadku kokultury bezpośredniej i monokultury uzyskano niższe wartości SI bez istotności statystycznej po 48 h ekspozycji (Rysunek 6.23. A).

Indukcja antygeny CD86 była słabsza niż antygeny CD54, wystąpiła głównie po 48 h inkubacji komórek z materiałem badanym. Po 24 godzinnej ekspozycji na MMP uzyskano porównywalne wyniki dla wszystkich systemów badawczych. Uzyskane wartości SI nieznacznie przekroczyły wartość uzyskaną dla kontroli rozpuszczalnikowej. Statystycznie istotny wzrost uzyskano tylko w najwyższym stężeniu MMP w obydwu układach kokultury pośredniej (Rysunek 6.23. B).

Po 48 h ekspozycji, wartości SI w przypadku kokultury bezpośredniej nie przekroczyły wartości wskaźnika kontroli rozpuszczalnikowej we wszystkich stężeniach. Niewielkie wzrosty SI, istotne statystycznie w najwyższym stężeniu uzyskano dla kokultury pośredniej w której narażano tylko komórki NHEK-neonatal. Najwyższy wzrost wartości SI obserwowano w systemie kokultury pośredniej z jednoczesną ekspozycją keratynocytów i komórek dendrytycznych oraz w monokulturze THP-1.



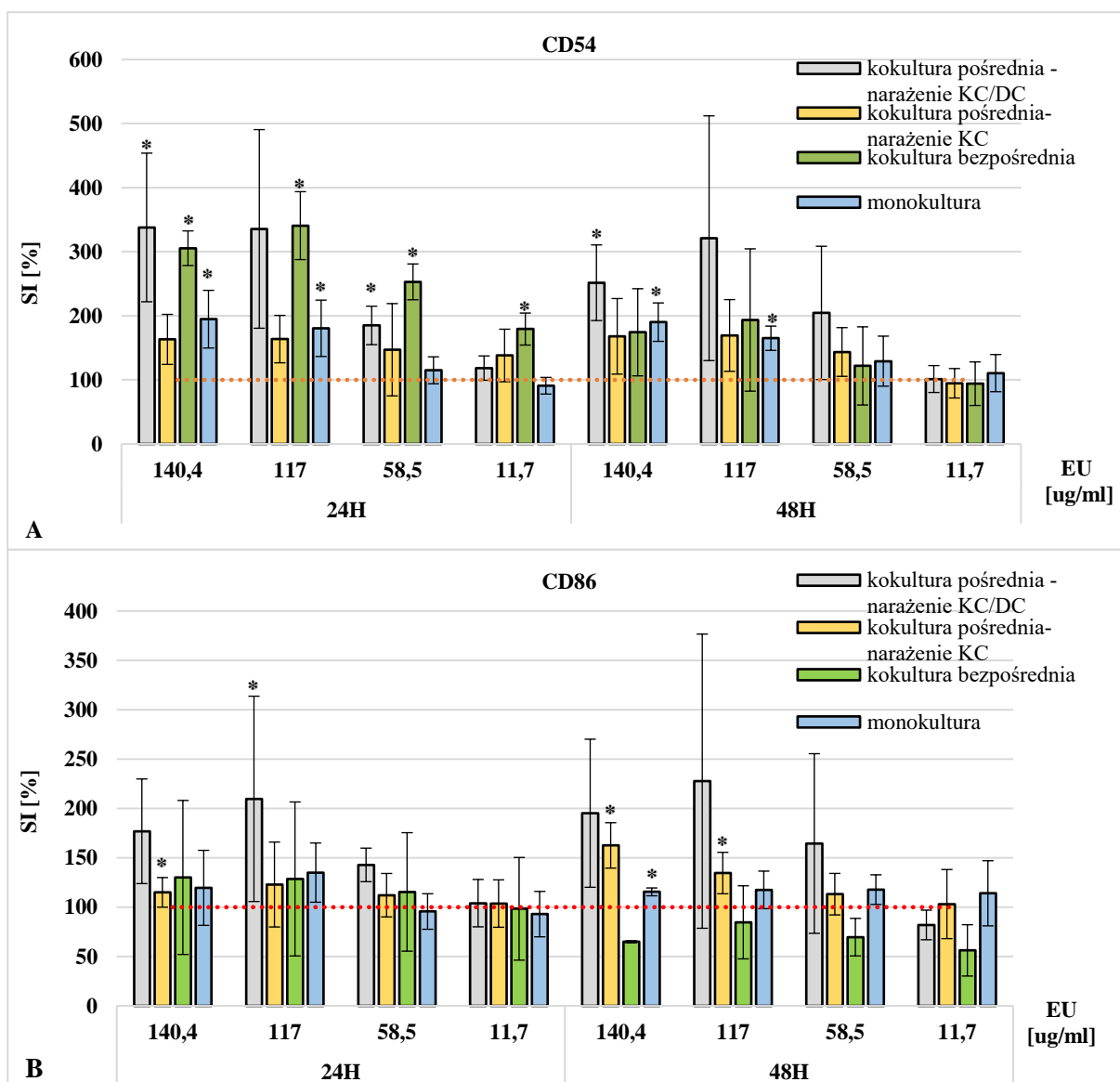
Rysunek 6.23. Efekt działania MMP na ekspresję antygenów powierzchniowych CD54 (A) i CD86 (B) komórek THP-1 hodowanych w obecności keratynocytów NHEK-neonatal w różnych układach kokultury lub bez obecności keratynocytów NHEK-neonatal przez 24 h oraz 48 h. Eksperymenty przeprowadzono w trzech niezależnych seriach pomiarowych, wyniki analizy cytometrycznej przedstawiono w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego. Linia przerywana wskazuje wartość odniesienia tj. kontrolę rozpuszczalnikową. Uzyskane wartości SI porównywano do kontroli rozpuszczalnikowej tj. DMSO przy użyciu testu t-Studenta przy $p \leq 0,05^*$. Stosowano stężenia końcowe MMP równe 0,1x, 0,5x, 1x, 1,2x TC

6.3.3. EU

W przypadku EU, substancji o słabej sile działania uczulającego stwierdzono statystycznie istotny wzrost ekspresji antygenu CD54 zarówno po 24h jak i 48h ekspozycji.

Najsilniej wyrażony wzrost wartości SI obserwowano w układzie kokultury bezpośredniej po 24 h ekspozycji, we wszystkich stężeniach MMP uzyskano wyniki statystycznie istotne. Najniższą ekspresję antygenu CD54 po 24 h ekspozycji odnotowano w układzie kokultury pośredniej, w której poddawano ekspozycji na materiał uczulający tylko keratynocyty. Z kolei w kokulturze pośredniej w której narażano obydwa typy komórek (KC i DC) uzyskano zdecydowanie wyższe wartości SI, w tym statystycznie istotne. W przypadku monokultury, również uzyskano wyniki istotnie statystycznie w dwóch najwyższych stężeniach EU, jednak uzyskane wartości SI były o około 50% niższe od uzyskanych w kokulturze bezpośredniej i pośredniej z jednoczesną ekspozycją KC/DC (Rysunek 6.24. A).

Indukcja ekspresji antygenu CD86 była mniej nasiloną niż antygenu CD54. Po 24 godzinach ekspozycji uzyskano niewielki wzrost wartości SI w trzech systemach badawczych: kokulturze pośredniej z narażeniem KC, kokulturze bezpośredniej oraz monokulturze. Najwyższe wartości uzyskano w układzie kokultury pośredniej z jednoczesną ekspozycją komórek NHEK-adult i THP-1. Po 48 h ekspozycji najwyższe wartości SI uzyskano również w przypadku kokultury pośredniej z ekspozycją KC/DC jednak bez istotności statystycznej. Wyniki statystycznie istotne uzyskano natomiast w przypadku kokultury pośredniej z ekspozycją tylko jednego typu komórek tj. keratynocytów NHEK-neonatal (Rysunek 6.24. B).



Rysunek 6.24. Efekt działania EU na ekspresję antygenów powierzchniowych CD86 (A) i CD54 (B) komórek THP-1 hodowanych w obecności keratynocytów NHEK-neonatal w różnych układach kokultury lub bez obecności keratynocytów NHEK-neonatal przez 24 h oraz 48 h. Eksperymenty przeprowadzono w trzech niezależnych seriach pomiarowych, wyniki analizy cytometrycznej przedstawiono w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego. Linia przerywana wskazuje wartość odniesienia tj. kontrolę rozpuszczalnikową. Uzyskane wartości SI porównywano do kontroli rozpuszczalnikowej tj. DMSO przy użyciu testu t-Studenta przy $p \leq 0,05^*$. Stosowano stężenia końcowe EU równe 0,1x, 0,5x, 1x, 1,2x TC

6.3.4. LA

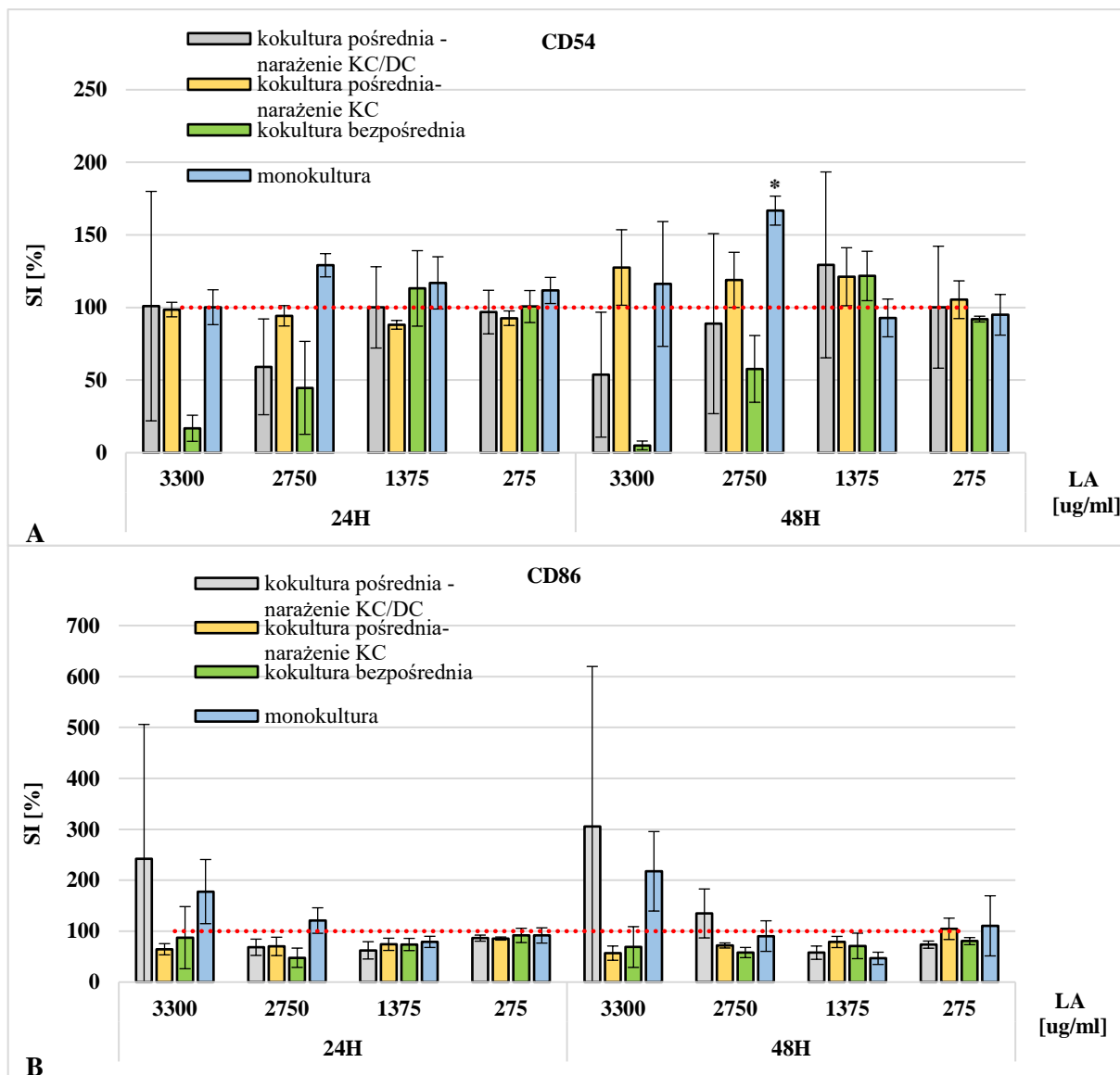
Po 24 godzinach ekspozycji na substancję nieuczulającą LA, nie stwierdzono statystycznie istotnego wzrostu ekspresji antygenu powierzchniowego CD54 na komórkach THP-1 w żadnym systemie badawczym. Stwierdzono niewielkie wzrosty wartości SI ponad wartość kontroli rozpuszczalnikowej w przypadku monokultury, były to jednak wyniki nieistotnie statystycznie. Jednak po dłuższej, 48 h ekspozycji stwierdzono już statystycznie istotny wzrost ekspresji antygenu CD54 w układzie monokultury (Rysunek 6.25. A).

Nie stwierdzono statystycznie istotnego wzrostu ekspresji antygenu CD86 w żadnym systemie badawczym, po 24 h ekspozycji jak i po 48 h ekspozycji. Jedyne przypadki wzrostu ekspresji CD86 powyżej wartości obserwowanej w kontroli rozpuszczalnikowej stwierdzono w przypadku kokultury pośredniej z jednoczesnym narażeniem KC/DC oraz w monokulturze THP – 1 (Rysunek 6.25. B).

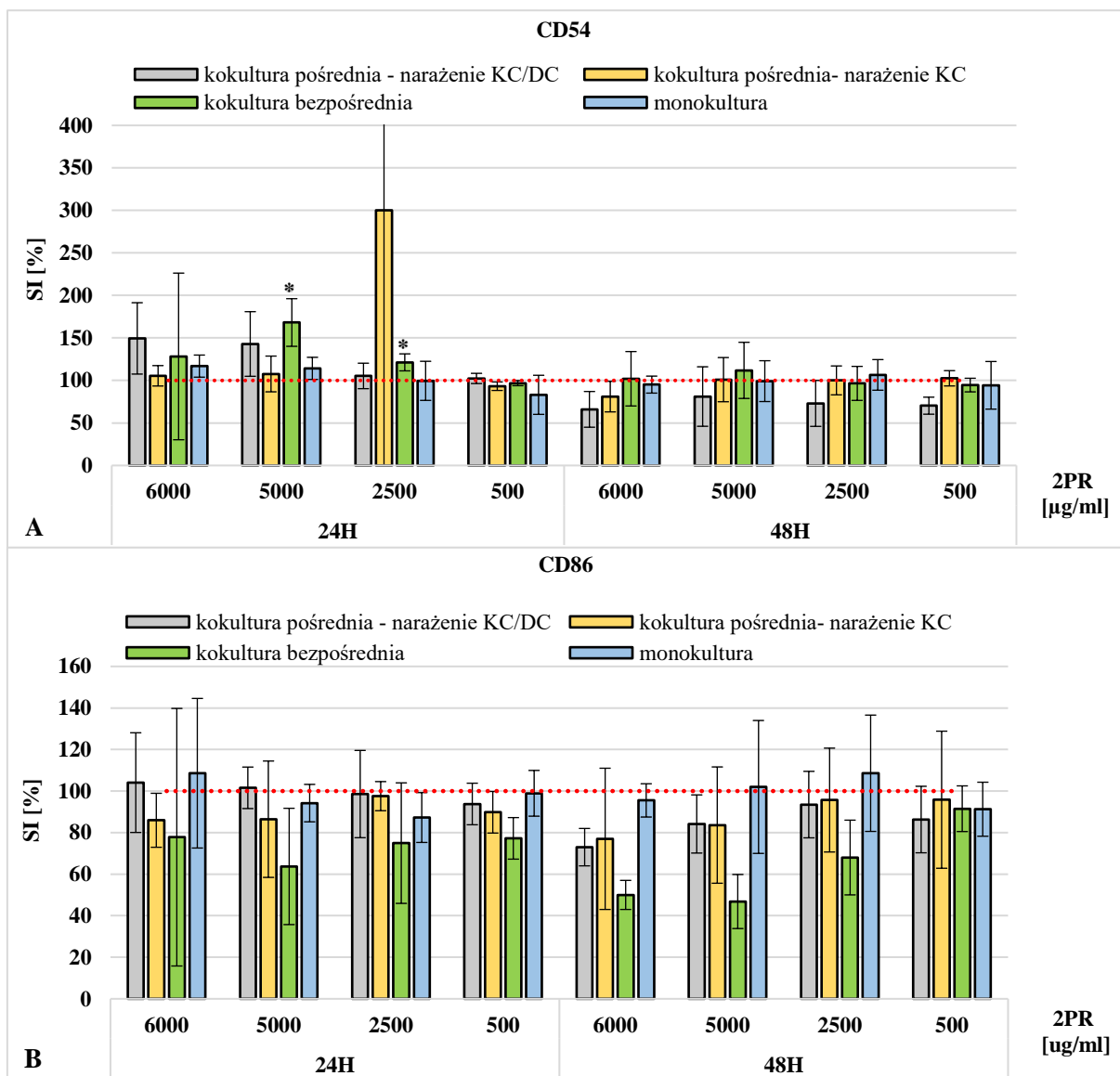
6.3.5. 2PR

Po 24 h ekspozycji komórek na substancję nieuczulającą 2PR stwierdzono dwa przypadki statystycznie istotnego wzrostu ekspresji antygenu CD54 w układzie kokultury bezpośredniej. Po 48 h ekspozycji w żadnym z systemów badawczych nie stwierdzono indukcji antygenu CD54 Rysunek (6.26. A).

Nie stwierdzono zwiększonej ekspresji antygenu CD86 w żadnym ze stosowanych systemów badawczych zarówno po 24 h ekspozycji, jak i po 48 h ekspozycji na 2PR (Rysunek 6.26. B).



Rysunek 6.25. Efekt działania LA na ekspresję antygenów powierzchniowych CD54 (A) i CD86 (B) komórek THP-1 hodowanych w obecności keratynocytów NHEK-neonatal w różnych układach kokultury lub bez obecności keratynocytów NHEK-neonatal przez 24 h oraz 48 h. Eksperymenty przeprowadzono w trzech niezależnych seriach pomiarowych, wyniki analizy cytometrycznej przedstawiono w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego. Linia przerywana wskazuje wartość odniesienia tj. kontrolę rozpuszczalnikową. Uzyskane wartości SI porównywano do kontroli rozpuszczalnikowej tj. medium hodowlanego przy użyciu testu t-Studenta przy $p \leq 0,05^*$. Stosowano stężenia końcowe LA równe 0,1x, 0,5x, 1x, 1,2x TC



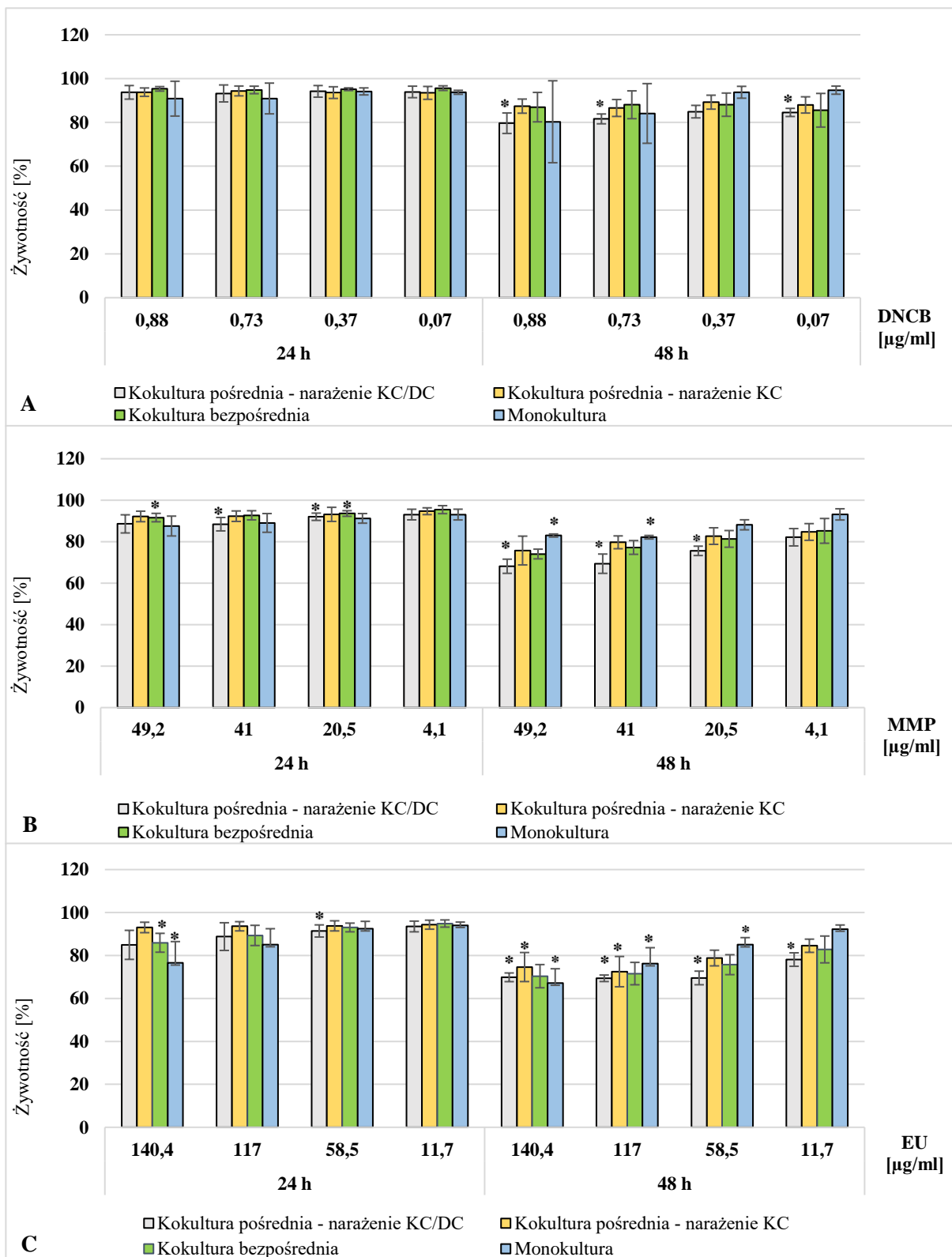
Rysunek 6.26. Efekt działania 2PR na ekspresję antygenów powierzchniowych CD54 (A) i CD86 (B) komórek THP-1 hodowanych w obecności keratynocytów NHEK-neonatal lub bez obecności keratynocytów NHEK-neonatal przez 24 h oraz 48 h. Eksperymenty przeprowadzono w trzech niezależnych seriach pomiarowych, wyniki analizy cytometrycznej przedstawiono w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego. Linia przerywana wskazuje wartość odniesienia tj. kontrolę rozpuszczalnikową. Uzyskane wartości SI porównywano do kontroli rozpuszczalnikowej tj. medium hodowlanego przy użyciu testu t-Studenta przy $p \leq 0,05^*$. Stosowano stężenia końcowe 2PR równe 0, 1x, 0,5x, 1x, 1,2x TC

6.3.6. Ocena wpływu różnych metod hodowli na żywotność komórek THP-1

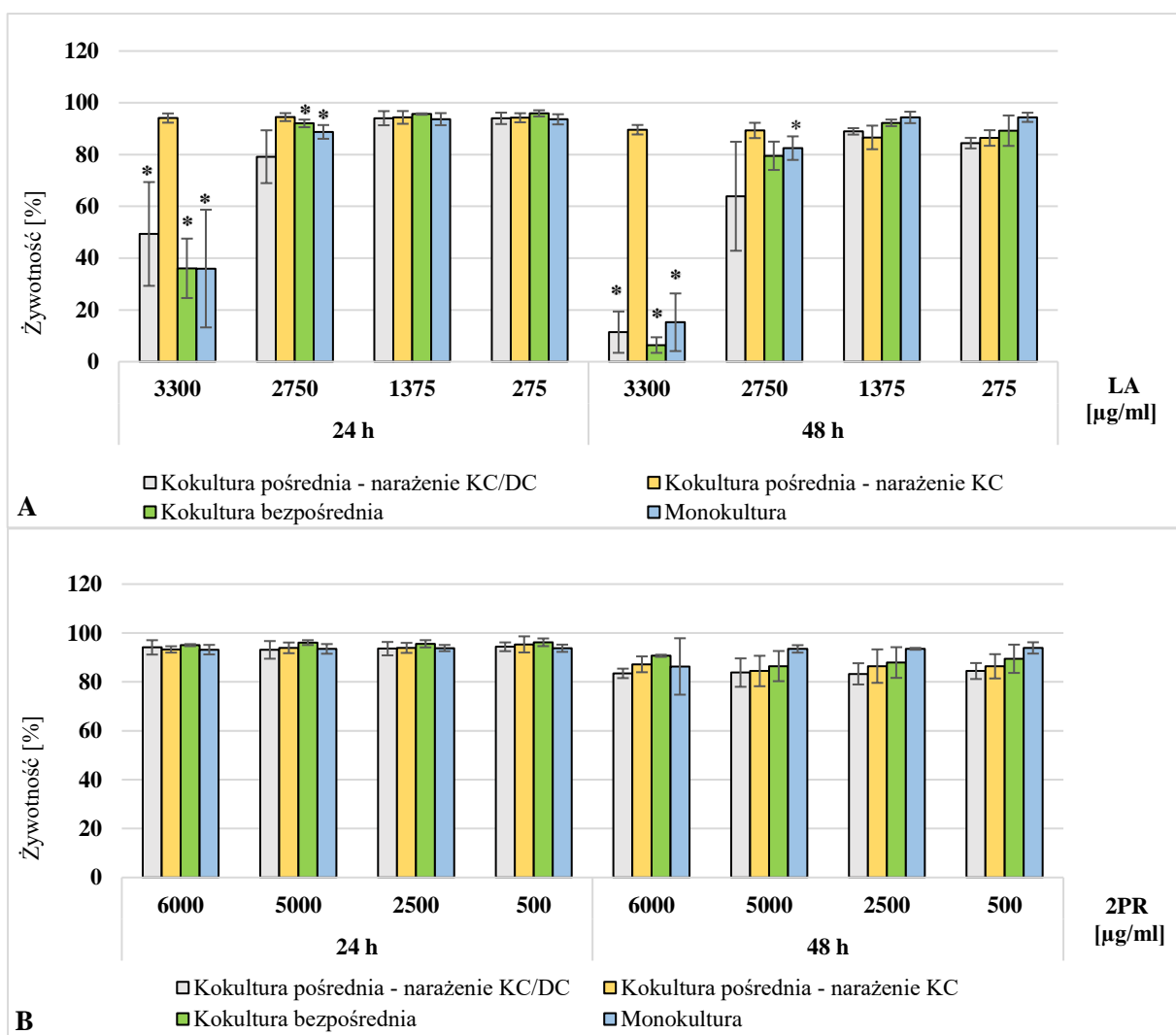
Żywotność komórek THP-1 oceniano podczas analizy cytometrycznej antygenów powierzchniowych CD54/CD86 we wszystkich systemach badawczych. Biorąc pod uwagę, że stosowano stężenia ekspozycyjne właściwe dla wrażliwszego typu komórek, czyli keratynocytów, nie spodziewano się negatywnego wpływu stosowanych materiałów badanych na żywotność komórek THP-1, ze względu na dużą różnicę w wartości CV75 pomiędzy komórkami THP-1 oraz keratynocytami, z wyjątkiem LA (Tabela 6.2.).

Po 24 h ekspozycji na DNCB oraz 2PR nie stwierdzono statystycznie istotnego spadku żywotności komórek THP-1 w porównaniu z kontrolą rozpuszczalnikową. Niewielkie spadki żywotności stwierdzono w przypadku ekspozycji na EU oraz MMP. Największą cytotoksyczność stwierdzono w przypadku ekspozycji komórek na najwyższe stężenie LA. Zastosowanie stężenia 1,2 x TC spowodowało znaczący spadek żywotności komórek THP-1 ponieważ, wartości CV75 nie różniły się znacząco pomiędzy komórkami NHEK-neonatal, a THP-1. Obniżenia żywotności komórek THP-1 nie stwierdzono w przypadku kokultury pośredniej, w której narażane były tylko komórki NHEK-neonatal znajdujące się górnym kompartmentem insertów.

Po 48 h godzinach ekspozycji nastąpił kilku lub kilkunastoprocentowy spadek żywotności komórek w porównaniu do ekspozycji 24 h, jednak nie stwierdzono obniżenia żywotności komórek THP-1 poniżej wartości 60% po ekspozycji na wszystkie materiały badane z wyjątkiem LA. 48 godzinna ekspozycja na DNCB wywołała statystycznie istotny spadek żywotności tylko w przypadku kokultury pośredniej z jednoczesną ekspozycją KC i DC. Ten system badawczy okazał się najbardziej wrażliwy po 48 h ekspozycji wśród wszystkich stosowanych w eksperymencie, ponieważ statystycznie istotne obniżenie żywotności obserwowano również po ekspozycji na MMP, EU oraz LA. Najmniej wrażliwy okazał się system kokultury bezpośredniej, w przypadku którego nie stwierdzono istotnego obniżenia żywotności po 48 h ekspozycji na wszystkie substancje z wyjątkiem LA. 48 h ekspozycja komórek THP-1 na najwyższe stężenie LA spowodowała znaczny spadek żywotności komórek poniżej 20% we wszystkich systemach badawczych z wyjątkiem kokultury pośredniej, w której narażano tylko keratynocyty (Rysunek 6.27., 6.28.).



Rysunek 6.27. Żywotność komórek THP-1 po 24 h i 48 h inkubacji z substancjami o działaniu uczulającym: DNCB (A), MMP (B) oraz EU (C) w różnych układach kokultury oraz monokulturze. Żywotność określano przy użyciu analizy cytometrycznej z zastosowaniem jodku propidyny ($n=3$). Uzyskane wartości porównywano do kontroli rozpuszczalnikowej przy użyciu testu t -Studenta przy $p \leq 0,05^*$



Rysunek 6.28. Żywotność komórek THP-1 po 24 h i 48 h inkubacji z substancjami nieuczulającymi: LA (A), 2PR (B) w różnych układach kokultury oraz monokulturze. Żywotność określano przy użyciu analizy cytometrycznej z zastosowaniem jodku propidyny ($n=3$). Uzyskane wartości porównywano do kontroli rozpuszczalnikowej przy użyciu testu *t*-Studenta przy $p \leq 0,05^*$

6.3.7. Etap III - podsumowanie

Uważa się, że substancje uczulające indukują ekspresję antygenów powierzchniowych CD86 oraz CD54 na komórkach THP-1. Biorąc pod uwagę tę informację, sprawdzono, czy antygeny CD86 oraz CD54 mogą służyć jako punkty końcowe oceniające potencjał uczulający badanych substancji w metodzie kokulturowej. W tym celu przeprowadzono eksperymenty, w których różne rodzaje kokultury keratynocytów NHEK-neonatal z komórkami THP-1 poddawano ekspozycji na znane substancje uczulające tj. DNCB, MMP, EU oraz substancje nieuczulające takie jak LA oraz 2PR. Dodatkowo, analiza antygenów powierzchniowych na komórkach THP-1 hodowanych w układach kokulturowych pozwoliła na ocenę, czy takie złożone układy w wydajniejszy sposób umożliwią szacowanie potencjału uczulającego substancji klasyfikowanych jako prohapteny, czyli wymagających wcześniejszej aktywacji metabolicznej. Powszechnie wiadomo, że metody monokulturowe nie są niezawodne podczas oceny takich substancji. W celach porównawczych przeprowadzono eksperyment z wykorzystaniem monokultury THP-1, który pozwolił zweryfikować doniesienia literaturowe. Na podstawie uzyskanych wyników (Tabela 6.5.) można stwierdzić, że:

- a) substancje uczulające silniej indukowały wzrost ekspresji antygenów powierzchniowych na komórkach THP-1 po 24 h ekspozycji niż po 48 h ekspozycji,
- b) substancje uczulające silniej indukowały wzrost ekspresji antygeny CD54 po 24 h ekspozycji niż antygeny CD86,
- c) antygen CD86 był indukowany tylko w układach kokultury pośredniej po 24 h. Po 48 h ekspozycji antygen był indukowany w układach kokultury pośredniej oraz również w układzie monokultury,
- d) antygen CD86 nie był indukowany w układzie kokultury bezpośredniej po 24 h oraz 48 h ekspozycji na materiały uczulające,
- e) najbardziej wydajnym systemem identyfikującym substancje uczulające będące prohaptenami (MMP, EU) jest układ kokultury bezpośredniej, co stwierdzono na podstawie ekspresji antygeny CD54 w porównaniu z pozostałymi systemami badawczymi stosowanymi w badaniu,
- f) system kokultury bezpośredniej identyfikuje prohapteny w niższych stężeniach niż układ monokultury.

Tabela 6.5. Zestawienie wyników statystycznie istotnych ekspresji antygenów powierzchniowych CD86 oraz CD54 na komórkach THP-1. Wyniki statystycznie istotne (+), wyniki bez istotności statystycznej (-), I – kokultura pośrednia z jednoczesną ekspozycją KC/DC, II – kokultura pośrednia z ekspozycją KC, III – kokultura bezpośrednia, IV – monokultura

Stężenie materiału badanego [xTC]	Czas ekspozycji / system badawczy / rodzaj antygeny															
	24 h								48 h							
	I		II		III		IV		I		II		III		IV	
	CD 86	CD 54	CD 86	CD 54	CD 86	CD 54	CD 86	CD 54	CD 86	CD 54	CD 86	CD 54	CD 86	CD 54	CD 86	CD 54
DNCB 1,2 x TC	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNCB 1 x TC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNCB 0,5 x TC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNCB 0,1 x TC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MMP 1,2 x TC	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
MMP 1 x TC	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MMP 0,5 x TC	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MMP 0,1 x TC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EU 1,2 x TC	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
EU 1 x TC	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
EU 0,5 x TC	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EU 0,1 x TC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA 1,2 x TC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA 1 x TC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA 0,5 x TC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA 0,1 x TC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2PR 1,2 x TC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2PR 1 x TC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2PR 0,5 x TC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2PR 0,1 x TC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Na podstawie powyższych wniosków stwierdzono, że układ kokultury bezpośredniej NHEK-neonatal/THP-1 z 24 h ekspozycją będzie stosowany w finalnej metodzie kokulturowej, pomimo uzyskania w tym układzie wyników pozytywnych dla substancji nieuczulającej 2PR. Statystycznie istotny wzrost ekspresji CD54 uzyskano przy wysokich stężeniach 2PR tj. 6000 oraz 5000 $\mu\text{g/ml}$, dlatego w kolejnym etapie badań i finalnej opracowanej metodzie maksymalne stężenie materiału badanego ustalono na 1000 $\mu\text{g/ml}$ w celu eliminacji wyników fałszywie pozytywnych dla substancji nieuczulających.

6.4. Etap IV - walidacja metody kokulturowej KC/DC

6.4.1. Ocena cytotoksyczności materiałów referencyjnych wobec KC i DC

W ostatnim etapie eksperymentów dokonano oceny cytotoksyczności znanych substancji uczulających i nieuczulających w stosunku do komórek wykorzystanych w kokulturze bezpośredniej tj. keratynocytów NHEK-neonatal oraz komórek dendrytycznych THP-1. W tym celu zastosowano test alamarBlue oceniający żywotność komórek. Test przeprowadzono po 24 h inkubacji komórek z badanymi substancjami stosowanym w ośmiu stężeniach końcowych.

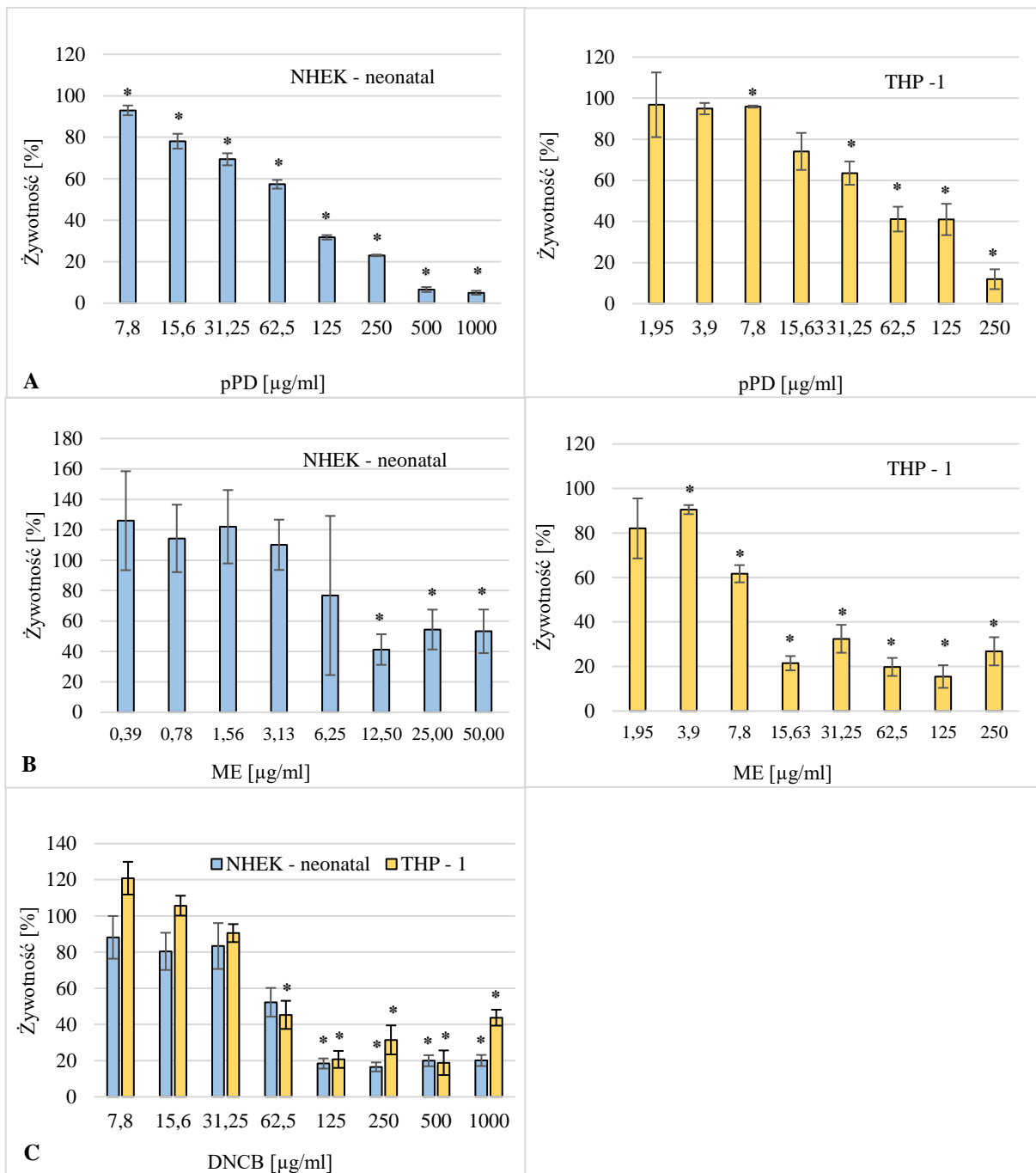
Najsilniejsze substancje uczulające tj. pPD, ME oraz DNCB (Tabela 4.3.) charakteryzowały się najsilniejszą cytotoksycznością w stosunku do stosowanych komórek. Reakcja komórek NHEK-neonatal oraz THP-1 na narażenie pPD była podobna, począwszy od stężenia 7,8 $\mu\text{g/ml}$ następuje systematyczny spadek żywotności obydwu typu komórek. Istotny spadek żywotności komórek NHEK-neonatal obserwowano przy stężeniu ME równym 12,50 $\mu\text{g/ml}$, natomiast w przypadku komórek THP-1 stwierdzono statystycznie istotny spadek żywotności już w stężeniu 7,8 $\mu\text{g/ml}$. Narażenie komórek na DNCB wywołało podobny wpływ na keratynocyty jak i komórki dendrytyczne. Istotne obniżenie żywotności do wartości około 20% stwierdzono przy stężeniu DNCB równym 125 $\mu\text{g/ml}$ (Rysunek 6.29.).

Wśród substancji umiarkowanie uczulających, bardziej cytotoksyczny dla komórek NHEK-neonatal okazał się 2 MBT, który wywołał istotny spadek żywotności już w stężeniu 62,5 $\mu\text{g/ml}$. W przypadku drugiej z substancji umiarkowanie uczulających tj. NiSO₄, statystycznie istotne obniżenie żywotności keratynocytów obserwowano dopiero w stężeniu 500 $\mu\text{g/ml}$. W przypadku ekspozycji komórek THP-1 na 2MBT stwierdzono istotne obniżenie żywotności przy stężeniu 125 $\mu\text{g/ml}$, natomiast po 24 h ekspozycji komórek THP-1 na NiSO₄, obserwowano spadek żywotności w wyższym stężeniu tj. 250 $\mu\text{g/ml}$ (Rysunek 6.30.).

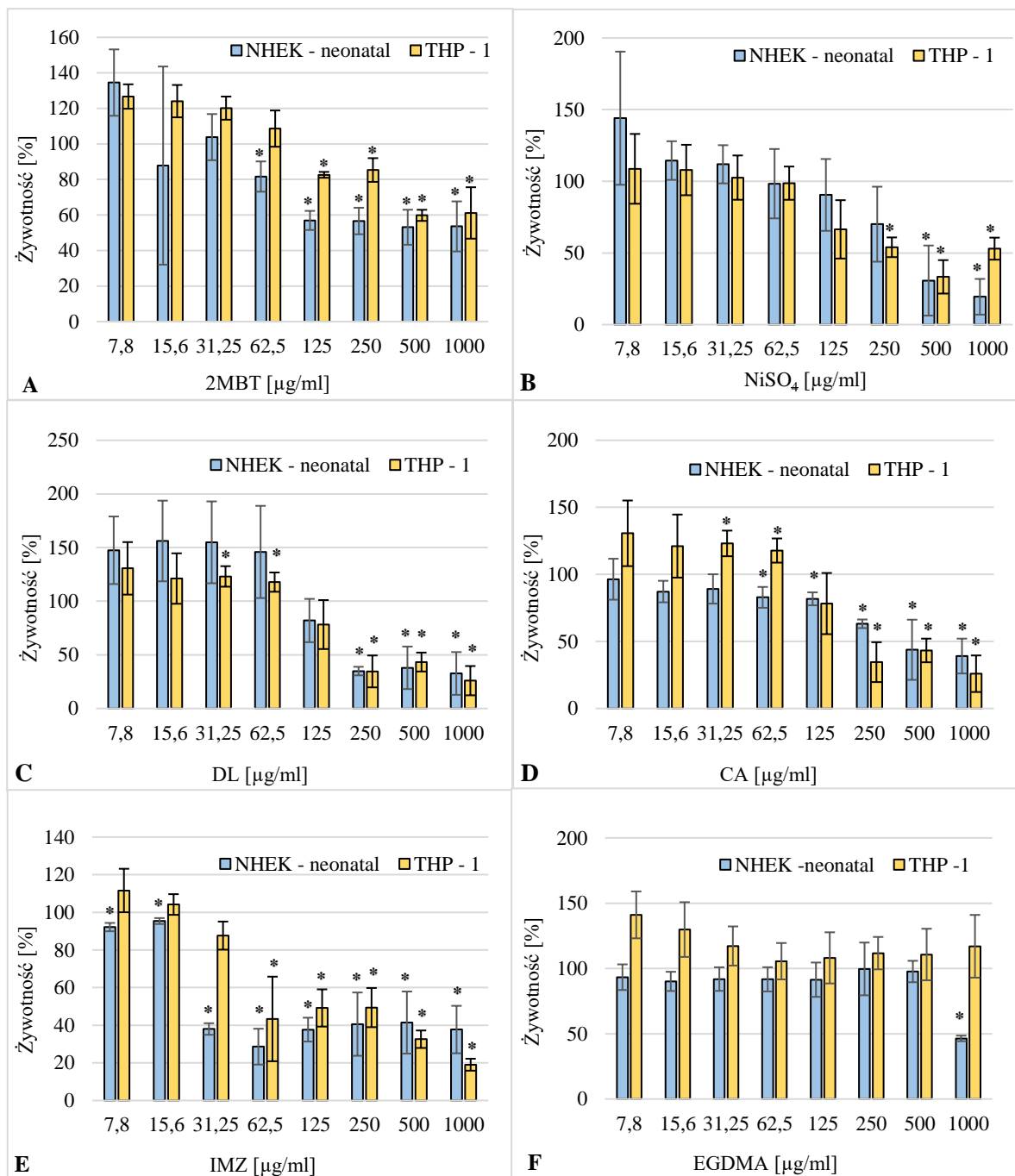
Wśród substancji słabo uczulających, najsilniejszą cytotoksycznością w stosunku do keratynocytów charakteryzował się IMZ, wywołując silny spadek żywotności poniżej 50% w

stężeniu 31,25 µg/ml. Komórki THP-1 charakteryzowały się nieco wyższą żywotnością po narażeniu na IMZ w porównaniu do keratynocytów. Analogiczne obniżenie żywotności komórek NHEK-neonatal oraz THP -1 stwierdzono po narażeniu na DL w stężeniu 250 µg/ml. Ekspozycja komórek na CA skutkowała istotnym obniżeniem żywotności keratynocytów poniżej wartości 50% przy stężeniu 500 µg/ml, natomiast żywotność komórek THP-1 obniżyła się do tej wartości już w stężeniu 250 µg/ml. Najmniejsze właściwości cytotoksyczne w stosunku do keratynocytów wykazał EGDMA, który wywołał statystycznie istotne obniżenie żywotności w najwyższym stężeniu tj. 1000 µg/ml. EDGMA nie wykazał właściwości cytotoksycznych w stosunku do komórek THP-1, w żadnym z testowanych stężeń nie stwierdzono istotnego obniżenia żywotności komórek.

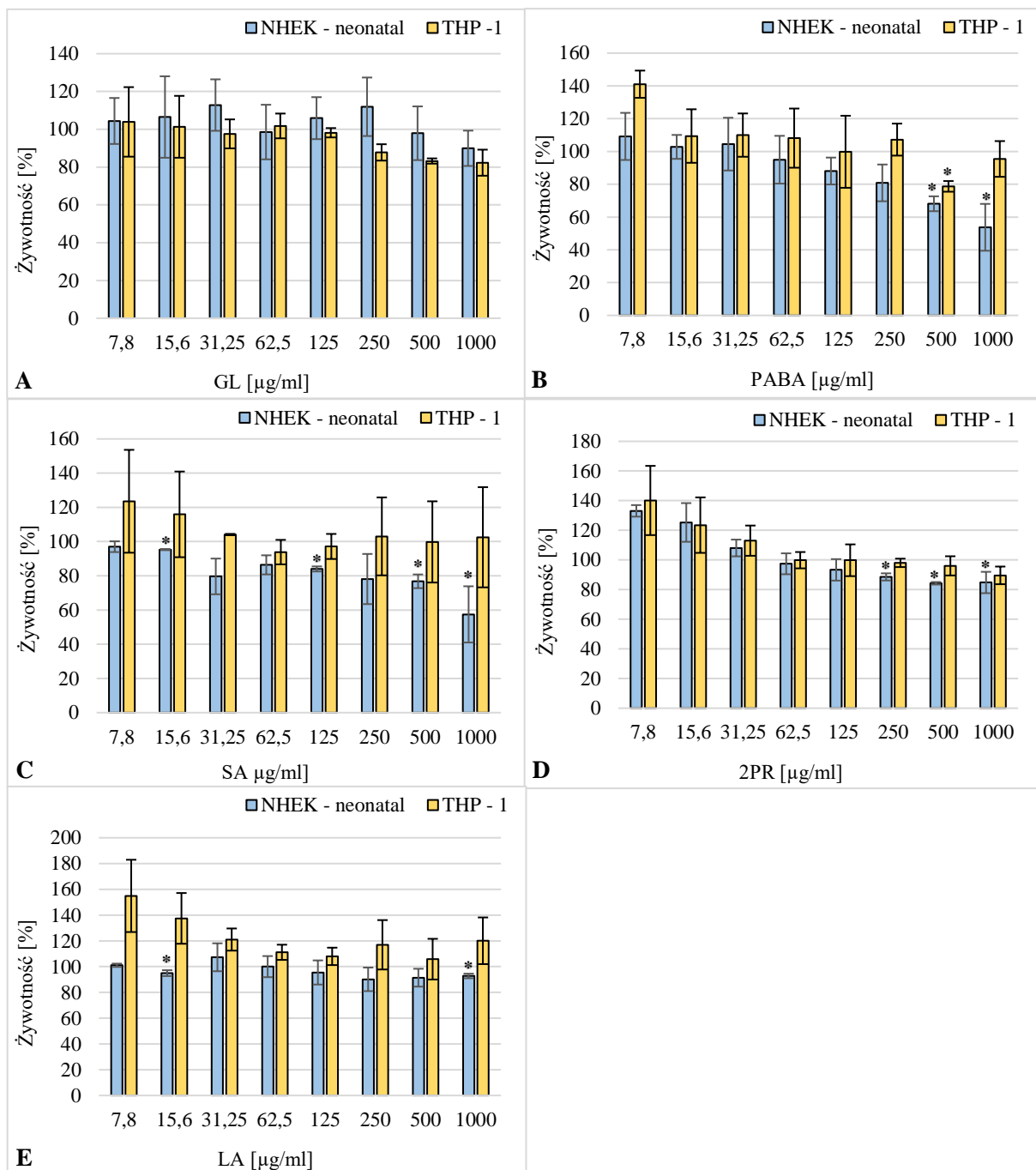
Ekspozycja komórek NHEK-neonatal oraz THP-1 na substancje uczulające takie jak: GL, 2PR oraz LA nie wywołała obniżenia żywotności komórek poniżej wartości 80%, pomimo stwierdzenia kilku przypadków statystycznego obniżenia żywotności w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej. Statystyczne obniżenie żywotności komórek poniżej wartości 80% stwierdzono w przypadku dwóch substancji nieuczulających tj. SA oraz PABA, głównie w przypadku komórek NHEK-neonatal (Rysunek 6.31.).



Rysunek 6.29. Żywotność komórek po 24 h ekspozycji na wzrastające stężenia substancji silnie uczulających: pPD (A), ME (B) oraz skrajnie uczulającej DNCB (C) wyznaczona przy użyciu testu alamarBlue. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego z trzech (ME, DNCB) lub dwóch (pPD) niezależnych pomiarów. Do oceny istotności statystycznej zastosowano test t-Studenta. Wartości statystycznie istotne w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej: * $p \leq 0,05$.



Rysunek 6.30. Żywotność komórek po 24 h ekspozycji na wzrastające stężenia substancji umiarkowanie uczulających: 2MBT (A), NiSO_4 (B) oraz substancji o słabym działaniu uczulającym: DL (C), CA (D), IMZ (E) oraz EGDMA (F) wyznaczona przy użyciu testu alamarBlue. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego z trzech niezależnych pomiarów. Do oceny istotności statystycznej zastosowano test t-Studenta. Wartości statystycznie istotne w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej: * $p \leq 0,05$



Rysunek 6.31. Żywotność komórek po 24 h ekspozycji na wzrastające stężenia substancji nieuczulające: GL (A), PABA (B), SA (C), 2PR (D), LA (E) wyznaczona przy użyciu testu alamarBlue. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego z trzech niezależnych pomiarów. Do oceny istotności statystycznej zastosowano test t-Studenta. Wartości statystycznie istotne w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej: * $p \leq 0,05$

6.4.2. Wyznaczenie wartości CV75 oraz stężenia ekspozycyjnego

Na podstawie wyników cytotoksyczności materiałów badanych wobec keratynocytów NHEK-neonatal oraz komórek dendrytycznych THP-1 wyznaczono wartości CV75, które obliczano z krzywej zależności dawka – odpowiedź metodą interpolacji log – liniowej. Wartość CV75 oznacza stężenie materiałów badanych przy którym stwierdza się 75% żywotność komórek w porównaniu do żywotności komórek w obecności kontroli rozpuszczalnikowej tj. 0,2% DMSO lub medium hodowlanego (Rysunek 6.32 – 6.35.).

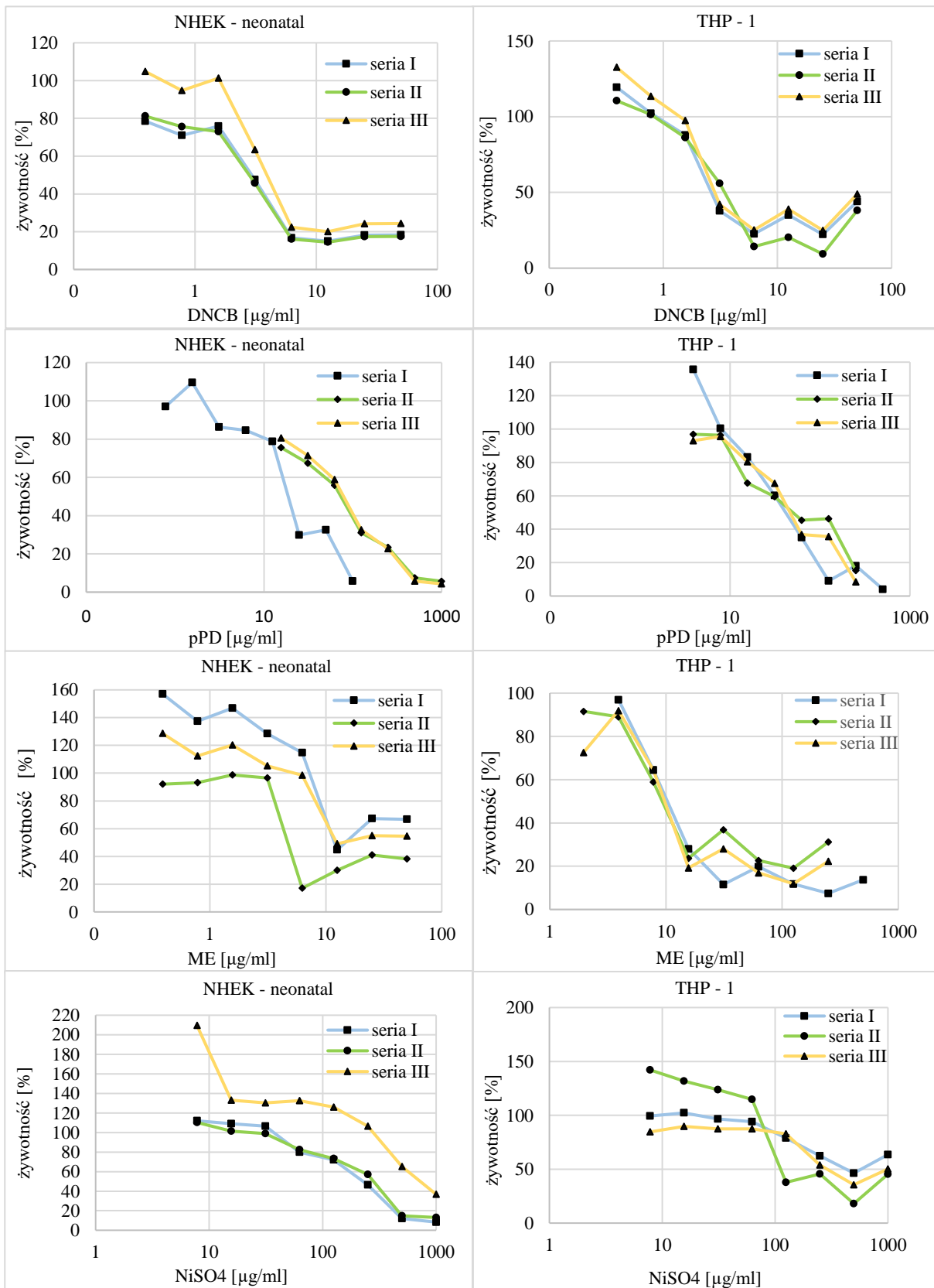
W przypadku substancji silnie uczulających tj. pPD, ME oraz DNCB uzyskano zbliżone wartości CV75 dla keratynocytów i komórek dendrytycznych, maksymalna różnica wynosiła około 20%.

Komórki charakteryzowały się zróżnicowaną reakcją na ekspozycję na substancje umiarkowanie uczulające. Zdecydowanie mniej wrażliwe na działanie NiSO₄ okazały się keratynocyty, dla których wartość CV75 była wyższa o około 63% od wartości CV75 dla komórek THP-1. Natomiast w przypadku 2MBT, komórki THP-1 charakteryzowały się ponad czterokrotnie wyższą wartością CV75 od komórek NHEK-neonatal.

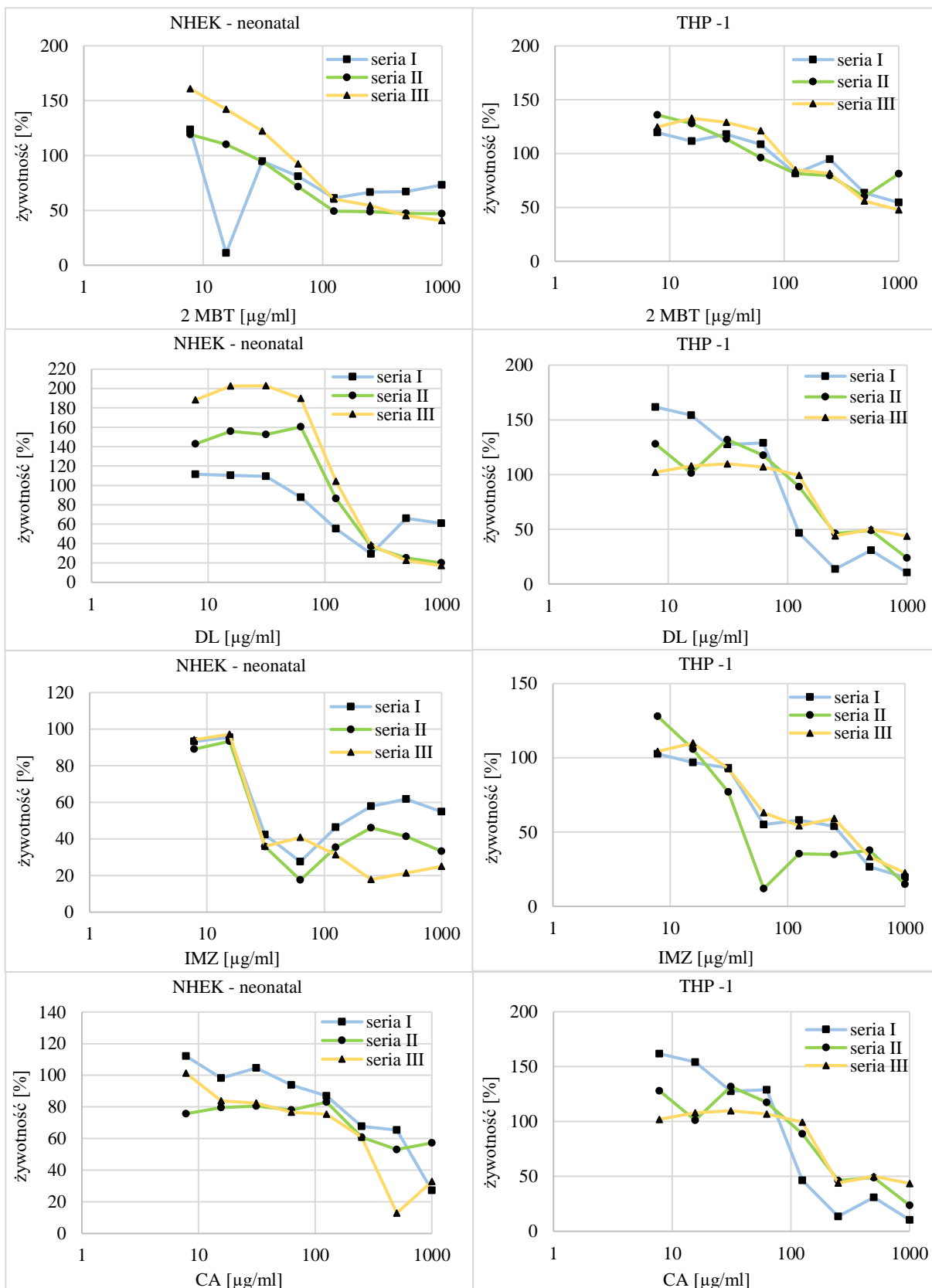
Uzyskano zbliżone wartości średnie CV75 w przypadku ekspozycji komórek na DL oraz CA. Większą różnicę pomiędzy wartościami CV75 dla komórek NHEK-neonatal oraz THP-1 stwierdzono w przypadku EGDMA oraz IMZ, wartości CV75% dla keratynocytów były zdecydowanie niższe niż dla komórek THP-1. W przypadku EGDMA nie wyznaczono wartości CV75 dla THP-1 ze względu na brak cytotoksyczności we wszystkich badanych stężeniach.

W przypadku wszystkich substancji nieuczulających tj. GL, LA, SA, PABA oraz 2PR nie wyznaczono wartości CV75 dla komórek THP-1, ponieważ w żadnym testowanym stężeniu nie stwierdzono obniżenia żywotności poniżej 75%. W przypadku keratynocytów, nie było możliwe wyznaczenie wartości CV75 ze względu na brak cytotoksyczności po ekspozycji na GL, LA oraz 2PR, natomiast PABA oraz SA spowodował spadek żywotności keratynocytów poniżej wartości 75% i możliwe było wyznaczenie wartości CV75 (Tabela 6.6.).

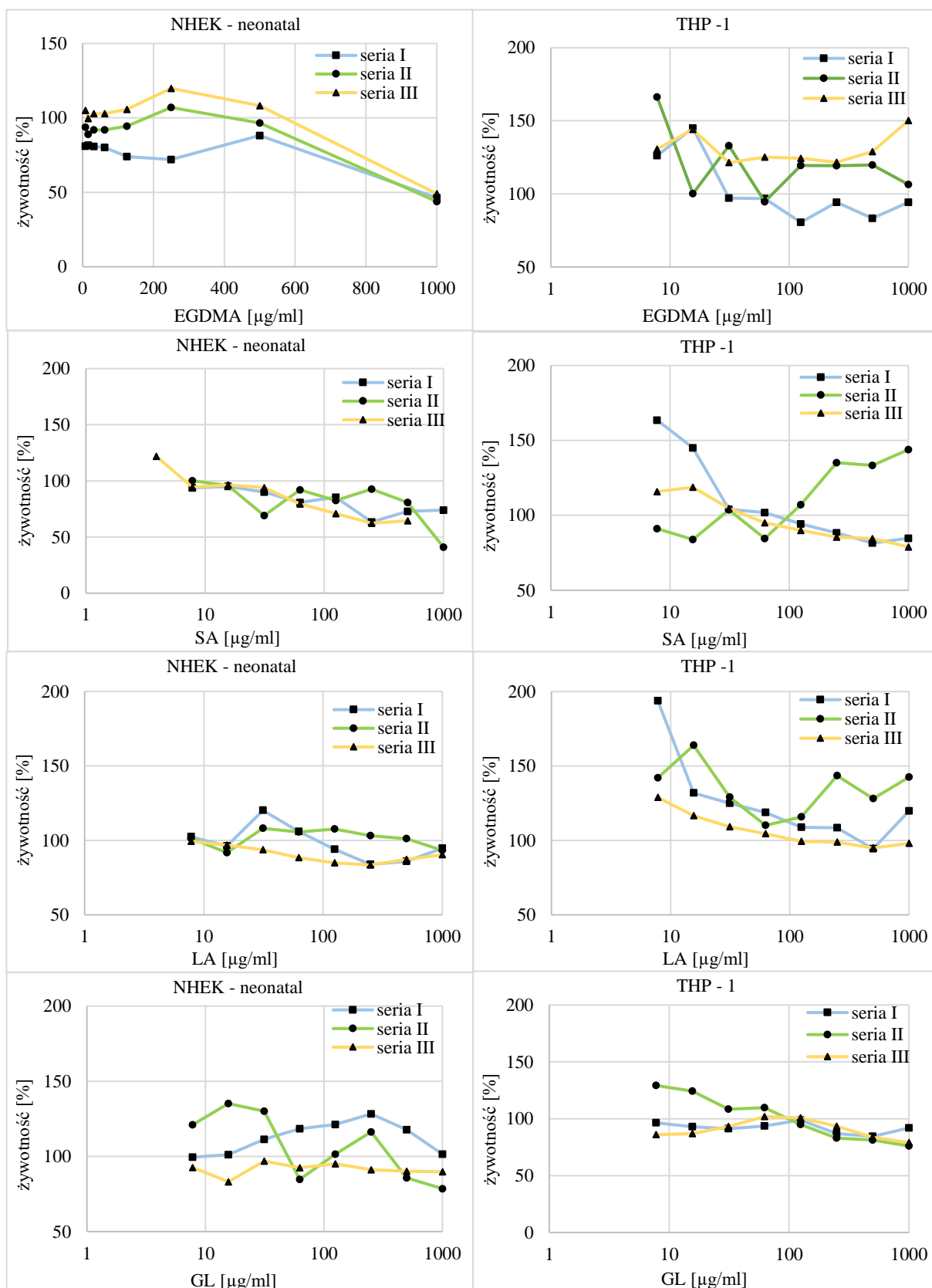
Wyznaczone wartości CV75 posłużyły do wyznaczenia stężeń ekspozycyjnych (TC). Jako stężenie ekspozycyjne, wyznaczono wartość CV75 wrażliwszego typu komórek (Tabela 6.6.). W ostatnim etapie eksperymentów zastosowano materiały badane w następujących stężeniach: 1,2x, 1x, 0,5x, 0,1x TC.



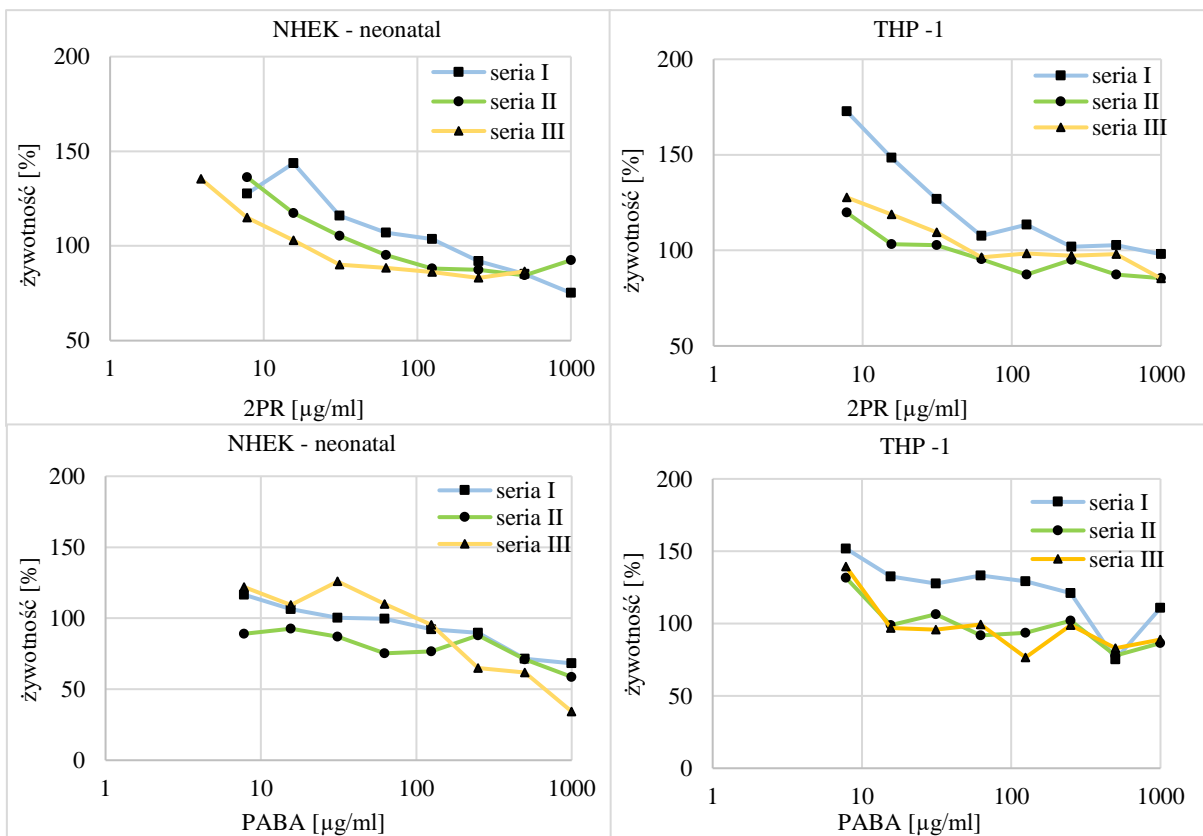
Rysunek 6.32. Żywność NHEK-neonatal oraz THP-1 po 24 h inkubacji z substancjami uczulającymi (DNCB, pPD, ME, NiSO₄) w stężeniach końcowych 7,80 – 1000 $\mu\text{g/ml}$ określona przy użyciu testu alamarBlue. Wykonano trzy serie pomiarowe, w każdej z nich wykonano trzy powtórzenia



Rysunek 6.33. Żywność komórek NHEK-neonatal oraz THP-1 po 24 h inkubacji z substancjami uczulającymi (2MBT, DL, IMZ, CA) w stężeniach końcowych 7,80 – 1000 µg/ml określona przy użyciu testu alamarBlue. Wykonano trzy serie pomiarowe, w każdej z nich wykonano trzy powtórzenia



Rysunek 6.34. Żywotność komórek NHEK-neonatal oraz THP-1 po 24 h inkubacji z substancjami uczulającymi (EGDMA) oraz nieuczulającymi (SA, LA, GL) w stężeniach końcowych 7,80 – 1000 $\mu\text{g/ml}$ określona przy użyciu testu alamarBlue. Wykonano trzy serie pomiarowe, w każdej z nich wykonano trzy powtórzenia



Rysunek 6.35. Żywołność komórek NHEK-neonatal oraz THP-1 po 24 h inkubacji z substancjami nieuczulającymi (2PR, PABA) w stężeniach końcowych 7,80 – 1000 µg/ml określona przy użyciu testu alamarBlue. Wykonano trzy serie pomiarowe, w każdej z nich wykonano trzy powtórzenia

Tabela 6.6. Zestawienie wartości CV75 oraz stężeń ekspozycyjnych (TC)

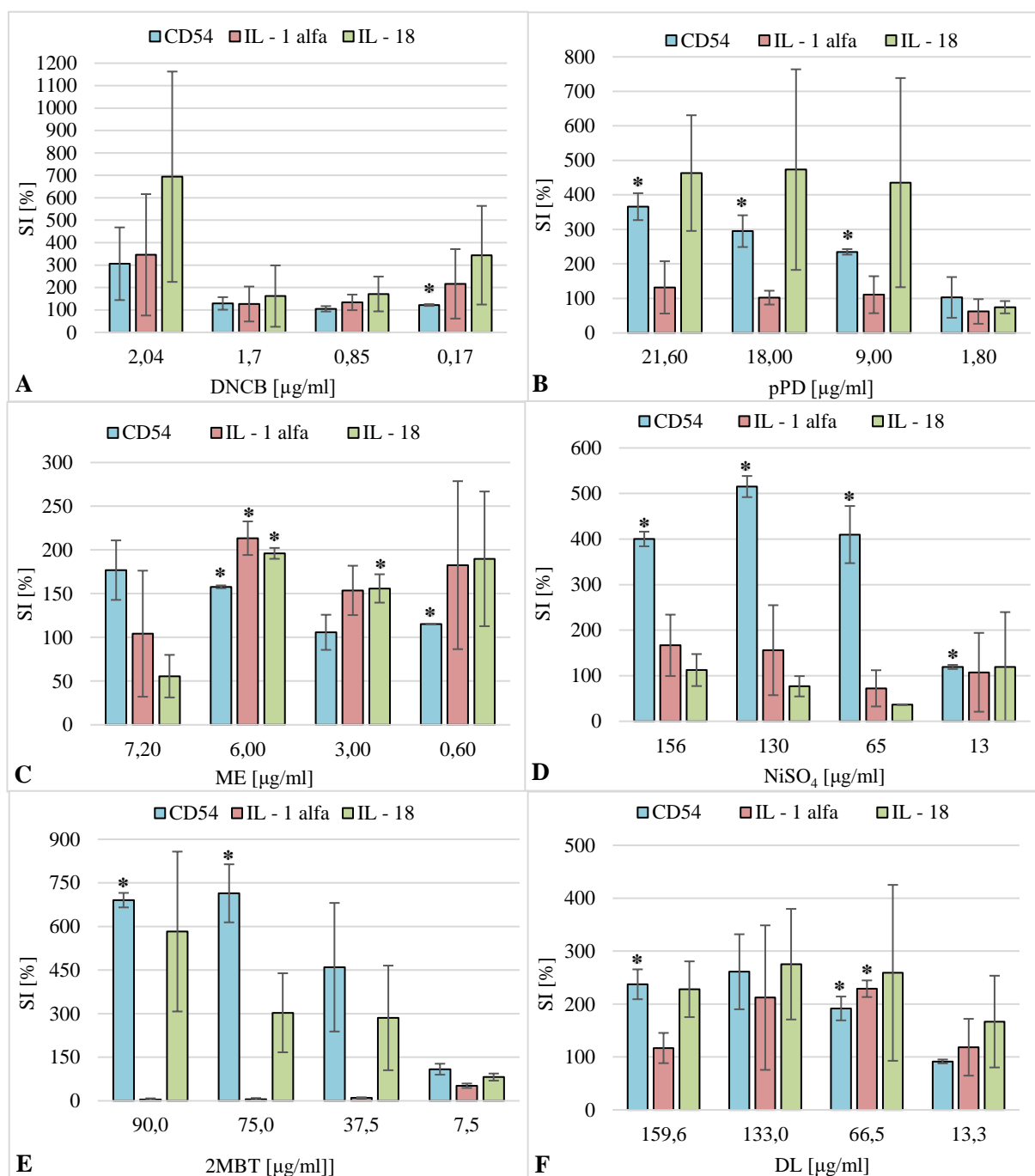
Material badany	CV75 [$\mu\text{g/ml}$]								TC [$\mu\text{g/ml}$]
	NHEK - neonatal				THP -1				
	I	II	III	$\bar{x} \pm \text{SD}$	I	II	III	$\bar{x} \pm \text{SD}$	
DNCB	1,59	0,92	2,53	$1,68 \pm 0,81$	1,87	2,02	2,07	$1,98 \pm 0,11$	1,70
pPD	13,19	16,37	23,87	$17,81 \pm 5,48$	13,09	20,94	20,02	$18,01 \pm 4,29$	18,00
ME	9,26	3,78	8,69	$7,24 \pm 3,02$	5,39	5,98	6,24	$5,87 \pm 0,43$	6,00
NiSO ₄	96,99	110,59	424,74	$210,78 \pm 185,43$	147,39	89,35	150,49	$129,08 \pm 34,44$	130,00
2 MBT	77,14	56,04	90,85	$74,68 \pm 17,54$	387,51	294,59	298,55	$341,05 \pm 52,54$	75,00
DL	81,88	146,62	170,04	$132,84 \pm 45,67$	185,45	174,06	135,62	$165,04 \pm 26,11$	133
IMZ	20,40	19,47	20,06	$19,98 \pm 0,47$	43,53	31,95	47,22	$40,90 \pm 7,97$	20,00
CA	192,12	160,75	126,99	$159,95 \pm 32,57$	98,39	156,42	169,45	$141,42 \pm 37,83$	140,00
EGDMA	622	663,75	737,90	$674,55 \pm 58,70$	>1000	>1000	>1000	NA	680,00
SA	173,83	552,98	89,74	$246,79 \pm 272,18$	>1000	>1000	>1000	NA	250,00
LA	>1000	>1000	>1000	NA	>1000	>1000	>1000	NA	1000
GL	> 1000	>1000	>1000	NA	>1000	>1000	>1000	NA	1000
2PR	>1000	>1000	>1000	NA	>1000	>1000	>1000	NA	1000
PABA	438,32	425,03	198,92	$354,09 \pm 134,54$	>1000	>1000	>1000	NA	350

6.4.3. Analiza ekspresji antygeny CD54 na komórkach THP-1 oraz IL-1 alfa i IL-18 w mediach pochodowlanych

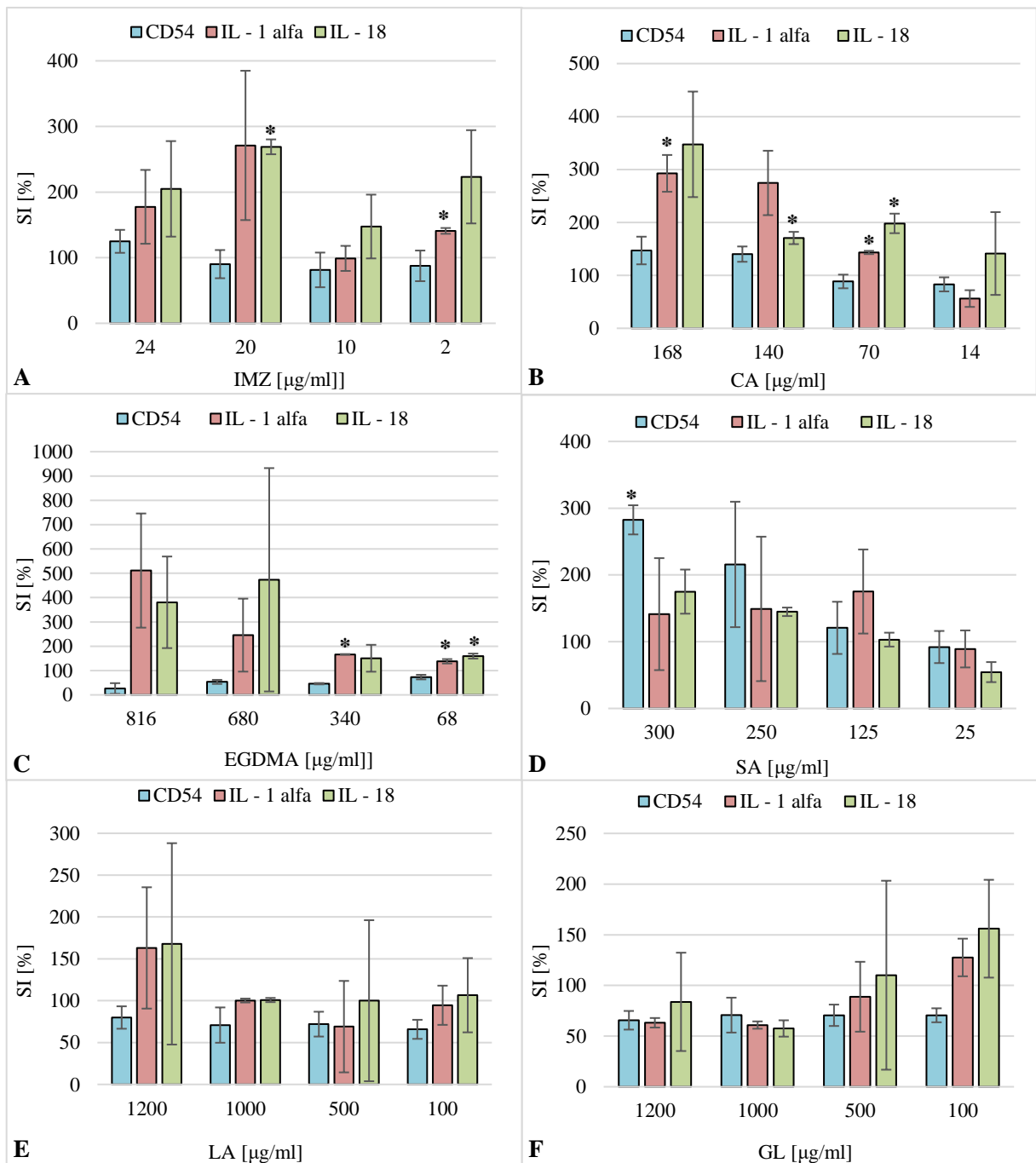
Po 24 h inkubacji układu kokultury bezpośredniej NHEK-neonatal/THP-1 z 14 substancjami badanymi (9 substancji uczulających, 5 substancji nieuczulających) oceniano ekspresję antygeny powierzchniowego CD54 na komórkach THP-1 stosując analizę cytometryczną oraz oznaczano stężenie IL-1 alfa oraz IL-18 w mediach pochodowlanych metodą ELISA – xMAP. Uzyskane wyniki porównywano do wyników uzyskanych po narażeniu komórek na kontrole rozpuszczalnikowe tj. 0,2% DMSO oraz medium hodowlane obliczając wartości SI, dla cytokin IL-1 alfa oraz IL-18 wg wzoru (4), dla antygeny CD54 wg wzoru (5).

W przypadku substancji uczulających takich jak: DNCB, pPD, NiSO₄, oraz 2MBT stwierdzono tylko statystycznie istotny wzrost ekspresji antygeny CD54, bez statystycznie istotnego wzrostu wartości SI dla IL-1 alfa oraz IL-18, pomimo uzyskania wysokich wartości SI. Z kolei statystycznie istotny wzrost wartości SI tylko dla IL-1 alfa oraz IL-18 obserwowano w przypadku następujących substancji uczulających: IMZ, CA, EGDMA. Jednocześnie, statystycznie istotny wzrost wartości SI dla antygeny CD54, IL-1 alfa oraz IL-18 stwierdzono po inkubacji komórek z dwiema substancjami uczulającymi: ME oraz DL.

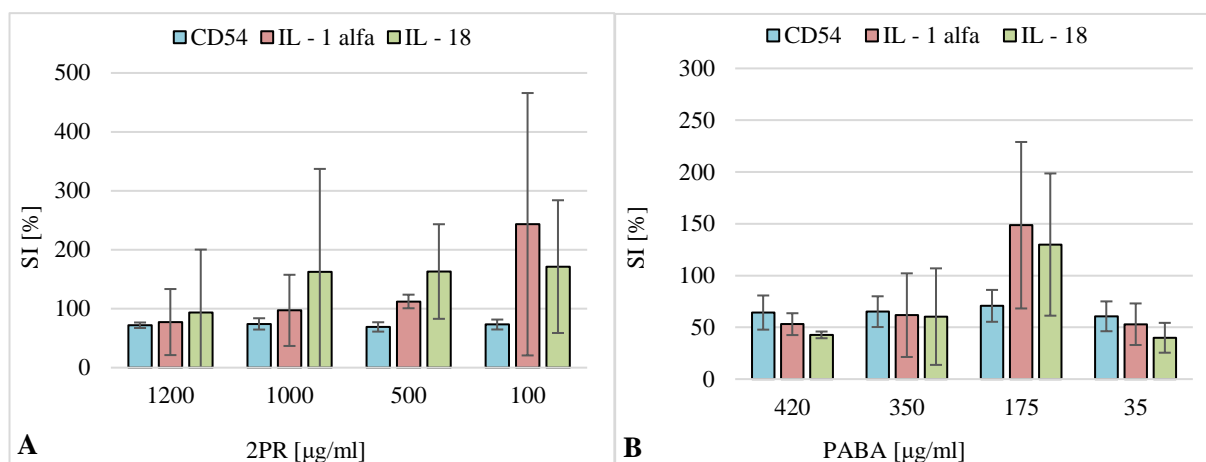
Nie uzyskano statystycznie istotnego wzrostu ekspresji CD54 lub poziomu IL-1 alfa oraz IL-18 dla wszystkich substancji nieuczulających (GL, LA, PABA, 2PR) wyjątkiem SA, w przypadku którego stwierdzono istotny wzrost ekspresji antygeny CD54 (Rysunek 6.36-6.38.).



Rysunek 6.36. Zestawienie wyników ekspresji antygenu CD54 oraz produkcji IL-1 alfa i IL-18 w mediach pochodzących z układu kokultury bezpośredniej NHEK-neonatal/THP-1 po 24 h ekspozycji na: DNCB (A), pPD (B), ME (C), NiSO₄ (D), 2MBT (E) oraz DL (F). Ekspresję antygenu CD54 mierzono przy użyciu cytometru przepływowego, cytokiny oznaczano metodą ELISA – xMAP. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego z dwóch niezależnych pomiarów. Do oceny istotności statystycznej zastosowano test t-Studenta. Wartości statystycznie istotne w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej (0,2% DMSO lub medium hodowlane): * $p \leq 0,05$



Rysunek 6.37. Zestawienie wyników ekspresji antygeny CD54 oraz produkcji IL-1 alfa i IL-18 w mediach pochodzących z układowej kultury bezpośredniej NHEK-neonatal/ THP-1 po 24 h ekspozycji na: IMZ (A), CA (B), EGDMA (C), SA (D), LA (E) oraz GL (F). Ekspresję antygeny CD54 mierzono przy użyciu cytometru przepływowego, cytokiny oznaczano metodą ELISA – xMAP. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego z dwóch niezależnych pomiarów. Do oceny istotności statystycznej zastosowano test t-Studenta. Wartości statystycznie istotne w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej (0,2% DMSO lub medium hodowlane): * $p \leq 0,05$



Rysunek 6.38. Zestawienie wyników ekspresji antygenu CD54 oraz produkcji IL-1 alfa i IL-18 w mediach pochodowlanych uzyskanych w układzie kokultury bezpośredniej NHEK-neonatal/ THP-1 po 24 h ekspozycji na: 2PR (A), PABA (B). Ekspresję antygenu CD54 mierzono przy użyciu cytometru przepływowego, cytokiny oznaczano metodą ELISA – xMAP. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej i odchylenia standardowego z dwóch niezależnych pomiarów. Do oceny istotności statystycznej zastosowano test t-Studenta. Wartości statystycznie istotne w porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej (0,2% DMSO lub medium hodowlane): * $p \leq 0,05$

6.4.4. Ocena poprawności klasyfikatora oraz wybór optymalnej wartości odcięcia dla antygenu CD54, IL-1 alfa oraz IL-18 na podstawie analizy krzywych ROC

Aby metoda kokulturowa była uznana za wartościową, powinna dawać jak najmniej błędnych klasyfikacji. W celu oceny zdolności metody kokulturowej do rozróżnienia substancji pozytywnych (uczulających) od substancji negatywnych (nieuczulających) posłużono się krzywymi ROC (receiver operating characteristics), które są graficznym przedstawieniem efektywności modelu, zapewniając łączny opis czułości i swoistości metody (Rysunek 6.39.). Na podstawie wielkości pola pod krzywą ROC (AUC – area under curve) można stwierdzić, że najdokładniejszą klasyfikację wyników jako pozytywne i negatywne można uzyskać na podstawie ekspresji antygenu CD54 (AUC = 0,82) oraz poziomu IL-18 (AUC = 0,81). Poziom IL-1 alfa może być również stosowany jako klasyfikator, ponieważ pole pod krzywą przyjmuje wartość wyższą niż wartość uznawana za niesatysfakcjonującą tj. 0,5 (AUC = 0,62), jednak ten klasyfikator będzie mniej skuteczny w porównaniu do CD54 oraz IL-18.

Jeżeli punkt końcowy charakteryzuje się wysoką wartością AUC, możliwe jest wyznaczenie wartości odcięcia. Na podstawie średnich wartości SI dla CD54, IL-1 alfa oraz IL-18 ustalono wartości odcięcia na podstawie których możliwa będzie identyfikacja substancji uczulających i substancji nieuczulających.

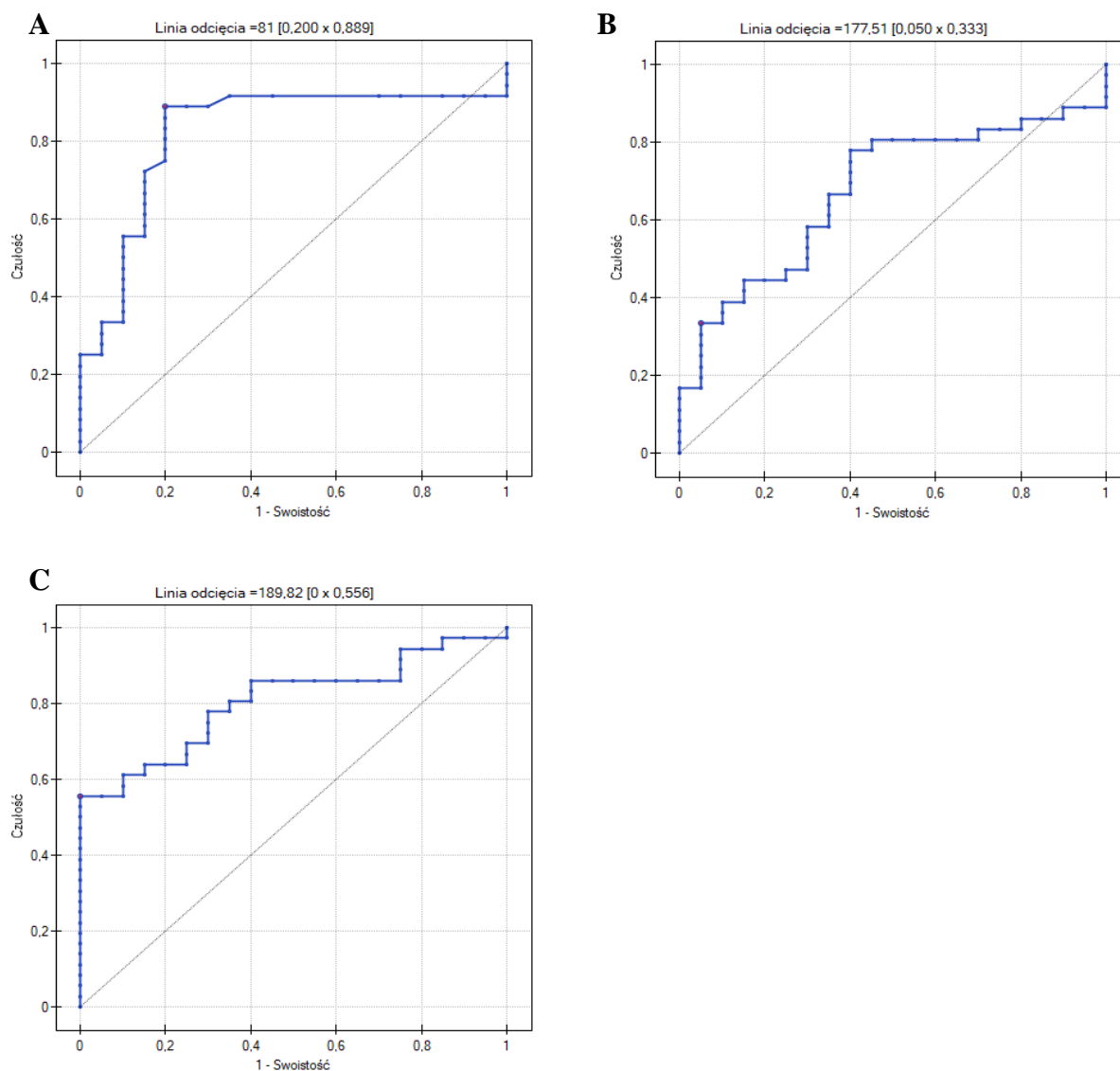
Wybrano następujące wartości odcięcia pozwalające na rozróżnienie substancji uczulających od substancji nieuczulających (Rysunek 6.40.):

- a) Wartość SI = 81 dla antygeny CD54,
- b) Wartość SI = 177,51 dla IL-1 alfa,
- c) Wartość SI = 189,82 dla IL-18.

Ponieważ wartość odcięcia uzyskana dla antygeny CD54 (SI=81%) jest niższa niż przyjmowana wartość kontroli rozpuszczalnikowej (100%), zdecydowano o podwyższeniu wartości odcięcia do 100%, aby uniknąć klasyfikacji kontroli rozpuszczalnikowej jako substancji uczulającej. W związku z tym, substancje będą klasyfikowane jako uczulające, jeżeli wartość SI dla antygeny CD54 >100%.

Optymalna wartość odcięcia powinna zapewnić jak najmniejszą liczbę błędów. Analizując wartości czułości, swoistości oraz dokładności dla trzech punktów końcowych można stwierdzić, że:

- a) Największą zdolność do wykrywania substancji uczulających będzie miał test oceniający ekspresję antygeny CD54 (czułość 0,89);
- b) Najmniejszą zdolność do wykrywania substancji uczulających będzie się charakteryzowała metoda wykorzystująca ocenę poziomu IL-1 alfa (czułość 0,33);
- c) Najlepszą metodą umożliwiającą wykrywanie substancji nieuczulających jest metoda z zastosowaniem pomiaru poziomu IL-18 (swoistość 1,0);
- d) Najmniej efektywną metodą do wykrywania substancji nieuczulających jest metoda oceniająca ekspresję antygeny CD54 (swoistość = 0,80);
- e) Najwyższe prawdopodobieństwo uzyskania prawidłowego wyniku, zarówno pozytywnego jak i negatywnego charakteryzuje metodę wykorzystującą ocenę ekspresji antygeny CD54 (dokładność = 0,86);
- f) Najniższe prawdopodobieństwo uzyskania prawidłowego wyniku, zarówno pozytywnego jak i negatywnego charakteryzuje metodę wykorzystującą jako punkt końcowy ocenę poziomu IL-1 alfa (dokładność 0,55) (Tabela 6.7.).



Rysunek 6.39. Zestawienie krzywych ROC dla CD54 (A), IL-1 alfa (B) oraz IL-18 (C) z uwzględnieniem punktu odcięcia wyznaczonego metodą stycznej przy użyciu programu PQStat v. 1.8.4.

Tabela 6.7. Charakterystyka punktów końcowych uzyskana na podstawie krzywej ROC przy wyznaczonych punktach odcięcia

Punkt końcowy	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość	Dokładność	AUC
CD54	81	0,89	0,80	0,86	0,82
IL – 1 alfa	177,51	0,33	0,95	0,55	0,67
IL -18	189,82	0,56	1,0	0,71	0,81

6.4.5. Klasyfikacja materiałów badanych

Uzyskane średnie wartości SI dla wszystkich parametrów poddano ocenie na podstawie przyjętych wartości odcięcia. W przypadku uzyskania wartości równych lub wyższych od przyjętych wartości odcięcia uznawano wynik za pozytywny. Jeżeli uzyskane wyniki były niższe od przyjętych wartości odcięcia klasyfikowano je jako negatywne (Tabela 6.8, 6.9.). Badane materiały były klasyfikowane jako substancje uczulające, jeżeli w jakimkolwiek stężeniu uzyskały wynik pozytywny dla danego punktu końcowego. Badane materiały były klasyfikowane jako substancje nieuczulające, jeżeli we wszystkich testowanych stężeniach uzyskały wynik negatywny dla danego punktu końcowego. Aby ustalić optymalny model predykcyjny (PM) do oceny potencjału uczulającego sprawdzono wszystkie możliwe kombinacje trzech punktów końcowych:

- a) PM1 – ocena ekspresji CD54,
- b) PM2 – ocena poziomu IL-1 alfa,
- c) PM3 – ocena poziomu IL-18,
- d) PM4 – ocena poziomu IL-1 alfa + IL-18,
- e) PM5 – ocena ekspresji CD54 + poziom IL-1 alfa,
- f) PM6 – ocena ekspresji CD54 + poziom IL-18,
- g) PM7 – ocena ekspresji CD54 + poziom IL-1 alfa + poziom IL-18.

Poszczególne modele predykcyjne oceniono obliczając czułość, swoistość i dokładność dla każdego z nich (Tabela 6.10.).

Najlepszą zdolność do wykrywania substancji uczulających wykazały trzy modele predykcyjne PM5, PM6, PM7, a więc modele łączące analizę ekspresji antygeny CD54 z oceną cytokin zapalnych w różnych kombinacjach. Za pomocą tych modeli poprawnie sklasyfikowano wszystkie zastosowane substancje uczulające (9/9) uzyskując czułość równą 1,00. Z kolei najwyższą swoistość, czyli zdolność metody do wykrywania substancji nieuczulających stwierdzono w przypadku modelu predykcyjnego PM3, czyli analizy tylko jednego punktu końcowego tj. poziomu IL-18. Wszystkie stosowane substancje nieuczulające (5/5) zostały prawidłowo zaklasyfikowane, model predykcyjny PM3 charakteryzował się swoistością równą 1,00 jako jedyny wśród wszystkich analizowanych modeli predykcyjnych. Najwyższą dokładnością, a więc zdolnością uzyskania poprawnego wyniku zarówno pozytywnego jak i negatywnego odznaczała się metoda z zastosowaniem oceny ekspresji antygeny CD54 i poziomu IL-18 (PM6). Zastosowanie tych dwóch punktów końcowych pozwoliło na poprawną identyfikację wszystkich badanych substancji z wyjątkiem SA, który

został nieprawidłowo sklasyfikowany jako substancja uczulająca (13/14). Zastosowanie tylko analizy poziomu IL-1 alfa (PM2) skutkowało uzyskaniem najniższej dokładności równej 0,71. Na 14 badanych substancji, przy użyciu PM2 nieprawidłowo sklasyfikowano aż 4 z nich (10/14), trzy substancje uczulające sklasyfikowano jako nieuczulające (pPD, NiSO₄, 2MBT) oraz jedną substancję nieuczulającą (2PR) błędnie uznano za substancję uczulającą.

Tabela 6.8. Ocena uzyskanych wyników (SI) dla substancji uczulających na podstawie przyjętych wartości odcięcia. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej z dwóch pomiarów, stosowano następujące wartości odcięcia dla wyniku pozytywnego: CD54 > 100, IL-1 alfa ≥ 177,51, IL-18 ≥ 189,82. Wyniki pozytywne zaznaczono na niebiesko, negatywne na zielono

Materiał badany	Stężenie materiału badanego [x TC]	Średnie wartości SI [%]		
		CD54	IL - 1 alfa	IL - 18
DNCB	1,2 x TC	306	345,74	693,90
	1 x TC	129	126,48	161,76
	0,5 XTC	105	133,75	171,27
	0,1 x TC	122	216,39	343,96
pPD	1,2 x TC	366	132,01	463,27
	1 x TC	295	102,35	473,34
	0,5 XTC	235	110,83	435,61
	0,1 x TC	103	62,29	74,63
ME	1,2 x TC	177	104,21	55,65
	1 x TC	158	213,42	196,07
	0,5 XTC	106	153,73	155,94
	0,1 x TC	115	182,60	189,82
NiSO ₄	1,2 x TC	400	166,74	112,44
	1 x TC	515	156,10	76,85
	0,5 XTC	410	72,33	36,42
	0,1 x TC	119	107,50	119,43
2MBT	1,2 x TC	691	4,42	582,59
	1 x TC	714	5,57	303,05
	0,5 XTC	460	9,84	285,34
	0,1 x TC	109	51,98	81,74
DL	1,2 x TC	237	116,92	228,04
	1 x TC	261	212,22	275,37
	0,5 XTC	192	229,04	259,05
	0,1 x TC	92	118,44	166,91
IMZ	1,2 x TC	125	177,51	204,91
	1 x TC	90	271,12	268,96
	0,5 XTC	81	98,94	147,50
	0,1 x TC	88	140,85	223,28
EGDMA	1,2 x TC	26	511,25	380,73
	1 x TC	53	245,72	473,31
	0,5 XTC	46	166,43	150,66
	0,1 x TC	73	138,14	159,43
CA	1,2 x TC	147	292,63	347,45
	1 x TC	140	274,54	170,58
	0,5 XTC	89	143,26	198,11
	0,1 x TC	83	56,20	141,28

Tabela 6.9. Ocena uzyskanych wyników (SI) dla substancji nieuczulających na podstawie przyjętych wartości odcięcia. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej z dwóch pomiarów, stosowano następujące wartości odcięcia dla wyniku pozytywnego: CD54 > 100, IL-1 alfa ≥ 177,51, IL-18 ≥ 189,82. Wyniki pozytywne zaznaczono na niebiesko, negatywne na zielono

Materiał badany	Stężenie materiału badanego [x TC]	Średnie wartości SI [%]		
		CD54	IL - 1 alfa	IL -18
SA	1,2 x TC	283	141,30	175,01
	1 x TC	216	149,13	144,80
	0,5 XTC	121	175,20	103,10
	0,1 x TC	92	89,16	54,46
LA	1,2 x TC	80	163,05	167,90
	1 x TC	71	100,19	100,82
	0,5 XTC	72	69,01	99,97
	0,1 x TC	66	94,55	106,54
GL	1,2 x TC	66	63,16	83,79
	1 x TC	71	60,92	57,54
	0,5 XTC	71	88,85	110,08
	0,1 x TC	71	127,59	155,97
2PR	1,2 x TC	72	77,36	93,81
	1 x TC	74	97,20	162,70
	0,5 XTC	69	112,30	163,08
	0,1 x TC	73	243,33	171,43
PABA	1,2 x TC	64	53,09	42,72
	1 x TC	65	61,77	60,35
	0,5 XTC	71	148,60	129,92
	0,1 x TC	61	53,02	39,91

Tabela 6.10. Charakterystyka modeli predykcyjnych na podstawie czułości, swoistości oraz dokładności

Model predykcyjny	PM 1	PM 2	PM 3	PM 4	PM 5	PM 6	PM 7
Czułość	0,89	0,67	0,89	0,89	1,00	1,00	1,00
Swoistość	0,80	0,80	1,00	0,80	0,60	0,80	0,60
Dokładność	0,86	0,71	0,92	0,86	0,86	0,93	0,86

7. Dyskusja

Podstawą do opracowania metod alternatywnych do oceny działania uczulającego na skórę jest wiedza na temat kluczowych zdarzeń występujących w tym procesie (KE1 – KE4) zintegrowana w ścieżkę niekorzystnych wyników (AOP) (OECD 2014). Aktualnie, zatwierdzone do celów regulacyjnych metody alternatywne obejmują tylko jedno kluczowe zdarzenie w procesie uczulenia skóry. W związku z tym konieczne jest wykonanie kombinacji kilku testów w celu uzyskania informacji równoważnych do testów *in vivo*, pozwalających na klasyfikację badanej substancji jako uczulającej lub nieuczulającej (OECD 2021a). Wydaje się, że rozwiązaniem tych niedogodności może być zastosowanie metod wykorzystujących kokultury. Metody wspólnej hodowli dwóch lub większej liczby populacji komórek umożliwiają komunikację międzykomórkową oraz naśladują mikrośrodowisko, pomagając wypełnić lukę pomiędzy metodami monokulturowymi, a modelami zwierzęcymi (Goers i in., 2014). W zakresie oceny działania uczulającego na skórę, metody kokulturowe pozwalają na integrację kilku kluczowych zdarzeń w jednym teście, dodatkowo w większym stopniu odzwierciedlają procesy *in vivo*, co może przyczynić się do zwiększenia zdolności predykcyjnej metody (Thélu i in., 2020).

Alergiczne kontaktowe zapalenie skóry charakteryzuje się skomplikowanym mechanizmem o podłożu immunologicznym (Tončić i in., 2011). Kluczowymi komórkami biorącymi udział w tym procesie są keratynocyty i komórki dendrytyczne, dlatego metody kokulturowe skupiają się na integracji tych dwóch typów komórek (Albanesi, 2010; Ainscough i in., 2013). Strategie wyboru odpowiedniego typu systemu badawczego są różne. Zastosowanie znalazły komórki pierwotne jak i linie unieśmiertelnione. W zakresie kluczowego zdarzenia KE2, czyli aktywacji keratynocytów stosowane są głównie linie ustanowione takie jak: KeratinoSensTM, (Emter i in., 2015; Natsch i in., 2013a; Huth i in., 2017), LuSensTM (OECD 2022a, 442), HaCaT (McKim i in., 2012; Veen i in., 2013; Chung i in., 2018), NCTC2544 (Corsini i in., 2012). Zastosowanie linii unieśmiertelnionych może wiązać się z uzyskaniem niespójnych wyników, ze względu na:

- a) możliwość występowania zmienności genotypowej oraz fenotypowej na wysokich pasażach,
- b) zaburzone mechanizmy sygnałowe,
- c) zmniejszoną aktywność metaboliczną (Kaur i in., 2012; Santos i in., 2009).

Prawidłową regulację wzrostu i różnicowania, jak również podobieństwo fenotypowe do komórek normalnych zachowują komórki pierwotne, jednak charakteryzują się ograniczoną

długością życia, czy zmiennością pomiędzy dawcami (L Berg i in., 2014). Biorąc pod uwagę powyższe zalety i wady systemów badawczych unieśmiertelnionych oraz pierwotnych komórek, zdecydowano o zastosowaniu w ramach KE2 obydwu typów komórek w celach porównawczych. Keratynocyty są komórkami, które można pozyskać w łatwy sposób, np. jako materiał resztkowy po zabiegach chirurgicznych. Podczas badań stosowano dwa typy keratynocytów pierwotnych, pochodzące od dawców noworodkowych komórki NKEK-neonatal (Lonza) oraz pochodzące od dawców dorosłych komórki NHEK-adult (Promocell), pozyskane od renomowanych dostawców. Aby ograniczyć wady wynikające z zastosowania komórek pierwotnych oraz ich możliwy wpływ na uzyskane wyniki, stosowano komórki łączone od wielu dawców, maksymalnie do 10 pasażu. W ten sposób ograniczono zmienność pomiędzy dawcami, możliwy dryft genetyczny oraz zaburzenie funkcji komórek mogące wystąpić na wyższych pasażach. Dodatkowo, zastosowano keratynocyty unieśmiertelnionej linii komórkowej pochodzącej z ludzkich keratynocytów, czyli HaCaT. Drugim typem komórek zastosowanych do opracowania metody kokulturowej były komórki dendrytyczne, których aktywacja stanowi trzeci kluczowy element w procesie uczulenia skóry (KE3). W przeciwieństwie do keratynocytów, pierwotne komórki dendrytyczne są trudne do pozyskania, ponieważ stanowią w naskórku niewielką, 2-4% populację komórek, są trudne do wyizolowania oraz do utrzymania w rutynowej hodowli komórkowej (Ayehunie i in., 2009). Z tego powodu, w metodach bazujących na aktywacji DC, najczęściej wykorzystuje się DC otrzymywane z prekursorów krwi obwodowej, szpiku kostnego lub krwi pępowinowej (Santos i in., 2009). Najczęściej stosowane są monocyty CD14+ uzyskiwane z krwi obwodowej lub hematopoetyczne komórki progenitorowe CD34+ pozyskiwane z krwi obwodowej, pępowinowej lub szpiku kostnego (Reuter i in., 2011; Toebak i in., 2006; Hooyberghs i in., 2008). Ten sposób pozyskiwania DC charakteryzuje się bardzo dużą zmiennością komórek oraz skomplikowanymi protokołami uzyskiwania DC z prekursorów. Alternatywnie, źródłem DC mogą być unieśmiertelnione linie DC – podobne. W pracy doktorskiej wykorzystano dwie z nich, tj. linię THP -1 oraz MUTZ-3. Pod względem właściwości morfologicznych, funkcjonalnych, jak i markerów różnicowania, komórki THP-1 przypominają pierwotne monocyty i makrofagi i są szeroko stosowane w badaniach odpowiedzi immunologicznej. Z kolei zaletą komórek MUTZ-3 jest ich fizjologiczne podobieństwo do komórek dendrytycznych (Chanput i in., 2014).

7.1. Profil uwalniania cytokin zapalnych przez różne rodzaje keratynocytów hodowanych w monokulturze

Jednym z istotnych elementów opracowywania metody kokulturowej był wybór odpowiednich markerów aktywacji keratynocytów.

Podczas procesu uczulenia, hapteny wywołują bezpośrednią zapalną aktywację keratynocytów, co prowadzi do uwalniania szeregu cytokin zapalnych (Albanesi, 2010). Do najczęściej opisywanych mediatorów reakcji zapalnej keratynocytów uwalnianych pod wpływem substancji uczulających należą: IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, TNF-alfa (Kydonieus i in., 1999). W pierwszym etapie badań zweryfikowano, czy wybrane typy keratynocytów (NHEK-neonatal, NHEK-adult, unieśmierteliona linia komórkowa pochodząca z ludzkich keratynocytów) produkują mediatory zapalne w odpowiedzi na ekspozycję na substancję uczulającą tj. DNCB oraz czy produkcja jest zależna od stężenia komórek i czasu ekspozycji na alergen. Spośród mediatorów zapalnych opisywanych w literaturze wybrano następujące: IL-1 alfa, IL-6, IL-12 (p40), IL-12 (70), IL-18 oraz TNF-alfa. Uzyskane wyniki pozwoliły na wstępną selekcję typu keratynocytów oraz zawężenie oznaczanych cytokin w dalszych etapach badań.

IL-12, która silnie stymuluje proliferację limfocytów T, jest heterodimerem zbudowanym z dwóch podjednostek: p40 oraz p35. Chociaż dane literaturowe potwierdzają produkcję tej cytokiny przez keratynocyty (Aragane i in., 1994), nie stwierdzono zewnątrzkomórkowego uwalniania podjednostki p(40) jak i postaci heterodimerycznej IL-12 (p70) przez zastosowane w badaniach keratynocyty. We wszystkich przypadkach stężenie IL-12 było nieoznaczalne lub poniżej dolnej granicy oznaczalności zastosowanej metody ELISA-xMAP, czyli LLOQ=6,40 pg/ml dla IL-12(p40) oraz LLOQ=0,88 dla IL-12(p70). Natomiast nie sprawdzano wewnątrzkomórkowej produkcji IL-12 w lizacie komórkowym.

Keratynocyty wykazują również zdolność do produkcji TNF-alfa (Köck i in., 1990). Analizując uzyskane wyniki, stwierdzono różnice w produkcji TNF-alfa pomiędzy keratynocytami pochodzącymi od dawców noworodkowych i dawców dorosłych. Skóra noworodków jest dojrzała anatomicznie, jednak w pierwszych latach życia występują odrębności funkcjonalne w porównaniu ze skórą dorosłych (Stamatas i in., 2011). Udowodniono, że keratynocyty noworodkowe produkują większe ilości TNF-alfa w odpowiedzi na inaktywowane termicznie mikroorganizmy w porównaniu do keratynocytów noworodkowych (Iram i in., 2012). Analogiczną sytuację stwierdzono po ekspozycji na substancję uczulającą DNCB. Wprawdzie keratynocyty NHEK-adult były bardziej reaktywne

od keratynocytów noworodkowych, tzn. produkowały TNF-alfa zarówno w warunkach podstawowych (narażenie na kontrolę rozpuszczalnikową) jak i po narażeniu na DNCB prawie we wszystkich zastosowanych warunkach eksperymentalnych, jednak w przypadku keratynocytów noworodkowych oznaczono zdecydowanie wyższe stężenia TNF-alfa. Poziom TNF-alfa w przypadku NHEK-neonatal mieścił się w granicach 15-36 pg/ml, podczas gdy maksymalne stężenie TNF-alfa w przypadku NHEK-adult było równe 18,31 pg/ml. Aby osiągnąć tak wysokie wartości, keratynocyty noworodkowe potrzebowały jednak dłuższej ekspozycji na substancję uczulającą. W porównaniu do kontroli rozpuszczalnikowej, najwyższe wartości SI (SI = 562%) stwierdzono po 48 h ekspozycji komórek w stężeniu $2,5 \times 10^5$ /ml. Keratynocyty od dawców dorosłych najwyższą wartość SI (SI=224,1%) osiągnęły już po 5 h inkubacji komórek z DNCB stosowanych w tym samym stężeniu co NHEK-neonatal. W przypadku komórek nieśmiertelnej linii komórkowej pochodzącej z ludzkich keratynocytów nie stwierdzono produkcji TNF-alfa powyżej wartości LLOQ zarówno w warunkach podstawowych jak i w przypadku ekspozycji na substancję uczulającą.

Jedyną cytokiną oznaczoną w mediach pochodzących po ekspozycji komórek nieśmiertelnej linii komórkowej pochodzącej z ludzkich keratynocytów była IL-6. Linia ta jest genetycznie zmodyfikowaną linią komórkową, wywodząca się z linii nieśmiertelnych ludzkich keratynocytów (HaCaT). Zawiera gen świetlika regulowany w taki sposób, że światło jest emitowane w przypadku kontaktu komórek z alergenem (OECD 2022b). Modyfikacja genetyczna przyczyniła się prawdopodobnie do utraty zdolności komórek do produkcji cytokin w porównaniu do linii HaCaT. Na bazie linii HaCaT powstało kilka metod wykorzystujących zdolność tych komórek do produkcji między innymi IL-1 alfa, IL-6 czy IL-18 pod wpływem substancji uczulających (Veen i in., 2014; Jung i in., 2016).

Badając wpływ gęstości komórek na produkcję IL-6 przez keratynocyty zaobserwowano, że komórki nie produkowały IL-6 powyżej poziomu produkowanego przez komórki narażane na kontrolę rozpuszczalnikową w najniższym stężeniu tj. $0,5 \times 10^5$ komórek/ml we wszystkich modelach badawczych. Najwyższe wartości SI (SI=268%) stwierdzono po 48 h ekspozycji komórek NHEK-neonatal stosowanych w stężeniu $2,5 \times 10^5$ /ml, co było najwyższą wartością SI stwierdzoną wśród wszystkich stosowanych modeli badawczych. Takie samo stężenie komórek uznano za optymalne dla wydzielania IL-6 przez innych badaczy oceniających produkcję mediatorów zapalnych przez komórki HaCaT (Jung i in., 2016).

Produkowana przez keratynocyty IL-18 należy do rodziny cytokin IL-1 (Garlanda i in., 2013) i poprzez indukcję wytwarzania IFN-gamma wzmacnia odpowiedź komórek Th1 (Sanders i in., 2016). Ponieważ odgrywa kluczową rolę w indukcji ACD, jest szeroko

stosowana w metodach oceniających potencjał uczulający na skórę, jednak nie zawsze z oczekiwanym rezultatem. Veen i in. uzyskał nieprawidłowe wyniki 19 substancji na 24 testowane, stosując linię komórkową HaCaT i oznaczenie IL-18 jako wskaźnik substancji uczulającej (Veen i in., 2014). Przyczyną takich rezultatów mogło być zastosowanie zbyt wysokiego stężenia komórek ($3,75 \times 10^5$ /dołek) lub analizy produkcji wewnątrzkomórkowej. Najwyższą produkcję IL-18 przez komórki NHEK-neonatal stwierdzono w najniższym stosowanym stężeniu tj. $0,5 \times 10^5$ komórek/ml. Wraz ze wzrostem stężenia komórek produkcja IL-18 wyraźnie malała, a w wyższych stężeniach komórek tj. 1×10^5 ; $2,5 \times 10^5$ oraz 5×10^5 komórek/ml, zewnątrzkomórkowa produkcja IL-18 uległa zahamowaniu w porównaniu z kontrolą rozpuszczalnikową. W przypadku komórek NHEK-adult, stwierdzono stężenia przewyższające stężenie obserwowane w kontroli rozpuszczalnikowej we wszystkich czasach inkubacji oraz wszystkich stężeniach wysiewanych komórek, jednak najwyższą wartość SI obserwowano również w najniższym stężeniu komórek. Te obserwacje potwierdzają wyniki uzyskane dla innej linii komórkowej keratynocytów tj. NCTC2544 (Corsini i in., 2009). Analiza wewnątrzkomórkowej produkcji IL-18 dała dobre rezultaty przy zastosowaniu komórek w niższych stężeniach tj. $1,5 - 2,5 \times 10^5$ /ml (500 ul), zastosowanie stężenia komórek powyżej 5×10^5 /ml powodowało zanik produkcji IL-18. Tak więc, produkcja IL-18 w znacznym stopniu zależy od stężenia komórek, nie jest natomiast zależna od sposobu oznaczania tej cytokiny tj. czy oznaczana jest wewnątrzkomórkowo czy zewnątrzkomórkowo (Tabela 7.1.). Jednak oznaczanie produkcji zewnątrzkomórkowej cytokin w porównaniu do wewnątrzkomórkowej jest prostsze technicznie. Zaletą oznaczania zewnątrzkomórkowego cytokin przy użyciu najczęściej stosowanej metody ELISA jest brak konieczności lizowania komórek oraz dodatkowego oznaczania stężenia białek w celu korekcji wyniku.

Tabela 7.1. Zestawienie podstawowych informacji na temat metod oceniających produkcję IL-18

System badawczy	Sposób oznaczania IL-18	Liczba komórek/dołek	Źródło
HaCaT	Wewnątrzkomórkowa IL-18	$3,75 \times 10^5$ /dołek	Veen i in.
NCTC 2544	Wewnątrzkomórkowa IL-18	$0,75 - 1,25 \times 10^5$ /dołek	Corsini i in.
NHEK – neonatal NHEK - adult	Zewnątrzkomórkowa IL-18	$0,25 \times 10^5$ /dołek	Badania własne

Ostatnią z ocenianych cytokin w mediach pochodowlanych była IL-1 alfa. IL-1 pobudza proliferację keratynocytów oraz inicjuje szybką odpowiedź immunologiczną, prowadząc do ekspresji innych cytokin takich jak IL-6, IL-8 i TNF, (Uchi i in., 2000; Kondo, 1999).

Keratynocyty noworodkowe i pochodzące od dawców dorosłych wykazały zbliżony profil uwalniania IL-1 alfa w odpowiedzi na ekspozycję na substancję uczulającą. Nie obserwowano znaczącego wzrostu wartości SI stosując keratynocyty w dwóch najniższych stężeniach 0,5 oraz 1×10^5 komórek/ml. Komórki stosowane w stężeniu $2,5 \times 10^5$ /ml wyprodukowały najwięcej IL-1 alfa w stosunku do kontroli rozpuszczalnikowej, NHEK-adult już po 5 h ekspozycji na DNCB, NHEK-neonatal dopiero po 48h ekspozycji. W najwyższym stężeniu komórek produkcja IL-1 alfa gwałtownie malała osiągając wartości zbliżone do stężenia uzyskanego w kontroli rozpuszczalnikowej.

Na podstawie wyników poziomu cytokin zapalnych uzyskanych w monokulturze keratynocytów, wybrano keratynocyty pierwotne (NHEK-neonatal, NHEK-adult) do drugiego etapu badań. Spośród wszystkich oznaczanych w monokulturze cytokin wybrano IL-1 alfa, IL-6 oraz IL-18 jako najlepiej rokujące markery działania uczulającego.

7.2. Profil uwalniania cytokin zapalnych przez keratynocyty hodowane w kokulturze bezpośredniej z komórkami dendrytycznymi

W drugim etapie badań zastosowano kokulturę bezpośrednią keratynocytów NHEK-neonatal oraz NHEK-adult z liniami komórek DC-podobnych tj. THP-1 oraz MUTZ-3 aby zweryfikować, czy komórki dendrytyczne wpłyną na profil wydzielania cytokin przez keratynocyty. W tym celu zastosowano kokulturę bezpośrednią, która zapewnia maksymalny kontakt między komórkami, zarówno bezpośredni jak i poprzez rozpuszczalne mediatory (Bogdanowicz i in., 2013). Rozszerzono panel substancji badanych, ponownie zastosowano DNCB jako substancję skrajnie uczulającą, dodatkowo użyto substancji o umiarkowanym działaniu uczulającym (MMP), słabo uczulającym (EU), oraz substancje nieuczulające (2PR, LA). MMP oraz EU to prohapteny, czyli substancje wymagające aktywacji metabolicznej. Obecnie stosowane metody opierające się na jednym z KE, charakteryzują się niską dokładnością w przewidywaniu potencjału uczulającego tego typu substancji (Urbisch i in., 2016). Uważa się, że metody kokulturowe, szczególnie te zawierając komórki, które są źródłem układów enzymatycznych (keratynocyty, fibroblasty) mogą w wydajniejszy sposób wykrywać prohapteny (Lee i in., 2018).

Komórki MUTZ-3 zostały zastosowane w kokulturze jako komórki niezróżnicowane. Już wiele lat temu stwierdzono, że niezróżnicowane komórki MUTZ-3 oraz komórki THP-1

wykazują silną i specyficzną reakcję na substancje uczulające w przeciwieństwie do innych DC-podobnych linii komórkowych takich jak: U937, KG-1, HL-60 czy K-562 (Azam i in., 2006). Jednak, zastosowanie kokultury keratynocytów z komórkami MUTZ-3 nie przyniosło oczekiwanych rezultatów. Nie stwierdzono statystycznie istotnego wzrostu wartości SI dla IL-1 alfa, IL-6 oraz IL-18 po ekspozycji kokultury na substancje uczulające w żadnym protokole badawczym. Podwyższone wartości SI dla IL-1 alfa i IL-18 obserwowano tylko w przypadku najwyższego stężenia substancji skrajnie uczulającej (DNCB), w przypadku kokultury komórek MUTZ-3 z keratynocytami pochodzącymi od dawców dorosłych. Niestety, obserwowano również statystycznie istotny wzrost SI dla IL-1 alfa w przypadku substancji nieuczulającej tj. LA w tym układzie kokultury. Zestawienie komórek MUTZ-3 z keratynocytami noworodkowymi wywołało niewielki wzrost wartości SI dla IL-1 alfa po ekspozycji na prohapteny (MMP, EU).

Odmianą sytuację obserwowano w kokulturze keratynocytów z komórkami THP-1, szczególnie w zestawieniu z keratynocytami noworodkowymi. Zastosowanie systemu badawczego NHEK-neonatal/THP-1 umożliwiło identyfikację zarówno skrajnych (DNCB), umiarkowanych (MMP) jak i słabych substancji uczulających (EU) oraz prawidłową identyfikację substancji jako nieuczulające (LA, 2PR) na podstawie poziomu IL-1 alfa oraz IL-18. Może to potwierdzać tezę, że interakcja pomiędzy keratynocytami i komórkami THP-1 jest aktywnym mechanizmem inicjowanym przez komórki THP-1, które stymulują keratynocyty do większej produkcji cytokin (Thélu i in., 2020; Balszuweit i in., 2014). Statystycznie istotny wzrost wartości SI dla IL-1 alfa oraz IL-18 osiągnął najwyższe wartości w przypadku ekspozycji na prohapteny (MMP, EU) a nie najsilniejszą, zastosowaną substancję uczulającą DNCB, co może potwierdzać zwiększoną zdolność kokultury NHEK-neonatal/THP-1 do aktywacji tego typu substancji. Zastosowanie kokultury komórek THP-1 z keratynocytami pochodzącymi od dawców dorosłych skutkowało nadmierną aktywacją komórek i produkcją cytokin również po ekspozycji na substancje nieuczulające. Stwierdzono statystycznie istotny wzrost wartości SI zarówno dla IL-1 alfa, IL-6, jak i IL-18 w przypadku ekspozycji na LA i 2PR. Reasumując, najlepszym systemem badawczym do oceny substancji uczulających, w tym prohaptenów, jest układ kokultury NHEK-neonatal/THP-1 z zastosowaniem poziomu IL-1 alfa oraz IL-18 jako wskaźników substancji uczulających. Najmniej wydajna okazała się integracja keratynocytów NHEK-adult z komórkami MUTZ-3, gdzie uzyskano wzrost poziomu cytokin zapalnych tylko w przypadku substancji nieuczulających. Natomiast integracja keratynocytów NHEK-adult z komórkami THP-1 skutkowałą uzyskaniem wyników fałszywie pozytywnych.

Jednym z celów cząstkowych rozprawy była weryfikacja możliwości integracji dwóch kluczowych zdarzeń procesu uczulenia skóry (KE2 i KE3). Na podstawie wyników uzyskanych w dwóch pierwszych etapach projektu, zdecydowano, że kokultura komórek NHEK-neonatal/THP-1 umożliwi ocenę reakcji zapalnej keratynocytów na podstawie zwiększonej produkcji IL-1 alfa oraz IL-18 po ekspozycji na substancje uczulające. Kolejnym, trzecim etapem opracowywania metody była integracja punktu końcowego właściwego dla aktywacji komórek dendrytycznych.

7.3. Ocena ekspresji antygenów powierzchniowych komórek dendrytycznych hodowanych w różnych rodzajach kokultury z keratynocytami

Interakcja zachodząca między keratynocytami a komórkami dendrytycznymi jest reakcją obustronną. Z jednej strony komórki THP-1 pobudzają keratynocyty do wydzielania cytokin, z drugiej strony keratynocyty zwiększają aktywację komórek dendrytycznych w odpowiedzi na substancje uczulające. Uważa się, że substancje uczulające indukują ekspresję antygenów powierzchniowych CD86 oraz CD54 na komórkach THP-1 (Sakaguchi i in., 2006). Ohtani i in. wykazali, że uwalniany przez keratynocyty adenosynotrifosforan (ATP) działa synergistycznie z haptenem powodując dojrzewanie komórek dendrytycznych (Ohtani i in. 2009). Wzajemne oddziaływanie pomiędzy keratynocytami a komórkami dendrytycznymi mogą być realizowane poprzez komunikację międzykomórkową o różnym nasileniu (Thélu i in., 2020). W badaniach zweryfikowano, czy rodzaj oraz czas kontaktu keratynocyty-komórki dendrytyczne ma wpływ na ekspresję antygenów powierzchniowych na komórkach THP-1. Zastosowano następujące typy systemów badawczych:

- a) kokultura bezpośrednia umożliwiająca kontakt bezpośredni typu komórka-komórka (sygnalizacja jukstakrynowa),
- b) kokultura pośrednia, w której dwa typy komórek znajdują się w osobnych kompartmentach (sygnalizacja parakrynowa).

W kokulturze pośredniej zastosowano dwa typy ekspozycji komórek. W jednym typie kokultury pośredniej poddawano ekspozycji tylko keratynocyty NHEK-neonatal znajdujące się w górnej komorze układu (narażenie KC), w drugim typie ekspozycji, dodatkowo narażano komórki dendrytyczne THP-1 znajdujące się w dolnym kompartmentcie (narażenie KC/DC). Dodatkowo, zastosowano również monokulturę THP-1 w celach porównawczych. Wszystkie typy hodowli komórkowej poddawano ekspozycji na substancje uczulające (DNCB, MMP, EU) oraz nieuczulające w dwóch przedziałach czasowych tj. 24 h oraz 48 h.

Analiza cytometryczną antygenów powierzchniowych po 24 h ekspozycji na prohapteny EU oraz MMP, wykazała, znacznie wyższą ekspresję antygeny CD54 niż antygeny CD86 we wszystkich systemach badawczych. Poziom ekspresji antygeny CD54 był zdecydowanie wyższy w systemach kokulturowych niż w monokulturze THP-1. Najwyższe wartości SI dla antygeny CD54 stwierdzono w kokulturze bezpośredniej, co sugeruje, że bezpośredni kontakt komórek zwiększa ekspresję tego antygeny w większym stopniu niż oddziaływanie parakryne. Wartości SI dla antygeny CD54 w układzie kokultury bezpośredniej były około dwukrotnie wyższe niż te uzyskane w monokulturze THP-1 (Tabela 7.2.). Wydłużenie inkubacji do 48 h nie wpłynęło w znaczący sposób na zwiększenie wydajności metody w wykrywaniu substancji uczulających.

Co ciekawe, zarówno MMP jak i EU uzyskały negatywne wyniki w teście oceniającym KE2 tj. metodzie KeratinosensTM. Stosując strategię oceny materiałów badanych na podstawie wyników uzyskanych z trzech badań oceniających różne zdarzenia kluczowe (KE), badacze uzyskali dla EU prawidłową klasyfikację (substancja uczulająca) uzyskując dwa pozytywne wyniki w badaniach DPRA oraz teście aktywacji linii komórkowej U-937 (Natsch i in., 2013b). Jednak MMP, został sklasyfikowany jako substancja nieuczulająca, ponieważ uzyskano dwa negatywne wyniki na trzy wykonane badania, co jest niezgodne z predykcją uzyskaną w teście LLNA, uznającą MMP za substancję uczulającą (Natsch i in., 2013b). Stosując kokulturę bezpośrednią komórek NHEK-neonatal oraz THP-1, uzyskano prawidłową klasyfikację obydwu prohaptenów (MMP, EU) jako substancje uczulające po wykonaniu jednego badania, uzyskując statystycznie istotny wzrost produkcji cytokin zapalnych przez keratynocyty (KE2) oraz wzrost ekspresji antygenów powierzchniowych na komórkach THP-1 (KE3). Potwierdza to hipotezę, że metoda kokulturowa jest bardziej wydajna w wykrywaniu prohaptenów, co jest spójne z wynikami uzyskanymi w innych badaniach (Eskes i in., 2019; Galbiati i in., 2020).

Wydaje się, że keratynocyty pierwotne mają wystarczającą aktywność metaboliczną. Wykazano, że NHEK charakteryzują się ekspresją różnych enzymów CYP, w szczególności CYP1A1, 1B1, 2B6, 2E1, oraz 3A (Baron i in., 2001). Szczególnie istotne są enzymy CYP1A1, ponieważ pełnią istotną rolę w przekształcaniu prohaptenów do aktywnych form (Bergström i in., 2007). Proponowana kokultura dwóch rodzajów komórek (NHEK-neonatal/THP-1) okazała się modelem badawczym wystarczającym do oceny potencjału uczulającego prohaptenów. Nie było potrzeby stosowania dodatkowych komórek aktywujących keratynocyty np. fibroblastów tak jak w metodzie trikulturowej wykorzystującej kom. Langerhansa, keratynocyty HaCaT oraz pierwotne skórne fibroblasty (Lee i in., 2018).

Tabela 7.2. Ekspresja antygenów powierzchniowych CD54, CD86 na komórkach THP-1 w różnych układach kokultury NHEK-neonatal/THP-1 i monokulturze THP-1. Przedstawiono wartości średnie z trzech pomiarów cytometrycznych wykonanych po 24 h inkubacji z prohaptenami. Statystycznie istotne wartości SI zaznaczono na niebiesko

Materiał badany/ stężenie [xTC]	Rodzaj systemu badawczego/ekspresja antygeny powierzchniowego [SI%]							
	Kokultura pośrednia, narażenie KC/DC		Kokultura pośrednia, narażenie KC		Kokultura bezpośrednia KC/DC		Monokultura THP-1	
	CD86	CD54	CD86	CD54	CD86	CD54	CD86	CD54
EU 1,2 x TC	177	338	115	163	130	306	120	195
EU 1 x TC	210	336	123	164	129	341	135	180
EU 0,5 x TC	143	185	112	147	115	253	96	115
EU 0,1 x TC	104	118	104	138	98	179	93	91
MMP 1,2 x TC	146	187	128	178	130	216	127	134
MMP 1 x TC	111	156	132	171	126	229	131	125
MMP 0,5 x TC	124	134	102	147	113	175	125	130
MMP 0,1 x TC	97	114	98	105	73	128	104	102

Ponieważ stwierdzono duże różnice wrażliwości komórek THP-1 oraz NHEK-neonatal na badane substancje uczulające, zdecydowano o zastosowaniu w kokulturze stężenia materiału badanego właściwego dla wrażliwszego typu komórek aby nie spowodować nadmiernej cytotoksyczności drugiego typu komórek. Zastosowanie w kokulturze dużo niższego stężenia ekspozycyjnego DNCB niż w monokulturze, mogło przyczynić się do ograniczonej indukcji ekspresji antygenów powierzchniowych na komórkach THP-1 po 24 h ekspozycji. Wydłużenie ekspozycji do 48 h, wywołało wzrost ekspresji antygeny CD54 oraz CD86 w tych systemach badawczych, w których narażano komórki THP-1 oraz stosowano barierę oddzielającą dwa typy komórek (monokultura THP-1; kokultura pośrednia/narażenie KC/DC) (Tabela 7.3.). Takie wyniki mogą również sugerować, że w systemie kokultury bezpośredniej mogło dojść do dezaktywacji DNCB. DNCB jest substancją, która jest detoksykowana przez sprzężenie z glutationem warunkowane przez enzym S-transferazę glutationową (GST), której aktywność wykazują keratynocyty (Pickard i in., 2009; Kazem i in., 2019).

Tabela 7.3. Ekspresja antygenów powierzchniowych CD54, CD86 na komórkach THP-1 w różnych układach kokultury NHEK-neonatal/THP-1 i monokulturze THP-1. Przedstawiono wartości średnie z trzech pomiarów cytometrycznych wykonanych po 24 h inkubacji z DNCB. Statystycznie istotne wartości SI zaznaczono na niebiesko

Czas ekspozycji	Materiał badany/ stężenie [xTC]	Rodzaj systemu badawczego/ekspresja antygeny powierzchniowego [SI%]							
		Kokultura pośrednia, narażenie KC/DC		Kokultura pośrednia, narażenie KC		Kokultura bezpośrednia KC/DC		Monokultura THP-1	
		CD86	CD54	CD86	CD54	CD86	CD54	CD86	CD54
24 h	DNCB 1,2 x TC	113	126	104	96	62	84	121	124
	DNCB 1 x TC	113	94	96	86	78	83	147	113
	DNCB 0,5 x TC	104	92	100	88	82	113	87	103
	DNCB 0,1 x TC	109	107	103	96	68	117	92	92
48h	DNCB 1,2 x TC	229	444	116	75	91	66	285	169
	DNCB 1 x TC	172	295	121	81	90	62	250	147
	DNCB 0,5 x TC	100	90	101	98	73	87	132	99
	DNCB 0,1 x TC	97	83	126	87	99	95	98	91

Dużo niższe stężenia materiałów badanych stosowane w metodach kokulturowych, z jednej strony mogą zmniejszyć czułość takiej metody w wykrywaniu substancji uczulającej, z drugiej strony mogą zwiększyć jej zastosowanie w przypadku substancji trudno rozpuszczalnych. Wykazano, że metoda kokultury bezpośredniej, daje pozytywne rezultaty w nietoksycznych dla THP-1 stężeniach materiału badanego, co potwierdziło doniesienia innych badaczy (Cao i in., 2012). Po 24 godzinach ekspozycji kokultury bezpośredniej NHEK-neonatal/THP-1 na substancje uczulające, żywotność komórek THP-1 przyjmowała wartości powyżej 90%. Jest to pozytywny efekt, w porównaniu do metod monokulturowych stosujących komórki THP-1, gdzie wykazano, wzrostu ekspresji antygeny CD54/CD86 ma miejsce w stężeniach subcytotoksycznych (Miyazawa i in., 2007; Sakaguchi i in., 2006).

Na podstawie uzyskanych wyników, stwierdzono, że układ kokultury bezpośredniej NHEK-neonatal/THP-1 był najlepszym spośród testowanych, systemem badawczym do oceny substancji uczulających na podstawie ekspresji antygeny powierzchniowego CD54 oraz poziomu cytokin IL-1 alfa, IL-18, pomimo uzyskania w tym układzie wyników pozytywnych dla substancji nieuczulającej 2PR. Statystycznie istotny wzrost ekspresji CD54 uzyskano przy wysokich stężeniach 2PR tj. 6000 oraz 5000 µg/ml, dlatego ustalono stosowanie w metodzie finalnej maksymalnego stężenie materiału badanego równego 1000 µg/ml w celu eliminacji wyników fałszywie pozytywnych dla substancji nieuczulających.

7.4. Walidacja metody kokulturowej KC/DC

W toku przeprowadzonych eksperymentów oraz analizy uzyskanych wyników ustalono warunki eksperymentalne dla metody kokulturowej łączącej dwa kluczowe zdarzenia w procesie uczulenia skóry tj. KE2 oraz KE3.

W metodach kokulturowych 2D opracowanych w ostatnich latach wykorzystuje się głównie linie ustanowione keratynocytów (Thelu i in. 2020). Część badaczy stosuje keratynocyty linii komórkowej HaCaT (Balszuweit i in., 2014; Hennen i in., 2017; Frombach i in., 2017; Lee i in., 2018, Eskes i in., 2019; Karri i in., 2021), stosowana jest również linia komórkowa NCTC 2544 (Meloni i in., 2010, Galbiati i in., 2020).

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, okazało się, że spośród wykorzystanych w pracy keratynocytów, zarówno pierwotnych jak i ustanowionych, najlepsze rezultaty uzyskano stosując komórki pierwotne pochodzenia noworodkowego tj. NHEK-neonatal. Keratynocyty pierwotne zostały również zastosowane w kokulturze pośredniej (Schreiner i in., 2007; Cao i in. 2012), kokulturze bezpośredniej z PBMC (Frombach i in., 2018). W ostatnio przedstawionej metodzie kokulturowej zastosowano keratynocyty pierwotne wysiewane na inserty w celu keratynizacji tj. utworzenia wielowarstwowej struktury (Sawada i in., 2022). W stosowanych obecnie do celów regulacyjnych metodach oceniających KE2 nie stosuje się komórek pierwotnych (OECD 2022b).

Jako komórki DC-podobne, w opracowanej metodzie zastosowano komórki THP-1, które są często stosowane w metodach oceniających działanie uczulające na skórę (Meloni i in. 2010; Hennen i in., 2011; Cao i in., 2012; Sawada i in., 2022). Jako najefektywniejszą metodę kokultury, w której uzyskano największą aktywację keratynocytów oraz komórek dendrytycznych wybrano kokulturę bezpośrednią.

Istotną kwestią w metodach kokulturowych jest wybór odpowiedniego stężenia ekspozycyjnego (TC) dla badanych materiałów, ponieważ metody te wykorzystują różne typy komórek różniące się często wrażliwością na badane substancje. W metodach monokulturowych stosowane są stężenia subcytotoksyczne, jednak w toku prac wykazano, że w kokulturze bezpośredniej dochodzi do aktywacji komórek już w stężeniach nietoksycznych. Z tego powodu, zdecydowano o zastosowaniu stężenia materiału badanego właściwego dla wrażliwszego typu komórek. Jest to podejście odmienne do stosowanych przez innych badaczy, którzy oceniają cytotoksyczność:

- a) dla układu kokulturowego (Lee i in., 2018, Karri 2021),
- b) tylko dla komórek dendrytycznych (Galbiati i in., 2020),

- c) zarówno dla monokultur jak i kokultury (Cao i in., 2012),
- d) nie stosują wstępnej oceny cytotoksyczności (Hennen i in., 2011, Sawada i in., 2022).

Ostatnim kluczowym elementem był wybór punktów końcowych dla opracowanej metody. Założeniem początkowym była integracja dwóch punktów końcowych, tj. markera stanu zapalnego keratynocytów oraz markera aktywacji komórek dendrytycznych. Na podstawie uzyskanych wyników wybrano trzy markery, które okazały się najlepsze w warunkach kokultury bezpośredniej. Dla komórek THP-1 zastosowano analizę antygeny powierzchniowego CD54, ponieważ analiza ekspresji antygeny CD86 nie przyniosła oczekiwanych rezultatów. Porównując wyniki ekspresji antygenów powierzchniowych CD54 oraz CD86 na komórkach dendrytycznych z wynikami innych badaczy, można stwierdzić, że komórki DC-podobne charakteryzują się różnicami w ekspresji antygenów powierzchniowych zależnymi od rodzaju użytych komórek DC-podobnych oraz rodzaju użytych keratynocytów. Na przykład, Schreiner i in. stosując kokulturę bezpośrednią ludzkich keratynocytów oraz komórek Langerhansa uzyskanych poprzez stymulację monocytów izolowanych z PBMC, stwierdził zadowalającą indukcję ekspresji antygeny CD86 pod wpływem substancji uczulających (Schreiner i in., 2007). Z kolei kokultura bezpośrednia oraz pośrednia komórek THP-1 i keratynocytów HaCaT skutkowałą indukcją ekspresji obydwu antygenów tj. CD54 oraz CD86 (Hennen i in., 2017; Cao i in., 2012). Jeżeli chodzi o wartości odcięcia dla antygeny CD54 ustaloną przy użyciu krzywych ROC, okazała się ona niższa w porównaniu do metody monokulturowej stosującej komórki THP-1 tj. OECD 442E. Substancje badane, które powodowały wzrost indukcji antygeny powierzchniowego CD54 powyżej 100% uznawano za substancje uczulające, w przypadku metody OECD 442E substancje uznaje się za uczulające gdy $CD54 \geq 200\%$ (OECD 2022c).

Za najbardziej wartościowe markery stanu zapalnego keratynocytów w układzie kokultury uznano IL-1 alfa oraz IL-18. W przypadku metod kokulturowych 2D najczęściej stosowany jest tylko marker oceniający aktywację komórek dendrytycznych (Hennen i in., 2011; Cao i in., 2012, Frombach i in., 2017). Inni autorzy stosujący drugi punkt końcowy w metodach 2D stosowali głównie oznaczenie IL-6 oraz IL-8 (Balszuweit i in., 2014). Oznaczenie IL-1 alfa oraz IL-18 jest szerzej stosowane w metodach 3D wykorzystujących modele zrekonstruowanego naskórka (RhE) lub ekwiwalenty skóry (EE) (Chau i in., 2013; Troese i in., 2016; Bock i in., 2018). Wyznaczone podczas walidacji metody wartości odcięcia dla oznaczanych cytokin oscylują wokół wartości dwukrotnie przekraczającej wartość kontroli rozpuszczalnikowej (dla IL-1 alfa = 177,51%, dla IL-18 = 189,82%) podobnie jak w modelu

3D wykorzystującym pDC oraz ludzki naskórkowy model RhE tj. EpiDermTM (Troese i in. 2015).

Ostatnim etapem badań była walidacja ustalonej metody kokulturowej polegająca na ocenie potencjału uczulającego 14 substancji referencyjnych o znanym działaniu uczulającym bądź nieuczulającym. Ponieważ opracowana metoda kokulturowa, integruje dwa kluczowe zdarzenia tj. KE2 oraz KE3, zastosowano substancje, które wykorzystywane są rutynowo do oceny metod stosujących monokulturę KC oraz monokulturę DC (OECD 2022b; OECD 2022c).

W pierwszej kolejności określono cytotoksyczność materiałów badanych, osobno w stosunku do keratynocytów NHEK-neonatal oraz komórek THP-1, w celu wybrania stężenia ekspozycyjnego (TC) dla kokultury. Jako stężenie ekspozycyjne, stosowano wartość CV75 wrażliwszego typu komórek, w większości przypadków była to wartość wyznaczona dla keratynocytów NHEK-neonatal. Ponieważ w wielu badaniach, wykazano, że efekt cytotoksyczny indukuje produkcję mediatorów zapalnych przez keratynocyty (Jung i in., 2016), zastosowano następujące stężenia końcowe: 0,1x; 0,5x; 1x; 1,2x TC. Analogicznie do obecnie stosowanej, zwalidowanej metody h-CLAT, przeprowadzono dwa niezależne eksperymenty (OECD 2022c). Biorąc po uwagę ekspresję antygenu CD54, dwie substancje zostały nieprawidłowo sklasyfikowane. Substancja słabo uczulająca EGDMA, została sklasyfikowana jako nieuczulająca, w żadnym z zastosowanych stężeń nie stwierdzono indukcji antygenu CD54 powyżej ustalonej wartości odcięcia tj. 100%. Prawdopodobnie, stężenie ekspozycyjne użyte do ekspozycji kokultury było zbyt niskie do aktywacji komórek THP-1, ponieważ odpowiadało wartości wyznaczonej dla wrażliwszych keratynocytów (680 µg/ml). Dla komórek THP-1 nie wyznaczono wartości CV75, ze względu na brak żywotności w najwyższym testowanym stężeniu tj. 1000 µg/ml. Natomiast EGDMA wywołało znaczący wzrost poziomu IL-1 alfa oraz IL-18, ponad dwukrotnie przekraczając wartości odcięcia wyznaczone dla tych parametrów. Zastosowanie monokultury keratynocytów HaCaT nie przyniosło takiego efektu, Jung i in. nie uzyskali wzrostu IL-1 alfa oraz IL-6, klasyfikując EDGMA jako substancję nieuczulającą (Jung i in., 2016). Przypadek EGDMA potwierdza tezę, że komórki dendrytyczne działają synergistycznie z haptenem prowadząc do zwiększonej aktywacji keratynocytów i uwalniania cytokin zapalnych.

Drugą substancją niepoprawnie sklasyfikowaną na podstawie ekspresji antygenu CD54 był kwas salicylowy (SA). SA, substancja nieuczulająca, wywołała statystycznie istotny wzrost ekspresji antygenu CD54. Kwas salicylowy, jest źródłem fałszywie pozytywnych wyników uzyskiwanych za pomocą metod alternatywnych. Jako substancja drażniąca dała fałszywie

pozytywny wynik w metodzie KE1 tj. DPRA (Natsch i in., 2013b), w metodzie KE2 tj. h-CLAT (Nukada i in., 2012) jak również w metodzie kokulturowej COCAT integrującej komórki HaCaT i THP-1 (Eskes i in., 2019). Na podstawie tych danych, można stwierdzić, że kwas salicylowy wywołuje aktywację komórek dendrytycznych, natomiast nie wpływa pobudzająco na keratynocyty, ponieważ nie uzyskano wzrostu poziomu IL-1 alfa oraz IL-18 dla tej substancji.

Substancją, która nie wykazała wzrostu poziomu IL-1 alfa oraz IL-18 był siarczan niklu (NiSO_4). Podobna sytuacja miała miejsce w innych metodach bazujących na pomiarze cytokin zapalnych i wiązano ten fakt z ograniczoną zdolnością siarczanu niklu jako dodatniego kationu do przechodzenia przez błonę komórkową jako (Veen i in., 2014; Jung i in., 2016). Zgodnie z wynikami prezentowanymi przez innych autorów, siarczan niklu wywołał silną indukcję ekspresji antygenu CD54 (Nukada i in., 2012).

Zastosowanie trzech punktów końcowych dało możliwość weryfikacji siedmiu różnych modeli predykcyjnych. Najniższą zdolnością predykcyjną charakteryzował się model wykorzystujący jako marker ocenę poziomu IL-1 alfa (PM2). Na 14 badanych substancji, przy użyciu PM2 nieprawidłowo sklasyfikowano aż 4 z nich (10/14), uzyskując czułość 67%, swoistość 80% a dokładność 71%. Trzy substancje uczulające sklasyfikowano na podstawie tego parametru jako nieuczulające (pPD, NiSO_4 , 2MBT) oraz jedną substancję nieuczulającą (2PR) błędnie uznano za substancję uczulającą. Najlepszą zdolność do wykrywania substancji uczulających wykazały trzy modele predykcyjne PM5, PM6, PM7, a więc modele łączące analizę ekspresji antygenu CD54 z oceną cytokin zapalnych w różnych kombinacjach. Za pomocą tych modeli poprawnie sklasyfikowano wszystkie zastosowane substancje uczulające (9/9) uzyskując czułość równą 100%. Z kolei najwyższą swoistość, czyli zdolność metody do wykrywania substancji nieuczulających stwierdzono w przypadku modelu predykcyjnego PM3, czyli analizy tylko jednego punktu końcowego tj. poziomu IL -18. Wszystkie stosowane substancje nieuczulające (5/5) zostały prawidłowo zaklasyfikowane, model predykcyjny PM3 charakteryzował się swoistością równą 100% jako jedyny wśród wszystkich analizowanych modeli predykcyjnych.

Najwyższą dokładnością, a więc zdolnością uzyskania poprawnego wyniku zarówno pozytywnego jak i negatywnego odznaczała się metoda z zastosowaniem oceny ekspresji antygenu CD54 i poziomu IL -18 (PM6). Zastosowanie tych dwóch punktów końcowych pozwoliło na poprawną identyfikację wszystkich badanych substancji z wyjątkiem SA, który został nieprawidłowo sklasyfikowany jako substancja uczulająca (13/14).

Opracowana metoda badawcza jest interesującą alternatywą dla testów wykorzystujących monokultury gdyż:

- do jej zastosowania nie jest konieczna zgoda komisji etycznej,
- materiały i aparatura konieczna do jej wykonania stanowią typowe wyposażenie laboratorium analitycznego,
- może być łatwo implementowana w innych laboratoriach, ponieważ wykorzystuje powszechnie stosowane metody tj. ELISA i cytometrię przepływową,
- skraca czas badania łącząc KE2 i KE3, protokół eksperymentalny nie wymaga aktywacji komórek (kilka-kilkanaście dni) lub hodowli modeli naskórka (około 3 tyg.),
- obniża koszty badania poprzez integrację KE2 oraz KE3; zastosowanie łatwo dostępnych typów komórek; brak zastosowania dodatkowych materiałów zużywalnych np. insertów,
- pozwala na obniżenie stężenia ekspozycyjnego materiału badanego, przez co umożliwia badanie substancji i materiałów słabo rozpuszczalnych,
- zastosowanie stężenia wagowo/objętościowego materiałów badanych może pozwolić na analizę próbek środowiskowych oraz mieszanin o nieznanym składzie,
- charakteryzuje się wysoką czułością (100%), swoistością (80%) oraz dokładnością (93%).

8. Wnioski

Przedstawione wyniki pozwalają na potwierdzenie tezy pracy sformułowanej przed przystąpieniem do badań. Zakres pracy został zrealizowany, a założone cele główne i częściowe zostały osiągnięte.

Na podstawie wyników przedstawionych w rozprawie sformułowano następujące wnioski:

1. Opracowana metoda kokultury bezpośredniej NHEK-neonatal/THP-1 łączy minimum dwa kluczowe etapy w zakresie działania uczulającego na skórę, to jest KE2 i KE3.
2. Najbardziej wydajnym rodzajem kokultury KC/DC do oceny działania uczulającego na skórę jest kokultura bezpośrednia odzwierciedlająca w większym stopniu procesy *in vivo*.
3. 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.
4. Metoda kokulturowa jest bardziej wydajna w wykrywaniu prohaptenów. Zastosowanie kokultury bezpośredniej NHEK-neonatal/THP-1 pozwala na identyfikację prohaptenów w niższych stężeniach niż układ monokultury. Kokultura bezpośrednia komórek NHEK-neonatal oraz THP-1, pozwala na prawidłową klasyfikację prohaptenów 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).
5. Model badawczy kokultury bezpośredniej KC/DC wykazuje większą aktywność metaboliczną niż systemy monokulturowe.
6. Cytotoksyczność badanego materiału jest specyficzna dla typu komórek dlatego konieczne jest wyznaczenie wartości CV75 dla keratynocytów i komórek

dendrytycznych występujących w kokulturze i stosowanie w badaniach zasadniczych koncentracji substancji badanej, właściwej dla komórek wrażliwszych.

7. 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.
8. 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.

Kierunki dalszych badań

W przyszłości, można podjąć próbę optymalizacji ustalonej metody poprzez:

1. Ustalenie innej metody wyboru stężeń ekspozycyjnych, w celu uniknięcia wyników fałszywie ujemnych np. poprzez ocenę cytotoksyczności w stosunku do kokultury.
2. Oszacowanie wartości odcięcia dla wybranych punktów końcowych poprzez analizę większej liczby substancji uczulających o różnej sile działania.
3. Ustalenie modelu oceny siły działania uczulającego przy zastosowaniu opracowanego modelu badawczego, czyli możliwości subkategoryzacji substancji do kategorii 1A lub 1B.
4. Przeprowadzenie badań międzylaboratoryjnych w celu porównania i weryfikacji uzyskanych wyników.

9. Bibliografia

- Ainscough J. S., Gerberick G.F., Dearman R.J., Kimber I. (2013) Danger, Intracellular Signaling, and the Orchestration of Dendritic Cell Function in Skin Sensitization. *Journal of Immunotoxicology* 10 (3): 223–34. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2012.711782>.
- Akimoto M., Yamamoto Y., Watanabe S., i in. (2020) Oxidation of a cysteine-derived nucleophilic reagent by dimethyl sulfoxide in the amino acid derivative reactivity assay. *Journal of Applied Toxicology* 40: 843– 854. <https://doi.org/10.1002/jat.3948>
- Albanesi C. (2010) Keratinocytes in Allergic Skin Diseases. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 10 (5): 452–56. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32833e08ae>.
- Aptula A. O., Roberts D.W., Pease C.K. (2007) Haptens, prohaptens and prehaptens, or electrophiles and proelectrophiles. *Contact Dermatitis* 56 (1): 54–56. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.00944.x>.
- Aragane Y., Riemann H., Bhardwaj R.S., Schwarz A., Sawada Y., Yamada H., Luger T.A., Kubin M., Trinchieri G., Schwarz T. (1994) IL-12 Is Expressed and Released by Human Keratinocytes and Epidermoid Carcinoma Cell Lines. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 153 (12): 5366–72.
- Avonto C., Chittiboyina A.G., Sadrieh N., Vukmanovic S., Khan I.A. (2018) In chemico skin sensitization risk assessment of botanical ingredients. *Journal of Applied Toxicology* 38 (7): 1047–53. <https://doi.org/10.1002/jat.3614>.
- Avonto C., Chittiboyina A., Rua D., Khan I.A. (2015) A fluorescence high throughput screening method for the detection of reactive electrophiles as potential skin sensitizers. *Toxicology and applied pharmacology* 289. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.09.027>.
- Avonto C., Wang Y-H., Chittiboyina A.G., Vukmanovic S., Khan I.A. (2019) In chemico assessment of potential sensitizers: Stability and direct peptide reactivity of 24 fragrance ingredients. *Journal of Applied Toxicology* 39 (2): 398–408. <https://doi.org/10.1002/jat.3732>.
- Ayehunie S., Snell M., Child M., Klausner M. (2009) A plasmacytoid dendritic cell (CD123+/CD11c-) based assay system to predict contact allergenicity of chemicals. *Toxicology* 264 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.07.021>.
- Azam P., Peiffer J-P., Chamousset D., Tissier M-H., Bonnet P-A., Vian L., Fabre I., Ourlin J-C. (2006) The cytokine-dependent MUTZ-3 cell line as an in vitro model for the screening of contact sensitizers. *Toxicology and Applied Pharmacology* 212 (1): 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.06.018>.
- Bains S. N., Nash P., Fonacier L. (2019) Irritant Contact Dermatitis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 56 (1): 99–109. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8713-0>.
- Balszuweit F., Menacher G., Bloemeke B., Schmidt A., Worek F., Thiermann H., Steinritz D. (2014) Development of a co-culture of keratinocytes and immune cells for in vitro investigation of cutaneous sulfur mustard toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 223 (listopad): 117–24. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.09.002>.
- Baron J. M., Höller D., Schiffer R., Frankenberger S., Neis M., Merk H.F., Jugert F.K. (2001) Expression of Multiple Cytochrome P450 Enzymes and Multidrug Resistance-Associated Transport Proteins in Human Skin Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 116 (4): 541–48. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.01298.x>.
- Basketter D. A., Gerberick G.F. (2022) Skin Sensitization Testing: The Ascendancy of Non-Animal Methods. *Cosmetics* 9 (2). <https://doi.org/10.3390/cosmetics9020038>.
- Battais F., Huppert C., Langonné I., Muller S., Sponne I. (2017) In vitro detection of chemical allergens: an optimized assay using mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Contact Dermatitis* 77 (5): 311–22. <https://doi.org/10.1111/cod.12829>.
- Bauer B., Andersson S.I., Stenfeldt A-L, Simonsson C., Bergström J., Ericson M.B., Jonsson C.A., Broo K.S. (2011) Modification and Expulsion of Keratins by Human Epidermal Keratinocytes upon Hapten Exposure in Vitro. *Chemical Research in Toxicology* 24 (5): 737–43. <https://doi.org/10.1021/tx200030y>.

- Bergström M.A., Ott H., Carlsson A., Neis M., Zwadlo-Klarwasser G., Jonsson C.A., Merk H.F., Karlberg A.T., Baron J.M. (2007) A Skin-Like Cytochrome P450 Cocktail Activates Prohaptens to Contact Allergenic Metabolites. *Journal of Investigative Dermatology* 127 (5): 1145–53. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700638>.
- Bock S., Said A., Müller G., Schäfer-Korting M., Zoschke C., Weindl G. (2018) Characterization of reconstructed human skin containing Langerhans cells to monitor molecular events in skin sensitization. *Toxicology in Vitro* 46: 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.09.019>.
- Bogdanowicz D. R., Luu H. H. (2013) Studying cell-cell communication in co-culture. *Biotechnology Journal* 8 (4): 395–96. <https://doi.org/10.1002/biot.201300054>.
- Bonamonte D., Romita P., Filoni A., Angelini G., Foti C. (2020) Airborne Contact Dermatitis. *The Open Dermatology Journal* 14: 31–37. <https://doi.org/10.2174/1874372202014010031>.
- Bos J. D., Meinardi M.M. (2000) The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental Dermatology* 9 (3): 165–69. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2000.009003165.x>.
- Cao, Y. P., Ma, P. C., Liu, W. D., Zhou, W. Q., Tao, Y., Zhang, M. L., Li, L. J., Chen, Z. Y. (2012) Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals in THP-1/keratinocyte co-cultures. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 34(2), 196–204. <https://doi.org/10.3109/08923973.2011.591800>
- Chanput, W., Mes, J. J., Wichers, H. J. (2014) THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International immunopharmacology*, 23(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
- Chau D. Y., Johnson C., MacNeil S., Haycock J. W., Ghaemmaghami A. M. (2013) The development of a 3D immunocompetent model of human skin. *Biofabrication*, 5(3), 035011. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/5/3/035011>
- Chehregani A., Kouhkan F. (2008) Diesel Exhaust Particles and Allergenicity of Pollen Grains of *Lilium Martagon*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69 (3): 568–73. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.05.007>.
- Chipinda, I., Hettick, J. M., Siegel, P. D. (2011) Haptenation: chemical reactivity and protein binding. *Journal of allergy*, 2011, 839682. <https://doi.org/10.1155/2011/839682>
- Chittiboyina, A. G., Avonto, C., Rua, D., Khan, I. A. (2015) Alternative testing methods for skin sensitization: NMR spectroscopy for probing the reactivity and classification of potential skin sensitizers. *Chemical research in toxicology*, 28(9), 1704–1714. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00098>
- Cho, S. A., An, S., Park, J. H. (2019) High-throughput screening (HTS)-based spectrophotometric direct peptide reactivity assay (Spectro-DPRA) to predict human skin sensitization potential. *Toxicology letters*, 314, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.07.014> Cho, Sun-A, Susun An, i Jae-Hak Park. 2019.
- Cho, S. A., Jeong, Y. H., Kim, J. H., Kim, S., Cho, J. C., Heo, Y., Suh, K. D., Shin, K., An, S. (2014) Method for detecting the reactivity of chemicals towards peptides as an alternative test method for assessing skin sensitization potential. *Toxicology letters*, 225(1), 185–191.
- Chung, H., Quan, H., Jung, D., Ravi, G., Cho, A., Kang, M. J., Kim, E., Che, J. H., Lee, E. S., Jeong, T. C., Heo, Y., Seok, S. H. (2018) Intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the HaCaSens assay: A skin sensitization test using human keratinocytes, HaCaT. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 46, 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.10.01>
- Clouet, E., Kerdine-Römer, S., Ferret, P. J. (2017) Comparison and validation of an in vitro skin sensitization strategy using a data set of 33 chemical references. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 45(Pt 3), 374–385. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.05.014>
- Corsini, E., Galbiati, V., Mitjans, M., Galli, C. L., Marinovich, M. (2012) NCTC 2544 and IL-18 production: a tool for the identification of contact allergens. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 27(3), 1127–1134. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.05.018>
- Corsini, E., Mitjans, M., Galbiati, V., Lucchi, L., Galli, C. L., Marinovich, M. (2009) Use of IL-18 production in a human keratinocyte cell line to discriminate contact sensitizers from irritants

- and low molecular weight respiratory allergens. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 23(5), 789–796. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.04.005>
- Cottrez, F., Boitel, E., Auriault, C., Aeby, P., Groux, H. (2015) Genes specifically modulated in sensitized skins allow the detection of sensitizers in a reconstructed human skin model. Development of the SENS-IS assay. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 29(4), 787–802. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.02.012>
- Cottrez, F., Boitel, E., Ourlin, J. C., Peiffer, J. L., Fabre, I., Henaoui, I. S., Mari, B., Vallauri, A., Paquet, A., Barbry, P., Auriault, C., Aeby, P., Groux, H. (2016) SENS-IS, a 3D reconstituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: Reproducibility and predictivity results from an inter-laboratory study. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 32, 248–260. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.01.007>
- Cumberbatch, M., Dearman, R. J., Antonopoulos, C., Groves, R. W., Kimber, I. (2001) Interleukin (IL)-18 induces Langerhans cell migration by a tumour necrosis factor-alpha- and IL-1beta-dependent mechanism. *Immunology*, 102(3), 323–330. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01187.x>
- Czarnobilska E., Mazur M. (2017) Wpływ zanieczyszczenia środowiska na występowanie chorób alergicznych u dzieci i młodzieży szkolnej w Krakowie. *Lekarz Wojskowy*, 95(1), 32–39.
- da Silva Brito W. A., Mutter F., Wende K., Cecchini A. L., Schmidt A., Bekeschus S. (2022) Consequences of nano and microplastic exposure in rodent models: the known and unknown. *Particle and fibre toxicology*, 19(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12989-022-00473-y>
- Dietz L., Kinzebach S., Ohnesorge S., Franke B., Goette I., Koenig-Gressel D., Thierse H-J. (2013) Proteomic allergen–peptide/protein interaction assay for the identification of human skin sensitizers. *Toxicology in Vitro* 27 (3): 1157–62. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.08.013>.
- Dinkova-Kostova A. T., Holtzclaw W. D., Kensler, T. W. (2005) The Role of Keap1 in Cellular Protective Responses. *Chemical Research in Toxicology*, 18(12), 1779–1791. <https://doi.org/10.1021/tx050217c>
- Dinkova-Kostova A. T., Kostov R. V., Canning P. (2017) Keap1, the cysteine-based mammalian intracellular sensor for electrophiles and oxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 617, 84–93. PubMed. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.08.005>
- EC (2016) Rozporządzenie Komisji (UE) 2016/1688 z dnia 20 września 2016 r. zmieniające załącznik VII do rozporządzenia (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji. (b.d.), Off. J. Eur. Communities 2016
- Edwards A., Roscoe L., Longmore C., Bailey F., Sim B., Treasure C. (2018) Adaptation of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) to animal-product-free conditions. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation* 35 (4). <https://doi.org/10.14573/altex.1710051>.
- Emter R., Ellis, G., Natsch, A. (2010) Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245(3), 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.03.009>
- Emter R., Natsch, A. (2015) A fast Resazurin-based live viability assay is equivalent to the MTT-test in the KeratinoSens assay. *Toxicology in Vitro*, 29(4), 688–693. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.02.003>
- English J., Dawe, R., Ferguson, J. (2003) Environmental effects and skin disease. *British Medical Bulletin*, 68(1), 129–142. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldg026>
- Eskes, C., Hennen, J., Schellenberger, M. T., Hoffmann, S., Frey, S., Goldinger-Oggier, D., Peter, N., Van Vliet, E., Blömeke, B. (2019) The HaCaT/THP-1 Cocultured Activation Test (COCAT) for skin sensitization: a study of intra-lab reproducibility and predictivity. *ALTEX*, 36(4), 613–622. <https://doi.org/10.14573/altex.1905031>
- EU (2008) Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/98/WE z dnia 19 listopada 2008 r. w sprawie odpadów oraz uchylająca niektóre dyrektywy. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/?uri=celex:32008L0098>
- EU (2009) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) NR 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczące produktów kosmetycznych. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&from=fr>

- Ezendam J., Braakhuis H. M., Vandebriel, R. J. (2016) State of the art in non-animal approaches for skin sensitization testing: From individual test methods towards testing strategies. *Archives of Toxicology*, 90(12), 2861–2883. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1842-4>
- Frombach J., Sonnenburg A., Krapohl B.-D., Zuberbier T., Peiser M., Stahlmann R., Schreiner M. (2018) Lymphocyte surface markers and cytokines are suitable for detection and potency assessment of skin-sensitizing chemicals in an in vitro model of allergic contact dermatitis: The LCSA-ly. *Archives of Toxicology*, 92(4), 1495–1505. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2164-5>
- Fujita M., Yamamoto Y., Tahara H., Kasahara T., Jimbo Y., Hioki T. (2014) Development of a prediction method for skin sensitization using novel cysteine and lysine derivatives. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 70(1), 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2014.06.001>
- Fujita M., Yamamoto Y., Wanibuchi S., Katsuoka Y., Kasahara T. (2019) A newly developed means of HPLC-fluorescence analysis for predicting the skin sensitization potential of multi-constituent substances using ADRA. *Toxicology in Vitro*, 59, 161–178. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.04.014>
- Fujita M., Yamamoto Y., Watanabe S., Sugawara T., Wakabayashi K., Tahara Y., Horie N., Fujimoto K., Kusakari K., Kurokawa Y., Kawakami T., Kojima K., Kojima H., Ono A., Katsuoka Y., Tanabe H., Yokoyama H., Kasahara T. (2018) Cause of and countermeasures for oxidation of the cysteine-derived reagent used in the amino acid derivative reactivity assay. *Journal of Applied Toxicology*, 39. <https://doi.org/10.1002/jat.3707>
- Galbiati V., Corsini, E. (2012) The NCTC 2544 IL-18 Assay for the In Vitro Identification of Contact Allergens. *Current Protocols in Toxicology*, 54(1), 20.8.1-20.8.18. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx2008s54>
- Galbiati V., Gibbs S., Roggen E., Corsini, E. (2018) Development of an In Vitro Method to Estimate the Sensitization Induction Level of Contact Allergens. *Current Protocols in Toxicology*, 75(1), 20.15.1-20.15.20. <https://doi.org/10.1002/cptx.44>
- Galbiati V., Maddalon A., Iulini M., Marinovich M., Corsini, E. (2020) Human keratinocytes and monocytes co-culture cell system: An important contribution for the study of moderate and weak sensitizers. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 68, 104929. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104929>
- Garlanda C., Dinarello C. A., Mantovani, A. (2013) The interleukin-1 family: Back to the future. *Immunity*, 39(6), 1003–1018. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.010>
- Gautam R., Jo J., Acharya M., Maharjan A., Lee D., K C P. B., Kim, C., Kim, K., Kim, H., Heo Y. (2022) Evaluation of potential toxicity of polyethylene microplastics on human derived cell lines. *The Science of the Total Environment*, 838(Pt 2), 156089. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156089>
- Gerberick G. F., Troutman A. J., Foertsch M. L., Vassallo D. J., Quijano M., Dobson L. M. R., Goebel C., Lepoittevin J.-P. (2009) Investigation of Peptide Reactivity of Pro-hapten Skin Sensitizers Using a Peroxidase-Peroxide Oxidation System. *Toxicological Sciences*, 112(1), 164–174. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp192>
- Gibbs S., Corsini E., Spiekstra S. W., Galbiati V., Fuchs H. W., DeGeorge G., Troese M., Hayden P., Deng W., Roggen E. (2013) An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272(2), 529–541. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.07.003>
- Gober M., Gaspari A. (2008) Allergic Contact Dermatitis. *W Current Directions in Autoimmunity* (T. 10, s. 1–26). <https://doi.org/10.1159/000131410>
- Goers L., Freemont P., Polizzi K. M. (2014) Co-culture systems and technologies: Taking synthetic biology to the next level. *Journal of the Royal Society, Interface*, 11(96), 20140065. PubMed. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0065>
- Gwaltney-Brant S. (2014) Chapter 22—Immunotoxicity biomarkers. *W R. C. Gupta (Red.), Biomarkers in Toxicology* (s. 373–385). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00022-1>

- Handa S., De D., Mahajan R. (2011) Airborne contact dermatitis—Current perspectives in etiopathogenesis and management. *Indian Journal of Dermatology*, 56(6), 700–706. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.91832>
- Helou D. G., Martin S. F., Pallardy M., Chollet-Martin S., Kerdine-Römer, S. (2019) Nrf2 Involvement in Chemical-Induced Skin Innate Immunity. *Frontiers in Immunology*, 10, 1004–1004. PubMed. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01004>
- Hennen J., Blömeke B. (2017) Keratinocytes improve prediction of sensitization potential and potency of chemicals with THP-1 cells. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*, 34(2). <https://doi.org/10.14573/altex.1606171>
- Hooyberghs J., Schoeters E., Lambrechts N., Nelissen I., Witters H., Schoeters G., Heuvel R. V. D. (2008) A cell-based in vitro alternative to identify skin sensitizers by gene expression. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231(1), 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.03.014>
- Hou F., Xing C., Li B., Cheng J., Chen W. (2020) Performance of a novel in vitro assay for skin sensitization based on activation of T lymphocytes. *ALTEX*, 37(3), 451–468. <https://doi.org/10.14573/altex.2001312>
- Huth L., Moss E., Huth S., Skazik C., Karlberg A., Lepoittevin J., Baron J. M., Merk H. F. (2017) Prohaptens-activation by human cutaneous cytochrome P450 isoenzymes – identified with a modified KeratinoSens assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 137, S265. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.07.625>
- Iram N., Mildner M., Prior M., Petzelbauer P., Fiala C., Hacker S., Schöppl A., Tschachler E., Elbe-Bürger A. (2012) Age-related changes in expression and function of Toll-like receptors in human skin. *Development (Cambridge, England)*, 139(22), 4210–4219. <https://doi.org/10.1242/dev.083477>
- Jenerowicz D., Silny W., Dańczak-Pazdrowska A., Polańska A., Osmola-Mańkowska A., Olek-Hrab, K. (2012) Environmental factors and allergic diseases. *Ann Agric Environ Med.*, 19(3), 475–481.
- Jeon B., Kim M. O., Kim Y., Han H., Yun J.-H., Kim J., Huang Y., Choi Y., Cho C.-H., Kang B., Kim S., Choi T. H. (2019) Optimization and validation of a method to identify skin sensitization hazards using IL-1 α and IL-6 secretion from HaCaT. *Toxicology in Vitro*, 61, 104589. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104589>
- Jeong Y. H., An S., Shin K., Lee T. R. (2013) Peptide reactivity assay using spectrophotometric method for high-throughput screening of skin sensitization potential of chemical haptens. *Toxicology in Vitro*, 27(1), 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.08.032>
- Johansson H., Lindstedt M., Albrekt A.-S., Borrebaeck C. A. (2011) A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests. *BMC Genomics*, 12(1), 399. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-399>
- Jung D., Che J.-H., Lim K.-M., Chun Y.-J., Heo Y., Seok S. H. (2016) Discrimination of skin sensitizers from non-sensitizers by interleukin-1 α and interleukin-6 production on cultured human keratinocytes. *Journal of Applied Toxicology*, 36(9), 1129–1136. <https://doi.org/10.1002/jat.3274>
- Kandárová H., Letašiová S. (2011) Alternative methods in toxicology: Pre-validated and validated methods. *Interdisciplinary Toxicology*, 4(3), 107–113. <https://doi.org/10.2478/v10102-011-0018-6>
- Kansanen E., Kuosmanen S. M., Leinonen H., Levonen A.-L. (2013) The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biology*, 1(1), 45–49. PubMed. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.10.001>
- Kaplan D. H., Igyártó B. Z., Gaspari A. A. (2012) Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nature Reviews Immunology*, 12, 114.
- Karlberg A.-T., Bergström M. A., Börje A., Luthman K., Nilsson J. L. G. (2008) Allergic contact dermatitis—Formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers. *Chemical Research in Toxicology*, 21(1), 53–69. <https://doi.org/10.1021/tx7002239>
- Karlberg A.-T., Börje A., Duus Johansen J., Lidén C., Rastogi S., Roberts D., Uter W., White I. R. (2013) Activation of non-sensitizing or low-sensitizing fragrance substances into potent

- sensitizers – prehapten and prohapten. *Contact Dermatitis*, 69(6), 323–334. <https://doi.org/10.1111/cod.12127>
- Karri V., Lidén C., Fyhrquist N., Högborg J., Karlsson, H. L. (2021) Impact of mono-culture vs. Co-culture of keratinocytes and monocytes on cytokine responses induced by important skin sensitizers. *Journal of immunotoxicology*, 18(1), 74–84. <https://doi.org/10.1080>
- Kaur G., Dufour J. M. (2012) Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*, 2(1), 1–5. <https://doi.org/10.4161/spmg.19885>
- Kazem S., Linssen E. C., Gibbs S. (2019) Skin metabolism phase I and phase II enzymes in native and reconstructed human skin: A short review. *Drug Discovery Today*, 24(9), 1899–1910. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.06.002>
- Keith R.H., Lokshin A., Prosser D., Pepin D., Xiao Q. (2020) Biological Evaluation of the MILLIPLEX® Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A for Disease Profiling of 48 Immune Factors. *The Journal of Immunology*, 204 (1 Supplement) 159.20;
- Kieć-Świerczyńska M. (1998) Alergiczne kontaktowe zapalenie skóry. *Alergia Astma Immunologia*, 3(2), 61–65.
- Kimber I., Basketter D. A., Gerberick G. F., Dearman R. J. (2002) Allergic contact dermatitis. *International Immunopharmacology*, 2(2), 201–211. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00173-4](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00173-4)
- Köck A., Schwarz T., Kirnbauer R., Urbanski A., Perry P., Ansel J. C., Luger T. A. (1990) Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: Evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *The Journal of Experimental Medicine*, 172(6), 1609–1614. <https://doi.org/10.1084/jem.172.6.1609>
- Kondo S. (1999) The roles of keratinocyte-derived cytokines in the epidermis and their possible responses to UVA-irradiation. *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings*, 4(2), 177–183. <https://doi.org/10.1038/sj.jidsp.5640205>
- Kosten I. J., Spiekstra S. W., Gruijl T. D. de, Gibbs S. (2015) MUTZ-3 derived Langerhans cells in human skin equivalents show differential migration and phenotypic plasticity after allergen or irritant exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 287(1), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.05.017>
- Kydonieus A.F., Wille J.J., (1999). *Biochemical Modulation of Skin Reactions: Transdermals, Topicals, Cosmetics*. Boca Raton. CRC Press.
- L Berg E., Hsu Y.-C., Lee J. A. (2014) Consideration of the cellular microenvironment: Physiologically relevant co-culture systems in drug discovery. *Innovative tissue models for drug discovery and development*, 69–70, 190–204. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.01.013>
- Lalko J. F., Dearman R. J., Gerberick G. F., Troutman J. A., Api A. M., Kimber I. (2013) Reactivity of chemical respiratory allergens in the Peroxidase Peptide Reactivity Assay. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 651–661. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.10.016>
- Laubach V., Zöller N., Rossberg M., Görg K., Kippenberger S., Bereiter-Hahn J., Kaufmann R., Bernd A. (2011) Integration of Langerhans-like cells into a human skin equivalent. *Archives of Dermatological Research*, 303(2), 135–139. <https://doi.org/10.1007/s00403-010-1092-x>
- Lee S., Dong D. X., Jindal R., Maguire T., Mitra B., Schloss R., Yarmush M. (2014) Predicting full thickness skin sensitization using a support vector machine. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 28(8), 1413–1423. PubMed. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.07.002>
- Lee S., Greenstein T., Shi L., Maguire T., Schloss R., Yarmush, M. (2018) Tri-culture system for pro-hapten sensitizer identification and potency classification. *Technology*, 6(2), 67–74. <https://doi.org/10.1142/S233954781850005X>
- Lepoittevin J.-P., Leblond I. (2000) Hapten-Peptide-T Cell Receptor Interactions: Molecular Basis for the Recognition of Haptens by T Lymphocytes. *European Journal of Dermatology* 7 (3): 151–54.
- Lukas M., Stössel H., Hefel L., Imamura S., Fritsch P., Sepp N. T., Schuler G., Romani N. (1996) Human Cutaneous Dendritic Cells Migrate Through Dermal Lymphatic Vessels in a Skin Organ Culture Model. *Journal of Investigative Dermatology*, 106(6), 1293–1299. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12349010>

- Luu-The V., Duche D., Ferraris C., Meunier J.-R., Leclaire J., Labrie F. (2009) Expression profiles of phases 1 and 2 metabolizing enzymes in human skin and the reconstructed skin models EpiskinTM and full thickness model from EpiskinTM. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 116(3), 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.05.011>
- Marigliani B., Silva J., Balottin L., Silva K., Baptista L., Campos C., Augusto E. (2018) Adaptation of a skin sensitization assay to a chemically defined culture. *Toxicology in Vitro*, 57. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.12.004>
- Martin S. F., Rustemeyer T., Thyssen J. P. (2018) Recent advances in understanding and managing contact dermatitis. *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-810. PubMed. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13499.1>
- Martins L. E. A. M., Reis V. M. S. dos. (2011) Immunopathology of allergic contact dermatitis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86, 419–433. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000300001>
- McKim J. M., Keller D. J., Gorski J. R. (2010) A new in vitro method for identifying chemical sensitizers combining peptide binding with ARE/EpRE-mediated gene expression in human skin cells. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 29(3), 171–192. <https://doi.org/10.3109/15569527.2010.483869>
- McKim J. M., Keller D. J., Gorski J. R. (2012) An in vitro method for detecting chemical sensitization using human reconstructed skin models and its applicability to cosmetic, pharmaceutical, and medical device safety testing. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 31(4), 292–305. <https://doi.org/10.3109/15569527.2012.667031>
- Meloni M., De Servi B., Le Varlet B. (2010) New approach for chemical sensitizing potential assessment using THP-1 and NCTC 2544 co-culture. *ALTEX*, 27, 90–91.
- Mertl E., Riegel E., Glück N., Ettenberger-Bornberg G., Lin G., Auer S., Haller M., Wlodarczyk A., Steurer C., Kirchnawy C., Czerny T. (2019) A dual luciferase assay for evaluation of skin sensitizing potential of medical devices. *Molecular Biology Reports*, 46(5), 5089–5102. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04964-8>
- Miyazawa M., Ito Y., Yoshida Y., Sakaguchi H., Suzuki H. (2007) Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicology in Vitro*, 21(3), 428–437. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.10.005>
- Nagahata T., Tsujino Y., Takayama E., Hikasa H., Satoh A. (2022) Evaluation of skin sensitization based on interleukin-2 promoter activation in Jurkat cells. *Biomedical Reports*, 16(1), 3. <https://doi.org/10.3892/br.2021.1486>
- Narita K., Ishii Y., Vo P. T. H., Nakagawa F., Ogata S., Yamashita K., Kojima H., Itagaki H. (2018) Improvement of human cell line activation test (h-CLAT) using short-time exposure methods for prevention of false-negative results. *The Journal of Toxicological Sciences*, 43(3), 229–240. <https://doi.org/10.2131/jts.43.229>
- Natsch A. (2009) The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers—Functional Relevance and a Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences*, 113(2), 284–292. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp228>
- Natsch A., Emter R. (2007) Skin Sensitizers Induce Antioxidant Response Element Dependent Genes: Application to the In Vitro Testing of the Sensitization Potential of Chemicals. *Toxicological Sciences*, 102(1), 110–119. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm259>
- Natsch A., Gfeller H. (2008) LC-MS–Based Characterization of the Peptide Reactivity of Chemicals to Improve the In Vitro Prediction of the Skin Sensitization Potential. *Toxicological Sciences*, 106(2), 464–478. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn194>
- Natsch A., Haupt T. (2013a) Utility of Rat Liver S9 Fractions to Study Skin-Sensitizing Prohaptens in a Modified KeratinoSens Assay. *Toxicological Sciences*, 135(2), 356–368. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft160>
- Natsch A., Ryan C. A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick F., Kern P. (2013b) A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, 33(11), 1337–1352. <https://doi.org/10.1002/jat.2868>

- Nepal M. R., Shakya R., Kang M. J., Jeong T. C. (2018) A simple in chemico method for testing skin sensitizing potential of chemicals using small endogenous molecules. *Toxicology Letters*, 289, 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.03.006>
- Neves B., Rosa S., Martins J., Silva A., Gonçalves M., Lopes M., Cruz M. (2013) Development of an in Vitro Dendritic Cell-Based Test for Skin Sensitizer Identification. *Chemical research in toxicology*, 26. <https://doi.org/10.1021/tx300472d>
- Nguyen J., Chen J. K. (2021) Environmental Causes of Dermatitis. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 41(3), 375–392. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2021.04.002>
- Novak-Bilić G., Vučić M., Japundžić I., Meštrović-Štefekov J., Stanić-Duktaj S., Lugović-Mihić L. (2018) Irritant and allergic contact dermatitis - skin lesion characteristic. *Acta Clinica Croatica*, 57(4), 713–720. <https://doi.org/10.20471/acc.2018.57.04.13>
- Nukada Y., Ashikaga T., Miyazawa M., Hirota M., Sakaguchi H., Sasa H., Nishiyama N. (2012) Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicology in Vitro*, 26(7), 1150–1160. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.07.001>
- Nukada Y., Miyazawa M., Kosaka N., Ito Y., Sakaguchi H., Nishiyama N. (2008) Production of IL-8 in THP-1 cells following contact allergen stimulation via mitogen-activated protein kinase activation or tumor necrosis factor-alpha production. *The Journal of toxicological sciences*, 33, 175–185.
- Och F. M. M. V., Loveren H. V., Wolfswinkel J. C. V., Machielsen A. J. C., Vandebriel R. J. (2005) Assessment of potency of allergenic activity of low molecular weight compounds based on IL-1 α and IL-18 production by a murine and human keratinocyte cell line. *Toxicology*, 210(2), 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.01.004>
- OECD (2010a), Test No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071100-en>
- OECD (2010b), *Test No. 442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264090972-en>
- OECD (2014) The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. <https://doi.org/10.1787/9789264221444-en>
- OECD (2018), *Test No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or -FCM*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264090996-en>.
- OECD (2021a), Guideline No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/b92879a4-en>.
- OECD. (2021b) Test No. 406: Skin Sensitisation. <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264070660-en>
- OECD (2022a) Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264229709-en>.
- OECD (2022b) Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264229822-en>
- OECD (2022c) Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264359-en>.
- Ohtani T., Mizuashi M., Nakagawa S., Sasaki Y., Fujimura T., Okuyama R., Aiba, S. (2009) TGF- β 1 dampens the susceptibility of dendritic cells to environmental stimulation, leading to the requirement for danger signals for activation. *Immunology*, 126(4), 485–499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02919.x>

- Ouwehand K., Gibbs S., Roggen E. (2011a) The impact of sensitizing compounds on the interactions between epithelial cells and dendritic cells. W: Pandalai S.G. (red), Progress towards novel testing strategies for in vitro assessment of allergens (55–65). Transworld Research Network
- Ouwehand K., Spiekstra S. W., Waaijman T., Scheper R. J., de Gruijl T. D., Gibbs S. (2011b) Technical Advance: Langerhans cells derived from a human cell line in a full-thickness skin equivalent undergo allergen-induced maturation and migration. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(5), 1027–1033. <https://doi.org/10.1189/jlb.0610374>
- Parise C., Sá-Rocha V., Zveiter de Moraes J. (2015) Skin sensitizer identification by IL-8 secretion and CD86 expression on THP-1 cells. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 30. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.10.004>
- Peiser M., Tralau T., Heidler J., Api A. M., Arts J. H. E., Basketter D. A., English J., Diepgen T. L., Fuhlbrigge R. C., Gaspari A. A., Johansen J. D., Karlberg A. T., Kimber I., Lepoittevin J. P., Liebsch M., Maibach H. I., Martin S. F., Merk H. F., Platzeck T., Luch A. (2012) Allergic contact dermatitis: Epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(5), 763–781. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0846-8>
- Pépin E., Goutet, M., Ban, M. (2007) Murine bone marrow-derived dendritic cells as a potential in vitro model for predictive identification of chemical sensitizers. *Toxicology Letters*, 175(1), 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.09.012>
- Pickard C., Louafi F., McGuire C., Lowings K., Kumar P., Cooper H., Dearman R. J., Cumberbatch M., Kimber I., Healy E., Friedmann P. S. (2009) The Cutaneous Biochemical Redox Barrier: A Component of the Innate Immune Defenses against Sensitization by Highly Reactive Environmental Xenobiotics. *The Journal of Immunology*, 183(11), 7576. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901064>
- Python F., Goebel C., Aeby P. (2007). Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 220(2), 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.12.026>
- Ramirez T., Mehling A., Kollé S. N., Wruck C. J., Teubner W., Eltze T., Aumann A., Urbisch D., Ravenzwaay B. van, Landsiedel R. (2014) LuSens: A keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. *Toxicology in Vitro*, 28(8), 1482–1497. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.08.002>
- Reuter H., Spiekler J., Gerlach S., Engels U., Pape W., Kolbe L., Schmucker R., Wenck H., Diembeck W., Wittern K.-P., Reisinger K., Schepky A. G. (2011) In vitro detection of contact allergens: Development of an optimized protocol using human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *Toxicology in Vitro*, 25(1), 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.09.016>
- Richter A., Schmucker S. S., Esser P. R., Traska V., Weber V., Dietz L., Thierse H.-J., Pennino D., Cavani A., Martin S. F. (2013) Human T cell priming assay (hTCPA) for the identification of contact allergens based on naive T cells and DC – IFN- γ and TNF- α readout. *Toxicology in Vitro*, 27(3), 1180–1185. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.08.007>
- Roberts D. W., Api A. M. (2018) Chemical applicability domain of the local lymph node assay (LLNA) for skin sensitisation potency. Part 4. Quantitative correlation of LLNA potency with human potency. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 96, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.04.022>
- Romani N., B. (2012). Ewolucja poglądów na temat roli komórek Langerhansa. *Dermatologia po Dyplomie*, 3(4), 25–38.
- Rubio L., Marcos R., Hernández A. (2020) Potential adverse health effects of ingested micro- and nanoplastics on humans. Lessons learned from in vivo and in vitro mammalian models. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 23(2), 51–68. <https://doi.org/10.1080/10937404.2019.1700598>
- Russell W. M. S., Burch R.L. (1959) The principles of humane experimental technique. *Medical Journal of Australia*, 1: 500-500. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x>
- Rustemeyer T., van Hoogstraten I. M. W., von Blomberg B. M. E., Gibbs S., Scheper R. J. (2011) Mechanisms of Irritant and Allergic Contact Dermatitis. W J. D. Johansen, P. J. Frosch, &

- J.-P. Lepoittevin (Red.), Contact Dermatitis (s. 43–90). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-03827-3_3
- Saito K., Nukada Y., Takenouchi O., Miyazawa M., Sakaguchi H., Nishiyama N. (2013). Development of a new in vitro skin sensitization assay (Epidermal Sensitization Assay; EpiSensA) using reconstructed human epidermis. *Toxicology in Vitro*, 27(8), 2213–2224. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.08.007>
- Saito K., Takenouchi O., Nukada Y., Miyazawa M., Sakaguchi H. (2016). An in vitro skin sensitization assay termed EpiSensA for broad sets of chemicals including lipophilic chemicals and pre/pro-haptens. *Toxicology in Vitro*, 40. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.12.005>
- Saito K., Takenouchi O., Nukada Y., Miyazawa M., Sakaguchi H. (2017) An in vitro skin sensitization assay termed EpiSensA for broad sets of chemicals including lipophilic chemicals and pre/pro-haptens. *Toxicology in Vitro*, 40, 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.12.005>
- Sakaguchi H., Ashikaga T., Miyazawa M., Yoshida Y., Ito Y., Yoneyama K., Hirota M., Itagaki H., Toyoda H., Suzuki, H. (2006) Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 20(5), 774–784. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.10.014>
- Sanders N. L., Mishra A. (2016) Role of interleukin-18 in the pathophysiology of allergic diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 32, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.07.001>
- Sanderson P. N., Simpson W., Cubberley R., Aleksic M., Gutsell S., Russell P. J. (2016) Mechanistic understanding of molecular initiating events (MIEs) using NMR spectroscopy. *Toxicol. Res.*, 5(1), 34–44. <https://doi.org/10.1039/C5TX00246J>
- Santos G. G. dos, Reinders J., Ouwehand K., Rustemeyer T., Scheper R. J., Gibbs S. (2009) Progress on the development of human in vitro dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236(3), 372–382. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.02.004>
- Sauer U. G., Hill E. H., Curren R. D., Raabe H. A., Kolle S. N., Teubner W., Mehling A., Landsiedel R. (2016). Local tolerance testing under REACH: Accepted non-animal methods are not on equal footing with animal tests. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, 44(3), 281–299. <https://doi.org/10.1177/026119291604400311>
- Sawada Y., Tsukumo H., Fukuda J., Iijima K., Itagaki, H. (2022) Co-Culture of THP-1 Cells and Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEK) for Modified Human Cell Line Activation Test (h-CLAT). *Applied Sciences*, 12(12), 6207. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/app12126207>
- Schellenberger M. T., Bock U., Hennen J., Groeber-Becker F., Walles H., Blömeke B. (2019) A coculture system composed of THP-1 cells and 3D reconstructed human epidermis to assess activation of dendritic cells by sensitizing chemicals after topical exposure. *Toxicology in Vitro*, 57, 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.02.002>
- Schloemer J. A., Zirwas M. J., Burkhart C. G. (2015) Airborne contact dermatitis: Common causes in the USA. *International Journal of Dermatology*, 54(3), 271–274. <https://doi.org/10.1111/ijd.12692>
- Schreiner M., Peiser M., Briechle D., Stahlmann R., Zuberbier T., Wanner R. (2007) A loose-fit coculture of activated keratinocytes and dendritic cell-related cells for prediction of sensitizing potential. *Allergy*, 62(12), 1419–1428. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01511.x>
- Son D., Na Y., Cho W.-S., Lee B.-H., Heo Y., Park J.-H., Seok S. H. (2013) Differentiation of skin sensitizers from irritant chemicals by interleukin-1 α and macrophage inflammatory protein-2 in murine keratinocytes. *Toxicology Letters*, 216(1), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.10.017>
- Sonnenburg A., Schreiner M., Stahlmann R. (2015) Assessment of the sensitizing potency of preservatives with chance of skin contact by the loose-fit coculture-based sensitization assay

- (LCSA). *Archives of Toxicology*, 89(12), 2339–2344. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1406-4>
- Stamatas G. N., Nikolovski J., Mack M. C., Kollias N. (2011) Infant skin physiology and development during the first years of life: A review of recent findings based on in vivo studies. *International Journal of Cosmetic Science*, 33(1), 17–24. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00611.x>
- Stępnik M., Arkusz J. (2003) Molecular events associated with dendritic cells activation by contact sensitizers. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 16(3), 191–199.
- Takahashi T., Kimura Y., Saito R., Nakajima Y., Ohmiya Y., Yamasaki K., Aiba S. (2011) An In Vitro Test to Screen Skin Sensitizers Using a Stable THP-1-Derived IL-8 Reporter Cell Line, THP-G8. *Toxicological Sciences*, 124(2), 359–369. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr237>
- Tan C.H., Rasool S., Johnston G. A. (2014) Contact dermatitis: Allergic and irritant. *Clinics in Dermatology*, 32(1), 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.033>
- Thélu A., Catoire S., Kerdine-Römer S. (2020) Immune-competent in vitro co-culture models as an approach for skin sensitisation assessment. *Toxicology in Vitro*, 62, 104691. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104691>
- Thyssen J. P., Linneberg A., Menné T., Johansen J. D. (2007) The epidemiology of contact allergy in the general population – prevalence and main findings. *Contact Dermatitis*, 57(5), 287–299. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.01220.x>
- Toebak M. J., Pohlmann P. R., Sampat-Sardjoepersad S. C., Blomberg B. M. E. von, Bruynzeel D. P., Scheper R. J., Rustemeyer T., Gibbs S. (2006). CXCL8 secretion by dendritic cells predicts contact allergens from irritants. *Toxicology in Vitro*, 20(1), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.039>
- Tončić R. J., Lipozečić J., Martinac I., Gregurić S. (2011) Immunology of allergic contact dermatitis. *Acta Dermatovenerologica Croatica : ADC*, 19(1), 51–68.
- Troese M., Pratt L. F., Hayden P., Ayehunie S., DeGeorge G. (2015) Progress on the society of toxicology Colgate Palmolive 2014 Grant for alternative research: In vitro assay for identification of dermal sensitizers. *The Toxicologist: Late-Breaking Supplement*, supplement to *Toxicological Sciences*, 144, 8.
- Troese M., Pratt L. F., Hayden P., Ayehunie S., DeGeorge G. (2016) Update on the Society of Toxicology - Colgate Palmolive Grant for Alternative Research: In vitro assay for identification of dermal sensitizers. *The Toxicologist*:150, 4407
- Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada, K. (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer*, 26(2), 171–176. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910260208>
- Uchi H., Terao H., Koga T., Furue M. (2000) Cytokines and chemokines in the epidermis. *Journal of Dermatological Science*, 24, S29–S38. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(00\)00138-9](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(00)00138-9)
- United Nations (2021) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Ninth Revised Edition. https://unece.org/sites/default/files/2021-09/GHS_Rev9E_0.pdf
- Urbisch D., Becker M., Honarvar N., Kolle S. N., Mehling A., Teubner W., Wareing B., Landsiedel R. (2016) Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Nonanimal Test Methods for Skin Sensitization. *Chemical Research in Toxicology*, 29(5), 901–913. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00055>
- Ustawa z dnia 14 grudnia 2012 r. o odpadach, Dz.U. z 2013, poz. 21
- Veen J. W. van der, Pronk T. E., Loveren H. van, Ezendam J. (2013) Applicability of a keratinocyte gene signature to predict skin sensitizing potential. *Toxicology in Vitro*, 27(1), 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.08.023>
- Veen J. W. van der, Rorije E., Emter R., Natsch A., Loveren H. van, Ezendam J. (2014) Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69(3), 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.04.018>

- Vinken M. (2013) The adverse outcome pathway concept: A pragmatic tool in toxicology. *Toxicology*, 312, 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.08.011>
- Visscher M., Narendran V. (2014) The Ontogeny of Skin. *Advances in Wound Care*, 3(4), 291–303. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0467>
- Vittorakis S., Samitas K., Tousa S., Zervas E., Aggelakopoulou M., Semitekolou M., Panoutsakopoulou V., Xanthou G., Gaga M. (2014) Circulating Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cell Subsets Display Distinct Kinetics during In Vivo Repeated Allergen Skin Challenges in Atopic Subjects. *BioMed Research International*, 2014, 231036. <https://doi.org/10.1155/2014/231036>
- Vocanson M., Achachi A., Mutez V., Tailhardat M., Le Varlet B., Rozières A., Fournier P., Nicolas J.-F. (2014) Human T Cell Priming Assay: Depletion of Peripheral Blood Lymphocytes in CD25+ Cells Improves the In Vitro Detection of Weak Allergen-Specific T Cells. *EXS*, 104, 89–100. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0726-5_7
- Vocanson M., Hennino A., Rozières A., Poyet G., Nicolas J.-F. (2009) Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*, 64(12), 1699–1714. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02082.x>
- Williams W. C., Copeland C., Boykin E., Quell S. J., Lehmann D. M. (2015) Development and utilization of an ex vivo bromodeoxyuridine local lymph node assay protocol for assessing potential chemical sensitizers. *Journal of Applied Toxicology*, 35(1), 29–40. <https://doi.org/10.1002/jat.2983>
- Xu H., Bjarnason B., Elmets C. A. (2000) Sensitization versus elicitation in allergic contact dermatitis: Potential differences at cellular and molecular levels. *American Journal of Contact Dermatitis*, 11(4), 228–234. <https://doi.org/10.1053/ajcd.2000.8009>
- Xu H., DiIulio N. A., Fairchild R. L. (1996) T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: Interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (Il) 4/Il-10-producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(3), 1001–1012. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1001>
- Yamamoto Y., Fujita M., Wanibuchi S., Katsuoka Y., Ono A., Kasahara T. (2019). Expanding the applicability of the amino acid derivative reactivity assay: Determining a weight for preparation of test chemical solutions that yield a predictive capacity identical to the conventional method using molar concentration and demonstrating the capacity to detect sensitizers in liquid mixtures. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 97, 67–79. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.01.001>
- Yamamoto Y., Tahara H., Usami R., Kasahara T., Jimbo Y., Hioki T., Fujita M. (2015) A novel in chemico method to detect skin sensitizers in highly diluted reaction conditions. *Journal of Applied Toxicology*, 35(11), 1348–1360. <https://doi.org/10.1002/jat.3139>
- Zeller K., Forreryd A., Lindberg T., Gradin R., Chawade A., Lindstedt M. (2017) The GARD platform for potency assessment of skin sensitizing chemicals. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*, 34(4). <https://doi.org/10.14573/altex.1701101>
- Zeromski J., Samara H., Mozer-Lisiewska I. (2007). Dendritic cells: Do we know everything? *Postępy biologii komórki*, 34(3), 541–556.
- Zhang F., Erskine T., Klapacz J., Settivari R., Marty S. (2018) A highly sensitive and selective high pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC/MS-MS) method for the direct peptide reactivity assay (DPRA). *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 94. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2018.07.004>

10. Załączniki

10.1. Etap I - profil uwalniania cytokin zapalnych przez różne rodzaje keratynocytów hodowanych w monokulturze - dane źródłowe

Tabela 10.1. Ocena cytotoksyczności DNCB wobec keratynocytów

NHEK - neonatal	seria I	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	0,08	0,16	0,31	0,63	1,25	2,50	5,00	10,00
		żywność [%]	184,20	147,88	127,88	154,45	69,23	7,43	3,83	3,89
	seria II	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	0,08	0,16	0,31	0,63	1,25	2,50	5,00	10,00
		żywność [%]	143,00	146,29	54,71	78,79	25,32	9,76	11,37	7,69
	seria III	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	0,08	0,16	0,31	0,63	1,25	2,50	5,00	10,00
		żywność [%]	127,61	121,89	162,93	88,89	35,74	10,57	8,48	8,20
NHEK - adult	seria I	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	0,08	0,16	0,31	0,63	1,25	2,50	5,00	10,00
		żywność [%]	110,00	108,18	203,03	93,53	76,34	47,28	28,01	15,39
	seria II	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	0,08	0,16	0,31	0,63	1,25	2,50	5,00	10,00
		żywność [%]	105,81	124,65	108,17	109,31	75,06	10,49	5,56	6,23
	seria III	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	0,08	0,16	0,31	0,63	1,25	2,50	5,00	10,00
		żywność [%]	108,60	120,95	113,65	120,55	80,94	8,75	3,56	3,78
Unieśmiertelnia linia komórkowa pochodząca z ludzkich keratynocytów	seria I	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	0,08	0,16	0,31	0,63	1,25	2,50	5,00	10,00
		żywność [%]	98,21	90,37	88,72	75,24	72,88	43,79	11,64	39,54
	seria II	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	0,08	0,16	0,31	0,63	1,25	2,50	5,00	10,00
		żywność [%]	117,00	94,25	93,35	73,52	60,90	57,20	35,32	22,71
	seria III	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	0,08	0,16	0,31	0,63	1,25	2,50	5,00	10,00
		żywność [%]	93,70	81,75	82,62	71,86	71,37	56,35	20,77	54,27

Tabela 10.2. Monokultura NHEK-neonatal - stężenie cytokin zapalnych w mediach pohodowlanych

Czas ekspozycji	Stężenie komórek [$\times 10^5/\text{ml}$]	Materiał badany	Marker stanu zapalnego [pg/ml]					
			IL-1 α	IL-6	IL-12 (p40)	IL-12 (p70)	IL-18	TNF α
5 h	0,5	DNBC	70,16	0,62	-	0,56	1,74	0,66
		DMSO	67,44	2,85	-	0,56	1,18	0,21
	1	DNBC	125,40	3,68	-	0,56	2,88	3,14
		DMSO	117,55	9,69	-	0,49	2,40	0,55
	2,5	DNBC	182,55	5,93	-	0,49	2,61	2,24
		DMSO	187,65	16,05	-	0,42	3,57	1,56
5	DNBC	160,57	4,80	-	0,34	2,45	1,22	
	DMSO	169,94	6,92	-	0,56	2,81	1,11	
18 h	0,5	DNBC	101,66	2,90	-	0,42	4,90	3,14
		DMSO	71,32	4,88	-	0,49	-	0,55
	1	DNBC	111,66	16,63	-	0,86	1,04	21,88
		DMSO	102,72	12,50	-	0,49	-	0,89
	2,5	DNBC	191,95	12,66	-	0,38	0,54	3,54
		DMSO	235,97	22,90	-	0,45	0,76	2,58
5	DNBC	195,26	7,69	-	0,34	1,29	2,35	
	DMSO	169,68	8,55	-	0,49	1,15	1,84	
24 h	0,5	DNBC	170,73	9,55	-	0,42	2,77	3,71
		DMSO	132,38	21,44	-	0,34	-	2,46
	1	DNBC	134,28	6,20	-	0,31	-	2,01
		DMSO	136,72	8,67	-	0,34	0,26	1,90
	2,5	DNBC	102,19	11,41	-	0,42	0,51	15,42
		DMSO	81,70	10,23	-	0,49	-	1,11
5	DNBC	67,05	2,32	-	0,34	0,48	2,58	
	DMSO	70,34	4,56	-	0,42	-	2,13	
48 h	0,5	DNBC	126,58	10,57	-	0,34	-	5,06
		DMSO	132,10	15,58	-	0,42	-	3,71
	1	DNBC	192,56	8,62	-	0,42	1,22	3,54
		DMSO	169,83	9,89	-	0,42	-	2,97
	2,5	DNBC	133,44	24,80	-	0,49	0,79	36,01
		DMSO	69,85	8,96	-	0,34	-	2,92
5	DNBC	0,01	0,73	-	0,27	-	-	
	DMSO	0,20	0,97	-	0,34	-	-	
-	-	stężenie nieoznaczalne	-	-	-	-	-	Wartość poniżej dolnej granicy oznaczalności

Tabela 10.3. Monokultura NHEK-adult. Stężenie cytokin zapalnych w mediach pochodowlanych.

Czas ekspozycji	Stężenie komórek [x10 ⁵ /ml]	Material	Marker stanu zapalnego [pg/ml]					
			IL-1α	IL-6	IL-12 (p40)	IL-12 (p70)	IL-18	TNFα
5 h	0,5	DNBC	422,28	2,07	0,02	0,64	4,24	1,11
		DMSO	401,02	5,73	0,41	0,64	3,43	1,11
	1	DNBC	593,59	6,85	0,02	0,49	6,65	2,69
		DMSO	661,74	15,47	0,02	0,64	5,76	1,68
	2,5	DNBC	1845,45	75,02	0,80	0,79	15,28	14,34
		DMSO	1009,50	35,67	0,02	0,49	6,65	3,37
5	DNBC	866,65	41,82	0,02	0,49	6,10	4,16	
	DMSO	802,90	37,31	0,41	0,56	3,80	2,69	
18 h	0,5	DNBC	323,66	12,28	0,41	0,64	3,07	6,19
		DMSO	339,31	14,75	0,41	0,71	1,73	2,46
	1	DNBC	580,74	40,57	0,41	0,71	5,73	6,65
		DMSO	537,08	25,54	0,02	0,56	2,08	5,18
	2,5	DNBC	389,33	13,60	0,02	0,49	3,98	3,93
		DMSO	449,89	17,96	-	0,56	3,28	4,27
5	DNBC	531,98	22,31	0,02	0,64	12,80	4,61	
	DMSO	585,14	23,74	0,41	0,71	9,57	4,61	
24 h	0,5	DNBC	450,09	7,43	0,99	0,49	10,07	2,80
		DMSO	388,86	23,23	-	0,42	0,35	3,93
	1	DNBC	612,81	66,21	0,80	0,71	3,98	15,82
		DMSO	912,17	71,93	0,80	0,86	1,57	11,62
	2,5	DNBC	1004,73	81,71	0,41	0,49	6,21	14,00
		DMSO	690,01	50,81	-	0,49	0,68	9,02
5	DNBC	855,66	60,13	0,02	0,42	5,25	10,66	
	DMSO	984,17	77,65	0,02	0,56	2,95	14,23	
48h	0,5	DNBC	201,35	5,81	0,41	0,56	2,97	5,18
		DMSO	284,11	47,46	0,41	0,56	1,04	8,57
	1	DNBC	555,75	218,07	0,80	0,64	7,06	17,74
		DMSO	609,68	90,14	0,80	0,71	4,61	17,63
	2,5	DNBC	600,34	94,59	0,80	0,64	6,97	18,31
		DMSO	603,39	62,81	0,80	0,56	5,37	15,93
5	DNBC	773,66	19,79	0,80	0,71	29,48	11,28	
	DMSO	741,06	24,25	0,80	0,64	15,86	12,30	

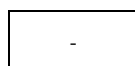
-

stężenie nieznaczalne

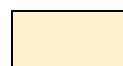
Wartość poniżej dolnej granicy oznaczalności

Tabela 10.4. Monokultura komórek uniesmiertelnionej linii komórkowej pochodzącej z ludzkich keratynocytów. Stężenie cytokin zapalnych w mediach pochodowlanych

Czas ekspozycji	Stężenie komórek [x10 ⁵ /ml]	Material	Marker stanu zapalnego [pg/ml]					
			IL-1α	IL-6	IL-12 (p40)	IL-12 (p70)	IL-18	TNFα
5 h	0,5	DNBC	0,09	1,16	-	-	0,34	-
		DMSO	0,28	4,02	-	-	0,34	-
	1	DNBC	0,64	4,21	-	-	0,27	-
		DMSO	2,17	7,21	-	-	0,27	-
	2,5	DNBC	0,14	5,02	-	-	0,27	-
		DMSO	0,40	8,16	-	-	0,34	-
5	DNBC	0,44	1,94	-	-	0,13	-	
	DMSO	0,56	1,98	-	-	0,27	-	
18 h	0,5	DNBC	0,02	4,72	-	-	0,27	-
		DMSO	0,85	14,25	-	-	0,27	0,10
	1	DNBC	0,90	12,60	-	-	0,13	0,10
		DMSO	0,40	12,68	-	-	0,20	0,10
	2,5	DNBC	0,35	16,71	-	-	0,27	0,21
		DMSO	0,26	10,76	-	-	0,20	0,10
	5	DNBC	0,20	8,47	-	-	0,20	-
		DMSO	0,26	10,62	-	-	0,20	-
24 h	0,5	DNBC	0,87	5,19	-	-	0,13	-
		DMSO	1,26	5,46	-	-	0,27	-
	1	DNBC	0,54	7,06	-	-	0,20	-
		DMSO	0,79	12,44	-	-	0,27	0,32
	2,5	DNBC	1,06	18,78	-	-	0,20	0,72
		DMSO	4,63	21,93	-	-	0,20	0,32
	5	DNBC	3,60	12,15	-	-	0,27	-
		DMSO	4,09	18,55	-	-	0,34	0,44
48 h	0,5	DNBC	3,56	15,04	-	-	0,27	0,55
		DMSO	1,85	18,19	-	-	0,27	1,34
	1	DNBC	6,13	27,44	-	-	0,27	3,03
		DMSO	7,22	43,97	-	-	0,34	3,25
	2,5	DNBC	4,27	18,23	-	-	0,34	1,22
		DMSO	4,67	28,41	-	-	0,42	1,34
	5	DNBC	2,52	15,87	-	-	0,27	0,44
		DMSO	1,55	8,32	-	-	0,27	0,10



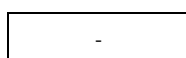
stężenie nieznaczalne



Wartość poniżej dolnej granicy oznaczalności

Tabela 10.5 Monokultura NHEK – neonatal. Wartości SI

Stężenie komórek [x10 ⁵ /ml]	Czas ekspozycji [h]	Wartości SI [%]					
		IL-1α	IL-6	IL-12 (p40)	IL-12 (p70)	IL-18	TNF-α
0,5	5	104,0	-	-	-	147,5	-
	18	142,5	59,4	-	-	765,6	-
	24	129,0	44,5	-	-	432,8	-
	48	95,8	67,8	-	-	-	-
1	5	106,7	38,0	-	-	120,0	-
	18	108,7	133,0	-	-	162,5	341,9
	24	98,2	71,5	-	-	-	-
	48	113,4	87,2	-	-	190,6	-
2,5	5	97,3	36,9	-	-	73,1	-
	18	81,3	55,3	-	-	-	-
	24	125,1	111,5	-	-	-	240,9
	48	191,0	276,8	-	-	123,4	562,7
5	5	94,5	69,4	-	-	87,2	-
	18	115,1	89,9	-	-	112,2	-
	24	95,3	50,9	-	-	-	-
	48	-	75,3	-	-	-	-



Stężenie cytokiny poniżej LLOQ

Tabela 10.6. Monokultura NHEK – adult. Wartości SI

Stężenie komórek [x10 ⁵ /ml]	Czas ekspozycji [h]	Wartości SI [%]					
		IL-1α	IL-6	IL-12 (p40)	IL-12 (p70)	IL-18	TNF-α
0,5	5	105,3	36,2	-	-	123,6	-
	18	95,4	83,3	-	-	177,5	-
	24	115,7	32,0	-	-	1573,8	-
	48	70,9	12,2	-	-	285,6	-
1	5	89,7	44,3	-	-	115,5	-
	18	108,1	158,8	-	-	275,0	103,9
	24	67,2	92,1	-	-	252,6	136,1
	48	91,2	241,9	-	-	153,1	100,6
2,5	5	182,8	210,3	-	-	229,7	224,1
	18	86,5	75,7	-	-	121,0	-
	24	145,6	160,8	-	-	917,4	155,2
	48	99,5	150,6	-	-	129,9	114,9
5	5	107,9	112,1	-	-	160,3	-
	18	90,9	94,0	-	-	133,8	-
	24	86,9	77,4	-	-	177,7	74,9
	48	104,4	81,6	-	-	185,9	91,7

-

Stężenie cytokiny poniżej LLOQ

Tabela 10.7. Monokultura unieśmiertelnionej . Wartości SI

Stężenie komórek [x10 ⁵ /ml]	Czas ekspozycji [h]	Wartości SI [%]					
		IL-1α	IL-6	IL-12 (p40)	IL-12 (p70)	IL-18	TNF-α
0,5	5	-	28,9	-	-	-	-
	18	-	33,1	-	-	-	-
	24	-	95,1	-	-	-	-
	48	-	82,7	-	-	-	-
1	5	-	58,4	-	-	-	-
	18	-	99,4	-	-	-	-
	24	-	56,8	-	-	-	-
	48	84,9	62,4	-	-	-	-
2,5	5	-	61,5	-	-	-	-
	18	-	155,3	-	-	-	-
	24	-	85,6	-	-	-	-
	48	-	64,2	-	-	-	-
5	5	-	98,0	-	-	-	-
	18	-	79,8	-	-	-	-
	24	-	65,5	-	-	-	-
	48	-	190,7	-	-	-	-

-

Stężenie IL-1α poniżej LLOQ

10.2. Etap II - profil uwalniania cytokin zapalnych przez keratynocyty hodowane w kokulturze bezpośredniej z komórkami dendrytycznymi – dane źródłowe

Tabela 10.8. Wyniki testu cytotoksyczności - DNCB

NHEK - neonatal	seria I	stężenie [µg/ml]	0,39	0,78	1,56	3,13	6,25	12,50	25,00	50,00	
		żywność [%]	95,02	77,92	12,75	10,36	10,37	10,79	10,39	9,87	
	seria II	stężenie [µg/ml]	0,39	0,78	1,56	3,13	6,25	12,50	25,00	50,00	
		żywność [%]	92,73	75,56	15,14	12,83	14,26	14,97	19,14	18,62	
NHEK - adult	seria I	stężenie [µg/ml]	0,04	0,08	0,16	0,31	0,63	1,25	2,50	5,00	
		żywność [%]	173,79	154,61	117,31	193,00	70,65	11,44	7,36	7,29	
	seria II	stężenie [µg/ml]	0,04	0,08	0,16	0,31	0,63	1,25	2,50	5,00	
		żywność [%]	122,39	94,00	97,34	95,86	87,54	48,02	10,96	11,02	
THP-1	seria I	stężenie [µg/ml]	0,04	0,08	0,16	0,31	0,63	1,25	2,50	5,00	
		żywność [%]	95,63	80,03	78,34	79,75	70,49	37,03	7,95	6,39	
	seria II	stężenie [µg/ml]	0,04	0,08	0,16	0,31	0,63	1,25	2,50	5,00	
		żywność [%]	140,70	117,74	115,25	117,33	103,71	54,48	11,69	9,40	
MUTZ-3	seria I	stężenie [µg/ml]	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50	125,00	
		żywność [%]	124,56	160,38	14,84	7,81	17,93	11,41	7,85	8,57	
	seria II	stężenie [µg/ml]	0,98	1,95	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50	125,00	
		żywność [%]	117,74	95,27	58,47	36,76	16,85	10,83	10,35	23,38	
	seria II	stężenie [µg/ml]	0,39	0,78	1,56	3,13	6,25	12,50	25,00	50,00	
		żywność [%]	83,88	76,89	65,41	38,12	10,77	15,42	7,08	28,98	
	MUTZ-3	seria I	stężenie [µg/ml]	0,03	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,90
			żywność [%]	85,01	82,90	94,90	96,61	89,96	77,28	30,23	13,11
seria II		stężenie [µg/ml]	0,03	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,90	
		żywność [%]	76,97	75,06	85,93	87,48	81,45	69,98	23,37	11,87	
seria II		stężenie [µg/ml]	0,03	0,06	0,12	0,24	0,49	0,98	1,95	3,90	
		żywność [%]	77,08	85,11	83,18	94,04	89,76	54,85	21,55	8,40	

Tabela 10.9. Wyniki testu cytotoksyczności - EU

NHEK - neonatal	seria I	stężenie [µg/ml]	7,80	15,60	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00	1000,00
		żywność [%]	90,78	75,52	82,48	80,94	73,93	74,80	65,58	48,08
	seria II	stężenie [µg/ml]	7,80	15,60	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00	1000,00
		żywność [%]	95,47	90,01	90,53	79,02	72,64	71,02	71,83	69,31
NHEK - adult	seria I	stężenie [µg/ml]	7,80	15,60	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00	1000,00
		żywność [%]	114,07	102,69	92,52	83,18	76,09	70,01	71,25	60,28
	seria II	stężenie [µg/ml]	7,80	15,60	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00	1000,00
		żywność [%]	108,20	92,78	87,98	85,31	76,17	69,39	65,76	47,60
THP-1	seria I	stężenie [µg/ml]	7,80	15,60	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00	1000,00
		żywność [%]	126,96	137,84	135,93	118,83	108,74	65,44	67,26	17,95
	seria II	stężenie [µg/ml]	7,80	15,60	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00	1000,00
		żywność [%]	106,58	115,71	114,11	99,76	91,29	54,93	56,47	15,07
MUTZ-3	seria I	stężenie [µg/ml]	7,80	15,60	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00	1000,00
		żywność [%]	113,86	102,17	88,10	79,55	81,86	54,17	36,93	16,10
	seria II	stężenie [µg/ml]	7,80	15,60	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00	1000,00
		żywność [%]	142,04	123,50	90,39	80,90	74,81	50,45	27,25	12,07
	seria II	stężenie [µg/ml]	7,80	15,60	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00	1000,00
		żywność [%]	132,87	114,49	89,35	79,97	73,95	45,23	23,90	11,93

Tabela 10.12. Wyniki testu cytotoxyczności – 2PR

NHEK - neonatal	seria I	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	39,06	78,13	156,25	312,50	625,00	1250,00	2500,00	5000,00
		żywołność [%]	133,48	133,93	122,79	131,14	112,47	107,79	97,28	102,15
seria II	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	7,80	15,60	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00	1000,00	
	żywołność [%]	142,53	146,17	128,32	140,51	111,26	110,76	96,32	103,83	
seria II	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	39,06	78,13	156,25	312,50	625,00	1250,00	2500,00	5000,00	
	żywołność [%]	151,74	128,23	114,26	101,65	96,77	95,46	90,99	95,94	
NHEK - adult	seria I	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	39,06	78,13	156,25	312,50	625,00	1250,00	2500,00	5000,00
	żywołność [%]	111,88	115,46	105,81	120,40	102,23	92,62	79,27	106,43	
seria II	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	39,06	78,13	156,25	312,50	625,00	1250,00	2500,00	5000,00	
	żywołność [%]	135,98	134,29	126,55	119,52	86,99	99,39	111,95	132,25	
seria II	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	39,06	78,13	156,25	312,50	625,00	1250,00	2500,00	5000,00	
	żywołność [%]	152,55	94,16	92,43	85,57	103,62	97,89	100,37	91,42	
THP-1	seria I	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	39,06	78,13	156,25	312,50	625,00	1250,00	2500,00	5000,00
	żywołność [%]	148,39	126,88	107,59	113,52	101,82	102,74	97,99	95,30	
seria II	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	39,06	78,13	156,25	312,50	625,00	1250,00	2500,00	5000,00	
	żywołność [%]	127,72	118,80	109,03	96,42	98,43	97,22	98,10	85,25	
seria II	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	39,06	78,13	156,25	312,50	625,00	1250,00	2500,00	5000,00	
	żywołność [%]	222,95	184,80	116,34	91,77	158,24	235,23	98,12	96,14	
MUTZ-3	seria I	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	39,06	78,13	156,25	312,50	625,00	1250,00	2500,00	5000,00
	żywołność [%]	150,45	119,37	103,44	106,90	109,44	112,83	111,34	140,37	
seria II	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	39,06	78,13	156,25	312,50	625,00	1250,00	2500,00	5000,00	
	żywołność [%]	137,63	120,71	110,17	87,35	105,40	99,64	97,15	93,81	
seria II	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	39,06	78,13	156,25	312,50	625,00	1250,00	2500,00	5000,00	
	żywołność [%]	143,66	126,00	114,99	96,49	97,11	96,59	89,29	97,92	

Tabela 10.13. Stężenie cytokin zapalnych oraz wartości SI. Kokultura bezpośrednia 48 h NHEK – neonatal/THP-1

material	Stężenie materiału badanego [$\times\text{TC}$]	IL-1				IL-6				IL-18			
		Stężenie [pg/ml]		SI [%]		Stężenie [pg/ml]		SI [%]		Stężenie [pg/ml]		SI [%]	
		Seria I	Seria II	\bar{x}	SD	Seria I	Seria II	\bar{x}	SD	Seria I	Seria II	\bar{x}	SD
DNCB	1 x TC	55,49	48,58	160,52	14,38	49,7	53,47	54,3	55,16	5,65	10,19	172,38	18,71
	0.5 x TC	38,04	39,87	120,20	4,52	41,7	136,35	58,7	27,74	5,54	12,97	196,15	56,70
	0.1x TC	47,68	27,39	115,72	43,76	43,1	335,76	88,6	10,85	6,24	10,08	179,69	5,54
MMP	1 x TC	80,74	112,13	297,70	69,78	33,5	164,63	55,0	11,07	6,95	12,74	213,92	25,66
	0.5 x TC	69,15	64,88	206,75	8,41	35,0	162,18	56,1	13,62	9,26	11,97	239,44	30,27
	0.1x TC	62,55	68,49	202,19	13,84	24,6	192,92	50,7	6,49	14,01	33,68	504,06	154,74
EU	1 x TC	137,80	115,02	389,93	48,00	38,7	132,41	55,3	24,49	5,33	11,53	180,08	42,34
	0.5 x TC	101,99	105,21	319,67	8,42	38,4	187,7	62,9	12,94	7,76	3,50	141,17	109,49
	0.1x TC	43,65	56,80	155,03	29,37	33,1	303,17	74,5	17,55	10,96	8,09	228,05	114,11
LA	1 x TC	184,99	60,68	451,17	194,33	1,0	3,64	3,4	0,67	37,12	15,17	574,93	721,89
	0.5 x TC	80,53	89,87	360,45	147,41	28,4	348,78	200,3	118,16	5,49	57,82	203,13	60,25
	0.1x TC	33,79	39,28	155,31	67,59	31,2	109,63	108,9	27,80	3,02	9,02	63,32	35,33
2PR	1 x TC	26,17	25,53	107,64	34,47	26,3	85,74	88,9	27,11	6,57	9,73	116,73	106,60
	0.5 x TC	23,81	26,90	107,42	44,78	19,2	103,68	81,6	3,85	6,68	2,12	102,17	131,74
	0.1x TC	36,51	44,74	173,75	81,44	28,7	109,69	103,6	20,28	7,44	13,16	136,74	114,28
DMSO	0,2%	32,51	32,31	-	-	53,3	348,9	-	-	3,55	5,49	-	-
medium	-	31,43	19,34	-	-	24,3	122,89	-	-	3,42	23,53	-	-

Tabela 10.14. Stężenie cytokin zapalnych oraz wartości SI. Kokultura bezpośrednia 48 h NHEK – neonatal/MUTZ-3

material	Stężenie materiału badanego	IL-1				IL-6				IL-18			
		Stężenie [pg/ml]		SI [%]		Stężenie [pg/ml]		SI [%]		Stężenie [pg/ml]		SI [%]	
		Seria I	Seria II	\bar{x}	SD	Seria I	Seria II	\bar{x}	SD	Seria I	Seria II	\bar{x}	SD
DNCB	1 x TC	64,69	60,96	89,47	2,80	12,2	10,48	35,0	0,61	21,37	17,78	91,32	43,02
	0.5 x TC	44,63	53,31	69,80	9,49	22,8	22,41	70,0	5,44	11,45	11,55	53,73	24,38
	0.1x TC	74,22	86,79	114,74	13,88	34,4	37,45	111,5	16,72	17,25	18,03	82,44	37,32
MMP	1 x TC	73,54	103,65	126,35	31,67	19,7	20,59	62,5	7,56	13,02	13,88	62,87	28,44
	0.5 x TC	53,64	90,53	102,87	38,25	8,1	21	46,3	32,34	8,62	13,80	52,56	25,85
	0.1x TC	100,70	106,96	147,93	7,88	27,0	27,4	84,3	8,36	16,88	16,83	78,74	35,76
EU	1 x TC	94,98	98,71	137,96	5,23	41,0	40,99	127,0	11,35	7,93	9,30	40,30	18,30
	0.5 x TC	110,64	114,33	160,24	5,43	19,6	19,61	60,6	5,58	17,62	18,37	84,10	38,07
	0.1x TC	171,66	109,98	200,25	59,98	49,5	24,72	112,4	43,86	25,34	18,24	101,54	50,37
LA	1 x TC	280,49	256,70	170,34	149,72	N	N	-	-	0,63	0,63	11,79	6,46
	0.5 x TC	125,57	68,09	70,38	75,34	562,6	449,81	216,6	64,95	8,52	2,18	98,02	78,56
	0.1x TC	68,77	56,58	40,96	37,84	232,4	251,35	101,9	9,23	5,64	5,21	101,39	55,53
2PR	1 x TC	67,76	87,83	44,39	31,58	48,0	61,77	22,9	0,73	30,48	31,21	577,51	316,59
	0.5 x TC	113,52	67,32	64,35	67,09	94,2	65,56	34,4	13,49	35,82	22,05	536,95	316,84
	0.1x TC	71,13	42,61	40,37	41,96	125,5	79,4	44,3	20,11	7,41	8,97	153,80	85,98
DMSO	0,2%	32,51	32,31	-	-	53,3	348,9	-	-	3,55	5,49	-	-
medium	-	31,43	19,34	-	-	24,3	122,89	-	-	3,42	23,53	-	-
<i>N – stężenie nieoznaczalne</i>													

Tabela 10.15. Stężenie cytokin. Kokultura bezpośrednia 5 h NHEK – adult/THP-1

material	Stężenie materiału badanego	IL-1				IL-6				IL-18			
		Stężenie [pg/ml]		SI [%]		Stężenie [pg/ml]		SI [%]		Stężenie [pg/ml]		SI [%]	
		Seria I	Seria II	\bar{x}	SD	Seria I	Seria II	\bar{x}	SD	Seria I	Seria II	\bar{x}	SD
DNCB	1 x TC	694,14	290,78	64,34	18,65	156,0	148,39	19,16	4,06	20,96	16,17	151,17	35,32
	0.5 x TC	314,73	374,97	50,56	21,79	364,7	338,88	44,20	8,66	9,21	10,33	83,99	40,36
	0.1x TC	303,24	287,89	42,26	11,86	465,1	440,52	56,98	11,92	10,05	12,14	96,37	50,73
MMP	1 x TC	373,45	476,71	62,79	29,80	605,2	605,75	76,57	18,93	18,28	11,48	117,55	10,61
	0.5 x TC	490,32	504,85	71,79	24,07	625,6	604,33	77,53	17,27	18,00	10,27	110,12	2,48
	0.1x TC	491,47	328,60	56,35	2,06	534,0	507,97	65,59	13,92	17,98	9,95	108,32	0,10
EU	1 x TC	337,54	487,27	61,71	33,95	575,5	633,41	77,07	24,03	12,28	14,76	117,36	61,41
	0.5 x TC	612,03	286,81	59,41	12,66	896,0	727,96	100,82	10,30	12,47	12,58	106,06	43,81
	0.1x TC	596,41	279,99	57,93	12,27	731,6	696,31	89,89	19,11	29,36	11,10	148,84	39,49
LA	1 x TC	241,46	216,27	116,83	50,87	904,7	930,1	108,64	20,07	5,81	5,60	101,41	4,62
	0.5 x TC	189,74	266,11	125,77	88,02	923,9	1017,35	115,40	26,80	5,16	6,46	103,95	23,75
	0.1x TC	253,77	271,32	138,33	75,46	756,9	768,27	90,24	15,87	6,73	6,19	114,69	1,43
2PR	1 x TC	222,32	238,04	121,31	66,28	813,6	949,31	105,15	28,59	6,27	6,95	117,91	16,97
	0.5 x TC	208,37	242,07	120,40	71,60	818,6	1202,83	122,15	51,89	5,68	10,00	141,43	64,33
	0.1x TC	180,84	189,04	97,06	51,62	1021,5	869,13	110,71	5,75	4,63	4,60	82,10	5,50
DMSO	0,2%	895,34	568,46	-	-	957,9	673,41	-	-	16,61	9,18	-	-
medium	-	298,64	141,54	-	-	1050,1	757,24	-	-	5,92	5,35	-	-

Tabela 10.16. Stężenie cytokin. Kokultura 48 h NHEK – adult/THP-1

material	Stężenie materiału badanego	IL-1				IL-6				IL-18			
		Stężenie [pg/ml]		SI [%]		Stężenie [pg/ml]		SI [%]		Stężenie [pg/ml]		SI [%]	
		Seria I	Seria II	\bar{x}	SD	Seria I	Seria II	\bar{x}	SD	Seria I	Seria II	\bar{x}	SD
DNCB	1 x TC	22,68	94,99	145,34	18,84	152,9	211,88	58,50	11,86	5,11	6,30	83,92	16,32
	0.5 x TC	20,72	70,22	118,95	2,35	298,3	256,58	89,38	11,86	6,08	7,44	99,42	18,81
	0.1x TC	27,89	54,23	126,46	50,74	393,8	207,63	97,30	44,92	6,73	4,68	83,12	17,27
MMP	1 x TC	47,28	81,46	205,63	98,39	458,5	496,15	153,44	4,50	7,27	20,90	209,82	151,10
	0.5 x TC	59,06	106,75	261,04	117,00	410,5	424,42	134,25	0,39	9,67	5,30	108,64	40,07
	0.1x TC	63,87	110,05	277,79	132,90	251,4	346,9	95,95	19,17	11,75	14,01	189,35	32,42
EU	1 x TC	90,13	124,93	366,65	223,41	786,5	646,25	230,87	38,01	11,92	4,06	115,18	75,89
	0.5 x TC	78,58	106,60	317,72	197,52	659,7	688,29	216,74	0,75	15,42	19,76	258,90	57,26
	0.1x TC	48,68	77,44	206,35	108,90	388,3	407,73	127,98	1,02	5,38	10,05	114,24	53,79
LA	1 x TC	150,29	528,99	494,75	4,10	874,8	820,18	240,80	26,33	14,23	5,19	131,24	74,40
	0.5 x TC	70,58	277,26	245,75	17,03	481,5	548,84	145,74	4,16	11,04	11,70	159,95	24,49
	0.1x TC	58,31	60,68	124,75	96,63	302,7	390,1	97,72	11,25	6,19	6,11	86,27	8,91
2PR	1 x TC	47,58	73,55	112,97	63,05	433,1	479,32	129,13	1,01	4,95	4,57	66,60	3,74
	0.5 x TC	54,48	53,88	115,25	92,14	465,6	429,79	127,25	15,31	3,77	4,47	58,22	13,45
	0.1x TC	57,80	65,90	126,33	92,01	347,6	386,57	103,89	1,17	4,81	10,68	111,98	70,48
DMSO	0,2%	17,18	59,87	-	-	305,1	316,79	-	-	7,06	6,60	-	-
medium	-	30,2	107,55	-	-	337,22	369,15	-	-	7,74	3,71	-	-

Tabela 10.17. Stężenie cytokin. Kokultura bezpośrednia 48h NHEK – adult/MUTZ-3

material	Stężenie materiału badanego	IL-1				IL-6				IL-18			
		Stężenie [pg/ml]		SI [%]		Stężenie [pg/ml]		SI [%]		Stężenie [pg/ml]		SI [%]	
		Seria I	Seria II	\bar{x}	SD	Seria I	Seria II	\bar{x}	SD	Seria I	Seria II	\bar{x}	SD
DNCB	1 x TC	269,54	198,48	185,61	104,92	311,1	194,02	28,13	11,24	47,46	33,25	175,15	88,57
	0.5 x TC	55,34	53,54	41,70	16,46	515,4	486,13	55,18	6,50	3,80	4,50	17,13	2,69
	0.1x TC	117,43	50,99	70,90	59,79	645,0	656,22	71,55	4,62	14,09	2,49	39,51	43,96
MMP	1 x TC	243,26	69,39	136,71	138,25	786,9	870,6	90,93	0,49	11,04	5,92	37,67	24,94
	0.5 x TC	94,49	55,72	61,18	42,28	616,2	753,07	74,92	4,86	10,15	6,60	36,59	20,16
	0.1x TC	59,29	48,96	42,32	20,97	652,4	634,28	70,83	6,84	10,35	8,35	40,06	16,69
EU	1 x TC	52,69	62,10	42,82	11,26	842,1	841,92	92,63	7,12	2,96	3,96	14,12	1,01
	0.5 x TC	90,58	57,72	59,85	38,82	860,0	845,98	93,89	8,30	10,74	5,16	35,63	25,70
	0.1x TC	36,90	96,07	44,75	12,98	685,7	702,37	76,31	4,56	3,71	17,01	38,08	27,56
LA	1 x TC	411,24	432,46	490,04	30,85	17,8	4,45	1,22	1,03	1,36	1,64	18,18	6,78
	0.5 x TC	103,55	64,30	97,00	29,55	1084,8	933,13	111,49	11,08	2,82	2,13	32,51	21,39
	0.1x TC	69,92	51,27	70,15	13,38	898,8	773,29	92,39	9,17	1,92	5,02	36,71	6,04
2PR	1 x TC	29,86	52,93	48,32	20,26	1001,3	988,33	109,97	0,25	1,94	4,27	33,81	1,48
	0.5 x TC	32,89	51,98	49,48	17,02	783,3	945,26	95,58	13,33	2,31	8,00	52,16	18,59
	0.1x TC	48,72	37,74	50,07	7,64	799,7	840,27	90,65	3,80	8,77	3,25	87,34	85,99
DMSO	0,2%	103,75	178,14	-	-	862,2	961,12	-	-	19,96	29,55	-	-
medium	-	87,83	84,49	-	-	909,09	900,22	-	-	5,92	12,25	-	-

10.3. Etap III - ocena ekspresji antygenów powierzchniowych komórek dendrytycznych hodowanych w różnych rodzajach kokultury z keratynocytami – dane źródłowe

Tabela 10.18. Kokultura pośrednia – narażenie KC/DC 24 h

Material badany	Stężenie materiału badanego [µg/ml]	CD86 [RFI %]			\bar{x}	SD	CD54 [RFI %]			\bar{x}	SD
		seria I	seria II	seria III			seria I	seria II	seria III		
EU	140,4	230	125	176	177	53	364	212	438	338	116
	117	317	109	203	210	104	457	161	389	336	155
	58,5	161	127	140	143	17	218	159	177	185	30
	11,7	83	99	130	104	24	115	102	138	118	19
MMP	49,2	173	128	137	146	24	209	170	181	187	20
	41,0	145	129	61	111	45	173	225	71	156	78
	20,5	99	131	142	124	22	140	141	120	134	12
	4,1	77	100	115	97	19	98	112	134	114	18
DNCB	0,88	103	117	120	113	9	121	122	134	126	7
	0,73	113	106	121	113	7	94	95	94	94	1
	0,37	104	112	95	104	9	103	87	87	92	9
	0,07	112	108	107	109	3	105	102	113	107	5
2PR	6000	129	104	80	104	24	196	136	116	149	42
	5000	113	98	94	102	10	187	118	124	143	38
	2500	100	119	77	99	21	121	92	103	105	15
	500	104	93	84	94	10	104	96	108	102	6
LA	3300	98	547	81	242	264	58	192	53	101	79
	2750	75	50	80	68	16	59	26	92	59	33
	1375	49	56	82	62	17	95	75	130	100	28
	275	79	90	90	86	6	83	95	113	97	15

Tabela 10.19. Kokultura pośrednia – narażenie KC 24h

Material badany	Stężenie materiału badanego [µg/ml]	CD86 [RFI %]			\bar{x}	SD	CD54 [RFI %]			\bar{x}	SD
		seria I	seria II	seria III			seria I	seria II	seria III		
EU	140,4	126	121	98	115	15	138	208	143	163	39
	117	171	111	87	123	43	186	184	121	164	37
	58,5	131	117	88	112	22	130	226	86	147	72
	11,7	124	111	77	104	24	122	184	108	138	41
MMP	49,2	153	118	112	128	22	169	233	131	178	52
	41,0	160	128	106	132	27	182	205	127	171	40
	20,5	121	79	105	102	21	147	182	111	147	35
	4,1	126	79	89	98	25	109	112	95	105	9
DNCB	0,88	140	101	71	104	35	86	94	109	96	12
	0,73	134	89	65	96	35	91	82	84	86	5
	0,37	131	93	75	100	28	93	95	76	88	10
	0,07	140	97	73	103	34	99	97	93	96	3
2PR	6000	98	88	72	86	13	93	117	106	105	12
	5000	114	88	58	86	28	132	101	90	108	21
	2500	106	94	92	98	7	107	103	690	300	338
	500	91	79	100	90	10	88	99	92	93	5
LA	3300	77	62	55	65	11	96	104	96	99	5
	2750	80	81	49	70	18	102	90	91	94	7
	1375	80	82	61	74	12	89	91	84	88	3
	275	82	87	88	86	3	87	94	97	93	5

Tabela 10.20 Kokultura bezpośrednia 24 h

Material badany	Stężenie materiału badanego [$\mu\text{g/ml}$]	CD86 [RFI %]			\bar{x}	SD	CD54 [RFI %]			\bar{x}	SD
		seria I	seria II	seria III			seria I	seria II	seria III		
EU	140,4	217	108	66	130	78	283	335	298	306	27
	117	215	107	63	129	78	400	322	300	341	53
	58,5	177	111	58	115	60	247	283	228	253	28
	11,7	151	97	46	98	52	150	193	195	179	25
MMP	49,2	202	130	57	130	72	246	196	205	216	26
	41,0	187	126	66	126	60	264	189	234	229	38
	20,5	168	113	58	113	55	159	153	212	175	32
	4,1	73	86	59	73	14	116	116	151	128	20
DNCB	0,88	87	55	44	62	22	106	79	66	84	20
	0,73	114	61	59	78	31	98	85	66	83	16
	0,37	129	68	50	82	41	124	91	125	113	19
	0,07	106	61	38	68	35	108	86	157	117	36
2PR	6000	149	51	33	78	62	21	150	214	128	98
	5000	93	62	37	64	28	190	137	177	168	28
	2500	97	86	42	75	29	116	115	133	121	10
	500	70	89	73	77	10	95	95	100	97	3
LA	3300	72	154	36	87	61	27	14	9	17	9
	2750	65	51	27	48	19	82	29	23	45	32
	1375	70	87	65	74	12	143	104	92	113	26
	275	77	105	93	92	14	112	99	91	101	11

Tabela 10.21. Monokultura THP-1 24 h

Material badany	Stężenie materiału badanego [$\mu\text{g/ml}$]	CD86 [RFI %]			\bar{x}	SD	CD54 [RFI %]			\bar{x}	SD
		seria I	seria II	seria III			seria I	seria II	seria III		
EU	140,4	109	162	88	120	38	247	166	171	195	45
	117	102	163	140	135	30	161	150	231	180	44
	58,5	115	80	91	96	18	108	97	138	115	21
	11,7	119	83	77	93	23	89	78	105	91	13
MMP	49,2	123	143	115	127	14	123	149	130	134	13
	41,0	119	143	131	131	12	125	119	130	125	6
	20,5	139	129	106	125	17	141	139	109	130	18
	4,1	105	112	95	104	9	105	108	92	102	8
DNCB	0,88	73	94	195	121	65	87	156	130	124	35
	0,73	78	104	259	147	98	92	110	138	113	23
	0,37	73	87	100	87	13	99	118	92	103	13
	0,07	88	88	99	92	7	104	72	101	92	18
2PR	6000	148	77	101	109	36	131	107	113	117	13
	5000	84	99	99	94	9	100	124	119	114	13
	2500	73	97	91	87	12	96	124	79	100	23
	500	108	101	87	99	11	71	110	68	83	23
LA	3300	150	250	133	178	63	100	88	113	100	12
	2750	140	93	130	121	25	134	120	133	129	8
	1375	70	75	92	79	11	129	96	126	117	18
	275	76	94	105	92	15	121	112	102	112	9

Tabela 10.22. Kokultura pośrednia – narażenie KC/DC 48h.

Material badany	Stężenie materiału badanego [ug/ml]	CD86 [RFI %]			\bar{x}	SD	CD54 [RFI %]			\bar{x}	SD
		seria I	seria II	seria III			seria I	seria II	seria III		
EU	140,4	195	270	120	195	75	252	311	192	252	59
	117	389	199	95	228	149	532	271	160	321	191
	58,5	264	144	85	164	91	322	164	127	205	104
	11,7	99	74	73	82	15	126	87	91	101	21
MMP	49,2	270	183	89	181	91	277	164	161	201	66
	41,0	225	165	107	166	59	195	161	137	164	29
	20,5	177	144	152	157	17	186	130	138	151	31
	4,1	120	140	81	114	30	112	92	100	101	10
DNCB	0,88	128	142	416	229	162	112	92	1129	444	593
	0,73	153	97	266	172	86	96	100	688	295	340
	0,37	129	90	81	100	26	98	84	89	90	7
	0,07	111	97	85	97	13	110	71	69	83	23
2PR	6000	73	81	64	73	9	88	63	47	66	21
	5000	81	99	73	84	14	121	67	55	81	35
	2500	102	75	104	93	16	105	58	57	73	27
	500	83	104	71	86	16	80	71	60	70	10
LA	3300	113	136	669	306	314	37	22	102	54	43
	2750	115	100	189	135	48	156	78	33	89	62
	1375	44	58	71	58	13	90	95	203	129	64
	275	73	67	81	74	7	83	70	148	100	42

Tabela 10.23. Kokultura pośrednia – narażenie KC 48 h

Material badany	Stężenie materiału badanego [ug/ml]	CD86 [RFI %]			\bar{x}	SD	CD54 [RFI %]			\bar{x}	SD
		seria I	seria II	seria III			seria I	seria II	seria III		
EU	140,4	163	140	185	163	23	168	227	108	168	59
	117	131	115	157	135	21	195	208	105	169	56
	58,5	120	89	130	113	21	169	162	100	144	38
	11,7	111	65	134	103	35	114	102	69	95	23
MMP	49,2	128	107	143	126	18	223	162	103	162	60
	41,0	161	82	177	140	51	237	151	105	164	67
	20,5	113	90	128	110	19	147	135	93	125	28
	4,1	118	68	125	104	31	121	99	58	93	32
DNCB	0,88	130	74	144	116	37	87	87	50	75	22
	0,73	192	52	120	121	70	93	92	58	81	20
	0,37	145	48	109	101	49	105	93	95	98	6
	0,07	163	67	148	126	52	99	95	68	87	17
2PR	6000	63	52	116	77	34	99	80	64	81	18
	5000	70	65	115	84	28	126	103	73	101	26
	2500	93	72	122	96	25	114	105	81	100	17
	500	91	65	131	96	33	106	93	109	103	9
LA	3300	65	40	65	57	14	114	111	157	128	26
	2750	77	72	67	72	5	99	120	138	119	19
	1375	91	71	74	79	11	113	107	144	121	20
	275	128	88	98	105	21	100	96	120	105	13

Tabela 10.24. Kokultura bezpośrednia 48 h

Materiał badany	Stężenie materiału badanego [μg/ml]	CD86 [RFI %]			\bar{x}	SD	CD54 [RFI %]			\bar{x}	SD
		seria I	seria II	seria III			seria I	seria II	seria III		
EU	140,4	65	64	66	65	1	174	242	106	174	68
	117	128	60	67	85	37	285	225	70	193	111
	58,5	90	52	66	70	19	182	123	60	122	61
	11,7	86	40	42	56	26	123	102	57	94	34
MMP	49,2	112	56	73	80	29	190	105	70	122	62
	41,0	97	74	83	85	12	170	152	79	134	48
	20,5	83	53	70	69	15	145	119	70	111	38
	4,1	75	38	49	54	19	107	92	68	89	19
DNCB	0,88	172	44	58	91	70	102	44	53	66	31
	0,73	182	41	48	90	79	99	48	40	62	32
	0,37	112	45	63	73	35	112	80	69	87	23
	0,07	198	41	59	99	86	110	91	86	95	13
2PR	6000	45	47	59	50	7	95	137	75	102	32
	5000	45	35	60	47	13	145	111	79	112	33
	2500	53	63	87	68	18	111	106	73	97	20
	500	104	87	83	91	11	100	99	85	95	8
LA	3300	39	53	114	69	40	4	3	8	5	3
	2750	69	49	57	58	10	63	77	32	58	23
	1375	51	63	98	71	25	109	115	141	122	17
	275	83	73	86	80	7	94	90	92	92	2

Tabela 10.25. Monokultura THP-1 48 h

Materiał badany	Stężenie materiału badanego [μg/ml]	CD86 [RFI %]			\bar{x}	SD	CD54 [RFI %]			\bar{x}	SD
		seria I	seria II	seria III			seria I	seria II	seria III		
EU	140,4	116	112	119	116	4	190	220	160	190	30
	117	117	99	137	117	19	159	186	149	165	19
	58,5	134	105	114	118	15	136	164	88	129	39
	11,7	150	86	107	114	33	135	119	78	111	29
MMP	49,2	192	128	179	166	34	154	138	100	130	28
	41,0	208	134	320	221	94	135	140	108	128	17
	20,5	156	123	205	161	41	110	118	103	110	7
	4,1	99	100	137	112	22	94	105	73	91	16
DNCB	0,88	95	124	636	285	304	101	114	293	169	107
	0,73	102	141	507	250	224	92	129	219	147	65
	0,37	178	87	130	132	45	104	106	88	99	10
	0,07	105	79	111	98	17	104	95	74	91	16
2PR	6000	103	97	87	96	8	100	102	83	95	10
	5000	138	93	75	102	32	109	117	72	99	24
	2500	140	100	86	109	28	109	123	88	107	18
	500	91	104	79	91	13	114	106	63	94	28
LA	3300	243	130	280	218	78	71	122	156	116	43
	2750	93	59	119	90	30	159	179	163	167	10
	1375	33	54	53	47	12	85	107	86	93	13
	275	73	80	179	110	59	106	99	79	95	14

Tabela 10.26. Żywotność komórek THP – 1 oceniana w analizie cytometrycznej przy użyciu jodku propidyny. Kokultura pośrednia NHEK-neonatal/THP-1; narażenie KC/DC

Material badany	Stężenie materiału badanego [µg/ml]	Inkubacja 24 h					Inkubacja 48 h				
		seria I	seria II	seria III	\bar{x}	SD	seria I	seria II	seria III	\bar{x}	SD
EU	140,4	88,59	89,09	77,14	84,94	6,76	70,82	67,51	71,18	69,84	2,02
	117	93,24	91,73	81,40	88,79	6,45	71,02	68,03	69,07	69,38	1,52
	58,5	94,64	90,21	89,39	91,41	2,83	72,69	66,35	69,58	69,54	3,17
	11,7	95,70	94,01	90,79	93,50	2,49	81,44	75,22	77,66	78,10	3,14
MMP	49,2	92,82	88,88	84,08	88,60	4,38	67,83	64,92	71,73	68,16	3,42
	41,0	91,37	88,98	84,98	88,44	3,23	70,89	64,17	73,12	69,39	4,66
	20,5	93,68	92,24	90,18	92,03	1,76	77,95	73,44	75,39	75,59	2,26
	4,1	94,92	94,19	90,17	93,10	2,56	85,39	77,42	83,62	82,14	4,18
DNCB	0,88	95,49	95,55	90,14	93,73	3,10	81,90	82,76	74,27	79,64	4,68
	0,73	95,62	95,30	88,76	93,23	3,87	83,78	79,30	81,75	81,61	2,24
	0,37	95,73	95,70	91,12	94,18	2,65	84,43	82,34	87,99	84,92	2,86
	0,07	95,83	95,02	90,92	93,92	2,63	83,83	83,18	86,66	84,56	1,85
2PR	6000	96,41	95,14	90,81	94,12	2,94	83,50	81,54	85,42	83,49	1,94
	5000	95,30	95,06	88,92	93,09	3,62	85,67	77,28	88,43	83,80	5,81
	2500	95,92	94,29	90,56	93,59	2,75	80,89	80,67	88,29	83,28	4,34
	500	95,95	94,71	92,40	94,35	1,80	83,15	82,03	88,16	84,45	3,27
LA	3300	66,16	27,16	54,70	49,34	20,04	3,52	11,24	19,47	11,41	7,98
	2750	88,88	68,53	80,11	79,18	10,21	86,15	61,27	44,29	63,90	21,05
	1375	95,84	95,42	90,92	94,06	2,73	89,62	89,76	87,53	88,97	1,25
	275	95,87	94,56	91,57	94,00	2,20	83,89	82,71	86,70	84,43	2,05

Tabela 10.27. Żywotność komórek THP – 1 oceniana w analizie cytometrycznej przy użyciu jodku propidyny. Kokultura pośrednia NHEK-neonatal/THP-1; narażenie KC

Material badany	Stężenie materiału badanego [µg/ml]	Inkubacja 24 h					Inkubacja 48 h				
		seria I	seria II	seria III	\bar{x}	SD	seria I	seria II	seria III	\bar{x}	SD
EU	140,4	93,39	95,28	90,46	93,04	2,43	75,00	67,67	81,17	74,61	6,76
	117	94,99	94,67	91,11	93,59	2,15	65,87	71,67	79,90	72,48	7,05
	58,5	95,53	94,73	91,10	93,79	2,36	75,29	78,57	82,58	78,81	3,65
	11,7	96,67	93,75	92,59	94,34	2,10	83,29	88,03	82,25	84,52	3,08
MMP	49,2	93,20	94,05	89,30	92,18	2,53	68,46	76,48	82,29	75,74	6,94
	41,0	94,86	92,25	89,81	92,31	2,53	76,21	80,78	82,11	79,70	3,09
	20,5	96,01	94,12	89,42	93,18	3,40	78,43	86,35	83,37	82,72	4,00
	4,1	96,24	94,88	92,98	94,70	1,64	80,72	88,77	84,61	84,70	4,03
DNCB	0,88	95,74	93,78	91,93	93,82	1,91	86,35	91,05	84,89	87,43	3,22
	0,73	96,37	94,80	91,93	94,37	2,25	84,11	91,05	84,63	86,60	3,87
	0,37	96,03	94,04	90,76	93,61	2,66	85,76	92,01	89,94	89,24	3,18
	0,07	96,32	93,68	90,45	93,48	2,94	84,74	92,03	87,19	87,98	3,71
2PR	6000	93,89	94,16	91,79	93,28	1,30	87,60	90,20	83,76	87,19	3,24
	5000	96,08	93,97	91,70	93,91	2,19	78,71	91,07	83,55	84,44	6,23
	2500	95,71	94,36	91,66	93,91	2,06	79,60	93,29	86,47	86,45	6,85
	500	96,23	98,08	91,67	95,33	3,30	81,59	91,50	86,03	86,37	4,96
LA	3300	95,40	94,86	92,07	94,11	1,79	91,08	90,19	87,55	89,61	1,83
	2750	95,78	94,87	92,77	94,48	1,54	89,79	92,03	86,16	89,33	2,96
	1375	96,46	94,96	91,65	94,36	2,46	83,11	91,78	85,00	86,63	4,56
	275	95,60	94,81	92,25	94,22	1,75	83,46	89,49	86,28	86,41	3,01

Tabela 10.28. Żywotność komórek THP – 1 oceniana w analizie cytometrycznej przy użyciu jodku propidyny. Kokultura bezpośrednia NHEK-neonatal/THP-1

Material badany	Stężenie materiału badanego [µg/ml]	Inkubacja 24 h					Inkubacja 48 h				
		seria I	seria II	seria III	\bar{x}	SD	seria I	seria II	seria III	\bar{x}	SD
EU	140,4	86,41	90,04	81,29	85,91	4,39	71,02	64,66	75,40	70,36	5,40
	117	92,30	91,78	83,91	89,33	4,70	71,41	66,44	76,86	71,57	5,21
	58,5	94,72	93,61	90,79	93,04	2,03	75,45	71,21	80,47	75,71	4,64
	11,7	96,68	94,57	93,37	94,87	1,68	77,12	81,83	89,48	82,81	6,24
MMP	49,2	92,38	93,19	89,34	91,64	2,03	71,69	74,12	76,38	74,07	2,34
	41,0	94,06	93,94	90,18	92,72	2,21	74,47	76,32	80,91	77,23	3,32
	20,5	94,89	93,74	92,19	93,61	1,35	77,45	81,13	85,49	81,36	4,03
	4,1	96,13	96,97	93,28	95,46	1,93	78,88	86,09	90,72	85,23	5,97
DNCB	0,88	96,08	95,74	94,16	95,33	1,03	79,41	89,26	92,26	86,98	6,72
	0,73	96,52	94,87	93,09	94,82	1,72	80,99	89,93	93,28	88,07	6,36
	0,37	95,87	94,86	94,75	95,16	0,62	82,02	90,44	91,84	88,10	5,31
	0,07	96,83	95,32	94,78	95,64	1,06	76,81	88,66	91,19	85,55	7,67
2PR	6000	94,68	94,93	95,50	95,03	0,42	90,85	90,18	91,01	90,68	0,44
	5000	97,11	95,16	95,94	96,07	0,98	79,35	89,55	90,47	86,46	6,17
	2500	97,13	94,17	95,45	95,58	1,48	80,79	90,35	92,62	87,92	6,28
	500	97,94	94,86	95,79	96,20	1,58	82,84	91,98	93,53	89,45	5,78
LA	3300	49,14	27,66	31,40	36,07	11,47	4,23	9,85	5,18	6,42	3,01
	2750	90,90	93,72	91,53	92,05	1,48	76,82	85,83	75,95	79,53	5,47
	1375	95,44	95,56	95,98	95,66	0,28	92,23	93,56	91,01	92,27	1,28
	275	97,23	95,65	94,91	95,93	1,19	82,52	93,45	91,75	89,24	5,88

Tabela 10.29 Żywotność komórek THP – 1 oceniana w analizie cytometrycznej przy użyciu jodku propidyny. Monokultura THP-1

Material badany	Stężenie materiału badanego [µg/ml]	Inkubacja 24 h					Inkubacja 48 h				
		seria I	seria II	seria III	\bar{x}	SD	seria I	seria II	seria III	\bar{x}	SD
EU	140,4	76,24	86,62	66,76	76,54	9,93	67,56	60,23	73,59	67,13	6,69
	117	90,03	88,59	76,52	85,05	7,42	81,15	67,61	79,76	76,17	7,44
	58,5	94,88	93,93	88,45	92,42	3,47	86,60	81,19	87,21	85,00	3,31
	11,7	94,81	95,01	92,28	94,04	1,52	94,29	90,47	92,07	92,28	1,92
MMP	49,2	90,54	90,08	82,02	87,55	4,79	83,44	82,14	83,38	82,98	0,73
	41,0	92,32	90,95	83,90	89,05	4,52	82,32	81,26	82,93	82,17	0,84
	20,5	93,21	91,86	88,70	91,26	2,31	90,66	85,83	87,96	88,15	2,42
	4,1	95,59	93,26	90,41	93,09	2,59	96,16	90,89	92,48	93,18	2,70
DNCB	0,88	96,60	94,18	81,77	90,85	7,95	96,95	83,90	60,07	80,30	18,70
	0,73	95,96	93,92	82,91	90,93	7,02	97,70	84,13	70,44	84,09	13,63
	0,37	95,37	94,74	92,33	94,15	1,60	96,71	93,17	91,39	93,76	2,71
	0,07	94,78	93,37	93,09	93,75	0,91	96,88	93,69	93,63	94,73	1,86
2PR	6000	94,68	93,90	90,97	93,18	1,96	73,00	92,43	93,50	86,31	11,54
	5000	95,76	92,70	92,04	93,50	1,98	95,12	92,09	93,28	93,49	1,53
	2500	94,88	94,22	92,40	93,83	1,28	93,95	93,21	93,41	93,52	0,38
	500	95,44	93,19	92,64	93,76	1,48	96,54	92,23	92,90	93,89	2,32
LA	3300	28,92	17,59	61,40	35,97	22,74	10,49	27,94	7,26	15,23	11,13
	2750	90,04	90,53	85,70	88,76	2,66	84,52	85,67	77,27	82,49	4,55
	1375	94,58	95,44	91,04	93,69	2,33	96,91	93,13	93,02	94,35	2,21
	275	95,15	94,31	91,40	93,62	1,97	96,44	93,57	93,17	94,40	1,78

10.4. Etap IV - walidacja metody kokulturowej – dane źródłowe

Tabela 10.30. Żywotność komórek THP-1 w teście alamarBlue

DNCB	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	0,39	0,78	1,56	3,13	6,25	12,50	25,00	50,00
	seria I [%]	119,46	102,22	87,82	37,85	22,66	35,07	22,21	44,09
	seria II [%]	110,56	101,35	86,21	56,02	14,20	20,33	9,33	38,21
	seria III [%]	132,58	113,45	97,47	42,01	25,15	38,93	24,93	48,93
PHE	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	1,95	3,90	7,80	15,63	31,25	62,50	125,00	250,00
	seria I [%]	107,91	96,85	96,25	67,71	59,52	45,39	46,35	15,29
	seria II [%]	85,64	92,94	95,53	80,45	67,54	36,87	35,57	8,47
	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	3,90	7,80	15,63	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00
	seria III [%]	135,69	100,38	83,21	60,21	34,98	9,07	18,06	4,11
ME	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	1,95	3,90	7,80	15,63	31,25	62,50	125,00	250,00
	seria I [%]	91,59	89,06	58,95	23,75	36,88	22,68	19,08	31,31
	seria II [%]	72,52	91,95	64,43	19,20	28,00	16,94	11,89	22,35
	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	3,90	7,80	15,63	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00
	seria III [%]	96,96	64,53	28,04	11,58	19,85	11,83	7,48	13,72
NI_{SO}₄	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	7,80	15,60	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00	1000,00
	seria I [%]	99,31	102,22	96,63	93,98	78,93	62,40	46,35	63,47
	seria II [%]	142,10	131,70	123,77	114,65	37,74	45,54	18,06	45,25
	seria III [%]	84,69	89,69	87,32	87,45	82,71	53,91	35,57	50,26
2MBT	seria I [%]	119,50	111,51	117,83	108,50	81,53	94,69	63,55	54,52
	seria II [%]	135,93	127,88	113,58	96,17	81,32	79,66	59,98	81,22
	seria III [%]	124,61	132,80	129,02	121,16	84,93	81,58	55,88	47,70
DL	seria I [%]	158,61	137,01	132,19	142,74	108,20	49,86	38,20	24,56
	seria II [%]	148,10	127,93	123,43	133,28	101,02	46,55	30,12	25,64
	seria III [%]	117,39	101,40	97,84	110,32	80,08	36,90	24,56	20,47
IMZ	seria I [%]	102,65	96,77	93,24	55,11	57,96	53,96	26,52	19,59
	seria II [%]	127,92	105,81	77,08	11,90	35,37	34,98	37,80	14,88
	seria III [%]	104,28	109,93	92,61	63,04	54,24	59,24	33,40	22,61
EGDMA	seria I [%]	126,22	145,05	97,08	96,73	80,53	94,23	83,26	94,25
	seria II [%]	166,33	100,16	133,07	94,69	119,45	119,28	119,87	106,48
	seria III [%]	130,59	144,20	121,44	125,24	124,32	121,69	128,90	150,20
CA	seria I [%]	161,77	154,13	127,56	128,93	46,55	13,57	30,83	10,42
	seria II [%]	128,06	101,25	131,89	117,50	88,78	46,18	48,90	23,70
	seria III [%]	102,01	107,93	109,79	106,89	99,34	43,89	50,10	43,61
2PR	seria I [%]	172,80	148,39	126,88	107,59	113,52	101,82	102,74	97,99
	seria II [%]	119,78	103,25	102,68	95,44	87,39	95,03	87,26	85,48
	seria III [%]	127,72	118,80	109,42	96,42	98,43	97,22	98,01	85,26
GL	seria I [%]	96,37	92,93	91,16	93,71	98,83	86,92	84,48	91,93
	seria II [%]	129,25	124,21	108,34	109,77	94,87	82,93	81,28	76,07
	seria III [%]	86,11	86,83	93,19	101,84	100,79	93,43	83,88	78,97
LA	seria I [%]	193,84	131,89	124,98	118,80	108,73	108,53	94,31	119,71
	seria II [%]	142,03	163,83	129,00	110,12	115,83	143,48	128,12	142,43
	seria III [%]	128,84	116,57	109,08	104,45	99,33	98,86	94,95	98,08
PABA	seria I [%]	151,89	132,50	127,61	133,31	129,31	120,94	75,20	110,78
	seria II [%]	131,74	98,85	106,54	91,84	93,58	101,93	77,89	86,55
	seria III [%]	139,51	96,92	95,80	99,29	76,56	98,87	83,04	88,99
SA	seria I [%]	163,59	145,05	103,95	101,93	94,26	88,27	81,53	84,73
	seria II [%]	91,14	83,90	103,73	84,53	107,20	135,23	133,33	143,84
	seria III [%]	115,92	118,77	104,62	95,04	89,97	85,61	84,53	79,03

Tabela 10.31. Żywotność komórek NHEK-neonatal w teście alamarBlue

DNCB	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	0,39	0,78	1,56	3,13	6,25	12,50	25,00	50,00
	seria I [%]	78,51	70,95	75,83	47,52	16,74	15,01	18,16	18,26
	seria II [%]	81,20	75,60	73,02	45,76	16,12	14,46	17,45	17,58
	seria III [%]	104,79	94,70	101,23	63,44	22,35	20,04	24,24	24,40
PHE	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	0,78	1,56	3,13	6,25	12,50	25,00	50,00	100,00
	seria I	97,07	109,57	86,26	84,57	78,82	29,88	32,57	5,72
	seria II	91,32	75,57	67,32	55,84	30,97	23,31	7,40	5,70
	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	7,80	15,60	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00	1000,00
ME	seria III	94,64	80,63	71,43	58,83	32,50	22,75	5,72	4,32
	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	0,39	0,78	1,56	3,13	6,25	12,50	25,00	50,00
	seria I [%]	157,07	137,37	146,89	128,53	114,76	44,69	67,18	66,75
	seria II [%]	92,13	93,11	98,71	96,54	17,06	29,88	40,97	38,21
NiSO₄	seria III [%]	128,61	112,48	120,28	105,25	98,49	49,08	55,00	54,65
	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	7,80	15,60	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00	1000,00
	seria I [%]	112,01	109,01	106,52	79,92	72,16	46,42	12,02	8,32
	seria II [%]	110,35	101,37	98,89	82,55	73,38	57,23	14,91	13,09
2MBT	seria III [%]	209,71	133,03	130,21	132,54	125,93	106,55	65,29	36,81
	seria I [%]	123,66	11,13	94,75	81,00	61,24	66,67	67,00	73,15
	seria II [%]	119,11	110,16	94,52	71,51	49,35	48,76	47,21	46,99
	seria III [%]	160,79	142,11	122,19	92,35	60,20	54,40	45,13	40,58
DL	seria I [%]	111,46	110,27	109,43	87,56	55,32	29,33	65,87	60,78
	seria II [%]	142,77	155,68	152,36	160,35	86,42	36,80	25,15	19,98
	seria III [%]	188,15	202,40	202,80	189,79	104,17	38,46	22,70	17,15
	seria I [%]	93,22	95,57	42,34	27,58	46,32	57,88	61,71	54,92
IMZ	seria II [%]	89,09	93,36	35,79	17,51	35,44	46,09	41,29	33,18
	seria III [%]	94,20	97,21	35,88	40,78	31,28	17,79	21,29	25,02
	seria I [%]	81,06	81,70	80,78	80,20	74,00	72,05	88,17	46,36
	seria II [%]	93,81	88,94	91,89	91,87	94,42	107,00	96,56	43,81
EGDMA	seria III [%]	105,08	99,63	102,93	102,91	105,76	119,86	108,19	49,08
	seria I [%]	112,10	98,25	104,57	93,82	86,93	67,69	65,42	27,26
	seria II [%]	75,72	79,52	80,50	78,10	83,03	60,90	53,07	57,17
	seria III [%]	101,35	83,76	82,33	76,65	75,33	60,85	12,84	32,85
2PR	seria I [%]	127,63	143,69	115,95	106,95	103,55	91,90	85,14	75,18
	seria II [%]	136,24	117,27	105,24	95,09	88,04	87,46	84,46	92,54
	seria III [%]	135,45	114,90	103,00	90,14	88,34	86,29	83,11	86,61
	seria I [%]	99,47	101,16	111,43	118,48	121,15	128,30	117,82	101,45
GL	seria II [%]	121,14	135,15	130,15	84,72	101,49	116,29	85,66	78,55
	seria III [%]	92,57	83,16	96,88	92,42	95,04	91,15	90,22	89,83
	seria I [%]	102,50	96,18	120,13	105,93	93,98	83,87	85,88	94,61
	seria II [%]	101,27	91,76	108,07	105,65	107,62	103,07	101,18	93,32
LA	seria III [%]	99,36	96,89	93,59	88,44	84,81	83,45	87,17	90,36
	seria I [%]	116,54	106,36	100,43	99,66	92,30	89,67	71,56	68,23
	seria II [%]	89,11	92,63	87,12	75,25	76,64	87,84	71,07	58,69
	seria III [%]	121,93	109,40	125,93	110,02	95,33	65,00	61,68	34,30
PABA	seria I	93,86	94,98	90,07	80,79	85,49	63,44	72,77	73,86
	seria II	100,17	95,66	69,18	91,98	82,53	92,77	80,78	41,00
	stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	3,90	7,80	15,63	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00
	seria III	121,82	94,39	96,50	94,01	79,54	70,84	62,31	64,49

Tabela 10.32. Zestawienie wartości SI cytokin zapalnych dla materiałów walidacyjnych

Material badany	stężenie materiału badanego [x TC]	SI IL-1 alfa [%]		\bar{x}	SD	SI IL-18 [%]		\bar{x}	SD
		seria I	seria II			seria I	seria II		
DNCB	1,2 x TC	154,43	537,04	345,74	270,55	362,39	1025,40	693,90	468,82
	1 x TC	71,43	181,53	126,48	77,85	65,04	258,48	161,76	136,78
	0,5 x TC	109,21	158,30	133,75	34,71	116,37	226,17	171,27	77,64
	0,1 x TC	106,88	325,89	216,39	154,87	188,50	499,43	343,96	219,86
PHE	1,2 x TC	78,43	185,59	132,01	75,77	344,76	581,78	463,27	167,60
	1 x TC	88,17	116,52	102,35	20,05	678,86	267,83	473,34	290,64
	0,5 x TC	148,75	72,92	110,83	53,62	649,90	221,32	435,61	303,06
	0,1 x TC	37,05	87,54	62,29	35,70	87,24	62,02	74,63	17,84
ME	1,2 x TC	155,18	53,25	104,21	72,08	72,87	38,42	55,65	24,36
	1 x TC	227,01	199,83	213,42	19,22	200,46	191,67	196,07	6,22
	0,5 x TC	173,68	133,77	153,73	28,22	167,41	144,48	155,94	16,22
	0,1 x TC	250,52	114,68	182,60	96,05	244,27	135,37	189,82	77,01
NiSO ₄	1,2 x TC	214,34	119,15	166,74	67,31	137,26	87,62	112,44	35,10
	1 x TC	225,94	86,27	156,10	98,76	92,62	61,08	76,85	22,30
	0,5 x TC	100,43	44,23	72,33	39,74	37,09	35,76	36,42	0,94
	0,1 x TC	46,33	168,68	107,50	86,51	34,43	204,44	119,43	120,22
2MBT	1,2 x TC	7,36	1,47	4,42	4,16	777,10	388,07	582,59	275,08
	1 x TC	2,75	8,39	5,57	3,99	206,82	399,28	303,05	136,09
	0,5 x TC	8,15	11,52	9,84	2,38	412,67	158,02	285,34	180,06
	0,1 x TC	46,56	57,40	51,98	7,67	90,38	73,11	81,74	12,21
DL	1,2 x TC	137,14	96,70	116,92	28,59	265,28	190,80	228,04	52,67
	1 x TC	115,69	308,76	212,22	136,52	201,48	349,26	275,37	104,49
	0,5 x TC	240,16	217,93	229,04	15,72	376,56	141,54	259,05	166,18
	0,1 x TC	156,37	80,51	118,44	53,64	228,19	105,64	166,91	86,66
IMZ	1,2 x TC	137,72	217,29	177,51	56,26	256,38	153,43	204,91	72,80
	1 x TC	190,66	351,58	271,12	113,79	260,95	276,96	268,96	11,32
	0,5 x TC	85,43	112,45	98,94	19,11	113,14	181,86	147,50	48,59
	0,1 x TC	143,97	137,72	140,85	4,42	273,52	173,04	223,28	71,05
CA	1,2 x TC	317,19	268,06	292,63	34,74	276,99	417,91	347,45	99,64
	1 x TC	231,53	317,55	274,54	60,82	178,78	162,39	170,58	11,59
	0,5 x TC	141,10	145,42	143,26	3,05	211,15	185,07	198,11	18,44
	0,1 x TC	45,02	67,39	56,20	15,81	196,59	85,97	141,28	78,22
EGDMA	1,2 x TC	345,26	677,24	511,25	234,75	513,89	247,56	380,73	188,33
	1 x TC	351,77	139,68	245,72	149,97	798,04	148,57	473,31	459,25
	0,5 x TC	167,49	165,38	166,43	1,49	111,55	189,78	150,66	55,32
	0,1 x TC	131,77	144,51	138,14	9,01	166,73	152,13	159,43	10,33
SA	1,2 x TC	200,61	81,99	141,30	83,88	198,38	151,64	175,01	33,05
	1 x TC	225,64	72,63	149,13	108,19	149,29	140,30	144,80	6,36
	0,5 x TC	130,66	219,75	175,20	62,99	95,76	110,45	103,10	10,39
	0,1 x TC	69,55	108,78	89,16	27,74	43,84	65,07	54,46	15,02
LA	1,2 x TC	214,30	111,80	163,05	72,48	252,95	82,85	167,90	120,28
	1 x TC	101,82	98,57	100,19	2,30	99,05	102,58	100,82	2,50
	0,5 x TC	107,65	30,37	69,01	54,65	168,00	31,95	99,97	96,20
	0,1 x TC	111,10	77,99	94,55	23,41	137,90	75,18	106,54	44,36
GL	1,2 x TC	66,49	59,82	63,16	4,72	118,10	49,49	83,79	48,51
	1 x TC	58,37	63,47	60,92	3,61	63,24	51,84	57,54	8,06
	0,5 x TC	113,24	64,47	88,85	34,49	176,00	44,17	110,08	93,22
	0,1 x TC	140,72	114,46	127,59	18,57	190,10	121,85	155,97	48,26
2PR	1,2 x TC	116,98	37,74	77,36	56,03	169,14	18,48	93,81	106,53
	1 x TC	139,90	54,51	97,20	60,38	286,10	39,31	162,70	174,50
	0,5 x TC	120,46	104,13	112,30	11,54	219,81	106,34	163,08	80,23
	0,1 x TC	85,95	400,71	243,33	222,57	91,81	251,06	171,43	112,61
PABA	1,2 x TC	60,55	45,63	53,09	10,55	45,01	40,44	42,72	3,23
	1 x TC	33,22	90,31	61,77	40,37	27,40	93,30	60,35	46,60
	0,5 x TC	205,43	91,77	148,60	80,37	178,47	81,36	129,92	68,67
	0,1 x TC	67,20	38,84	53,02	20,06	50,10	29,72	39,91	14,41

Tabela 10.33. Zestawienie wartości SI antygenu powierzchniowego dla materiałów walidacyjnych

Materiał badany	stężenie materiału badanego [x TC]	SI CD54 [%]	SI CD54 [%]	\bar{x}	SD
		seria I	seria II		
DNCB	1,2 x TC	191	420	306	162
	1 x TC	109	149	129	28
	0,5 x TC	96	113	105	12
	0,1 x TC	119	125	122	4
PHE	1,2 x TC	394	339	366	39
	1 x TC	262	327	295	46
	0,5 x TC	230	241	235	8
	0,1 x TC	62	144	103	59
ME	1,2 x TC	201	153	177	34
	1 x TC	159	157	158	2
	0,5 x TC	92	120	106	20
	0,1 x TC	115	115	115	0
NiSO ₄	1,2 x TC	389	412	400	16
	1 x TC	532	499	515	23
	0,5 x TC	454	365	410	63
	0,1 x TC	123	116	119	5
2MBT	1,2 x TC	708	673	691	25
	1 x TC	785	643	714	100
	0,5 x TC	616	303	460	221
	0,1 x TC	96	122	109	19
DL	1,2 x TC	217	257	237	28
	1 x TC	211	311	261	71
	0,5 x TC	208	176	192	23
	0,1 x TC	94	89	92	4
IMZ	1,2 x TC	137	113	125	18
	1 x TC	75	105	90	21
	0,5 x TC	63	100	81	26
	0,1 x TC	71	104	88	23
EGDMA	1,2 x TC	42	11	26	22
	1 x TC	59	48	53	8
	0,5 x TC	48	44	46	3
	0,1 x TC	80	67	73	9
CA	1,2 x TC	165	128	147	26
	1 x TC	130	150	140	14
	0,5 x TC	98	79	89	13
	0,1 x TC	92	74	83	13
2PR	1,2 x TC	69	75	72	5
	1 x TC	67	81	74	10
	0,5 x TC	63	75	69	8
	0,1 x TC	67	79	73	8
GL	1,2 x TC	59	72	66	9
	1 x TC	59	83	71	17
	0,5 x TC	63	78	71	11
	0,1 x TC	66	75	71	7
LA	1,2 x TC	70	89	80	13
	1 x TC	56	86	71	21
	0,5 x TC	62	82	72	15
	0,1 x TC	58	74	66	11
PABA	1,2 x TC	53	76	64	16
	1 x TC	55	76	65	15
	0,5 x TC	60	82	71	15
	0,1 x TC	50	71	61	14
SA	1,2 x TC	267	298	283	22
	1 x TC	149	282	216	94
	0,5 x TC	93	148	121	39
	0,1 x TC	75	109	92	24