

Kontaktowe zapalenie skóry: od patomechanizmu do immunotoksykologii

Stefan F. Martin

STRESZCZENIE

Alergeny kontaktowe są małowcząsteczkowymi związkami chemicznymi. Wywołują alergiczne kontaktowe zapalenie skóry (allergic contact dermatitis, ACD) przez pobudzenie wrodzonej i nabytej odporności. Wyjątkowość alergenów kontaktowych wynika z wbudowanej autoadiuwantowości, która umożliwia im wywołanie jałowego stanu zapalnego po penetracji przez skórę. Wrodzona odpowiedź zapalna obejmuje pobudzenie receptorów rozpoznających wzorce przez bezpośrednią interakcję chemiczną z nimi albo przez pobudzenie ich endogennych aktywatorów. Autor omawia ostatnie wyniki dotyczące rozpowszechnienia i predyspozycji, identyfikacji mechanizmów odporności wrodzonej i mechanizmów odpowiedzi stresowej istotnych dla sensytyzacji oraz orkiestracji wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej na alergeny kontaktowe.

Mimo ciągle istotnych luk w wiedzy ostatnie postępy w pojmowaniu immunopatogenezy ACD mogą zostać wykorzystane do opracowania strategii leczenia przyczynowego i alternatyw *in vitro* testowania na zwierzętach dla wyodrębnienia alergenów kontaktowych dla immunotoksykologii.

SKRÓTY

ACD – alergiczne kontaktowe zapalenie skóry; AhR – receptor wodorowęglanu aryłu; BMDC – komórki dendrytyczne pochodzące ze szpiku kostnego; CHS – nadwrażliwość kontaktowa; CYP – cytochrom P450; DAMP – wzorce molekularne związane z uszkodzeniem; DC – komórki dendrytyczne; DNCB – 2,4-dinitrochlorobenzen; ECM – macierz zewnątrzkomórkowa; HA – kwas hialuronowy; LLNA – badanie regionalnych węzłów chłonnych; NLR – receptor Nod-podobny; TLR – receptor toll-podobny; TNCB, 2,4,6-trinitrochlorobenzen; Treg – limfocyty T regulatorowe.

SŁOWA KLUCZOWE

alergen kontaktowy, stan zapalny, odporność wrodzona, regionalne węzły chłonne, skóra

Allergy Research Group, Department of Dermatology, University Freiburg Medical Center, Freiburg, Niemcy

Adres do korespondencji: Stefan F. Martin, PhD, Allergy Research Group, Department of Dermatology, University Freiburg Medical Center, Hauptstra e 7, D-79104 Freiburg, Niemcy; e-mail: stefan.martin@uniklinik-freiburg.de

Konflikt interesów: autor nie zgłasza konfliktu interesów.

Experimental Dermatology, 2012, 21, 382-389

Dermatologia po Dyplomie 2013;4(1):17-31

Kontaktowe zapalenie skóry – częstość występowania i predyspozycje

Kontaktowe zapalenie skóry z podrażnienia i alergiczne kontaktowe zapalenie skóry (allergic contact dermatitis, ACD) mogą być poważnym problemem zdrowotnym. Te zapalne wypryskowe choroby skóry są zazwyczaj spowodowane przez działające toksycznie substancje bez pobudzania odpowiedzi z limfocytów T (substancje drażniące) lub przez małowcząsteczkowe związki chemiczne, które modyfikują białka oraz pobudzają wrodzoną i nabytą odpowiedź immunologiczną (alergeny kontaktowe). ACD jest ostatecznie pośredniczona przez limfocyty T swoiste dla alergenu kontaktowego.

Częstość występowania ACD jest duża: 15-20% populacji ogólnej cierpi z powodu ACD spowodowanego co najmniej jedną substancją chemiczną, najczęściej niklem, dodatkami zapachowymi i konserwantami.^{1,2} Bardzo istotną kwestię stanowi zawodowe kontaktowe zapalenie skóry. Jest to najczęstsza choroba skóry związana z pracą i wiąże się ze znacznymi kosztami.^{3,4} Do znanych czynników ryzyka należą: płeć, z częstszym występowaniem ACD u kobiet, wiek, z częstszym początkiem w młodym wieku, ekspozycja w miejscu pracy, korzystanie z produktów dostępnych na rynku oraz predyspozycja genetyczna. Brakuje jednak potwierdzonych dowodów na zwiększone ryzyko związane ze swoistymi haplotypami MHC. Różni się to od niektórych reakcji nadwrażliwości na leki.⁵ Predyspozycja genetyczna jest jednak wyraźna i składają się na nią polimorfizmy genów regulujących metabolizm ksenobiotyków i ich biotransformację, jak również odpowiedzi komórkowe na stres, włączając równowagę procesów redoks (np. N-acetylotransferaza, transferaza S-glutationowa), stan zapalny włączający odporność wrodzoną i nabytą (np. IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α) oraz czynność bariery skórnej (np. filagrynę) (tab. 1).^{6,7} Najprawdopodobniej polimorfizmy wrodzonych receptorów rozpoznających wzorce (pattern recognition receptor, PRR), takich jak receptory toll-podobne (toll-like receptors, TLR) i receptory Nod-podobne (nod-like receptors, NLR) lub receptorów dla cytokin, takich jak IL-12R, również składają się na predyspozycję genetyczną. W tym kontekście ważną rolę może również odgrywać flora bakteryjna skóry.^{8,9}

Aktualne dane dotyczące predysponujących polimorfizmów genetycznych istotnych dla sensytyzacji wskazują częściowo te same ścieżki, jak zidentyfikowane na modelu myszy z nadwrażliwością kontaktową (contact hypersensitivity, CHS),¹⁰ co dostarcza dowodów na ich znaczenie dla choroby człowieka, wzmocnionych

Tabela 1. Szlaki sygnałowe i odpowiedzi komórkowe istotne w alergicznym kontaktowym zapaleniu skóry (ACD). Wymienione zostały szlaki sygnałowe i odpowiedzi komórkowe wyzwalane przez alergeny kontaktowe stwierdzone w badaniach genomowych na ludzkich komórkach progenitorowych MUTZ-3¹³ i w badaniach proteomowych na keratynocytach ludzkich (SENS-IT-IV NEWSLETTER 44, www.sens-it-iv.eu)^{16,17} oraz szlaki zidentyfikowane na podstawie polimorfizmów związanych z podatnością na ACD^{6,7}

Genomika (MUTZ-3)	Proteomika (keratynocyty)	Polimorfizmy ludzkie
Oksydacyjna/komórkowa odpowiedź stresowa (np. ścieżka Keap1/Nrf2).	Oksydacyjna/komórkowa odpowiedź stresowa (np. ścieżka Keap1/Nrf2).	Oksydacyjna/komórkowa odpowiedź stresowa
Metabolizm ksenobiotyków	Toksyczność metali	Metabolizm ksenobiotyków
Ubikwitynacja białek	Odpowiedź metaboliczna	Stan zapalny (wrodzona/nabyta odpowiedź immunologiczna)
Inhibicja RXR pośredniczona przez LPS/IL-1 Sygnałowanie AhR Sygnałowanie kinazy białkowej A	Reorganizacja cytoszkieletu	Funkcja bariery skórnej

przez badania genomu i proteomu ludzkich komórek eksponowanych na alergeny kontaktowe (tab. 1)¹¹⁻¹⁷ (Sens-it-iv Newsletter 44, <http://www.sens-it-iv.eu>).

Ksenobiotyczne związki chemiczne i stan ksenozapalny – uczenie się od patogenów

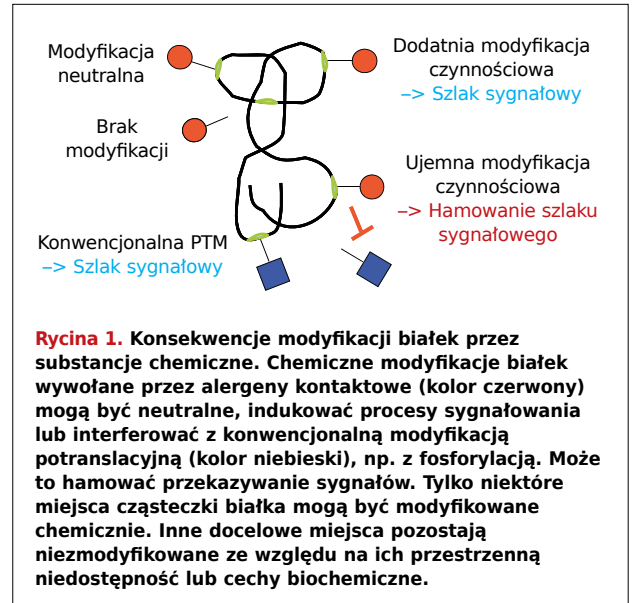
Ksenobiotyczne związki chemiczne, takie jak leki, alergeny oddechowe i kontaktowe, mogą powodować i przyczyniać się do takich reakcji niepożądanych jak choroby autoimmunologiczne lub alergię.¹⁸ Wiele spośród tych substancji chemicznych jest wyjątkowych, ponieważ są egzogennymi czynnikami wywołującymi jałowy stan zapalny. Podobnie jak w przypadku sterylonego stanu zapalnego, na przykład po urazie, do obrony przeciwdrobnoustrojowej pobudzane są receptory PRR, przykładowo pod wpływem alergenów kontakto-

wych nawet u wyjąłowionych myszy, co sugeruje rolę endogennych aktywatorów, takich jak wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (damage-associated molecular pattern, DAMP).¹⁹ Ponieważ odpowiedź zapalna wywołana substancjami chemicznymi różni się na początkowym etapie od stanu autozapalnego i spowodowanego drobnoustrojami, ale prowadzi do pobudzenia podobnych szlaków sygnałowych, dla określenia tego zjawiska autor zaproponował termin „stan ksenozapalny” (xenoinflammation).

Od dawna wiadomo, że alergen kontaktowy powodują stan zapalny skóry angażujący wytwarzanie cytokin prozapalnych. Wiadomo również, że jest to związane z ich reaktywnością chemiczną, ale pozostaje niejasne, jak ta reaktywność przekłada się na pobudzenie wrodzonego układu immunologicznego i odpowiedź na stres. Dlatego zaczęto analizować znaczenie dobrze znanych wrodzonych szlaków stanu zapalnego pobudzanych przez patogeny, podejrzewając, że mogą one odgrywać rolę w ACD. Dzięki temu wykazano fizjologiczne znaczenie TLR, aktywacji inflammasomu NLRP3 zależnego od P2X7 oraz reaktywnych form tlenu (ROS) w ACD i w modelu CHS²¹⁻²³ (P.R. Esser, U. Wölfle, C. Dürr, F.D. Von Loewenisch, C.M. Schempp, M.A. Freudenberg, T. Jakob, S.F. Martin, opracowanie zgłoszone do publikacji).

Substancje chemiczne jako czynniki modyfikujące biocząsteczki

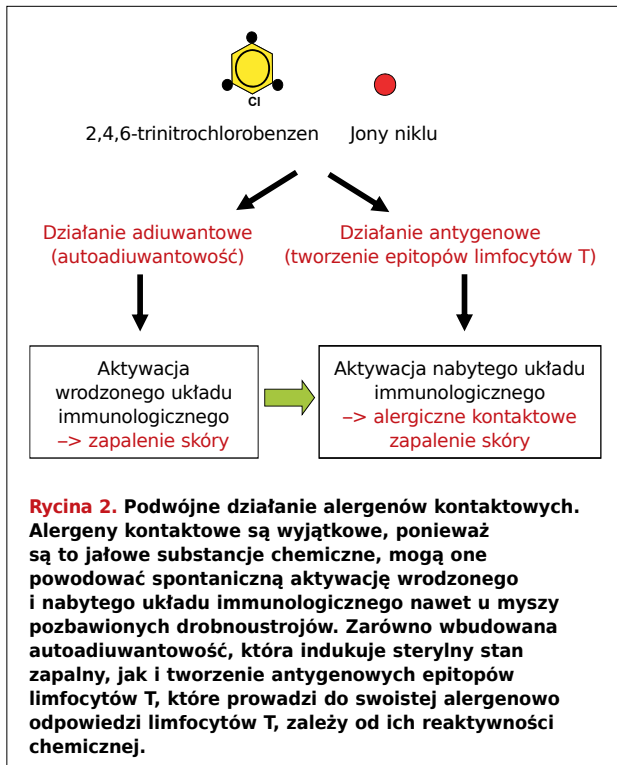
Analiza pełnej sekwencji ludzkiego genomu uwidoczniła dylemat ewolucyjny. Duża biologiczna złożoność gatunku *Homo sapiens* opiera się na zaledwie około 23 000 genów kodujących białka^{24,25} i około 10¹⁴ komórek, z wieloma genami niewiele różniącymi się od małego nicienia *Caenorhabditis elegans*, którego genom składa się z około 19 000 genów, a organizm w przypadku dorosłego hermafrodyty zbudowany jest z 959 komórek, a w przypadku samca z 1031 komórek.²⁶ Ta duża złożoność osiągana jest dzięki różnorodności kombinatorycznej z białek powstających w wyniku różnych połączeń, co służy na przykład do stworzenia różnych szlaków sygnałowych. Dodatkowo do tworzenia tej różnorodności wykorzystywane są chemiczne modyfikacje białek [modyfikacja potranslacyjna (post-translational modification, PTM)] i innych biocząsteczek. Zmiany w lokalizacji białek, interakcjach między białkami i zmiany czynności białek są osiągane przez PTM. Inne poziomy różnorodności są generowane przez modyfikacje epigenetyczne, włączając metylację DNA i potranslacyjną modyfikację



histonów przez metylację i acetylację oraz przez wykorzystanie niekodujących małych interferujących (si)RNA i micro(mi)RNA jako swoistych dla sekwencji potranskrypcyjnych regulatorów ekspresji genów.^{27,28}

Przykładami PTM prowadzącymi do zmian w białkach są metylacja, acetylacja, ubikwitynacja, sumoilaacja, myristoilacja, glikozylacja i fosforylacja. Można również podejrzewać, że wiele leków i alergenów chemicznych powoduje odwracalne i nieodwracalne zmiany białek i innych biomolekuł, w ten sposób naśladując lub nakładając się z konwencjonalną PTM (ryc. 1). Zatem wiązanie się alergenów kontaktowych, w większości elektrofilowych substancji chemicznych lub jonów metali, z białkami będzie prowadziło do zmian w czynności białek, lokalizacji i interakcji między białkami a najprawdopodobniej do zmian konformacyjnych prowadzących nawet do zakłócania prawidłowego fałdowania się białek ze zwiększonym zakresem modyfikacji chemicznej. Może to prowadzić do pobudzenia odpowiedzi niepołażowanych białek i pobudzenia retikulum endoplazmatycznego.^{29,30}

Alergeny kontaktowe są wyjątkowe, ponieważ wykazują podwójne działanie jako „półantigeny” (hapteny), które generują epitopy antygenowe na limfocytach T oraz jako adiuwanty dla pobudzenia wrodzonego układu immunologicznego z wbudowaną autoadiuwantowością (ryc. 2).³¹ Określenie to jest na przykład stosowane do opisu adiuwantowego działania alergenów białkowych, takich jak Derp2 z roztoczy kurzu domo-



wego, które naśladują MD-2, element strukturalny kompleksu receptora TLR4, i które dlatego mogą uczestniczyć – i zwielfokrotnić, – szlak sygnałowy TLR4.³² Zarówno antygenowość, jak i autoadiuwantowość alergenów kontaktowych opiera się na ich reaktywności chemicznej, co oznacza ich zdolność do modyfikacji białek i innych biomolekuł przez wiązanie kowalencyjne ze związkami organicznymi i tworzenie kompleksów z cząsteczkami nieorganicznymi, takimi jak jony metali, np. niklu i kobaltu. Autoadiuwantowość alergenów kontaktowych może wynikać z bezpośredniego pobudzenia szlaków sygnałowych wrodzonego układu immunologicznego lub pośredniego działania, które obejmuje tworzenie lub uwalnianie endogennych sygnałów zagrożenia DAMP jako aktywatorów wrodzonego układu immunologicznego.¹⁰ Przykładami bezpośrednich oddziaływań są interakcja jonów niklu z utrwalonymi resztkami histydyny w ludzkim TLR4 i pobudzenie antyoksydacyjnej odpowiedzi zależnej od Keap1/Nrf2 przez interakcję cząsteczek organicznych, takich jak TNCB i DNCB, z pozostałościami cysteinowymi w Keap1. Pośrednia aktywacja TLR2 i TLR4 przez TNCB, oksazoloni i prawdopodobnie przez inne alergeny kontaktowe prowadzi do degradacji składowej macierzy po-

zakomórkowej (ECM) kwasu hialuronowego (HA)²¹ (P. R. Esser, U. Wölfle, C. Dürr, F.D. Von Loewenisch, C. M. Schempp, M.A. Freudenberg, T. Jakob, S.F. Martin, manuskrypt zgłoszony do publikacji). Fragmenty kwasu hialuronowego mogą pobudzać TLR2 i TLR4.³³⁻³⁵ Jak dotąd jednak, bezpośrednie wiązanie czystych, syntetycznych fragmentów kwasu hialuronowego do TLR nie zostało opisane. Podobnie pobudzenie inflamasomu NLRP3 przez te substancje chemiczne obejmuje aktywację purinergicznego receptora P2X₇ przez uwolnienie endogennego sygnału zagrożenia ATP z poddanych stresowi lub uszkodzonych komórek skóry do przestrzeni pozakomórkowej.²³

Orkiestracja wrodzonej komórkowej i molekularnej odpowiedzi immunologicznej pod wpływem alergenów kontaktowych

Pozbawienie komórek ich kontekstu tkankowego może całkowicie zmienić ich funkcję, ponieważ wiele procesów i czynności komórkowych nie jest autonomicznych dla komórek, a silnie zależy od kontekstu tkankowego i jest przez niego regulowane.^{36,37} Dlatego należy zawrócić od podejścia redukcjonistycznego do złożoności tkanki i organizmu, co jest sednem biologii systemowej. Kontaktowe zapalenie skóry jest dobrym przykładem wzajemnych oddziaływań komórek i szlaków sygnałowych w zapalnej chorobie skóry. Odpowiednim określeniem tych wzajemnych oddziaływań jest orkiestracja. Warto zauważyć, że w badaniach eksperymentalnych zawsze identyfikujemy jeden rodzaj komórek lub jedną cząsteczkę lub szlak, które są kluczowe w uwrażliwieniu skóry na alergeny kontaktowe, co jest rozpoznawane przez skuteczną prewencję sensytyzacji i w niektórych przypadkach również przez wyłączenie genu (knockout) lub inhibicję farmakologiczną pojedynczego komórkowego lub molekularnego elementu. Podobne wyniki mogą być obserwowane w innych typach komórek, cząsteczkach i szlakach sygnałowych,¹⁰ co wskazuje na istotne interakcje czynnościowe niezbędnych uzupełniających mechanizmów komórkowych i molekularnych.

Należy ustalić jakościowy i ilościowy wkład różnych graczy komórkowych i molekularnych, a także ich związek w czasie i przestrzeni. Istnieje silna zależność między różnymi komórkowymi szlakami sygnałowymi i typami komórek, jak również między przedziałami narządowymi, takimi jak naskórek i skóra właściwa, lub całymi narządami, jak skóra i węzły chłonne, które

wspólnie tworzą perfekcyjną symfonię. Wykorzystując to porównanie, zabranie skrzypiec lub instrumentów dętych z orkiestry jest w takim samym stopniu uszkadzające. Dlatego musimy rozumieć orkiestrację tych odpowiedzi immunologicznych w odpowiednim kontekście tkankowym.

Orkiestracja wrodzonej odpowiedzi komórkowej w kontaktowym zapaleniu skóry

Skóra składa się z rezydujących komórek macierzy, komórek hematopoetycznych, komórek, które stale krążą w celu utrzymania nadzoru układu immunologicznego oraz z komórek rekrutowanych w czasie odpowiedzi immunologicznej. W czasie nagle pobudzonej przez alergeny kontaktowe odpowiedzi wrodzonego układu immunologicznego między innymi pobudzane są keratynocyty, komórki tuczne i komórki dendrytyczne (DC), a także komórki NK i neutrofile. Komórki tuczne zwiększają przepuszczalność naczyń, w ten sposób ułatwiając rekrutację komórek wrodzonego układu immunologicznego. Wykazano również, że komórki tuczne uczestniczą w rekrutacji leukocytów przez TNF α i wspomagają dojrzewanie komórek DC skóry, migrację i polaryzację odpowiedzi limfocytów T w kierunku produkcji IL-17 i IFN- γ .³⁸⁻⁴¹ Konstytywny brak lub warunkowa deplecja komórek tucznych u myszy wyklucza CHS.⁴¹ Podobnie, deplecja komórek Gr-1+ za pomocą przeciwciał monoklonalnych zapobiega rozwojowi CHS. Sugerowano znaczenie neutrofilów Gr-1+ w rekrutacji limfocytów T do skóry,⁴² ale również znaczenie monocytów Gr-1+CCR6, które są rekrutowane z krwi i są potrzebne w prezentacji krzyżowej limfocytów T Cd8+.⁴³ Dane te wskazują na to, że deplecja komórek tucznych albo komórek Gr1+ jest wystarczająca do wyłączenia odpowiedzi CHS, a orkiestracja obecności obydwu typów komórek na różnych etapach stanu zapalnego odgrywa istotną rolę w odpowiedzi wrodzonego układu immunologicznego na kontaktowe substancje uczulające.

Ponadto, szczególnie we wczesnej fazie efektorowej CHS, potrzebne są komórki NKT wątroby. Przez wytwarzanie IL-4 pobudzają one komórki B1 B do wywarzania IgM, która odgrywa rolę w rekrutacji limfocytów T.⁴⁴ Wykazano, że po sensytyzacji w wątrobie gromadzą się lipidy pobudzające powodujące zależną od CD1d aktywację komórek NKT.⁴⁵ Zaobserwowano tu udział komórek B B1 i limfocytów T $\gamma\delta$. IL-33, członek rodziny IL-1, wytwarzana przez komórki zrębu i komórki tucz-

ne skóry, może mieć znaczenie w pobudzeniu komórek B B1 w CHS.⁴⁶ Powoduje aktywację komórek tucznych i odgrywa rolę w rekrutacji neutrofilów,⁴⁷ co stanowi kolejne połączenie między różnymi czynnikami immunologicznymi. Rolę prozapalną limfocytów T $\gamma\delta$ wytwarzających IL-17 w stanie zapalnym skóry wykazano u myszy i ludzi.⁴⁸⁻⁵⁰

Kolejnym typem komórek mającym zasadnicze znaczenie w CHS są komórki NK. Komórki NK wątroby powodują swoistą dla alergenu kontaktowego odpowiedź podobną do CHS u myszy pozbawionych RAG, sztucznie pozbawionych limfocytów T i B lub u myszy pozbawionych CD3 ϵ .⁵¹⁻⁵³ Odpowiedź zapalna w postaci obrzęku ucha różni się jednak od CHS indukowanego limfocytami T brakiem komórkowego nacieku zapalnego, brakiem zwiększenia stężenia charakterystycznych markerów stanu zapalnego i cytotoksyczności w skórze oraz efektu wyrzutu po ponownej ekspozycji na alergen kontaktowy.⁵³ Swoistość antygenowa odpowiedzi z komórek NK może być spowodowana haptenacją ligandu na komórkach prezentujących antygen, który jest rozpoznawany przez odpowiedni receptor na komórkach NK. Można spekulować, że bezpośrednia modyfikacja haptenu cząsteczek MHC lub prezentacja peptydów o zmodyfikowanych haptenach jest postrzegana przez komórki NK jako brak, co uniemożliwia rozpoznawanie przez receptory hamujące i umożliwia rozpoznawanie zmienionych, alopodobnych własnych MHC przez receptory pobudzające. U podstawy tych procesów może leżeć indukcja swoistych haptenowo zmian konformacyjnych. W klasycznym CHS w skórze zmienionej zapalnie można znaleźć komórki NK, ale ich związek z chorobą jest do tej pory niejasny.⁵¹ Komórki NK są również wykrywane w skórze uczulonych na nikiel chorych na ACD. Wykazano, że są one pobudzane przez limfocyty Th1 i Th17 i nasilają odpowiedź zapalną. Pozostaje do wyjaśnienia, czy pobudzenie ligandów pobudzających receptor NK chemicznie indukowanym stresem komórkowym jest zaangażowane w aktywację komórek NK w ACD. Wciąż nie przedstawiono dowodów na swoistość antygenu dla odpowiedzi ludzkich komórek NK.⁵⁴

Ze względu na spowolnioną kinetykę prezentacji i polaryzacji naiwnych limfocytów T przez komórki dendrytyczne pochodzące ze skóry, limfocyty T przybywają później niż komórki wrodzonego układu odpornościowego i kończą reakcję nadwrażliwości przez wyzwolenie fazy efektorowej. U myszy doświadczalne wyzwolenie przez ekspozycję na alergen kontaktowy nie wydaje się konieczne, ponieważ CHS występuje

po pojedynczej aplikacji silnego alergenu kontaktowego.⁵⁵⁻⁵⁷ Te dane wskazują, że dzięki ich autoadiuwantowości alergeny kontaktowe wywołują wrodzoną odpowiedź zapalną, która pobudza wszystkie elementy potrzebne do prezentacji, polaryzacji i zasiedlenia skóry przez efektorowe limfocyty T, przynajmniej w przypadku silnych alergenów.

Obecnie powstaje nowa koncepcja łącząca wrodzoną i nabytą odpowiedź komórkową skóry. Początkowa wrodzona odpowiedź komórkowa prowadzi do wczesnej rekrutacji limfocytów T swoistych alergenowo, które u myszy stanowią cytotoksyczne limfocyty T (Tc1) CD8+ wytwarzające IFN-. Może być to analogiczna sytuacja do wczesnej rekrutacji limfocytów T w skórze atopowej.⁵⁸ Ta swoista antygenowo zależna od limfocytów T faza inicjacji poprzedza fazę amplifikacji, która częściowo nie jest swoista dla alergenu kontaktowego i angażuje komórki NK,⁵⁴ również komórki NKT mogą rozpoznawać własne lipidy,⁵⁹ jak również limfocyty stanu zapalnego T $\gamma\delta$.⁴⁸

Orkiestracja wrodzonej odpowiedzi molekularnej i odpowiedzi stresowych

W ostatnich latach poczyniono istotne postępy w identyfikacji wrodzonej immunologicznej i komórkowej odpowiedzi stresowej wywoływanej przez alergeny kontaktowe. Szlaki te mają istotne znaczenie w interwencjach terapeutycznych i rozwoju alternatyw *in vitro* do testowania na zwierzętach służącego opracowaniu alergenów kontaktowych w immunotoksykologii.^{60,61} W większości badań koncentrowano się na komórkach dendrytycznych i keratynocytach. W badaniu z wykorzystaniem mysiego modelu CHS stwierdzono, że alergeny kontaktowe aktywują ścieżki pobudzane przez patogeny,^{21-23,62-65} (P.R. Esser, U. Wölflle, C. Dürr, F.D. Von Loewenisch, C.M. Schempp, M.A. Freudenberg, T. Jakob, S.F. Martin, opracowanie zgłoszone do publikacji). Podczas gdy nikiel bezpośrednio oddziałuje z ludzkim TLR4, organiczne alergeny chemiczne, takie jak TNCB i oksazonol, powodują degradację HA do fragmentów prozapalnych, które mogą być endogennymi aktywatorami TLR2 i TLR4. Wskazuje to, że degradacja i uwolnienie składowych ECM, takich jak HA i biglikan, daje sygnał dla wrodzonego układu immunologicznego i w ten sposób uczestniczy w stanie zapalnym.⁶⁶ Ponadto, alergeny kontaktowe powodują uwolnienie ATP z komórek skóry, co jest endogennym sygnałem zagrożenia, pobudzającym inflamosom

NLRP3 przez P2X7 do wytwarzania dojrzałych IL-1 β i IL-18. Co ciekawe, zespół autora wykazał zasadnicze znaczenie komórek dendrytycznych w czynności TLR2, TLR4, IL-12R/ β 2, ASC, NLRP3 i P2X7. Komórki dendrytyczne pochodzące ze szpiku kostnego (bone marrow derived dendritic cell, BMDC) pozbawione dwóch spośród trzech receptorów TLR2, TLR4 i IL-12R/ β 2 w różnych kombinacjach lub jednego z innych receptorów zmodyfikowane alergenem kontaktowym TNBS i podane śródskórnie myszom typu dzikiego traciły zdolność indukowania sensytyzacji. BMDC typu dzikiego skutecznie uwrażliwiały jednak pozbawione odpowiedniego genu myszy.^{21,23,62,63} Te wyniki podkreślają konieczność indukcji TLR i inflamasomu w komórkach dendrytycznych dla skutecznego uwrażliwienia na alergeny kontaktowe i jeszcze raz wskazują na uzupełniające się interakcje między różnymi ścieżkami i ich współdziałanie w indukowaniu stanu zapalnego skóry. Takie interakcje są również obserwowane w zakażeniach.^{67,68}

Dodatkowo do aktywacji TLR i inflamasomu, alergeny kontaktowe indukują oksydacyjne odpowiedzi stresowe prowadzące do wytwarzania ROS i aktywacji antyoksydacyjnej odpowiedzi drugiej fazy. Obejmuje ona aktywację Nrf2 pośredniczoną przez Keap1 i pobudzenie genów odpowiedzi antyoksydacyjnej.^{69,70}

Ostatnie dowody sugerują znaczenie receptora wodorowęglanu arylowego (arylhydrocarbon receptor, AhR) w CHS. Z jednej strony, u myszy pozbawionych AhR obserwuje się zmniejszenie nasilenia odpowiedzi typu CHS, co może być spowodowane defektem dojrzewania komórek Langerhansa.⁷¹ Z drugiej strony, niektóre alergeny kontaktowe, takie jak prohapteny eugenol i izoeugenol, wydają się aktywować AhR bezpośrednio i w ten sposób powodować supresję progresji cyklu komórkowego, co wykazano w badaniach na linii keratynocytów HaCaT.^{72,73} Znaczenie szlaku sygnałowego AhR było również wyraźne w komórkach ludzkich MUTZ-3 stymulowanych alergenem kontaktowym w badaniach genomowych.¹³ Regulacja postępu cyklu komórkowego może być jedną z fizjologicznych funkcji AhR. Co ciekawe, niektóre ksenobiotyczne enzymy rodziny cytochromu P450 (CYP) i niektóre transportery ABC, włączając białka wielolekooporności, są regulowane przez AhR.^{74,75} Może być to istotne dla metabolicznej konwersji chemicznie niereaktywnych prohaptenów przez CYP do haptenów w skórze⁷⁶⁻⁷⁸ i ich eksportu z komórek skóry przez białka wielolekooporności.^{79,80} Ponadto, AhR bierze udział w rozwoju limfocytów Th17 i odgrywa istotną rolę w wytwarzaniu IL-17 i IL-22.^{81,82} Komórki Th17 są również zaangażo-

wane w patologię CHS.¹⁰ AhR ma również znaczenie dla limfocytów T, które są źródłem IL-17,⁸³ i jest ważny dla homeostazy limfocytów T $\gamma\delta$ skóry,⁸⁴ które są zaangażowane w stan zapalny skóry.⁴⁸ Kuszająca jest spekulacja na temat znaczenia alergenów kontaktowych w polaryzacji odpowiedzi z limfocytów T przez szlak AhR i dla regulacji ich własnego metabolizmu i transportu komórkowego w komórkach skóry.

Genomowe i proteomowe badania profilowe keratynocytów i DC odkrywają nowe ścieżki i ich interakcje po aktywacji alergenami kontaktowymi.¹⁵⁻¹⁷ Przed badaczami jeszcze wiele pracy, w szczególności ocena znaczenia genów kandydujących, białek i szlaków z uwzględnieniem ich istotności w procesie sensytyzacji w ACD.

Luki w wiedzy i ich praktyczne konsekwencje dla immunotoksykologii

Problemy wynikające z naszej ciągle ograniczonej wiedzy o immunopatologii ACD to nie tylko brak leczenia przyczynowego, ale również trudności w opracowaniu wiarygodnych alternatyw badań *in vitro*, które zastąpiłyby złoty standard immunotoksykologii, w postaci testów na zwierzętach, badania regionalnego węzła chłonnego (local lymph node assay, LLNA) dla identyfikacji i oceny siły alergenów kontaktowych.⁶⁰ Siódma Poprawka Dyrektywy Kosmetycznej obowiązuje od marca 2009 roku z wyjątkami do końca 2013 roku i zakazuje przeprowadzania badań potencjału uwrażliwiającego substancji kontaktowych zawartych w kosmetykach na zwierzętach.⁸⁵ Ponadto, testowanie 40 000-60 000 już sprzedawanych substancji chemicznych pod kątem ich potencjału uwrażliwiającego na zwierzętach ze względu na regulację Unii Europejskiej REACH wymagałoby ogromnej liczby zwierząt. Bezpieczeństwo produktu i konsumenta wymaga oceny ryzyka immunotoksykologicznego, wyzwaniem stanowi opracowanie badań *in vitro*, które pokryłyby najważniejsze elementy procesu sensytyzacji.^{60,61} Obecnie jest bardzo prawdopodobne, że jedynie połączenie badań będzie mogło pokryć różne etapy tego procesu i jest ono potrzebne do opracowania optymalnej zintegrowanej strategii testowania.⁸⁶ Aktualne braki w wiedzy i redukcjonizm badań *in vitro*, który eliminuje wiele czynników odgrywających rolę w fazie sensytyzacji *in vivo* stanowią istotny problem w dokładnej ocenie ryzyka i właściwej predykcji badań *in vitro*. Ostatecznie tylko ekspozycja *in vivo* może powiedzieć, czy substan-

cja chemiczna powoduje sensytyzację.⁸⁷ W przyszłości należy przełożyć wiedzę z identyfikacji szlaków molekularnych i interaktomów na zrozumienie wpływu złożonych interakcji komórek w kontekście tkankowym i interakcji między różnymi tkankami na drodze rozpuszczalnych mediatorów i komórek migracyjnych w całym organizmie.

Aktualnie trwające lub będące w fazie wstępnej badania dotyczą różnych etapów sensytyzacji (tab. 2).^{60,61,88} Chemiczna reaktywność haptenu i prohaptenu jest oceniana w bezpośrednim teście reaktywności peptydów (direct peptide reactivity assay, DPRA),⁸⁹⁻⁹¹ aktywacji DC w MUSST, badaniach hCLAT i PBMD, ^{92,93} wytwarzaniu IL-18 przez keratynocyty i aktywacji Keap1/Nrf2 w badaniach odpowiednio NCTC2544 i KeratinoSens.⁹⁴⁻⁹⁷ Profilowanie genomowe jest przeprowadzane w teście VITASENS^{98,99} i GARD.^{13,15} Migracja DC jest badana przy wykorzystaniu badania opierającego się na chemokinach i komórkach Langerhansa wywodzących się z MUTZ-3 (MUTZ-LC).¹⁰⁰ Jedną z głównych wad wszystkich dostępnych aktualnie badań jest ich niezdolność do oceny siły alergenu. Jest to wyróżniająca się cecha LLNA. Test DPRA i warstwowa metoda łącząca NCTC i badania mocy odpowiednika naskórkowego¹⁰¹ mają to na celu. Pozostaje do wyjaśnienia, czy badania te są odpowiednie do uzyskania takiej informacji. Najbardziej swoistymi badaniami potrzebnymi do identyfikacji przypuszczalnych alergenów kontaktowych są badania pobudzania ludzkich limfocytów T (human T-cell priming assay, hTCPA).¹⁰²⁻¹⁰⁴ Substancje chemiczne są w nich badane pod kątem zdolności do pobudzania naiwnych limfocytów T. Sprawdzana jest również siła działania hTCPA. Jeśli istnieje korelacja między siłą alergenu a nasileniem pobudzenia limfocytów T swoistych alergenowo i limfocytów T regulatorowych (T_{reg}) i zróżnicowaniem receptora limfocytów T (TCR), badanie to może być przydatne.¹⁰⁵ Nie oceniono jeszcze, czy siła alergenu rzeczywiście koreluje z rozmiarem puli limfocytów T i czy zakres immunoregulacji puli limfocytów T jest ważniejszy. Ciekawe, że odpowiedzi CHS porównywalne w nasileniu do tych powodowanych przez silne alergeny kontaktowe mogą być wywołane u myszy pod wpływem powtarzającej się sensytyzacji na słabe alergeny kontaktowe i leki przy deplecji komórek CD4+¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ oraz w hTCPA po deplecji komórek immunoregulatorowych T CD25+ i CD56+.¹⁰³ Może to wskazywać na obecność puli limfocytów T o porównywalnych rozmiarach i skuteczniejszą supresję tych komórek przez immunoregulatorowe komórki CD4+,

Tabela 2. Badania *in vitro* oceniające potencjał uwrażliwiający substancji chemicznych. Wymienione zostały aktualne badania *in vitro* służące do rozpoznawania alergenów kontaktowych. Żadne z badań nie zostało do tej pory oficjalnie zwalidowane.

Etap sensytyzacji	Badanie <i>in vitro</i>	Typ komórki/model	Punkt końcowy	Piśmiennictwo
Modyfikacja białek skóry	Badanie bezpośredniej reaktywności peptydów (DPRA)	–	Reaktywność peptydów	89-91
Aktywacja keratynocytów	Badanie NCTC2544	NCTC2544	Wytwarzanie IL-18	94,95
Antyoksydacyjna odpowiedź keratynocytów	Badanie Keratinosens	HaCaT	Aktywacja Keap-1/Nrf2	96,97
Aktywacja DC	MUSST	U937	Indukcja CD86, IL-8	92
	hCLAT	THP-1	Indukcja CD54, CD86	92
	badanie PBMDc	DC CD14+ wywodzące się z monocytów	Indukcja CD86	93
	Vitosens®	DC CD34+ wywodzące się z komórek progenitorowych	Sygnatura genowa	98,99
	GARD	Komórki progenitorowe MUTZ-3	Sygnatura genowa	13,15
Migracja DC	Badanie migracji DC	MUTZ-LC	Migracja zależna od CCR5/CXCR4	100
Toksyczność skórna wywołana przez substancje chemiczne, stres tkankowy	Sifa EE	Ekwiwalent naskórka	Toksyczność, indukcja IL-1 α	101
Pobudzanie limfocytów T	Badanie pobudzania ludzkich limfocytów T (htCPA)	DC CD14+ wywodzące się z monocytów + autologiczne naiwne ludzkie limfocyty T	Proliferacja i wytwarzanie cytokin przez limfocyty T	102-104

takie jak T_{reg} i komórki NKT w przypadku słabych alergenów kontaktowych. Może to być częściowo związane z potencjałem alergenów kontaktowych o różnej sile wywołania stanu zapalnego skóry, co wpływa na równowagę między komórkami efektorowymi a limfocytami T_{reg}.¹⁰⁹ Aby wyjaśnić ten problem, należy określić częstotliwość limfocytów T i zakresu TCR. Ścisłe związana z równowagą między komórkami efektorowymi a limfocytami T_{reg} jest siła wrodzonej odpowiedzi zapalnej. Wydaje się oczywiste, że siła alergenu silnie koreluje ze zdolnością do indukowania stanu zapalnego skóry, która jest wymagana, aby przerwać homeostatyczną tolerancję i powodować odporność nabytą. Dlatego opracowanie badań *in vitro* dla jakościowej i ilościowej oceny wrodzonej odpowiedzi zapalnej na alergeny chemiczne powinno dostarczyć informacji o sile działania.

Problem wynika z tego, że badania immunotoksykologiczne przeprowadzane są z pojedynczymi składnika-

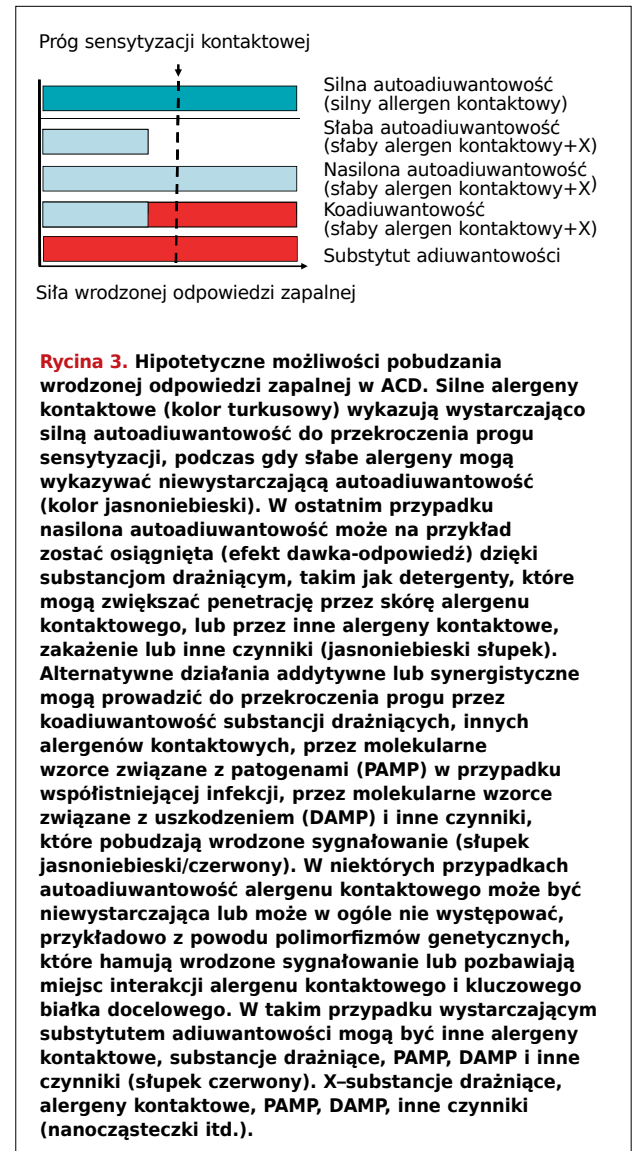
mi, a nie z mieszaninami i formułami lub z produktem końcowym, który zawiera mieszaninę słabego alergenu kontaktowego, w związku z tym wiąże się z małym ryzykiem wywołania sensytyzacji. Ponadto substancje drażniące mogą często znajdować się w produkcie końcowym, jak również w miejscu pracy. Mogą one ułatwiać sensytyzację lub nasilać ACD. Z mechanistycznego punktu widzenia można przewidywać addytywne i synergistyczne działania mieszaniny kilku słabych alergenów kontaktowych, które wspólnie wywołują wystarczający do przekroczenia punktu krytycznego stan zapalny, co umożliwia uwrażliwienie na jeden lub kilka składników (ryc. 3). Takie synergistyczne działanie zostało opisane na modelu mysim CHS¹¹⁰ i istnieją dowody na istotność kliniczną takich działań.¹¹¹⁻¹¹³ W przypadku substancji drażniących można przewidywać ułatwianie penetracji przez skórę np. przez detergenty. Zwiększy to miejscowe stężenie alergenu kontaktowego i w ten sposób zwielokrotni niewystarczające działanie

autoadiuwantowe ponad próg sensytyzacji. Substancje drażniące mogą również wywoływać zapalenie skóry przez pobudzenie szlaków kluczowych dla sensytyzacji i fazy efektorowej (ryc. 3). Niektóre substancje drażniące mogą pobudzać odpowiedzi zapalne, które ułatwiają słabemu alergenowi kontaktowemu przekroczenie progu sensytyzacji, jak to przedstawiono na przykładzie oleju krotonowego i suboptymalnych dawek TNCB,¹¹⁰ innym przykładem jest laurylosiarczan sodu i DNTB.⁶⁴ Należy zdać sobie sprawę, że wiedza na temat działania substancji drażniących jest niewystarczająca. Ze względu na profilowe dane genomowe i proteomowe dotyczące alergenów kontaktowych i nieopublikowane dane dotyczące substancji drażniących stosowanych jako kontrole w badaniach można zidentyfikować zasadnicze dla sensytyzacji na alergeny kontaktowe szlaki, które mogą być również pobudzone przez substancje drażniące i z tego względu może dochodzić do ich wzmocnienia w ACD. Oczekuje się, że odkryte zostanie nakładanie się profili genomowych i proteomowych sygnatur substancji drażniących i swoistych dla alergenów kontaktowych, ale powinno się również odkryć ścieżki, które nie są pobudzone przez substancje drażniące i takie, które są tylko przez nie pobudzone.

Badania przeprowadzane na zwierzętach mają kilka ograniczeń, na przykład fałszywie dodatnie i fałszywie ujemne wyniki badania LLNA dla niektórych substancji chemicznych lub gatunkowo swoiste różnice interakcji niklu z TLL4. Ponadto brakuje badań potencjału uwrażliwiającego mieszanin i formuł, w których można obserwować działania addytywne i synergistyczne poszczególnych składników, oraz brak badań produktów końcowych i dostępnych na rynku. Dodatkowo w wiedzy dotyczącej procesu sensytyzacji są nadal istotne luki. Te problemy uzasadniają konieczność lepszego postmarketingowego i epidemiologicznego nadzoru.

Genomika i proteomika w badaniach podstawowych i immunotoksykologii

Współczesne szeroko zakrojone badania sprawnie identyfikują swoiste alergenowo sygnatury genomowe i proteomowe, które mogą pomóc w opracowaniu testów o dużej przepustowości. Wraz ze zwiększaniem się liczby substancji wykorzystywanych w takich badaniach widoczna jest coraz bardziej wysoka zmienność w profilach różnych substancji chemicznych, co może uniemożliwiać identyfikację sygnatury pojedynczego alergenu kontaktowego. Może być to spowodowane dużą różnorodnością właściwości fizykochemicznych zwią-



ków chemicznych, które powodują ACD. Jednym ze sposobów rozwiązania tego problemu może być pogrupowanie substancji chemicznych według domen mechanistycznych, to jest mechanizmów reakcji tworzenia adduktów z białkami.^{114,115} Jest to bardzo interesująca metoda mogąca uwidocznić klasy profili chemicznych na podstawie domen mechanistycznych. W optymalnej sytuacji może wykryć wspólne elementy dominujące między kilkoma lub wszystkimi klasami substancji chemicznych, które mogą być stosowane w identyfikacji alergenów kontaktowych. Podobne badania powinny zostać przeprowadzone z alergenami oddechowymi

i lekami, które mogą powodować nadwrażliwość pośredniczoną przez limfocyty T, która może mieć wiele części wspólnych z alergenami kontaktowymi w zakresie odpowiedzi wrodzonego układu immunologicznego i odpowiedzi na stres, jak również z substancjami drażniącymi.

Jednym z przyszłych zadań proteomiki jest identyfikacja proteomu haptenu, który jest zbiorem białek zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych, które wchodzi w interakcje z alergenami kontaktowymi.¹⁶ Takie badania zostały rozpoczęte, dotyczą identyfikacji białek wchodzących w interakcję z niklem w ludzkich komórkach i białkach modyfikowanych DNP w ludzkich monocytach THP-1 i makrofagach RAW264.7.¹¹⁶⁻¹¹⁸ Ich celem jest identyfikacja białek celowych, których modyfikacja przez alergeny chemiczne prowadzi do pobudzenia szlaków istotnych dla sensytyzacji i wywoływania ACD. Ponadto potrzebna jest identyfikacja istotnych miejsc celowych w obrębie tych białek. Badania te są istotne do wyjaśnienia podstaw molekularnych autoadiuwantowości alergenów chemicznych.

Brzydkie, złe i dobre

Oprócz złych działań niepożądanych alergenów kontaktowych prowadzących do przewlekłych zmian wypryskowych lub mniej ciężkiego, ale nawrotowego alergicznego kontaktowego zapalenia skóry, te substancje chemiczne mają dobre strony i mogą być stosowane w miejscowej immunoterapii chorób skóry.¹¹⁹ Jednym z przykładów jest łysienie plackowate. W chorobach skóry powodujących utratę owłosienia głowy alergeny kontaktowe, takie jak DNCB, difenylocyproteron (DPCP) lub kwas skwarowy, są stosowane do stymulacji wzrostu włosa.¹²⁰ Innym przykładem wykorzystania alergenów kontaktowych jest chemioimmunoterapia czerniaka skóry.^{121,122} W tym przypadku pobudzenie ostrego stanu zapalnego przez alergeny kontaktowe może pomóc przerwać mechanizmy tolerancji guza. Ponadto modyfikacja haptenu antygenów własnych może promować limfocyty efektorowe T swoiste dla guza, które mogą również rozpoznawać niezmiennione antygeny własne. Ta samoreaktywność limfocytów T wyjaśnia okresowe występowanie odbarwień typu witiigo, które są najprawdopodobniej wywołane zniszczeniem prawidłowych melanocytów prezentujących własne antygeny na cząsteczkach MHC.

Dalszy interesujący ciągle hipotetyczny aspekt to potencjalne wykorzystanie alergenów kontaktowych do lepszego zrozumienia i modulacji czynności białek.

Jest prawdopodobne, że PTM wywołana przez alergeny kontaktowe może różnić się od konwencjonalnej PTM budową molekularną substancji chemicznej i jej miejsc docelowych oraz składem aminokwasów w białkach. Z tego względu być może dowiemy się, że czynności białek mogą być dalej modulowane przez alergeny kontaktowe, co wpływa na jakościowe i ilościowe parametry odpowiedzi. Przydatnym porównaniem może być różnorodność fenotypowa choroby w przypadku mutacji tego samego białka w różnych domenach białkowych, jak to się na przykład obserwuje w pacjentów IPEX z różnymi mutacjami FOXP3.¹²³⁻¹²⁵ Badania w tym obszarze biologii chemicznej wydają się ciekawe i mogą pomóc w opracowywaniu leków, które naśladują lub zapobiegają zależnej od alergenów modulacji czynności białek.

Wszystkie drogi prowadzą do Rzymu – implikacje wrodzonej i stresowej odpowiedzi na alergeny kontaktowe

Zdanie sobie sprawy, że alergeny kontaktowe i czynniki infekcyjne mogą pobudzać te same szlaki wrodzonego układu immunologicznego i szlaki stresowe, ma istotne implikacje. Zakażenia mogą być czynnikami spustowymi dla sensytyzacji kontaktowej i fazy efektorowej przez substytucję nieskutecznej bądź nieobecnej autoadiuwantowości lub wzmacnianie słabej autoadiuwantowości alergenów kontaktowych, co pomaga przekroczyć próg aktywacji wrodzonego układu immunologicznego (ryc. 3). Dowody na tę hipotezę pochodzą z doświadczeń zespołu autora dotyczących BMDC, które ze względu na brak IL-12R β 2 i TLR4 nie mogą wywołać CHS indukowanego TNCB u myszy, mogą wywoływać sensytyzację po uprzednim traktowaniu *in vitro* oligonukleotydamy CpG, które są ligandami dla TLR9.²¹ Wskazuje to, że niekoniecznie te same PRR, które są odpowiedzialne za szlak kontaktowy pośredniczony alergenem kontaktowym, muszą być pobudzane, aby zapewnić niewystarczającą autoadiuwantowość. Inne badania wykazały oporność myszy na rozwój CHS indukowanej niklem u myszy pozbawionych miejsc wiązania niklu na mysim receptorze TLR4. Niewystarczająca autoadiuwantowość była zastępowana przez jednoczesną iniekcję niklu z LPS¹²⁶ lub elementów drobnoustrojów.^{127,128} Z tego względu ciekawe jest rozważenie adiuwantów drobnoustrojowych, które mogą powodować zmiany w układzie immunologicznym i immunoregulację lub tolerancję i dlatego mogą pomóc w opracowaniu

strategii leczenia jak to sugerowano w ostatnim badaniu.¹²⁹

Fakt, że zakażenia indukują szlaki sygnałowe TLR i mogą również prowadzić do aktywacji inflamasyonu oraz wytwarzania ROS sprawia, że koncepcja drobnoustrojowych koadiuwantów/adjuwantów substytucyjnych jest bardzo atrakcyjna. Przypadkowe zakażenia mogą więc dostarczyć egzogennych adjuwantów (PAMP) lub pobudzić wytwarzanie lub uwalnianie endogennych sygnałów zagrożenia takich jak DAMP, w ten sposób mogą stanowić substytut niewystarczającej lub brakującej autoadjuwantowości i nasilać niewystarczającą autoadjuwantowość alergenów kontaktowych. Aktywacja inflamasyonu nie musi się ograniczać do bakteryjnych lub wirusowych molekularnych wzorców związanych z patogenem (PAMP) i innych prozapalnych czynników indukowanych drobnoustrojami, ale może odbywać się również przez inne drobnoustrojowe czynniki, takie jak krzemionka czy kryształy azbestu,¹³⁰ nanocząsteczki^{131,132} i wiele innych składników, które mogą wywołać ważne zapalne ścieżki sygnałowe odpowiedzi wrodzonej bezpośrednio lub przez indukcję endogennych aktywatorów takich DAMP (ryc. 3). Możliwe, że zwiększona ekspozycja na takie egzogenne koadiuwanty w środowisku lub produktach dostępnych na rynku wyjaśnia częściowo wzrost częstości występowania ACD w ciągu ostatnich dziesięcioleci.

Podsumowanie

Nagłym problemem nauk podstawowych w dziedzinie alergii na substancje chemiczne jest wyzwalanie wrodzonych immunologicznych i stresowych odpowiedzi przez alergeny kontaktowe, które są wykorzystywane w przeciwdrobnoustrojowej/przeciwwirusowej odpowiedzi.^{10,133} Dotyczy to nie tylko alergenów chemicznych, ale jest również obserwowane w przypadku niektórych alergenów białkowych^{31,134} i wynika z wewnątrzpochodnej autoadjuwantowości alergenów. Dodatkowe znaczenie mają kofaktory biogenne nośników alergenowych, na przykład oksydazy NADPH związanych z pyłkami lub mediatorzy lipidowych.¹³⁵ Te ciekawe dane dostarczają informacji tłumaczących dlaczego alergen jest alergenem.

Podobne mechanizmy mogą dotyczyć chemicznych alergenów wziewnych i leków, takich jak antybiotyki β -laktamowe, które wywołują reakcje niepożądane, w których pośredniczą limfocyty T.^{5,108,136} Swoiste działanie tych substancji chemicznych, biorąc pod

uwagę rodzaj odpowiedzi immunologicznej, może być wywoływane ich wewnątrzpochodnymi właściwościami, ale najprawdopodobniej również odpowiednim mikrośrodowiskiem tkankowym. Różne podtypy komórek zrębu w skórze, płucach, jelicie, wątrobie i innych narządach oraz odpowiednie komórki immunologiczne z pewnością wpływają na wyniki ekspozycji na substancję chemiczną.^{36,37} Może to częściowo tłumaczyć, dlaczego nakładane zewnętrznie alergeny wziewne dają dodatni wynik testu LLNA, ale nie wywołują ACD. Innym chemicznym wewnątrzpochodnym zjawiskiem jest indukcja różnych profili cytokin przez alergeny kontaktowe i wziewne.^{60,137-141} Co ciekawe, sensytyzacja na alergeny wziewne może odbywać się przez skórę.

Identyfikacja cech molekularnych swoistego mikrośrodowiska tkankowego, szczególnie na komórkach nabłonka, które również odzwierciedlają tkankowo swoiste cechy komórek immunologicznych, tak zwany epimimom, stanowi wyzwanie i ciekawy temat przyszłych badań.¹⁴²

Mając na uwadze leczenie ACD, odkrycie uzupełniającego się działania wrodzonego układu immunologicznego i szlaków stresowych prowadzących razem do indukcji zapalenia skóry otwiera nowe możliwości objawowego leczenia przeciwzapalnego. Jak pokazano na modelu CHS, zablokowanie jednej ścieżki wystarczy, aby zapobiec sensytyzacji, a w pewnych przypadkach fazie efektorowej. W przyszłych badaniach należy ocenić istotność tych szlaków dla fazy efektorowej i przewlekłego ACD. Przewiduje się opracowanie strategii leczenia przeciwzapalnego, które blokują więcej niż jedną ścieżkę, w połączeniu ze strategiami, które prowadzą do pozbycia się alergenowoswoistych komórek efektorowych i limfocytów T pamięci, na przykład przez immunoterapię swoistą, co ma na celu przywrócenie tolerancji.

Podziękowania

Dziękuję dr. Philippowi R. Esserowi za owocne dyskusje oraz uważne i krytyczne przeczytanie opracowania. Artykuł był częściowo finansowany z grantu Komisji Europejskiej jako część projektu „Novel Testing for In Vitro Assessment of Allergens (Sens-it-iv)”, LSHB-CT-2005-018681

© 2012 John Wiley & Sons A/S. All rights reserved. Reprinted from *Experimental Dermatology*, 2012, 21, 382-389 Stefan F. Martin Contact dermatitis: from pathomechanisms to immunotoxicology with the permission from John Wiley & Sons

Piśmiennictwo

1. Thyssen J P, Linneberg A, Menne T et al. *Contact Dermatitis* 2007; 57: 287–299.
2. Peiser M, Tralau T, Heidler J et al. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69: 763–781.
3. Diepgen T L, Coenraads P J. *Int Arch Occup Environ Health* 1999; 72: 496–506.
4. Diepgen T L. *Int Arch Occup Environ Health* 2003; 76: 331–338.
5. Pichler W J, Naisbitt D J, Park B K. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 574–581.
6. Schnuch A, Westphal G, Mossner R et al. *Contact Dermatitis* 2011; 64: 2–23.
7. Kezic S. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011; 24: 735–785.
8. Grice E A, Segre J A. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9: 244–253.
9. Kong H H, Segre J A. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 933–939.
10. Martin S F, Esser P R, Weber F C et al. *Allergy* 2011; 66: 1152–1163.
11. Schoeters E, Verheyen G R, Nelissen I et al. *Mol Immunol* 2007; 44: 3222–3233.
12. Vandebriel R J, Pennings J L, Baken K A et al. *Toxicol Sci* 2010; 117: 81–89.
13. Johansson H, Lindstedt M, Albrekt A S et al. *BMC Genomics* 2011; 12: 399.
14. Lindstedt M, Borrebaeck C. *Biomark Med* 2011; 5: 809–811.
15. Lindstedt M, Nelissen I, Gibbs S et al. Mimicking the immunoregulatory properties of primary dendritic cells in vitro – a rational approach to design a test system. In: Roggen E L, Weltzien H U, Hermans H, ed. *Progress towards novel testing strategies for in vitro assessment of allergens*. Kerala: Transworld Research Network, 2012: 67–84.
16. Thierse H J, Budde P, Dietz L et al. Proteomic Identification of allergen-regulated proteins and allergen-protein interaction networks in assisting biomarker and assay development. In: Roggen E L, Weltzien H U, Hermans H, ed. *Progress Towards Novel Testing Strategies for in vitro Assessment of Allergens*. Kerala: Transworld Research Network, 2012: 145–166.
17. Gibbs S, Thierse H J, Corsini E. Multifunctional role of keratinocytes in sensitization. In: Roggen E L, Weltzien H U, Hermans H, ed. *Progress towards novel testing strategies for in vitro assessment of allergens*. Kerala: Transworld Research Network, 2012: 35–53.
18. Kadow S, Jux B, Chmll S et al. *Future Med Chem* 2009; 1: 1583–1591.
19. Chen G Y, Nunez G. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 826–837.
20. Martin S F. *Allergo J* 2011; 20: 81–86. 21. Martin S F, Dudda J C, Bachtanian E et al. *J Exp Med* 2008; 205: 2151–2162.
22. Schmidt M, Raghavan B, Muller V et al. *Nat Immunol* 2010; 11: 814–819.
23. Weber F C, Esser P R, Muller T et al. *J Exp Med* 2010; 207: 2609–2619.
24. Lander E S, Linton L M, Birren B et al. *Nature* 2001; 409: 860–921.
25. Lander E S. *Nature* 2011; 470: 187–197.
26. consortium T C e s. *Science* 1998; 282: 2012–2018.
27. Lodish H F, Zhou B, Liu G et al. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 120–130.
28. Czech B, Hannon G J. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 19–31.
29. Walter P, Ron D. *Science* 2011; 334: 1081–1086.
30. Todd D J, Lee A H, Glimcher L H. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 663–674.
31. Wills-Karp M, Nathan A, Page K et al. *Mucosal Immunol* 2010; 3: 104–110.
32. Trompette A, Divanovic S, Visintin A et al. *Nature* 2009; 457: 585–588.
33. Termeer C, Benedix F, Sleeman J et al. *J Exp Med* 2002; 195: 99–111.
34. Jiang D, Liang J, Fan J et al. *Nat Med* 2005; 11: 1173–1179.
35. Scheibner K A, Lutz M A, Boodoo S et al. *J Immunol* 2006; 177: 1272–1281.
36. Matzinger P. *Nat Immunol* 2007; 8: 11–13.
37. Matzinger P, Kamala T. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 221–230.
38. Biedermann T, Kneilling M, Mailhammer R et al. *J Exp Med* 2000; 192: 1441–1452.
39. Kneilling M, Mailhammer R, Hultner L et al. *Blood* 2009; 114: 1696–1706.
40. Cumberbatch M, Dearman R J, Antonopoulos C et al. *Immunology* 2001; 102: 323–330.
41. Dudeck A, Suender C A, Kostka S L et al. *Eur J Immunol* 2011; 41: 1883–1893.
42. Engeman T, Gorbachev A V, Kish D D et al. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 941–949.
43. Le Borgne M, Etchart N, Goubier A et al. *Immunity* 2006; 24: 191–201.
44. Askenase P W, Szczepanik M, Itakura A et al. *Trends Immunol* 2004; 25: 441–449.
45. Askenase P W, Majewska-Szczepanik M, Kerfoot S et al. *Scand J Immunol* 2011; 73: 465–477.
46. Komai-Koma M, Gilchrist D S, McKenzie A N et al. *J Immunol* 2011; 186: 2584–2591.
47. Hueber A J, Alves-Filho J C, Asquith D L et al. *Eur J Immunol* 2011; 41: 2229–2237.
48. Cai Y, Shen X, Ding C et al. *Immunity* 2011; 35: 596–610.
49. Laggner U, Di Meglio P, Perera G K et al. *J Immunol* 2011; 187: 2783–2793.
50. Gray E E, Suzuki K, Cyster J G. *J Immunol* 2011; 186: 6091–6095.
51. O’Leary J G, Goodarzi M, Drayton D L et al. *Nat Immunol* 2006; 7: 507–516.
52. Paust S, Gill H S, Wang B Z et al. *Nat Immunol* 2010; 11: 1127–1135.
53. Rouzaira P, Luci C, Blasco E et al. *Eur J Immunol* 2012; 42: 80–88.
54. Carbone T, Nasorri F, Pennino D et al. *Eur J Dermatol* 2010; 20: 724–730.
55. Saint-Mezard P, Krasteva M, Chavagnac C et al. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 641–647.
56. Bonneville M, Chavagnac C, Vocanson M et al. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 1430–1435.
57. Dudeck A, Dudeck J, Scholten J et al. *Immunity* 2011; 34: 973–984.
58. Hennino A, Jean-Decoster C, Giordano-Labadie F et al. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 1064–1067.
59. Gober M D, Fischelevich R, Zhao Y et al. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 1460–1469.
60. Kimber I, Basketter D A, Gerberick G F et al. *Toxicol Sci* 2011; 120 (Suppl 1): S238–S268.
61. Martin S F, Esser P R. *Allergologie* 2011; 34: 529–537.
62. Sutterwala F S, Ogura Y, Szczepanik M et al. *Immunity* 2006; 24: 317–327.
63. Watanabe H, Gaide O, Petrilli V et al. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 1956–1963.
64. Watanabe H, Gehrke S, Contassot E et al. *J Immunol* 2008; 180: 5826–5832.
65. Klekotka P A, Yang L, Yokoyama W M. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 184–191.
66. Sorokin L. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 712–723.
67. Kawai T, Akira S. *Immunity* 2011; 34: 637–650.
68. Nish S, Medzhitov R. *Immunity* 2011; 34: 629–636.
69. Ade N, Leon F, Pallardy M et al. *Toxicol Sci* 2009; 107: 451–460.
70. Natsch A. *Toxicol Sci* 2010; 113: 284–292.
71. Jux B, Kadow S, Esser C. *J Immunol* 2009; 182: 6709–6717.
72. Kalmes M, Neumeyer A, Rio P et al. *Biol Chem* 2006; 387: 1201–1207.
73. Kalmes M, Hennen J, Clemens J et al. *Biol Chem* 2011; 392: 643–651.
74. Swanson H I. *Chem Biol Interact* 2004; 149: 69–79.
75. Zordoky B N, El-Kadi A O. *Curr Drug Metab* 2009; 10: 164–178.
76. Bergstrom M A, Ott H, Carlsson A et al. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 1145–1153.
77. Merk H F, Baron J M, Neis M M et al. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 224: 313–317.
78. Baron J M, Wiederholt T, Heise R et al. *Curr Med Chem* 2008; 15: 2258–2264.
79. Heise R, Skazik C, Rodriguez F et al. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 305–308.
80. Skazik C, Heise R, Ott H et al. *Arch Biochem Biophys* 2011; 508: 212–216.
81. Veldhoen M, Hirota K, Westendorf A M et al. *Nature* 2008; 453: 106–109.
82. Stockinger B, Hirota K, Duarte J et al. *Semin Immunol* 2011; 23: 99–105.



83. Martin B, Hirota K, Cua D J et al. *Immunity* 2009; 31: 321–330.
84. Kadow S, Jux B, Zahner S P et al. *J Immunol* 2011; 187: 3104–3110.
85. Adler S, Basketter D, Creton S et al. *Arch Toxicol* 2011; 85: 367–485.
86. Jowsey I R, Basketter D A, Westmoreland C et al. *J Appl Toxicol* 2006; 26: 341–350.
87. Friedmann P S, Pickard C. *Contact Dermatitis* 2010; 63: 237–247.
88. Aeby P, Ashikaga T, Bessou-Touya S et al. *Toxicol In Vitro* 2010; 24: 1465–1473.
89. Gerberick G F, Vassallo J D, Bailey R E et al. *Toxicol Sci* 2004; 81: 332–343.
90. Gerberick G F, Vassallo J D, Foertsch L M et al. *Toxicol Sci* 2007; 97: 417–427.
91. Gerberick G F, Troutman J A, Foertsch L M et al. *Toxicol Sci* 2009; 112: 164–174.
92. Maxwell G, Aeby P, Ashikaga T et al. *ALTEX* 2011; 28: 50–55.
93. Reuter H, Spiekker J, Gerlach S et al. *Toxicol In Vitro* 2011; 25: 315–323.
94. Corsini E, Mitjans M, Galbiati V et al. *Toxicol In Vitro* 2009; 23: 789–796.
95. Galbiati V, Mitjans M, Lucchi L et al. *Toxicol In Vitro* 2010; 25: 724–732.
96. Emter R, Ellis G, Natsch A. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 245: 281–290.
97. Natsch A, Caroline B, Leslie F et al. *Toxicol In Vitro* 2011; 25: 733–744.
98. Lambrechts N, Nelissen I, Van Tendeloo V et al. *Toxicol Lett* 2011; 203: 106–110.
99. Hooyberghs J, Schoeters E, Lambrechts N et al. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 231: 103–111.
100. Ouweland K, Spiekstra S W, Reinders J et al. *Toxicol In Vitro* 2010; 24: 578–585.
101. dos Santos G G, Spiekstra S W, Sampat-Sardjoepersad S C et al. *Toxicol In Vitro* 2011; 25: 347–357.
102. Dietz L, Esser P R, Schmucker S S et al. *Toxicol Sci* 2010; 117: 336–347.
103. Vocanson M, Cluzel-Tailhardat M, Poyet G et al. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2119–2122.
104. Martin S F, Esser P R, Schmucker S et al. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 4171–4184.
105. Kimber I, Maxwell G, Gilmour N et al. *Toxicology* 2012; 291: 18–24.
106. Lass C, Vocanson M, Wagner S et al. *Exp Dermatol* 2008; 17: 849–857.
107. Vocanson M, Hennino A, Rozieres A et al. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 1185–1191.
108. Rozieres A, Vocanson M, Rodet K et al. *Allergy* 2010; 65: 996–1003.
109. Lass C, Merfort I, Martin S F. *Exp Dermatol* 2010; 19: 1007–1013.
110. Grabbe S, Steinert M, Mahnke K et al. *J Clin Invest* 1996; 98: 1158–1164.
111. Bruynzeel D P, von Blomberg-van der Flier M, van Ketel W G et al. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1983; 72: 67–70.
112. Pedersen L K, Johansen J D, Held E et al. *Contact Dermatitis* 2004; 50: 265–273.
113. Bonefeld C M, Nielsen M M, Rubin I M et al. *Contact Dermatitis* 2011; 65: 336–342.
114. Roberts D W, Aptula A O. *J Appl Toxicol* 2008; 28: 377–387.
115. Lalko J F, Kimber I, Dearman R J et al. *Toxicol In Vitro* 2011; 25: 433–445.
116. Heiss K, Junkes C, Guerreiro N et al. *Proteomics* 2005; 5: 3614–3622.
117. Megherbi R, Kiopelidou E, Foster B et al. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238: 120–132.
118. Kim D, Kim Y J, Seo J N et al. *Immunol Invest* 2009; 38: 132–152.
119. Holzer A M, Kaplan L L, Levis W R. *J Drugs Dermatol* 2006; 5: 410–416.
120. Singh G, Lavanya M. *Int J Trichology* 2010; 2: 36–39.
121. Terheyden P, Kortum A K, Schulze H J et al. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133: 437–444.
122. Berd D. *Expert Rev Vaccines* 2004; 3: 521–527.
123. Wildin R S, Smyk-Pearson S, Filipovich A H. *J Med Genet* 2002; 39: 537–545.
124. Gambineri E, Torgerson T R, Ochs H D. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15: 430–435.
125. Gambineri E, Perroni L, Passerini L et al. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 1105–1112 e1101.
126. Sato N, Kinbara M, Kuroishi T et al. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 743–751.
127. Takahashi H, Kinbara M, Sato N et al. *Int Immunopharmacol* 2011; 11: 1534–1540.
128. Huang L, Kinbara M, Funayama H et al. *Int Immunopharmacol* 2011; 11: 1916–1924.
129. Weise C, Zhu Y, Ernst D et al. *Exp Dermatol* 2011; 20: 805–809.
130. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 229–265.
131. Chang C. *J Autoimmun* 2010; 34: J234–J246.
132. Hubbs A F, Mercer R R, Benkovic S A et al. *Toxicol Pathol* 2011; 39: 301–324.
133. Freudenberg M A, Esser P R, Jakob T et al. *G Ital Dermatol Venereol* 2009; 144: 173–185.
134. Karp C L. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 955–960.
135. Traidl-Hoffmann C, Jakob T, Behrendt H. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 558–566.
136. Rozieres A, Vocanson M, Said B B et al. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009; 9: 305–310.
137. Kimber I, Basketter D A, Dearman R J. *Toxicology* 2010; 268: 139–142.
138. Dearman R J, Basketter D A, Kimber I. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 138: 308–316.
139. Plitnick L M, Loveless S E, Ladics G S et al. *Toxicology* 2003; 193: 191–201.
140. Holden N J, Bedford P A, McCarthy N E et al. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 1148–1159.
141. De Jong W H, Arts J H, De Klerk A et al. *Toxicology* 2009; 261: 103–111.
142. Swamy M, Jamora C, Havran W et al. *Nat Immunol* 2010; 11: 656–665.

KOMENTARZ

fot. Włodzimierz Wasyluk

**Prof. dr hab. n. med.****Wiesław Gliški**Katedra i Klinika Dermatologiczna
WUM w Warszawie

W latach 70. ubiegłego wieku przeprowadzono wiele badań wykorzystujących modele mysie i szurcze, w których wykazano genetyczne podłoże uwarunkowania i ukierunkowania odpowiedzi immunologicznej. Stwierdzono, że niektóre szczepy zwierząt nie są w stanie odpowiedzieć na uczulanie na część prostych substancji chemicznych, które stanowiły antygen rozpoczynający odpowiedź immunologiczną u innych pokrewnych szczepów myszy. Porównywano zwykle odpowiedź rodziców i ich potomstwa z krzyżówek z innym szczepem myszy na substancje chemiczne, a jako antygen używano zwykle prostych cyklicznie powtarzających się sekwencji łańcuchów peptydowych lub DNA, do których przyłączano hapteny, najczęściej dwunitrochlorobenzen lub trójnitrochlorobenzen. Są to substancje generujące swoiste populacje limfocytów T, rozpoznające określony hapten.

Wyniki tych badań legły u podstawy zrozumienia mechanizmu powstawania odpowiedzi limfocytów (komórkowej, opóźnionej) i powstawania wyprysku kontaktowego na skórze. Zrozumiano wówczas sposób prezentacji antygenów/haptenów na cząsteczkach HLA i budowę receptora TCR, który rozpoznawał niewielkie 9-10-aminokwasowe fragmenty z przyłączonymi do nich cząsteczkami haptenu.

Artykuł Martina przedstawia współczesne poglądy na patomechanizm wyprysku kontaktowego na poziomie molekularnym i stara się uporządkować naszą wiedzę o powstawaniu odpowiedzi immunologicznej (fizjologicznej) po kontakcie z haptenami oraz o zjawiskach współlistniejących, które nasilają odpowiedź zapalną w czasie rozwoju wyprysku kontaktowego.

Po pierwszych badaniach zrozumiano, że to, czy dany osobnik jest skłonny do uczulenia na daną substancję jest zapisane w genach i zależy od tego, czy występuje u niego populacja naiwnych limfocytów

zdolna do rozpoznania budowy przestrzennej alergenu/haptenu na nośniku polipeptydowym, z której powstają swoiście uczulone limfocyty T odpowiedzialne za objawy wyprysku kontaktowego.

W dalszych badaniach wykazano, że nie każda substancja chemiczna może stać się antygenem, bo zależy to od: 1. możliwości wiązania z białkami, 2. wiązania się z miejscem danego białka, co zmienia jego kształt przestrzenny lub czynność. Czynniki te wpływają na wywołanie naturalnej odpowiedzi, a nie tylko swoistej nabytej odporności. Autorzy wskazują że tzw. ksenobiotyczne związki chemiczne mogą prowadzić do rozwoju alergii lub procesu autoagresyjnego.

Substancje chemiczne mogą zmieniać budowę białek (jako proces modyfikacji posttranslacyjnej), co zmienia lokalizację białek w komórce, współdziałanie różnych białek oraz często ich podstawową funkcję. Zmiany te mogą być spowodowane metylacją, acetylacją, glikolizacją, fosforylacją, ubikwityzacją oraz sumojlacją. Zwykle wiąże się to z przyłączeniem dodatkowego rodnika lub łańcucha bocznego do łańcucha polipeptydowego/białkowego, co powoduje zmiany antygenowości tego białka. Staje się ono immunologicznie czynną cząsteczką również w przypadku przyłączenia haptenu, co prowadzi z kolei do wyprysku kontaktowego lub odpowiedzi komórkowej.

Ten typ reakcji został przedstawiony na rycinie 2 artykułu. Hapten (Ni lub TNCB) wywołuje nabytą odpowiedź immunologiczną generującą swoiście uczulone limfocyty T, ale jednocześnie prowadzi do aktywacji naturalnej nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, np. poprzez wiązanie atomów niklu z histydyną w receptorach TLR4 lub DNCB z cysteiną w Keap 1 odpowiedzialną za proces antyoksydacji.

Autor podkreśla, że substancje chemiczne powinny być badane pod względem ich potencjalnej zdolności do uczulania przez kontakt ze skórą. Są to modele hodowli komórkowych pochodzenia nabłonkowego lub z linii dendrytycznych. Pozwoliłyby to na ocenę substancji chemicznych jako adiuwantu w reakcji zapalnej pobudzającej naturalną odporność immunologiczną (wiele możliwości przedstawiono na rycinie 3). Adiuwantem są zwykle substancje



drażniące, hapteny, białka związane z patogenami lub z białkami uwalnianymi przy zniszczeniu tkanki (urazie, martwicy).

Ważne dla alergii kontaktowej jest rozpoznanie powinowactwa haptenu do poszczególnych białek w komórkach i tkankach, co wyjaśniłoby najłatwiejszą drogę uczulenia, jak i wskazywałoby, które białka zmieniają swą czynność pod wpływem haptenu.

Nazwano to „haptenu proteome”, co nie ma odpowiednika w polskim nazewnictwie.

Zrozumienie tych mechanizmów być może pozwoli na przeciwdziałanie uczuleniu lub pomoże w uzyskaniu tolerancji na alergeny kontaktowe. Przy blokadzie choćby jednego głównego ogniwa patogenetycznego, które może być różne dla poszczególnych grup haptenu/alergenów, uzyskiwałoby się efekt leczniczy.