



**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

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 (prohaptenu) w porównaniu do metody monokulturowej.