

Wojciech DYGA  
 Krystyna OBTUŁOWICZ  
 Anna BOGDALI  
 Ewa CZARNOBILSKA  
 Grażyna ANTOSZCZYK<sup>1</sup>  
 Aleksander OBTUŁOWICZ<sup>1</sup>

Zakład Alergologii Klinicznej  
 i Środowiskowej UJCM

<sup>1</sup>Zakład Dermatologii UJCM

**Słowa kluczowe:**

- Elispot
- alergia na leki
- cytokiny

**Key words:**

- Elispot
- drug allergy
- cytokins

## ELISPOT – Immunoenzymatyczny test aktywacji limfocytów T w laboratoryjnej diagnostyce alergii na leki Profil cytokinowy alergii na amoksycylinę-badania pilotażowe

Celem badania była adaptacja laboratoryjnego testu immunoenzymatycznego ELISPOT pozwalającego na ocenę aktywacji komórek krwi (monocytów, limfocytów T) do monitorowania zmian czynnościowego fenotypu swoistych lekowo limfocytów T u chorych z nadwrażliwością na leki. Ocena czynnościowych zmian limfocytów T pod wpływem badanego leku w teście Elispot oparta była na pomiarze i analizie zmian w wydzielaniu cytokin o profilu Th1 (INFgamma, IL2) i Th2 (IL13) charakterystycznych dla indukcji zapalenia alergicznego pod wpływem badanej substancji/leku w 3-dniowej hodowli in vitro. Do badań zakwalifikowano: 9 chorych z odczynami grudkowo-osutkowymi po amoksycylinie oraz 3 ochotników zdrowych stanowiących grupę kontrolną. Wyniki prowadzonych badań wskazują na znaczną indywidualnie zróżnicowaną reaktywność spontaniczną i nieswoistą w wydzielaniu badanych cytokin limfocytów T w grupie badanych chorych i osób z grupy kontrolnej. Wzrost liczby komórek wydzielających IL2 lub IL13 w grupie chorych, dostrzegalny był zwykle przy najwyższych stężeniach badanego leku. Wskazywać to może na udział limfocytów zarówno Th1 jak i Th2 w reakcji. Ponadto u jednych chorych pojawiała się tendencja pobudzania reakcji na amoksycylinę w kierunku Th2 (wydzielanie u 3 pacjentów IL13, a u jednego jeszcze dodatkowo IL2) u innych Th1. Sugeruje to, że badani nie wykazują jednorodnego molekularnego mechanizmu odpowiedzi. Test wydaje się istotnie przydatny do badania alergii na leki w reakcjach, które wskazują na istotny udział w patomechanizmie odczynu lekowo-swoistych uczulonych limfocytów T, takich jak skórne odczyny polekowe, zwłaszcza plamkowo-grudkowych, krostkowych i alergo-toksyczne.

### ELISPOT - The immunoenzymatic test of T lymphocyte activation in the laboratory diagnostics of drug allergy Cytocines profile in amoxicillin allergy- preliminary study

The aim of the study was to apply the ELISPOT technique, which allows to estimate the activation of blood cells, for the monitoring of immune responses of cytokine-producing cells in patients with drug allergy. The changes in the immune response were detected by monitoring of the secretory product Th1-type (IFN gamma, IL-2) or Th2-type (IL-13). These changes are characteristic for induction of an allergic inflammation influenced by a studied drug in a 3 day cell culture. The study was performed in 9 patients with the allergic reaction to amoxicillin and 3 non-allergic donors (controls). The results of our study shows a high variability in the non specific cell response in both groups under the study. Our results revealed an increase in number of cells secreting IL-2 and IL-13, in the group of patients with drug allergy, observed usually in higher concentration of the drug being examined. This may suggest that the both Th-1 and Th-2 types of the cell response take part in the reaction to amoxicillin in the group of the drug allergy patients. There is observed a tendency to direct the immune response to amoxicillin in order to provoke Th-2 type (lymphocytes in 3 patients were secreting IL-13 only) or Th-1 type (secretion of IFN-gamma in 4 patients). These results suggest that in the group of patients with allergy to amoxicillin there is no homogeneous molecular response to the allergen. The mechanism of the immunological response seems not to be always related to the dose of the drug. Results presented here as a preliminary report on the ELISPOT technique seem to be promising for monitoring of the immune response in the drug allergy reaction with drug-specific activated T cells.

---

Adres do korespondencji:  
 Zakład Alergologii Klinicznej  
 i Środowiskowej  
 Collegium Medicum  
 Uniwersytet Jagielloński  
 31-531 Kraków, ul. Śniadeckich 10  
 Tel./Fax: 12 423 11 22

## Wstęp

Nadwrażliwość na leki stanowi 1/6-1/7 wszystkich ubocznych reakcji prowokowanych lekami [1-3], jest to jednak poważny problem medyczny w codziennej praktyce ze względu na nieprzewidywalność występowania, ostrej i często groźny przebieg. Są to odczyny alergiczne IgE zależne i IgE niezależne oraz odczyny pseudoalergiczne związane z idiosynkrazją lub reakcjami anafilakoidalnymi [1,4,5,7].

Patomechanizm tych reakcji jest różnorodny podobnie jak obraz kliniczny. Pojawiają się jako objawy anafilaktyczne o różnym nasileniu, zmiany płamkowo-grudkowe, pęcherzowe, krostkowe, obrzęko-pokrzywki, zespół Stevens-Johnsona (SJS), zespół Dressa, toksyczna epidermoliza (TEN), śródmiąższowa choroba płuc lub nerek, zapalenie polekowe wątroby, zapalenie polekowe trzustki, dyskrazja komórek krwi, odczyny autoimmunologiczne. Reakcje te mogą wystąpić bezpośrednio po przyjęciu pierwszej dawki leku wcześniej tolerowanego, mogą pojawić się po kilku godzinach i później, a także po dłuższym okresie przyjmowania i tolerancji danego leku.

Udział lekowo swoistych IgE w anafilaksji polekowej, jak i IgG i IgM w immunologicznych polekowych odczynach hematologicznych jest znany. Jednak patomechanizm wielu odczynów nadwrażliwości polekowej dotyczący skóry, wątroby, nerek, płuc nadal pozostaje mało znany [1].

Problem nadwrażliwości na leki jest celem stałych badań zmierzających do opracowania wiarygodnych diagnostycznych testów laboratoryjnych pozwalających zapobiegać tym odczynom lub ustalać ich patomechanizm. Głównie są to badania reaktywności bazoofilów i limfocytów na leki.

Rozpoznanie nadwrażliwości na lek opiera się na wywiadzie, objawach, testach skórnych z lekami (punktowych, śródskórnych i płatkowych) często ujemnych, rzadko dających groźne odczyny anafilaktyczne, testach prowokacyjnych z lekiem stanowiących „złoty standard” lecz nie zawsze akceptowanych przez chorych, a czasami prowokujących gwałtowne reakcje z nadwrażliwości [3] i nie różnicujących alergii od pseudoalergii [1].

Diagnostyka laboratoryjna nadwrażliwości na leki aktualnie obejmuje oznaczanie we krwi chorego swoistych lekowo IgE metodami referencyjnymi, np. CAP-FEIA (ograniczenia metodyczne pozwalają na ocenę ograniczonej grupy leków), wprowadzany do użytku klinicznego cytometryczny test aktywacji polekowej CD63+ lub CD 205 + na bazoofilach, test transformacji limfocytów z oceną wydzielenia cytokin po aktywacji lekiem [3], test wydzielenia cytokin z komórek mononuklearnych po indukcji lekiem - ELISPOT [10-12].

Laboratoryjne testy aktywności komórkowej po lekach są nadal w fazie badań klinicznych, standaryzacji ich metod i standaryzacji stężeń leków w nich stosowanych. W użytku nadal pozostaje test wydzielenia histaminy oraz leukotrienu C4 (LTC4) z bazoofilów pod wpływem leku [1,2,6]. Test degranulacji polekowej bazoofilów jest mało wiarygodny, niepowtarzalny i obecnie nie stosowany w diagnostyce.

Celem badania była adaptacja laboratoryjnego testu immunoenzymatycznego ELISPOT pozwalającego na ocenę aktywacji komórek krwi (monocytów, limfocytów T) do monitorowania zmian czynnościowego fenotypu swoistych lekowo limfocytów T w nadwrażliwości na leki. Ocena czynnościowych zmian limfocytów T pod wpływem badanego leku w teście Elispot oparta była na pomiarze i analizie zmian w wydzieleniu cytokin o profilu Th1 (INF-gamma, IL2) i Th2 (IL13) charakterystycznych dla indukcji zapalenia alergicznego pod wpływem badanej substancji/leku w 3-dniowej hodowli in vitro.

## Materiał i metoda

Do badań zakwalifikowano:

- 9 chorych (średni wiek 35 lat, 6 kobiet i 3 mężczyzn) z odczynami grudkowo-osutkowymi po amoksycylinie oraz
- 3 ochotników zdrowych (średni wiek 38 lat, 3 mężczyzn) stanowiących grupę kontrolną.

U badanych wykonano analizę wydzielenia cytokin z jednojądrzastych komórek krwi pod wpływem amoksycyliny testem ELISPOT (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), który jest połączeniem testu immunoenzymatycznego z hodowlą komórkową. Umożliwia charakterystykę komórek układu odpornościowego organizmu poprzez analizę:

- typu wydzielanych białek regulujących funkcjonowanie komórek układu immunologicznego tzw. cytokin,

- wielkości populacji komórek wydzielających analizowaną cytokinę na skutek stymulacji alergenem poprzez pomiar liczby komórek wydzielających cytokinę w jednostce objętości krwi.

Jednojądrzaste leukocyty krwi obwodowej (PBMC) chorych i osób grupy kontrolnej były izolowane metodą wirowaną w gradiencie gęstości na Ficollu. Wyizolowane komórki były hodowane w płytkach 96-dołkowych w medium hodowlanym z dodatkiem fitohemaglutyniny jako kontroli pozytywnej oraz 3 stężeniami roztworu amoksycyliny (Amoksiklav) stosując stężenia: 0,156 mg/ml, 0,625 mg/ml, i 2,5 mg/ml u 6 chorych i 5-cioma stężeniami amoksycyliny (dodatkowo stosując stężenia: 0,313 mg/ml, 1,25 mg/ml) u 3 chorych dla oceny zależności aktywacji komórek od stężenia leku i ewentualnie oceny jego działania cytotoksycznego w określonym stężeniu. Gęstość komórek wynosiła w zależności od badanej cytokiny od 100 tys/ dołek (INF-gamma) do 200 tys/dolek (IL-2, IL-13). Kontrolę dla każdego oznaczenia stanowiła hodowla komórek niestymulowanych.

Wyizolowane komórki hodowano na płytkach 96-dołkowych, w których dna poszczególnych studzienek stanowić będzie membrana ze związanymi przeciwciałami specyficznymi rozpoznającymi badane białko (cytokiny, przeciwciało, receptor) w medium.

Hodowle były zakładane na 3 dni. Po trzech dniach przeprowadzano analizę profilu spontanicznie wydzielanych cytokin będących markerami aktywacji subpopulacji limfocytów Th1, (INF?, IL-2) i Th2 (IL-13) w otoczeniu badanych komórek metodą ELISPOT.

Analizując rezultaty badań wybrano najbardziej popularny parametr wydzielniczości cytokin - liczby PBMC wydzielających daną cytokinę (PBMC)/ml krwi obwodowej (ang. spots)- wskaźnik liczebności populacji komórek wydzielających analizowaną cytokinę po stymulacji.

## Wyniki

Rezultaty badań przedstawione w tabeli I oraz na rycinach 1 A, B i C wskazują na możliwość oceny testem ELISPOT wydzielenia spontanicznego, indukowanego bodźcem nieswoistym (np. fitohemaglutyniną - kontrola pozytywna) oraz badaną substancją (amoksycyliną) określonych cytokin przez jednojądrzaste komórki krwi.

Wyniki prowadzonych badań wskazują na znaczną indywidualnie zróżnicowaną reaktywność w wydzieleniu badanych cytokin limfocytów T w grupie badanych chorych i osób z grupy kontrolnej. W przedstawionych badaniach:

1. Wydzielenie IL13 w odpowiedzi na amoksycylinę było najsilniejsze przy trzech najwyższych stężeniach leku: 2,5 mg/ml i 1,25 mg/ml i 0,625 mg/ml w ocenie liczby komórek aktywnych. Ta odpowiedź była porównywalna z poziomem aktywacji w kontroli pozytywnej.

2. Liczba komórek wydzielających IL2 była najwyższą przy najniższym stężeniu leku (0,078 mg/ml) oraz w dwóch przypadkach po stymulacji 1,25 mg/ml amoksycyliny. Nasilenie aktywacji nie było silne; poniżej kontroli pozytywnej.

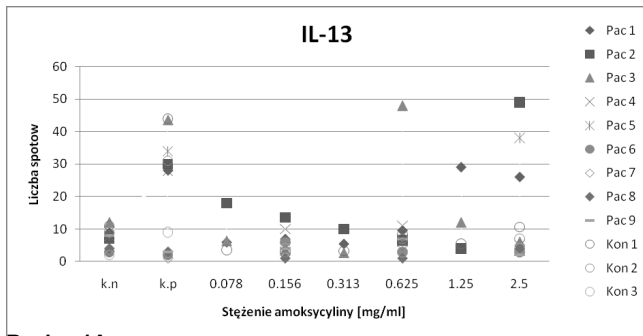
3. Wydzielenie INF $\gamma$  było najwyższe po stymulacji amoksycyliną o stężeniu 0,156 mg/ml. Odpowiedź była silna na poziomie kontroli pozytywnej i powyżej. U 4 chorych wykazano wzrost wydzielenia tylko INF $\gamma$  po stymulacji amoksycyliną.

4. Wydzielenie badanych cytokin u 3 osób stanowiących kontrolę było niższe od kontroli pozytywnej i niezależne od stężenia badanej substancji.

Analiza liczby komórek spontanicznie wydzielających daną cytokinę u poszczególnych chorych wykazywała znaczne indywidualne zróżnicowanie. Aktywacja wydzielenia danej cytokiny pod wpływem danej substancji zwykle zależała od jej stężenia. Można było obserwować u poszczególnych chorych prostą zależność aktywacji komórek od stężenia lub ogniskowanie aktywacji komórek przy jednym stężeniu. Można było także obserwować istotny wzrost liczby komórek aktywnie wydzielających przy niższych stężeniach badanej substancji ze zmniejszeniem wyraźnym aktywacji komórek przy stężeniach wyższych sugerujące możliwość toksycznego (supresyjnego) działania wyższych stężeń badane- go leku do wydzielenia danej cytokiny.

## Dyskusja

Test ELISPOT [12,13] staje się ważnym nowoczesnym immunoenzymatycznym, testem laboratoryjnym, pozwalającym oceniać zdolność komórek do wydzielenia badanych cytokin pod wpływem różnych substancji. Test ten jest stosowany do oceny reaktywności komórek na antygeny bakteryjne takie jak prątek gruźlicy, antygeny krętka *Borrelia*, antygeny *Salmonelli*. Ma istotną wartość w testowaniu szczepionek przeciw HIV, wirusowemu zapaleniu wątroby, grypie. Cechuje go wysoka czułość i swoistość. W ostatnich latach stosowany jest także w detekcji zaburzeń aler-



Rycina 1A

Liczba komórek wydzielających IL-13: aktywacja spontaniczna (kontrola negatywna), po fitohemaglutynie (kontrola pozytywna), oraz po ampicynie w 6 kolejnych stężeniach: 0.078 mg/ml; 0.156 mg/ml; 0.313 mg/ml; 0.625 mg/ml; 1.25mg/ml; 2.5 mg/ml.

Number of cells secreting IL-13 without stimulation (negative control), after PHA stimulation (positive control), and after stimulation with different concentration of amoxicillin (0.078 mg/ml; 0.156 mg/ml; 0.313 mg/ml; 0.625 mg/ml; 1.25mg/ml; 2.5 mg/ml).

Tabela I

Średnia liczba limfocytów T wydzielających daną cytokinę (INF $\gamma$ , IL2, IL13): w grupie 9 chorych i 3 osób grupy kontrolnej.

Comparison of mean values of T-lymphocytes secreting examined cytokines (INF $\gamma$ , IL2, IL13) in groups of 9 patients with drug allergy and 3 persons from control group.

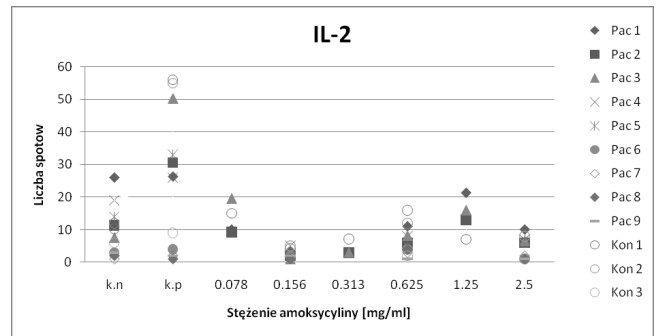
I. grupa badanych:								
	Kontrola		Amoksylicyna w stężeniu [mg/ml] :					
	negatywna	pozytywna	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5
INF $\gamma$	30.4	49.6	12.3	43.6	10.5	33.9	8.9	19.7
IL-2	9.7	19.5	13.0	2.4	2.9	5.6	16.8	4.6
IL-13	7.0	19.2	10.1	5.7	6.0	10.8	15.0	15.3
II. grupa kontrolna :								
	II. grupa kontrolna :		Amoksylicyna w stężeniu [mg/ml] :					
	negatywna	pozytywna	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5
INF $\gamma$	20.2	24.2	8.7	7.3	9.0	13.3	17.0	8.3
IL-2	9.4	40.0	15.0	4.7	7.2	10.0	7.0	7.3
IL-13	7.3	28.0	3.6	3.3	3.3	6.1	5.5	7.2

gicznych takich jak skaza atopowa, wyprysk, alergia pokarmowa, alergia na nikiel, leki i jady owadów oraz do monitorowania swoistej immunoterapii.

Największą zaletą testu ELISPOT jest wysoka czułość metody. Za pomocą tej techniki można wykryć pojedynczą komórkę wydzielającą dane białko wśród 1 000 000 komórek w hodowli. Jeżeli interesujące nas białko jest wydzielane przez pobudzone limfocyty, wychwytywane jest ono w bezpośrednim sąsiedztwie komórek przez specyficzne przeciwciała związane do membrany.

Pozwala to uniknąć zafałszowania wyniku na skutek konsumpcji analizowanego białka przez komórki w hodowli. Po usunięciu komórek, obecność wydzielonego białka wykrywana była za pomocą reakcji immunoenzymatycznej. W wyniku katalizowanej przez enzym konwersji w nierozpuszczalny barwny produkt (w miejscach uprzedniej obecności komórek wydzielających interesujące nas białko) i powstają obserwowane na obrazie plamki (ang. spots). Z wykorzystaniem systemu komputerowej analizy obrazu uzyskane wyniki poddawane są analizie cyfrowej, której przedmiotem jest zarówno liczba plamek (odpowiadająca liczbie komórek wydzielających daną cytokinę) jak i ich parametry stanowiące odzwierciedlenie natężenia aktywności wydzielniczej danej cytokiny poszczególnych komórek (% powierzchni wysoczonej barwnikiem).

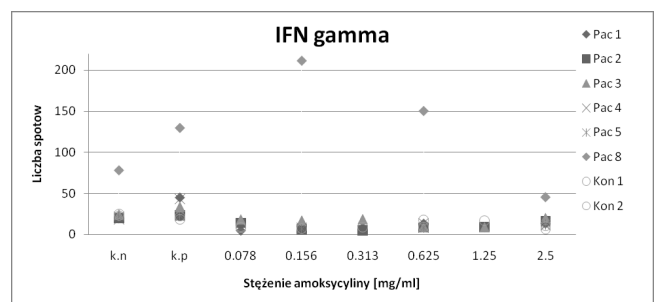
Zintegrowany system do skanowania płytek ELISpot Eli.Scan firmy A.EL.VIS składa się ze skanera do membran z płytek ELI-



Rycina 1B

Liczba komórek wydzielających IL-2: aktywacja spontaniczna (kontrola negatywna), po fitohemaglutynie (kontrola pozytywna), oraz po ampicynie w 6 kolejnych stężeniach: 0.078 mg/ml; 0.156 mg/ml; 0.313 mg/ml; 0.625 mg/ml; 1.25mg/ml; 2.5 mg/ml.

Number of cells secreting IL-2 without stimulation (negative control), after PHA stimulation (positive control), and after stimulation with different concentration of amoxicillin (0.078 mg/ml; 0.156 mg/ml; 0.313 mg/ml; 0.625 mg/ml; 1.25mg/ml; 2.5 mg/ml).



Rycina 1C

Liczba komórek wydzielających IFN gamma: aktywacja spontaniczna (kontrola negatywna), po fitohemaglutynie (kontrola pozytywna), oraz po ampicynie w 6 kolejnych stężeniach: 0.078 mg/ml; 0.156 mg/ml; 0.313 mg/ml; 0.625 mg/ml; 1.25mg/ml; 2.5 mg/ml

Number of cells secreting IFN gamma without stimulation (negative control), after PHA stimulation (positive control), and after stimulation with different concentration of amoxicillin (0.078 mg/ml; 0.156 mg/ml; 0.313 mg/ml; 0.625 mg/ml; 1.25mg/ml; 2.5 mg/ml)

SPOT, komputera z zainstalowanym oprogramowaniem do analizy obrazu oraz drukarki. Skaner wyposażony jest w specjalną ramkę do pozycjonowania membran lub folii ELISPOT. Badanie aktywacji komórek do wydzielania określonej cytokiny pod wpływem danej substancji w teście Elispot pozwala oceniać spontaniczną i stymulowaną bodźcem nieswoistym (fitohemaglutyniną) aktywność co stanowi odrębną wartość tego testu.

Wyniki prowadzonych badań wskazują na znaczną indywidualnie zróżnicowaną reaktywność spontaniczną i nieswoistą w wydzielaniu badanych cytokin limfocytów T w grupie badanych chorych i osób z grupy kontrolnej. Ocena aktywacji wydzielania cytokin po indukcji badanych komórek daną substancją (w przedstawionych badaniach - amoksylicyną) pozwala nie tylko obserwować wpływ badanego leku lecz także oceniać dawko-zależność badanego zjawiska. Umożliwia także ustalenie progowego działania leku i w miarę podnoszonej dawki ujawnienie jego stężenia przy którym dochodzi do działania cytotoksycznego. Dołączana do każdej serii badań analiza reaktywności limfocytów osoby zdrowej wnosi dodatkową wartość porównawczą, stanowiącą tło do oceny wyników osób badanych. Wstępna ocena wydaje się wskazywać, że w ocenie wyniku testu analiza liczby komórek aktywnie wydzielających daną cytokinę ma większą wartość niż analiza odsetka powierzchni związanego barwnika, która może mieć wartość uzupełniającą. Ocena wzrostu liczby komórek wydzielających daną cytokinę po indukcji badaną substancją pozwala

nie tylko obserwować wpływ jej na aktywację badanych komórek lecz także oceniać dawko-zależność tego zjawiska, a przez rodzaj wydzielanych cytokin identyfikować rodzaj komórek reaktywnych wśród komórek jednojądrzastych (np. Th2, Th1). Test umożliwia także ustalenie progowego stężenia leku przy którym uzyskuje się najsilniejszą aktywację komórek do wydzielania danej cytokiny u badanego chorego.

Przedstawione wyniki badań wskazują na wzrost liczby komórek wydzielających IL2 lub IL13 w badanej grupie chorych dostrzegalną zwykle przy najwyższych stężeniach badanego leku. Wskazywać to może na możliwość udziału limfocytów łącznie zarówno Th1 jak i Th2 w reakcji na amoksycylinę w grupie badanych chorych. W badanej grupie u 4 chorych wykazano wzrost wydzielania tylko  $INF_{\gamma}$  po stymulacji amoksycyliną wskazując na pobudzenie aktywności Th1 pod wpływem tego leku. Pojawiła się tendencja nakierowywania u jednych chorych reakcji na amoksycylinę w kierunku pobudzenia Th2 (wydzielanie u 3 pacjentów IL13, a u jednego jeszcze dodatkowo IL2) lub Th1 (tylko  $INF_{\gamma}$  u 4 pacjentów). Sugeruje to, że pacjenci uczuleni na amoksycylinę nie wykazują jednorodnego molekularnego mechanizmu odpowiedzi.

Wydzielanie i zmianę wydzielania badanych cytokin pod wpływem różnych bodźców można w teście Elispot oceniać na podstawie zmiany liczby komórek aktywnych lub ocenie odsetka powierzchni zajętej przez znakowaną cytokinę. Porównanie tych wartości w przedstawionym materiale wydaje się zbliżone. Ocena jednej z tych wartości wydaje się wystarczająca do analizy reakcji komórek na dany bodziec.

Mechanizm odpowiedzi nie zawsze wydaje się być dawko-zależny, ponieważ maksima odpowiedzi pojawiały się zarówno przy wyższych stężeniach (2,5 mg/ml oraz 1,25 mg/ml) dla IL13 jak i przy niższych stężeniach leku (0,078 mg/ml i 0,156 mg/ml) dla IL2 i  $INF_{\gamma}$ . Istnieje możliwość, że aktywacja komórki do wydzielania danej cytokiny pod wpływem danego bodźca w teście Elispot może ujawniać jego pobudzające lub supresyjne działanie zależnie od stężenia.

Z punktu widzenia metodycznego dla oceny reaktywności badanych komórek wystarczające wydaje się stosowanie 2-3 stężeń badanej substancji/leku. W przypadku amoksycyliny stężenia graniczne: 0,156 mg/ml, 0,625 mg/ml i 2,5 mg/ml wydają się optymalne i wystarczające. Przedstawione wyniki badań należy uznać za wstępne. Test wydaje się istotnie przydatny do badania alergii na leki w reakcjach, które wskazują na istotny udział w patomechanizmie odczynu lekowo-swoistych uczulonych limfocytów T takich jak skórne odczyny polekowe, zwłaszcza płamkowo-grudkowych, króstkowych i alergo-toksyczne [5,7].

Trwają badania nad wprowadzeniem Elispot do monitorowania wydzielniczości komórek jednojądrzastych krwi obwodowej tzw. PBMC w toku leczenia poszczególnych schorzeń oraz do celów diagnostycznych.

#### Podsumowanie

Reakcja komórek badanych chorych na amoksycylinę była różnicowania mimo podobnych odczynów po leku w wywiadzie sugerując mechanizm Th1 lub Th2-zależny. Maksimum reakcji

pojawiało się przy różnych indywidualnie stężeniach leku, sugerując możliwość ujawniania się pobudzającego lub supresyjnego działania badanego leku. Także ostateczne ustalenie czy stężenie leku, przy którym pojawia się maksimum odpowiedzi, a rodzaj wydzielanej cytokiny ( $INF_{\gamma}$ , IL2, IL13) mają ze sobą związek, wymaga dalszych badań.

W przypadku braku odpowiedzi na stymulację lekiem podejrzewać można udział w reakcji na amoksycylinę chorego innych, nieoznaczonych w badaniach cytokin. Przedstawione, wstępne wyniki badań wymagają potwierdzenia na większej grupie pacjentów.

#### Wnioski

1. Test Elispot pozwala oceniać spontaniczne, nieswoiste i indukowane badaną substancją wydzielanie badanych cytokin przez komórki jednojądrzaste.

2. Analiza krzywej aktywacji komórek badaną substancją (amoksycyliną) w teście Elispot wykazywać może jej pobudzające lub supresyjne (toksyczne) działanie lub brak działania zależnie od stężenia.

3. Dla oceny aktywacji badanych komórek pod wpływem badanej substancji wydaje się wystarczające wydatki się stosowanie 3 jej stężeń.

#### Piśmiennictwo

- Anderson JA. Allergic and Allergic Like Reactions to Drugs and Other Therapeutic Agents [w] Allergic Diseases Ed. by Lieberman P, Anderson J, Human Press, Tokowa, N, Jersey, 1997; 275-292.
- Hari Y, Urwyler A, Humi M et al. Distinct cytokine levels in drug- and measles-induced exanthema. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 120: 225-229
- Holgate ST., Church MK. Allergy, Mosby-Wolfe, London, Baltimore, 1995;
- Jager L, Merk HF Alergie lekowe. Tłum. z j. niem. Wyd. Czelej, Lublin, 1997
- Obtułowicz K. Alergia na leki. *Alergologia Immunologia* 2003; 1: 3-6.
- Mędrala W, Wolańczyk-Mędrala A. Diagnostyka Chorób Alergicznych in vitro. [w] Choroby Alergiczne i Astma (red. J. Małolepszy). Volumed, Wrocław, 1996; 483-503.
- Pichler WJ, Zanni M, von Greyser S et al. High IL5 secretion by human drug specific T cell clones. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113: 177-180.
- Sachs B, Merk H. Demonstration and Characterization of Drug-Specific Lymphocyte Reactivity in Drug Allergies. *ICA International* 2001; 13: 91-98.
- Obtułowicz A, Obtułowicz K, Zdziłowska E, Antoszczyk G. Test aktywacji CD63 (Bazotest) i CD 69 na limfocytach w diagnostyce alergii na leki. *Alergologia-Immunologia* 2004; 2: 54-57.
- Obtułowicz A, Antoszczyk G, Obtułowicz K, Dyga W. Profil cytokin limfocytów T (badanie metodą ELISPOT) u chorych z wypryskiem kontaktowym i atopowym. *Postępy Dermatologii i Alergologii* 2009; XXVI, S. 527.
- Czarnobilska E, Jenner B, Kaszuba-Zwolinska J., Kapusta M, Obtułowicz K, Thor P, Śpiewak R. Contact allergy to nickel: Patch Test Score correlates with IL5, but not with  $INF_{\gamma}$ . Nickel specific secretion by peripheral blood lymphocytes. *Ann Agric Environ Med* 2009; 16: 37-41.
- Śpiewak R et al. ELISPOT: a potential in vitro test for contact allergy - development of the protocol and first results. *Ned Tijdschr Dermatol Venereol* 2004; 14: 61.
- Śpiewak R.: Test immunoenzymatyczny ELISOPOT. Perspektywy zastosowań w alergologii i immunologii. *Alergologia Immunologia* 2007; 4: 3-4.