

Zewnątrzkomórkowe pułapki eozynofilowe w astmie alergicznej

Eosinophil extracellular traps in allergic asthma

S U M M A R Y

Increased eosinophils in the peripheral blood are often observed in allergic diseases. Eosinophilic inflammation in asthma modulates the severity of the disease through the production of inflammatory mediators, causing airway remodeling. Eosinophils can generate eosinophil extracellular traps (EETs), web-like structures made of DNA complexes and cytotoxic granulate proteins. They are a part of the immune system's defences against pathogens and are responsible for programmed cell death by destroying the membranes of cell organelles. Recent studies show that eosinophil extracellular traps might also react to the presence of the allergens, therefore modulating the severity of the allergic diseases. This work focuses on describing the mechanisms of EET, methods used for its analysis and their function in allergic asthma.

Podwyższony poziom eozynofili w krwi obwodowej jest cechą charakterystyczną chorób alergicznych. Zapalenie eozynofilowe w astmie wpływa na ciężkość przebiegu choroby poprzez remodeling dróg oddechowych spowodowany produkcją mediatorów stanu zapalnego. Eozynofile mogą tworzyć zewnątrzkomórkowe pułapki eozynofilowe (EET), a więc sieci składające się z kompleksów DNA i cytotoksycznych białek ziarnistości. Ich zadaniem jest zapoczątkowanie zaprogramowanej śmierci komórki poprzez destrukcję błon organelli komórkowych celem obrony organizmu przeciwko patogenom. Ostatnie doniesienia wskazują, iż pułapki eozynofilowe potrafią również reagować na alergeny, przyczyniając się istotnie do rozwoju i przebiegu chorób alergicznych. Niniejsza praca opisuje mechanizm działania i metody wykorzystywane do analizy EET, a także ich znaczenie w astmie alergicznej.

Narożna B.: Zewnątrzkomórkowe pułapki eozynofilowe w astmie alergicznej. *Alergia*, 2022, 1; 4-6

Choroby alergiczne charakteryzują się eozynofilią, a więc podwyższoną liczbą eozynofili w rozmazie krwi [1]. Eozynofile to granulocyty kwasochłonne - jeden z rodzajów leukocytów, których istotną rolą jest produkcja mediatorów stanu zapalnego, odpowiedzialnych za zwalczanie infekcji wirusowych, bakteryjnych i pasożytniczych oraz podtrzymywanie zapalenia alergicznego.

Zapalenie eozynofilowe w astmie alergicznej jest jedną z istotnych przyczyn wpływających na ciężkość przebiegu astmy, gdyż uwalniane przez eozynofile mediatory stanu zapalnego powodują skurcz mięśniówki gładkiej, a także przekrwienie i obrzęk śluzówki oraz nadprodukcję śluzu przez komórki kubkowe, przyczyniając się do remodelingu dróg oddechowych [2].

Granulocyty kwasochłonne są w stanie produkować zewnątrzkomórkowe pułapki eozynofilowe (ang. eosinophil extracellular traps, EET) – sieci składające się z kompleksów DNA i cytotoksycznych białek ziarnistości [3].

Podobne pułapki tworzą również neutrofile, a proces uwalniania DNA z tych komórek został odkryty w 2004 roku i nazwany NETozą (ang. NETosis) [4].

Mechanizm ten jest dokładniej znany jako zaprogramowana śmierć komórki, a jego skutkiem jest modyfikacja histo-

nowi i dekondensacja chromatyny w jądrze komórkowym, co prowadzi do zniszczenia organelli i błon komórkowych [5]. Proces ten jest zależny od produkcji reaktywnych form tlenu, tzw. ROS (ang. reactive oxygen species), powstałych z udziałem oksydazy NADPH.

NEToza działa na innej zasadzie niż apoptoza: zamiast degradacji kwasów nukleinowych uwalniane są pułapki neutrofilowe, które powodują uszkodzenie błon komórkowych. Mechanizm ten jest częścią naturalnej obrony układu odpornościowego przed patogenami, aczkolwiek został również powiązany z patofizjologią nowotworów [6].

W przeciwieństwie do pułapek neutrofilowych, pułapki eozynofilowe nie są tak dobrze poznane, a ostatnie badania wykazują, iż mogą przyczyniać się do powstawania chorób alergicznych.

Mechanizm działania EET

Zewnątrzkomórkowe pułapki eozynofilowe, zwane również EETozą (ang. EETosis) zostały odkryte dopiero w 2013 roku [3]. Zasada działania pułapek eozynofilowych jest podobna do pułapek neutrofilowych: procesy zależne od oksydazy NADPH powodują zaprogramowaną śmierć komórkową



Dr n. med.

Beata Narożna

Pracownia Badań Komórkowych i Molekularnych Kliniki Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej

Kierownik Pracowni:
Prof. dr hab. n. med.
Aleksandra Szczepankiewicz

Kierownik Kliniki:
Dr hab. n. med.
Irena Wojsyk-Banaszak

Słowa kluczowe:

zewnątrzkomórkowe pułapki eozynofilowe, astma, alergologia, astma

Key words:

eosinophil extracellular traps, allergy, asthma

poprzez łąkę błon cytoplazmatycznych i jądrowych. Główne różnice można zaobserwować w budowie strukturalnej ziarnistości i pułapek: nie wszystkie ziarnistości ulegają rozpadowi, a struktury EET mają większą średnicę z powodu zmniejszonej aktywności proteaz modyfikujących chromatynę [7]. Ponadto, w trakcie EET-oty wypustki plazmatyczne produkują pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Łąka eozynofili, powodująca uwolnienie ziarnistości i powstanie struktury sieci opartej na chromatynie, jest kluczową cechą charakteryzującą EET, a pułapki te niejako przedłużają zdolność do działania eozynofili na długo po ich śmierci komórkowej.

Metody analizy pułapek

Standardową metodą identyfikacji pułapek eozynofilowych *in vitro* jest obserwacja mikroskopowa komórek adhe rentnych na płytkach do hodowli komórkowych lub slajdach mikroskopowych w jasnym polu [7]. Alternatywą mogą być eksperymenty w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem kontrastu fazowego lub interferencyjnego. Obserwację ułatwiają barwniki chemiczne wizualizujące ziarnistości eozynofili (np. barwnik May-Grunwalda lub Diff-Quik) i barwniki fluorescencyjne uwidaczniające w sposób ilościowy śmierć komórkową (np. SYTOX). Proces EET-oty od procesu apoptozy można odróżnić poprzez ocenę morfologii komórek.

Jedną z istotnych cech pułapek eozynofilowych jest ich zdolność łapania innych komórek, mierzona przy pomocy wyznakowanych fluorescencyjnie mikrokulek, dodawanych do pożywki hodowlanej po indukcji EET-oty. Pułapki eozynofilowe łączą się z mikrokulkami, tworząc duże agregaty. Liczbę niezwiązanych mikrokulek oznacza się w pożywce hodowlanej za pomocą czynnika fluorescencyjnego, natomiast strukturę 3D samych mikrokulek ocenia się przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej.

Za pomocą transmisyjnej elektropii mikroskopowej można z kolei wykryć cytolityczne ziarnistości eozynofili. Ponadto, analizy proteomiczne eozynofili obwodowych wykazały, iż galektyna-10 jest jednym z pięciu białek o najwyższej ekspresji, a jej oznaczenia immunohistochemiczne wraz z białkiem ziarnistości MBP pozwalają odróżnić cytolityczne eozynofile od tych nieuszkodzonych.

Astma alergiczna

Badania pokazują, że chociaż EET-ota jest jednym z kluczowych elementów układu odpornościowego podczas walki z wirusami, bakteriami i pasożytami, to pułapki eozynofilowe potrafią również reagować na czynniki niepatogenne, takie jak alergeny, przyczyniając się istotnie do rozwoju i przebiegu chorób alergicznych.

Jednym z największych i najbardziej kompleksowych badań dotyczących udziału EET w astmie alergicznej jest opublikowane w 2021 badanie Lu i wsp., gdzie wykazano związek pułapek eozynofilowych w popłuczynach pęcherzykowo-oskrzelowych z ciężkością przebiegu astmy, a także udowodniono ich wpływ na hiperplazję komórek kubkowych, produkcję śluzu i zwiększoną ekspresję cytokin zapalnych [8].

Używając mikroskopii elektronowej i immunobarwienia zaobserwowano kolokalizację sieci DNA z białkiem kationowym eozynofili (ECP) u pacjentów chorych na astmę; nieobecna u osób zdrowych. Badacze zauważyli również korela-

cję poziomu EET z ciężkością przebiegu astmy wg klasyfikacji GINA (ang. Global Initiative for Asthma) i wartości FEV1%.

Powyższe odkrycie zostało zweryfikowane z wykorzystaniem modelu zwierzęcego. W mysim modelu astmy alergicznej wywołanej owalbuminą potwierdzono obecność pułapek eozynofilowych, nieobecnych z kolei u myszy kontrolnych. Mikroskopia immunofluorescencyjna wykazała sieci DNA pochodzenia zewnątrzkomórkowego w kolokalizacji z ECP, co dalej potwierdzono metodą ELISA z wykorzystaniem przeciwciał anti-ECP i anti-DNA. Następnie naukowcy zweryfikowali również inne mysie modele astmy: indukowane alergenami roztozczami kurzu domowego, alergenami pyłków oraz alergenami karaluchów. Immunobarwienie potwierdziło występowanie sieci DNA i ECP, co wskazuje iż również te alergeny mogą powodować produkcję pułapek eozynofilowych *in vivo*.

W dalszej części eksperymentu badacze zastosowali terapię przeciwciałami neutralizującymi cytokiny aktywowane przez eozynofile (interleukiny IL-4, IL-5, IL-13, IL-33, IL-25 i limfopoetyna zębłu grasicy - TSLP) w mysim modelu alergii na owalbuminę. Spośród wybranych cytokin jedynie TSLP znacząco zredukowało ilość powstających pułapek eozynofilowych, sugerując istotny udział tego białka w tym procesie. Dalsze analizy wykazały, iż w skład pułapek eozynofilowych wchodzi głównie DNA pochodzenia chromosomalnego i mitochondrialnego, a także białka pochodzenia eozynofilowego.

Zastosowanie DNazy po uczuleniu owalbuminą zmniejszyło ciężkość choroby poprzez zahamowanie produkcji cytokin zapalnych. Nebulizowana dornaza alfa (rhDNaza), fosforylowane i glikozylowane rekombinowane białko ludzkiej dezoksyrybonukleazy-1 było stosowane w badaniach nad astmą, ale nie wykazało znacznej poprawy stanu klinicznego pacjentów [9, 10]; być może jej skuteczność jest zależna od fenotypu choroby i wykazałaby lepszy efekt leczniczy u pacjentów, u których zaobserwowano wyższą aktywność pułapek eozynofilowych.

Autorzy pracy potwierdzili również, że tak jak w przypadku pułapek neutrofilowych, do powstawania pułapek eozynofilowych konieczna jest obecność deiminazy peptydyloargininowej 4 (PAD4), odpowiedzialnej za regulację dekondensacji chromatyny [11]. Eozynofile myszy z knock-outem tego genu nie produkowały EET; zauważono u nich również zmniejszenie produkcji śluzu i inhibicję hiperplazji komórek kubkowych.

Kolejnym etapem badań była ocena wpływu pułapek eozynofilowych na progres choroby. W poprzedniej pracy autorów gen CCDC25 wykazał związek z pułapkami neutrofilowymi, dlatego postanowili oni sprawdzić czy ma on znaczenie również dla pułapek eozynofilowych [12]. Analizując dane transkryptomyczne dotyczące różnych tkanek zawarte w internetowych bazach danych, zauważono, iż gen CCDC25 ulega wysokiej ekspresji w próbach pochodzących z układu nerwowego [13]. Jak wiadomo, komunikacja pomiędzy układem odpornościowym a układem neuroendokrynnym jest istotna w rozwoju stanu zapalnego w chorobach alergicznych [14]. Prawdopodobnie pułapki eozynofilowe właśnie w ten sposób mogą nasilać odpowiedź alergiczną. Badacze wykazali, iż pułapki eozynofilowe w mysim modelu uczulenia na owalbuminę znajdują się w dużej bliskości płucnych komórek neuroendokrynnych (PNEC), a komórki te wykazują wysoką ekspresję CCDC25. U uczulonych myszy zauważono również zwiększoną ekspresję neuroprzekazników wytwarza-

nych przez PNEC (w szczególności CGRP i enzymu syntetyzującego GABA); ekspresja ta zmniejszyła się po podaniu DNazy I. Eksperymenty weryfikujące rolę tych neurotransmiterów w modelu zwierzęcym wykazały, iż CGRP jest najbardziej kluczowym neuropeptydem powodującym zaostrzenie astmy. Badacze potwierdzili również, iż EET są w stanie wpłynąć na produkowane przez komórki PNEC neuropeptydy i neuroprzekazniki, co nasila alergiczny stan zapalny.

W innym badaniu postanowiono sprawdzić zdolność eozynofili do produkowania EET po indukcji IL-5 i LPS w dwóch grupach pacjentów: z łagodniejszym przebiegiem astmy i ciężką astmą eozynofilową [15]. Eozynofile pacjentów z drugiej grupy generowały znacznie większą ilość pułapek. Co ciekawe, niestymulowane komórki nie wykazały różnic w poziomie tworzenia EET, co sugeruje, iż eozynofile u pacjentów z ciężką astmą wykazują łatwiejszą zdolność do aktywacji tego procesu. Ponadto, badacze zaobserwowali negatywną korelację pomiędzy EETozą a wyjściową wartością FEV₁%.

Kolejnym etapem powyższego eksperymentu było sprawdzenie czy EETozę można regulować poprzez inhibicję ROS. N-acetylo-L-cysteina zmniejszyła liczbę produkowanych pułapek w indukowanych eozynofilach, natomiast deksametazon i hydroksychlorochina nie wykazały istotnych zmian pomiędzy dwoma badanymi grupami. EETozę wykazała również korelację z produkcją ROS, co podkreśla ich istotną rolę w tym procesie.

Autorzy pracy sprawdzili również jak EETozę wpływa na komórki nabłonka dróg oddechowych i zaobserwowali zmiany w morfologii i konfluencji komórek nabłonka dróg od-

dechowych; pułapki eozynofilowe powodowały utratę adherencji u co najmniej 10% komórek i zwiększenie przepuszczalności nabłonka. Pułapki eozynofilowe zwiększyły również produkcję cytokin IL-5 i IL-6 przez nabłonek dróg oddechowych w trzech różnych liniach komórkowych. Ponadto badacze wykazali brak wpływu pułapek na aktywację komórek tucznych, co sugeruje że nie biorą one udziału w ich degranulacji [15].

Podsumowanie

Zewnątrzkomórkowe pułapki eozynofilowe zostały odkryte dopiero niedawno, a ich dokładna funkcja jest wciąż poznawana. Niewiele jest wiadomo odnośnie ich roli w patofizjologii różnych chorób, w tym chorób alergicznych, charakteryzujących się podwyższoną liczbą eozynofili w krwi obwodowej.

Przytoczone prace wskazują, iż pułapki eozynofilowe wpływają na występowanie astmy alergicznej, a w szczególności mogą przyczyniać się do jej cięższego przebiegu i występowania zaostrzeń choroby. Prawdopodobny mechanizm nasilenia działania mediatorów stanu zapalnego jest związany z płucnymi komórkami neuroendokrynnymi i produkowanymi przez nie neuroprzekaznikami.

W przytoczonych badaniach sprawdzono także wpływ różnych substancji (DNaza I, N-acetylo-L-cysteina i inne), które mogłyby zahamować generowanie pułapek eozynofilowych, z różnym sukcesem. Otrzymane wyniki wydają się być jednak obiecujące, szczególnie w kontekście diagnostyki i potencjalnej terapii astmy ciężkiej.

Prace nadesłano
10.03.2022
Zaakceptowano do
druku 21.03.2022

Konflikt interesów nie występuje.
Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

Piśmiennictwo: 1. Ramirez GA, Yacoub MR, Ripa M, Mannina D, Cariddi A, Saporiti N, et al. Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. *Biomed Res Int.* 2018;2018:9095275. 2. Ackerman SJ, Bochner BS. Mechanisms of eosinophilia in the pathogenesis of hypereosinophilic disorders. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2007;27(3):357-75. 3. Ueki S, Melo RC, Ghiran I, Spencer LA, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. *Blood.* 2013;121(11):2074-83. 4. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5. 5. Vorobjeva NV, Chernyak BV. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochemistry (Mosc).* 2020;85(10):1178-90. 6. Ronchetti L, Boubakker NS, Barba M, Vici P, Gurtner A, Piaggio G. Neutrophil extracellular traps in cancer: not only catching microbes. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021;40(1):231. 7. Fukuchi M, Miyabe Y, Furutani C, Saga T, Moritoki Y, Yamada T, et al. How to detect eosinophil ETosis (EETosis) and extracellular traps. *Allergol Int.* 2021;70(1):19-29. 8. Lu Y, Huang Y, Li J, Huang J, Zhang L, Feng J, et al. Eosinophil extracellular traps drive asthma progression through neuro-immune signals. *Nat Cell Biol.* 2021;23(10):1060-72. 9. Boogaard R, Smit F, Schornagel R, Vaessen-Verberne AA, Kouwenberg JM, Hekkelaan M, et al. Recombinant human deoxyribonuclease for the treatment of acute asthma in children. *Thorax.* 2008;63(2):141-6. 10. Silverman RA, Foley F, Dalipi R, Kline M, Lesser M. The use of rDNase in severely ill, non-intubated adult asthmatics refractory to bronchodilators: a pilot study. *Respir Med.* 2012;106(8):1096-102. 11. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* 2010;207(9):1853-62. 12. Sollberger G, Choidas A, Burn GL, Habenberger P, Di Lucrezia R, Kordes S, et al. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Sci Immunol.* 2018;3(26). 13. Lizio M, Harshbarger J, Shimoji H, Severin J, Kasukawa T, Sahin S, et al. Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas. *Genome Biol.* 2015;16:22. 14. Sui P, Wiesner DL, Xu J, Zhang Y, Lee J, Van Dyken S, et al. Pulmonary neuroendocrine cells amplify allergic asthma responses. *Science.* 2018;360(6393). 15. Choi Y, Le Pham D, Lee DH, Lee SH, Kim SH, Park HS. Biological function of eosinophil extracellular traps in patients with severe eosinophilic asthma. *Exp Mol Med.* 2018;50(8):1-8.

Piśmiennictwo ze str. 16: 1. Miller, J.D. The Role of Dust Mites in Allergy. *Clinic Rev Allerg Immunol* 57, 312–329 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8693-0>. 2. Buczyko K. Prof. Dr hab. Molekuly alergogene; Polsko-Ukraińska Fundacja Rozwoju Medycyny 3. Matos Semedo F, Doroteeva Y, Pires AP, Tomaz E, Taborada Barata L, Inácio F, Valenta R Der p 23: Clinical Relevance of Molecular Monosensitization in House Dust Mite Allergy; *J Investig Allergol Clin Immunol* 29(4), 314-316 (2019). 4. Pittner G, Vrtala S, Thomas WR, et al. Component-resolved diagnosis of house-dust mite allergy with purified natural and recombinant mite allergens. *Clin Exp Allergy* 34, 597-603 (2004). 5. Ukleja-Sokolowska N., Sokolowski Z., Bartuzi Z., Alergia na roztocze kurzu domowego i krewetki- co wiemy obecnie? *Alergia Astma Immunologia* 23(3), 221-227 (2018). 6. Hajduga-Staško B., Kasprzyk M., Roztocze kurzu domowego jako czynniki alergogene. *Alergoprofil* 12(2), 81-86 (2016) 7. Arlian LG, Bernstein IL, Gallagher JS. The prevalence of house dust mites, *Dermatophagoides* spp, and associated environmental conditions in homes in Ohio. *J Allergy Clin Immunol* 69, 527-532 (1982). 8. Leaderer BP, Belanger K, Triche E, Holford T, Gold DR, Kim Y, Jankun T, Ren P, McSharry Je JE, Platts-Mills TA, Chapman MD, Bracken MB. Dust mite, cockroach, cat, and dog allergen concentrations in homes of asthmatic children in the northeastern United States: impact of socioeconomic factors and population density. *Environ Health Perspect.* 10(4), 419-25 (2002). 9. Neal JS, Arlian LG, Morgan MS. Relationship among house-dust mites, Der 1, Fel d 1, and Can f 1 on clothing and automobile seats with respect to densities in houses. *Ann Allergy Asthma Immunol* 88(4), 410-5. (2002) 10. Taketomi EA, Justino CM, Pereira FL, Segundo GR, Sopoetele MC, Sung SJ, Silva DA. Taxis but not private cars are mite allergen reservoirs in Brazil. *J Investig Allergol Clin Immunol* 16, 34-36, (2006) 11. Mario Sánchez-Borges, Raúl Suárez-Chacon, Arnaldo Capriles-Hulett, Fernan Caballero-Fonseca, Victor Iraola, Enrique Fernández-Caldas, Pancake Syndrome (Oral Mite Anaphylaxis), *World Allergy Organization Journal*, Volume 2 (5), 91-96 (2009) 12. [online:] Badanie ECAP http://ecap.pl/pdf/ECAP_wyniki_pl.p 13. strona internetowa-Lukasiewicz, instytut włośniennictwa 14. Solarz K., Biologia roztocze kurzu domowego, *Alergoprofil* 1 (4), 2-11 (2008) 15. Samoliński B., alergia na roztocze kurzu domowego. *Diagnostyka I terapia.* *Alergia* 3, 39-42 (2016) 16. Siwak E., Skotny A., Zbrojewicz A., Wolańczyk Mędrala A., Mędrala W., Kustrzeba-Wójcicka I., Alergeny roztocze. *Postępy Hig Med. Dosw.* 68, 369-374 (2014). 17. Waldrón R. McGowan J, Gordon N, McCarthy C, Michell EB, Fitzpatrick DA. Proteome and allergenome of the European house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *PLoS One* 14, 0216171 (2019). 18. Kowal K: Diagnostyka molekularna alergii na roztocze kurzu domowego. *Alergia*, 4, 23-28 (2019). 19. Vidal-Quist JC, Ortego F, Lambrecht BN, Castañera P, Hernández-Crespo P. Effects of domestic chemical stressors on expression of allergen genes in the European house dust mite. *Med Vet Entomol.* 31(1), 97-101 (2017). 20. Lin YP, Nelson C, Kramwe H, Parekh AB. The Allergen Der p3 from House Dust Mite Stimulates Store-operated Ca²⁺ Channel and Mast Cell Migration through PAR4 Receptors. *Molecular Cell* 70(2) (2018) 21. Wilson J.M., Platts-Mills Thomas A.E., Home environmental interventions for house dust mite. *J. Allergy Clin Immunol Pract.* 6(1), 1-7 (2018) 22. A. Acar, Z. Türkmen, K. Çavuşoğlu, E. Yalçın, Investigation of benzyl benzoate toxicity with anatomical, physiological, cytogenetic and biochemical parameters in vivo. *Caryologia* 73(3): 21-32 (2020) 23. Wenninger JA, R.C. Canterbury, and G. N. McEwen. International cosmetic ingredient dictionary and handbook. 8th ed. Washington (DC): Cosmetic, toiletry, and fragrance association, 126-131 (2000). 24. Buckley DA., Fragrance ingredient labelling in products on sale in the UK. *Br J Dermatol.* 157(2), 295-300 (2007) 25. Pearson M.A., Miller G.W. Benzyl Benzoate Encyclopedia of Toxicology (Third Edition), 433-434 (2014). 26. Charles A.K., Darbre PD., Oestrogenic activity of benzyl salicylate, benzyl benzoate and butylphenylmethylpropional (Lilial) in MCF7 human breast cancer cells in vitro. *J Appl Toxicol.* 29(5), 422-34 (2009) 27. Hicks MI, Elston DM. Scabies. *Dermatol Ther.* 22(4), 279-292 (2009) 28. Stuart MC, Kouimtzis M, Hill SR. WHO model formulary 2008. Geneva: World Health Organization; 311-312 (2009) 29. Kalpaklioglu AF, Ferizli AG, Misirgizli Z, Demirel YS, Gürbüz L. The effectiveness of benzyl benzoate and different chemicals as acaricides. *Alergia.* 51(3), 164-70 (1996). 30. Jarzab J., Bożek A., Raport z badania: wpływ preparatu Allergoff na alergię na roztocze kurzu domowego (dostęp dnia 8.03.2022 godzina 11.00). 31. <https://allergoff.pl/wp-content/uploads/2021/12/Instrukcja-Allergoff-spray.pdf> dostęp z dnia 09.03.2022 r. 32. Johnson W, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, Marks JG, Shank RC, Slaga TJ, Snyder PW, Andersen FA. Safety Assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid and its Salts, and Benzyl Benzoate. *Int J Toxicol.* 36(3), 5-30 (2017). 33. Kim, J.R., Perumalsamy, H., Shin, H.M. et al. Toxicity of Juniperus oxycedrus oil constituents and related compounds and the efficacy of oil spray formulations to Dermatophagoides farinae (Acari: Pyroglyphidae). *Exp Appl Acarol* 73, 385-399 (2017). 34. Hall, R. L. and B. L. Oser. Recent progress in the consideration of flavoring ingredients under the food additive positive rates in laboratory animal carcinogenicity studies. *Fundam. Appl. Toxicol.* 7, 573-584. (2017). 35. Lei, Y., Fu, P., Jun, X., Cheng, P. Pharmacological properties of geraniol - A Review. *Planta Medica*, 85, 48-55 (2019). 36. Jeon, J.H., Kim, H.W., Kim, M.G., and Lee, H.S. Mite-control activities of active constituents isolated from *Pelargonium graveolens* against house dust mites. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1666-1671 (2008)