

## **ZAŁĄCZNIK 2.**

### **AUTOREFERAT W JĘZYKU POLSKIM**

#### **1. Imię i Nazwisko.**

Grzegorz Porębski

#### **2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

- Dyplom ukończenia studiów wyższych medycznych na kierunku lekarskim, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Lekarski, 1998
- Dyplom doktora nauk medycznych, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Lekarski, 2004

Tytuł rozprawy doktorskiej: "Zmiany wskaźników czynnościowych układu oddechowego u chorych z alergią dróg oddechowych. Badania z zastosowaniem wziewnych testów prowokacyjnych"

- Dyplom specjalisty w dziedzinie: choroby wewnętrzne, Centrum Egzaminów Medycznych w Łodzi, 2006
- Dyplom specjalisty w dziedzinie: alergologia, Centrum Egzaminów Medycznych w Łodzi, 2011

#### **3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.**

- od 2007 - adiunkt, Zakład Alergologii Klinicznej i Środowiskowej Katedry Toksykologii Klinicznej i Środowiskowej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum (UJ CM)
- I 2010 - XII 2010 - post-doc, Division of Allergology, Department of Rheumatology, Clinical Immunology and Allergology, Uniwersytet w Bernie
- 2004 - 2006 - asystent, Zakład Alergologii Klinicznej i Środowiskowej Katedry Toksykologii Klinicznej i Środowiskowej, UJ CM
- 1999 - 2003 - doktorant (studia doktoranckie), Zakład Alergologii Klinicznej i Środowiskowej Katedry Toksykologii Klinicznej i Środowiskowej, UJ CM

**4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

**a) Tytuł osiągnięcia naukowego**

Lekowo-swoiste mechanizmy efektorowe w diagnostyce opóźnionych polekowych reakcji alergicznych.

**b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego**

1. Grzegorz Porębski, Anna Gschwend-Zawodniak, Werner J. Pichler. In vitro diagnosis of T cell-mediated drug allergy. Clin. Exp. Allergy 2011; 41(4): 461-470.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu jej koncepcji, wykonaniu doświadczeń laboratoryjnych, napisaniu manuskryptu pracy, akceptacji ostatecznej wersji pracy. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

2. Grzegorz Porebski, Tatjana Pecaric-Petkovic, Monika Groux-Keller, Magdalena Bosak, Thomas T. Kawabata, Werner.J. Pichler. In vitro drug causality assessment in Stevens-Johnson syndrome - alternatives for lymphocyte transformation test. Clin. Exp. Allergy 2013; 43(9): 1027-1037.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji i projektu badania, rekrutacji części badanych, wykonaniu doświadczeń laboratoryjnych (hodowle komórkowe, testy proliferacji limfocytów, testy granzym B-ELISpot, wewnątrzkomórkowe oznaczanie granulizyny i IFN-gamma przy pomocy cytometrii przepływowej oraz eksperymenty z użyciem IL-7/IL-15) u 30 spośród 33 łącznie badanych, napisaniu manuskryptu pracy, akceptacji ostatecznej wersji pracy. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

3. Grzegorz Porębski, Ewa Czarnobilska, Magdalena Bosak. Cytotoxic-based assays in delayed drug hypersensitivity reactions induced by antiepileptic drugs. Pol. Arch. Med. Wew. 2015; 125(11): 823-834.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji i projektu badania, zaplanowaniu doświadczeń laboratoryjnych, wykonaniu całości doświadczeń laboratoryjnych (hodowle komórkowe, testy proliferacji limfocytów, test granzym B-ELISpot, pomiar stężenia perforyny metodą ELISA i oznaczanie granulizyny przy pomocy cytometrii przepływowej), rekrutacji części badanych i wykonaniu części testów płatkowych, napisaniu manuskryptu pracy, akceptacji ostatecznej wersji pracy. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

4. Grzegorz Porębski, Ewa Czarnobilska. Drug-specific *in vitro* secretion of IFN $\gamma$  in the diagnosis of drug-induced exanthemas: electrochemiluminescence assay versus previously used diagnostic methods. Przegl Lek. 2015; 72(12): 721-724.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji i projektu badania, zaplanowaniu doświadczeń laboratoryjnych, wykonaniu w całości hodowli komórkowych, testów proliferacji limfocytów, oznaczaniu IFN-gamma przy pomocy testów ELISpot, ELISA i cytometrii przepływowej oraz we współpracy z dr T. Pecaric-Petkovic (wymieniona w sekcji

"Acknowledgments") testów metodą elektrochemiluminescencji, rekrutacji części badanych, napisaniu manuskryptu pracy, akceptacji ostatecznej wersji pracy. Mój udział procentowy szacuję na 95%.

5. Grzegorz Porębski, Magdalena Bosak. The role of IL-7 and IL-15 in the ELISpot detection of drug-specific response. *Alergol. Immunol.* 2014; 11(3-4): 26-31.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji i projektu badania, zaplanowaniu doświadczeń laboratoryjnych, wykonaniu całości doświadczeń laboratoryjnych (hodowle komórkowe, testy IFN-gamma-ELISpot), rekrutacji części badanych, napisaniu manuskryptu pracy, akceptacji ostatecznej wersji pracy. Mój udział procentowy szacuję na 95%.

### **c) Omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Ludzie są obecnie powszechnie poddawani ekspozycji na liczne ksenobiotyki, w tym leki. Chociaż we współczesnej medycynie farmakoterapia jest jednym z podstawowych rodzajów interwencji, jest równocześnie przyczyną polekowych działań niepożądanych, które przyczyniają się do zwiększenia wskaźników hospitalizacji i śmiertelności [1, 2]. Za większość działań niepożądanych odpowiadają przewidywalne efekty uboczne leków wynikające z ich aktywności farmakologicznej. Jednak około 15% działań niepożądanych leków to nieprzewidywalne reakcje nadwrażliwości [3], które są nazywane alergią na leki, gdy reakcja jest mediowana immunologicznie. Polekowe reakcje nadwrażliwości (drug hypersensitivity reactions, DHR) są bardzo heterogenne pod względem symptomatologii i ciężkości przebiegu. Zwykle manifestują się zmianami skórnymi, począwszy od stosunkowo łagodnych, lecz częstych jak osutki plamisto-grudkowe, aż do ciężkich zespołów objawów, jak zespół Stevensa-Johnsona. Kluczowe znaczenie dla dalszego postępowania z chorym ma potwierdzenie związku przyczynowego pomiędzy zastosowanym lekiem a wystąpieniem objawów. Nieuzasadnione wycofanie podejrzanego leku prowadzi do ograniczenia opcji terapeutycznych i wprowadzenia leków drugiego rzutu, z reguły mniej skutecznych i/lub droższych.

W pracy „*In vitro* diagnosis of T cell-mediated drug allergy”, poświęconej opóźnionym polekowym reakcjom nadwrażliwości, wskazano na ograniczenia w dostępnych metodach diagnozowania przyczyn tych reakcji, zidentyfikowano istniejące w tym obszarze potrzeby oraz przeanalizowano testy laboratoryjne mogące w przyszłości posłużyć jako narzędzia diagnostyczne. Przedstawiono również wstępne wyniki własnych eksperymentów. Wykazały one, że detekcja markerów aktywacji lekowo-swoistych komórek o zdefiniowanym fenotypie, jak granulizyna w komórkach NK, umożliwi wykrycie leku odpowiedzialnego za reakcję alergiczną.

Badanie polekowej reakcji alergicznej zaczyna się od zebrania szczegółowych danych z historii medycznej. Niestety często reakcje te nie są dobrze udokumentowane, a ich odtworzenie na podstawie samego wywiadu nie jest wystarczające do pełnej oceny. Stosunkowo dobrze dostępnym sposobem identyfikacji leku, który wywołał objawy są skórne testy punktowe, płatkowe i testy śródskórne. Jednak często nie przynoszą one dodatnich wyników, nawet u chorych z przekonującym wywiadem [4-6]. Z kolei testy prowokacyjne, chociaż obiektywnie dowodzą sprawczego działania testowanego leku, są źle akceptowane przez pacjentów i kontrowersyjne etycznie z powodu ryzyka wywołania niebezpiecznych objawów [7]. Co więcej, dobra tolerancja pojedynczej dawki leku wyklucza IgE-zależną reakcję natychmiastową, ale nie reakcję opóźnioną, która może rozwinąć się dopiero po dłuższym podawaniu podejrzanego leku, co w gruncie rzeczy bliższe jest ponownemu leczeniu niż procedurze diagnostycznej [8]. Inne wady testów prowokacyjnych to możliwa resensytyzacja lub desensytyzacja z powodu reekspozycji na testowany lek, a nawet ograniczenie czułości i swoistości związane odpowiednio z nierozpoznanymi czynnikami zakłócającymi i subiektywnymi dolegliwościami występującymi podczas prowokacji [9, 10].

Testy *in vitro* stanowią procedurę bezpieczną dla pacjentów, pozwalającą na uniknięcie wspomnianych niedogodności testów prowokacyjnych. Co więcej dostarczają głębszego wglądu w patomechanizmy polekowych reakcji nadwrażliwości i umożliwiają równoczesną ocenę odpowiedzi immunologicznej na wiele leków. W omawianej pracy skupiono się na DHR mediowanych przez komórki T. Opisano systemy odczytu stosowane *in vitro* do identyfikacji reagujących swoiście na dany lek komórek pochodzących z krwi obwodowej uczulonych pacjentów. Obecnie najlepiej znanym testem stosowanym w diagnostyce opóźnionych reakcji nadwrażliwości na leki jest test transformacji limfocytów (lymphocyte transformation test, LTT), zwany również testem proliferacji limfocytów. Opiera się on na aktywacji i proliferacji badanych komórek po stymulacji danym lekiem. Wymaga zastosowania izotopów radioaktywnych, a co za tym idzie odpowiedniego wyposażenia. Ze względu na sześciodniowy czas trwania hodowli komórek jest także stosunkowo czasochłonny. Nasilenie odpowiedzi proliferacyjnej nie jest powiązane z ciężkością objawów klinicznych. LTT u pacjentów z osutką plamisto-grudkową może wykazywać znacznie silniejszą proliferację komórkową niż u chorego z ciężką postacią nadwrażliwości na leki, jak zespół Stevensa-Johnsona czy toksyczna nekroliza naskórka. Istotnie, ciężkość przebiegu klinicznego reakcji polekowej wydaje się być raczej związana z funkcjami efektorowymi reagujących komórek niż z częstością występowania tych komórek w krwi obwodowej, wykrywaną przez LTT. Funkcje efektorowe aktywowanych lekiem komórek T mogą być uchwycone przy pomocy odpowiednio ukierunkowanych badań laboratoryjnych. Ocena

histologiczna i immunohistologiczna komórek pozyskanych ze zmian skórnych wskazała na istotną rolę mechanizmów cytotoksycznych w różnych postaciach polekowych reakcji nadwrażliwości [11-16].

W naszych wstępnych eksperymentach postawiliśmy pytanie, czy komórki z próbki krwi pobranej w okresie remisji od chorych z przebytymi DHR mogą wykazywać lekowo-swoistą odpowiedź wyrażoną przez ich funkcje cytotoksyczne. Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) pacjenta z osutką plamisto-grudkową oraz pacjenta z zespołem Stevensa-Johnsona były poddane pięciodniowej hodowli z lekami sprawczymi (odpowiednio – amoksycyliną i karbamazepiną), toksyną tężcową (kontrola dodatnia) i medium hodowlanym (kontrola ujemna). Następnie wykonano barwienie wewnątrzkomórkowe i pomiar cytometryczny ekspresji granulizyny w komórkach NK. Zaobserwowano, że stymulacja lekami sprawczymi znamienne i swoście zwiększyła produkcję granulizyny w komórkach NK w przypadku obu pacjentów. Systemy odczytu mierzące efektorowe funkcje lekowo-swoistych komórek cytotoksycznych wydają się być w tym kontekście szczególnie obiecujące, ale wymagają dalszych pogłębionych badań.

Ta koncepcja została podjęta w kolejnej pracy: **„*In vitro* drug causality assessment in Stevens–Johnson syndrome –alternatives for lymphocyte transformation test”**.

Założenia:

- „Potrzebne jest opracowanie nowych narzędzi diagnostycznych, szczególnie do diagnostyki ciężkich skórnych polekowych reakcji nadwrażliwości” - postuluje się w najnowszym międzynarodowym konsensusie poświęconym alergii na leki w części dotyczącej niezaspokojonych potrzeb w przedmiotowym zakresie [9]. Takie ciężkie skórne DHR reprezentowane są przez zespół Stevensa-Johnsona (SJS) i toksyczną epidermolizę naskórka (TEN), będącą najcięższą postacią skórnych reakcji polekowych obejmującą ponad 30% powierzchni ciała i cechującą się wysoką śmiertelnością [17].
- Pęcherze u chorych z SJS/TEN zawierają dużą liczbę limfocytów mających czynnościowe cechy limfocytów cytotoksycznych o fenotypie CD8+ i NKp46+ [13, 18]. Wykazano, że produkują one w dużych ilościach granzym B i perforynę [19, 20]. Cytotoksyczny efekt komórek T CD8+ i NKp46+ jest również mediowany przez granulizynę będącą białkiem

wydzielniczym o istotnym znaczeniu w SJS/TEN, gdyż powoduje rozwój zmian pęcherzowych i śmierć keratynocytów [11].

- Dotychczasowe badania wykazały, że standardowy LTT u pacjentów z SJS/TEN stosunkowo rzadko daje pozytywny wynik w porównaniu z polekowymi wykwitami skórnymi o łagodniejszym przebiegu [21, 22]. Testy skórne mają ograniczoną użyteczność, jak wskazano wyżej, a testy prowokacyjne nie są rekomendowane w SJS/TEN.
- IL-7 i IL-15 są cytokinami odgrywającymi ważną rolę w rozwoju, żywotności i aktywacji cytotoksycznych komórek T CD8+ i NKp46+ [23-25], a ekspozycja komórek PBMC na te cytokiny może wzmocnić odpowiedź antygenowo-swoistą [26, 27].
- Precyzyjna identyfikacja leku sprawczego ma kluczowe znaczenie nie tylko dla dalszego postępowania z chorym, ale także dla instytucji powołanych do monitorowania bezpieczeństwa farmakoterapii i ryzyka zdarzeń niepożądanych oraz dla przemysłu farmaceutycznego.

#### Hipotezy badawcze

- Testy *in vitro* oparte na różnorodnych mechanizmach cytotoksycznych odpowiedzialnych za objawy SJS/TEN mogą osiągnąć wyższą czułość w identyfikacji leku sprawczego niż standardowy test LTT.
- Inkubacja z IL-7 i IL-15 hodowli PBMC wzmacnia odpowiedź lekowo-swoistą.

#### Metody

Grupa badana składała się z 15 pacjentów z dobrze zdefiniowanym SJS/TEN w stanie remisji oraz 18 osób stanowiących kontrolę, dopasowanych pod względem płci i wieku, którzy byli ekspozowani na te same leki i tolerowali je dobrze. Chorzy zostali podani indywidualnej ocenie za pomocą wskaźnika ALDEN - algorytmu opracowanego i zwalidowanego przez grupę RegiSCAR [28], służącego do oceny związku przyczynowo-skutkowego między lekiem sprawczym a objawami nadwrażliwości. Pacjenci byli włączani do badania tylko jeśli ich

punktacja według ALDEN wskazywała na "bardzo prawdopodobny" związek przyczynowy, co odpowiada wynikowi  $\geq 6$  punktów (podczas gdy w innych badaniach jako referencję przyjmowano wynik ALDEN  $\geq 4$  punkty [21] lub dodatni wynik LTT [26, 29]). Dzięki takim wygórowanym kryteriom, dobrze zdefiniowana pod względem leku sprawczego grupa pacjentów mogła posłużyć jako wiarygodna reprezentacja przypadków prawdziwie dodatnich.

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) pobrane od badanych były bezpośrednio poddane hodowli z lekami sprawczymi, pozytywną i negatywną kontrolą lub inkubowane uprzednio przez noc z IL-7 i IL-15 w stężeniu po 1ng/ml. Wykonano pomiar i bezpośrednie porównanie lekowo-swoistych odpowiedzi PBMC wyrażonych proliferacją (LTT), wydzielaniem granzymu B (test ELISpot, enzyme-linked immunospot assay), wewnątrzkomórkową ekspresją granulizyny i interferonu gamma (IFN $\gamma$ ) w komórkach CD3+CD4+, CD3+CD8+ i NKp46+ (pomiar w cytometrii przepływowej) oraz stężeniami IL-2, IL-5, IFN $\gamma$  w nadsączu hodowli komórkowych (test cytokine beads array, CBA). Łącznie oceniano zatem u badanych 11 różnych punktów końcowych, a dodatkowo wykonano testy cytometryczne i ELISpot po inkubacji z IL-7 i IL-15. W analizie statystycznej, poza testami rutynowymi, użyto krzywych ROC (receiver operator characteristic) do porównania testów laboratoryjnych i wyznaczenia ich punktów odcięcia.

#### Omówienie wyników

Dodatnie wyniki (indeks stymulacji  $>2$ ) w standardowym LTT stwierdzono jedynie u pojedynczych chorych z SJS/TEN (czułość 27%), co jest zgodne z obserwacjami innej grupy badaczy (czułość LTT 11-21%) [21] i epizodycznymi dodatnimi wynikami raportowanymi przez Kano i wsp. [22]. Nie obserwowano dodatnich wyników w grupie kontrolnej (swoistość 100%).

Leki sprawcze indukowały wzrost wydzielania badanych cytokin przez PBMC chorych w porównaniu z grupą kontrolną w większości ocenianych testów. Ekspresja granzymu B w teście ELISpot (GrB-ELISpot) była większa u chorych niż w kontroli. Również wewnątrzkomórkowe wydzielanie granulizyny w odpowiedzi na leki było większe w grupie pacjentów we wszystkich badanych subpopulacjach komórek, a wyrażone najsilniej w komórkach NKp46+. Odpowiada to danym o znaczącym odsetku komórek NK w płynie z pęcherzy skórnych chorych z SJS/TEN [18, 30]. Stężenia IL-5 i IFN $\gamma$  w nadsączu hodowli komórkowych były także znacząco wyższe w grupie pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną. Taki sam trend obserwowano dla stężenia

IL-2, ale nie był on znamieny statystycznie. Z kolei wewnątrzkomórkowa ekspresja IFN $\gamma$  nie różniła się istotnie w grupie chorych i w grupie kontrolnej. Najprawdopodobniej, w przypadku tej cytokiny, wewnątrzkomórkowa detekcja w pojedynczym, ustalonym punkcie czasowym nie była wystarczająco czuła w porównaniu do testu CBA, który mierzy cytokiny wydzielane w całym czasie trwania hodowli komórkowej.

W następnym kroku przeanalizowano zdolność testów do różnicowania pomiędzy lekiem sprawczym a obojętnym przez porównanie pól powierzchni (AUC, area under curve) pod krzywymi ROC. Najwyższe wartości AUC osiągnęły testy: stężenie IL-5, stężenie IFN $\gamma$ , ekspresja granulizyny w komórkach NKp46+ i CD4+. Wartości AUC dla IL-5 (0,81), IFN $\gamma$  (0,80) i granulizyny w NKp46+ (0,80) były statystycznie znamienne większe niż dla LTT (AUC 0,73). Wyznaczone na podstawie analizy krzywych ROC punkty odcięcia pozwoliły na określenie wyników dodatnich i ujemnych, a tym samym czułości i swoistości badanych testów. Największą wartość czułości wykazało oznaczenie stężenia IFN $\gamma$  w nadsączu, a następnie kolejno ekspresja granulizyny w komórkach CD4+ (Grl-CD4+), stężenie IL-5 w nadsączu, ekspresja granulizyny w komórkach NKp46+ (Grl-NKp46+), stężenie IL-5 w nadsączu, GrB-ELISpot i LTT (odpowiednio: 55%, 53%, 43%, 40%, 38%, 33% i 27%). Wartości czułości Grl-CD4+ i Grl-NKp46+ były porównywalnie wysokie, w odróżnieniu od niskiej czułości oznaczenia granulizyny w komórkach CD8+ (Grl-CD8+), wynoszącej 7%, co może być związane z wyczerpaniem reaktywności tych komórek na dalszą na stymulację *in vitro* z powodu wzmożonej aktywności komórek Treg lub ekspresji PD-1 [31, 32]. Inne systemy odczytu wykazały niską czułość (IFN $\gamma$ -CD4+: 13%) lub nie zidentyfikowały żadnego prawdziwie dodatniego przypadku (IFN $\gamma$ -NKp46+ i IFN $\gamma$ -CD8+). Wartości swoistości badanych testów pozostawały w wysokim zakresie 95-100%.

Pojedynczy test *in vitro* nie obejmuje wszystkich możliwych efektorowych mechanizmów reakcji nadwrażliwości polekowej, ale łączne zastosowanie kilku testów może istotnie zwiększyć czułość diagnostyki. Takie podejście jest uzasadnione jeśli (i) stajemy wobec szczególnie trudnej sytuacji klinicznej, takiej jak SJS/TEN, w której dokładna diagnoza przyczyny pozwala uniknąć stanu zagrożenia życia czy wysokich kosztów leczenia oraz (ii) połączenie testów diagnostycznych nie powoduje istotnego spadku ich łącznej swoistości. Stosując taką strategię stwierdziliśmy, że Grl-CD4+ i GrB-ELISpot razem wykrywają dodatnią odpowiedź u 73% pacjentów, a dołączenie oznaczenia IFN $\gamma$  w nadsączu pozwala wykryć jeszcze jeden prawdziwie dodatni przypadek, co podnosi czułość tego zestawu diagnostycznego do 80% przy zachowaniu łącznej swoistości na wysokim poziomie 95%.



Inkubacja z IL-7 i IL-15 nie zwiększyła istotnie średnich wartości ekspresji granulizyny w komórkach CD4+, CD8+ i NKp46+, ani wydzielania granzymu B w teście ELISpot pod wpływem leku sprawczego w grupie pacjentów. Niektórzy pacjenci wykazywali zwiększenie, a inni zmniejszenie lekowo-swoistej odpowiedzi. Biorąc pod uwagę, że IL-7 i IL-15 mogą nasilać produkcję granzymu B i granulizyny w sposób swoisty, ale nie można także wykluczyć nieswoistej aktywacji komórek [27], ostatecznie zwiększenie swoistej odpowiedzi na stymulację lekiem może pozostać niewykrywalne.

## Wnioski

- W badaniu wykazaliśmy lekowo-swoisty wzrost granzymu B, granulizyny i cytokin (IL-2, IL-5, IFN $\gamma$ ) w stymulowanych lekami sprawczymi hodowlach PBMC chorych z dobrze zdefiniowanym SJS/TEN. Testy *in vitro* bazujące na mechanizmach cytotoksycznych okazały się mieć wyższą czułość niż standardowy test LTT. Co więcej, diagnostyczny zestaw testów obejmujący GrB-ELISpot w połączeniu z pomiarem ekspresji granulizyny w komórkach CD4+ i stężenia IFN $\gamma$  w nadsączu hodowli osiągnął wyjątkowo wysoką czułość 80%, bez istotnej redukcji swoistości, co stanowi poważny postęp w możliwościach identyfikacji metodami *in vitro* leków sprawczych w SJS/TEN.
- Zmiany lekowo-swoistej odpowiedzi po inkubacji PBMC z IL-7 i IL-15 w teście ELISpot i w eksperymentach cytometrycznych były niestabilne, dlatego nie rekomendowaliśmy testowanych interleukin do regularnego zastosowania.

W kolejnej pracy: "**Cytotoxic-based assays in delayed drug hypersensitivity reactions induced by antiepileptic drugs**" skupiliśmy się na cytotoksyczności mediowanej komórkowo na drodze zależnej od ziarnistości i jej możliwych aplikacjach do oceny zależności przyczynowo-skutkowej w pospolitych osutkach płamisto-grudkowych indukowanych przez leki przeciwpadaczkowe.

## Założenia

- "Standardowe procedury diagnostyczne powinny być dopasowane do konkretnych leków, manifestacji klinicznych i grup wiekowych (dzieci vs dorośli)" [9]. Istotnie, jeśli test diagnostyczny był oceniany w określonej, często heterogenicznej, grupie chorych, a później

stosowany w praktyce u chorych z innymi - pod względem wywołujących leków i obrazu klinicznego - polekowymi reakcjami nadwrażliwości, istnieje poważne ryzyko, że uzyskiwane wyniki mogą być zniekształcone z powodu różnic między grupą, w której test był walidowany a grupą, w której został zastosowany.

- Osutki plamisto-grudkowe (MPE, maculopapular exanthema) są najczęstszą manifestacją opóźnionych reakcji nadwrażliwości na leki. Leki przeciwpadaczkowe (LPP) są stosowane w padaczce, ale także w wielu innych wskazaniach neurologicznych i psychiatrycznych, jak ból neuropatyczny, migrena, choroba dwubiegunowa, czy depresja [33]. Są to zatem leki często wypisywane, a ich zużycie wykazuje trend rosnący [34].
- Dostępne narzędzia diagnostyczne w opóźnionych DHR nie są zadowalające, jak wskazano we wprowadzeniu. Wyniki testów płatkowych z lekami są bardzo zmienne i często fałszywie ujemne. LTT wymaga zastosowania długotrwałego protokołu i użycia radioizotopów. Także testy prowokacyjne wykazują wiele wad (np. niska akceptacja przez badanych, możliwa resensytyzacja i desensytyzacja, nieokreślony czas trwania reekspozycji do potwierdzenia dobrej tolerancji).
- Badania immunohistologiczne i analizy *in vitro* komórek efektorowych pochodzących ze zmian skórnych wskazują na ważną rolę mechanizmów cytotoksycznych w różnych postaciach indukowanej lekami nadwrażliwości obejmujących zmiany plamisto-grudkowe, pęcherzowe i krostkowe [11-14]. Perforyna, granzymy i granulizyna uwalnianie z ziarnistości limfocytów cytotoksycznych biorą udział w różnorodnych DHR [12, 16, 35].
- Uważa się, że upływ czasu pomiędzy wystąpieniem polekowej reakcji nadwrażliwości a przeprowadzeniem diagnostyki przyczynowej ma duży wpływ na jej skuteczność, ale konkretne dane na ten temat są bardzo ograniczone.

#### Pytania badawcze

- Czy testy *in vitro* oparte na cytotoksyczności zależnej od ziarnistości mogą wykrywać lekowo-swoistą odpowiedź w osutkach plamisto-grudkowych?
- Czy te testy zastosowane w zdefiniowanej grupie chorych (dorośli z MPE wywołaną LPP) przewyższają jako narzędzie diagnostyczne test LTT i testy płatkowe, uwzględniając czas, który upłynął od reakcji nadwrażliwości?

## Metody

Badaniem objęto 23 chorych z osutką plamisto-grudkową i 24 osoby stanowiące kontrolę, które były w przeszłości eksponowane na badane leki bez żadnych objawów DHR. Indukowane przez leki przeciwpadaczkowe MPE zostały zdefiniowane jako osutka bez objawów systemowych wymagająca wycofania LPP w ciągu 3 miesięcy od rozpoczęcia leczenia [36]. PBMC izolowano z krwi obwodowej badanych i poddano hodowli w obecności leku sprawczego, kontroli pozytywnej i negatywnej (medium hodowlane). Następnie zmierzono wydzielanie granzymu B metodą ELISpot (GrB-ELISpot), wewnątrzkomórkową ekspresję granulizyny w komórkach NKp46+ (Gr1-NK) z użyciem cytometrii przepływowej oraz stężenie perforyny w nadsączu hodowli komórkowych metodą ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), Per-ELISA. Wyniki zostały wyrażone jako różnica (wartość delta): wartość odczytu w warunkach stymulacji testowanymi lekami minus wartość odczytu bez stymulacji (kontrola negatywna). Poziomy odcięcia dodatniego wyniku testu zostały wyznaczone w oparciu o normalną zmienność statystyczną obserwowaną w grupie kontrolnej i zdefiniowane jako średnia wartość delta plus dwa odchylenia standardowe, jak podają inni autorzy [29, 37-40]. Testy LTT zostały wykonane i zinterpretowane według standardowego protokołu [41]. Testy płytkowe z lekami zostały wykonane i odczytane zgodnie z obowiązującymi zaleceniami [42].

## Omówienie wyników

Zarówno test ELISpot, jak i analiza cytometryczna wykazały znacząco większą ekspresję granzymu B i granulizyny w grupie pacjentów niż w grupie kontrolnej. Badane leki indukowały też proliferację w LTT u chorych, ale nie w grupie kontrolnej. Natomiast stężenia perforyny w nadsączach hodowli PBMC pacjentów nie różniły się znacząco od próbek kontrolnych. Do badań oceniających diagnostyczne testy *in vitro* pacjenci są często rekrutowani na podstawie dodatniego LTT z lekiem sprawczym [26, 29, 43]. W naszym badaniu wszystkie oceniane testy, w tym LTT były wykonywane równolegle, co pozwoliło na ich bezpośrednie porównanie. Uwalnianie granzymu B z PBMC i ekspresja granulizyny w komórkach NK osiągnęły wyższą czułość (odpowiednio 55% i 39,1%) niż indeks stymulacji w standardowym LTT (30,4%), co mogłoby sugerować, że odpowiedź lekowo-swoistych komórek w MPE opiera się głównie na wydzielaniu cytotoksycznych cytokin, a jedynie w mniejszym stopniu na proliferacji. Wykazaliśmy jednak znamienne dodatnią korelację pomiędzy wynikami testów LTT, a GrB-ELISpot i Gr1-NK. Wszyscy, z wyjątkiem jednego, pacjenci z dodatnim LTT, mieli także dodatnie wyniki GrB-ELISpot i Gr1-NK. Zaś kolejnych 7 pacjentów miało dodatni wynik tylko w testach wykrywających granzym B i/lub granulizynę. Co więcej, najdłuższy odstęp czasu

między wystąpieniem objawów a uzyskaniem dodatniego wyniku testu wyniósł 232 miesiące dla GrB-ELISpot i 135 miesięcy dla GrI-NK wobec 59 miesięcy dla LTT. Dlatego uważamy, że testy LTT, GrB-ELISpot i GrI-NK identyfikują pacjentów z osutką plamisto-grudkową, którzy nie różnią się istotnie pod względem sposobu reakcji na lek, ale testy bazujące na oznaczeniu granzymu B i granulizyny pozwalają na wykrycie słabszej odpowiedzi lekowo-swoistej i utrzymują diagnostyczną reaktywność przez dłuższy czas.

Za taką interpretacją przemawia dalsza analiza odstępów czasowych pomiędzy DHR a wykonaniem testów. Porównaliśmy wyniki pacjentów testowanych w czasie krótszym niż mediana odstępu czasowego (48 miesięcy) z wynikami pozostałych pacjentów. We wszystkich testach, poza Per-ELISA, obserwowaliśmy większą liczbę dodatnich wyników i znamienne wyższe średnie wartości odczytów w grupie testowanej w krótszym odstępie czasu. Szeroki zakres odstępów czasowych między reakcją polekową a testowaniem (1-232 miesiące) u włączonych pacjentów pozwolił nam na lepsze zróżnicowanie ocenianych testów pod względem czułości. Z naszymi wynikami korespondują pojedyncze doniesienia o możliwości wykrycia lekowo-swoistych komórek T w odległym czasie od pierwotnej reakcji [43].

Spośród badanych testów, GrB-ELISpot był zdolny do zidentyfikowania największej liczby prawdziwie dodatnich przypadków. Detekcja cytokin tą metodą ma wysoką czułość - pozwala wykryć granzym B wydzielany przez pojedyncze komórki zanim zostanie zdegradowany. U chorych nieeksponowanych na lek sprawczy przez wiele lat pozostają jedynie nieliczne komórki T reagujące na swoistą stymulację [43]. Dla takich pacjentów GrB-ELISpot jest szczególnie użytecznym narzędziem diagnostycznym. Test GrI-NK również wykazał potencjalną użyteczność jako czuły i swoisty system odczytu do detekcji lekowo-swoistej odpowiedzi. W naszym wcześniejszym badaniu poświęconym SJS/TEN stwierdziliśmy znamienne wzrost granulizyny pod wpływem stymulacji lekiem zarówno w komórkach NK, jak i CD4+, ale biorąc pod uwagę tylko chorych uczulonych na LPP, które są testowane także w bieżącym badaniu, komórki NK były lepszym diagnostycznym systemem odczytu. Odpowiada to roli komórek NK jako głównego źródła granulizyny w polekowych reakcjach nadwrażliwości, w tym w osutkach plamisto-grudkowych [16]. Per-ELISA, kolejny oceniany test, miał niezadowalającą czułość (17,4%) i dostarczył wyniki rozbieżne z wynikami pozostałych testów. Może to być związane ze sposobem działania perforyny, która polimeryzuje po aktywacji komórek efektorowych formując cylindryczne pory w błonie komórek docelowych umożliwiając innym mediatorom wnikanie do komórki [44]. Zatem perforyna wiązana podczas hodowli w błonach komórkowych nie osiąga istotnych stężeń w nadsączu. Biorąc pod uwagę najczęściej testowane leki, odsetki dodatnich odpowiedzi po karbamazepinie i jej analogu okskarbazepinie (LTT - 28,6%; GrB-ELISpot -

64,3%; GrI-NK - 42,9% i Per-ELISA - 21,4%) nie wykazały znamiennej statystycznie różnicy w porównaniu lamotryginą (LTT - 37,5%; GrB-ELISpot - 37,5%; GrI-NK - 37,5% and Per-ELISA - 12,5%).

Wyniki testów płatkowych z lekami zależą od czasu, który upłynął od reakcji, jej klinicznej manifestacji, a także różnic pomiędzy samymi lekami. Badacze często koncentrują się wyłącznie na testach skórnych albo na testach *in vitro*, ale z praktycznego punktu widzenia najciekawsze jest pytanie, czy dany test laboratoryjny przewyższa testy skórne, czy odwrotnie. W naszym badaniu odsetek dodatnich testów płatkowych był niski (14,3%) w porównaniu z testami *in vitro*. Prawdopodobnie najważniejszą tego przyczyną był długi odstęp czasowy pomiędzy reakcją a wykonaniem testów u większości badanych pacjentów. Zgodnie z oczekiwaniem wartości swoistości badanych testów *in vitro* i testów płatkowych pozostawały w wysokim zakresie 95,8%-100%.

## Wnioski

U dorosłych pacjentów z osutką plamisto-grudkową indukowaną lekami przeciwpadaczkowymi testy *in vitro* oparte na detekcji granulizyny w komórkach NK, a szczególnie granzymu B produkowanego przez lekowo-swoiste komórki efektorowe przewyższają rutynowe testy diagnostyczne i umożliwiają wykrycie swoistej odpowiedzi mającej niski poziom i niewykrywalnej standardowymi technikami. W fazie remisji lekowo-swoiste komórki okazały się być łatwiej wykrywalne w krążeniu przy pomocy badanych testów *in vitro*, niż w skórze przy pomocy testów płatkowych.

Problematyka diagnostyki *in vitro* w opóźnionych polekowych reakcjach nadwrażliwości była kontynuowana w pracy: **"Drug-specific *in vitro* secretion of IFN $\gamma$  in the diagnosis of drug-induced exanthemas: electrochemiluminescence assay versus previously used diagnostic methods."**

## Założenia

- W praktyce klinicznej potwierdzenie związku przyczynowo-skutkowego pomiędzy zastosowanym lekiem a objawami nadwrażliwości jest poważnym wyzwaniem. Zarówno fałszywie ujemna, jak i fałszywie dodatnia diagnoza przyczynowa niesie za sobą

negatywne konsekwencje, dlatego oczekuje się zwykle, że wywiad zostanie poparty obiektywnymi badaniami. Istniejące metody diagnostyczne, szczególnie testy skórne mają ograniczoną wartość, co omówiono wcześniej.

- Na polu badań *in vitro* ukierunkowanych na wykrycie lekowo-swoistej reakcji obiecującym celem badawczym jest IFN $\gamma$ , często wykorzystywany do monitorowania antygenowo-swoistej odpowiedzi komórek T. IFN $\gamma$  jest uważany za główną cytokinę w patogenezie opóźnionych DHR, szczególnie osutek plamisto-grudkowych, gdyż stwierdza się jego zwiększoną ekspresję w bioptatach ze skóry zmienionej chorobowo, przede wszystkim w komórkach T CD4+ [45].
- Opracowano kilka metod pomiaru ekspresji IFN $\gamma$ . Opierają się one na różnych technikach, np. ELISA, ELISpot albo cytometria przepływowa (FACS) na poziomie wewnątrzkomórkowym [37, 46, 47], ale brak przekonujących danych pozwalających wskazać metodę z wyboru do diagnostyki opóźnionych DHR [8].

#### Pytania badawcze

- Która z metod opartych na detekcji IFN $\gamma$  na różnych etapach jego produkcji i uwalniania powinna służyć jako metoda z wyboru do identyfikacji leku sprawczego u chorych z opóźnionymi polekowymi reakcjami nadwrażliwości?
- Czy ultraczuły test elektrochemiluminescencji (ECL) wykazuje w procesie diagnostycznym istotną przewagę nad innymi testami, wykorzystującymi pomiary IFN $\gamma$  i nad standardowym testem LTT?

#### Metody

Włączyliśmy do badania 16 pacjentów ze zdiagnozowaną polekową osutką plamisto-grudkową kategorii A według Nyfelera- Pichlera [48] indukowaną karbamazepiną, lamotryginą lub okskarbazepiną. Grupa kontrolna składała się z 16 dopasowanych pod względem płci i wieku osób eksponowanych na analogiczny zestaw leków bez żadnych objawów nadwrażliwości.

PBMC były izolowane z próbek krwi badanych i poddane hodowli w obecności leku sprawczego, kontroli pozytywnej i negatywnej (medium hodowlane). Następnie zmierzono wydzielanie IFN $\gamma$

metodą ELISpot, wewnątrzkomórkową ekspresję IFN $\gamma$  w komórkach T CD4 $^{+}$  przy pomocy cytometrii przepływowej oraz stężenia IFN $\gamma$  w nadsączu hodowli metodą ELISA i ECL. Test LTT i jego interpretacja zostały przeprowadzone według standardowego protokołu [41].

Wyniki zostały wyrażone jako wartości delta: różnica pomiędzy reakcją w obecności leku a reakcją w warunkach niestymulowanych. Wynik odnotowywano jako dodatni, jak poprzednio, gdy wartość delta była większa niż średnia wartość delta +2SD zmierzone w grupie kontrolnej. Celem bezpośredniego porównania FACS, ECL, ELISA i ELISpot pomiędzy sobą, wyniki uzyskane każdą z technik zostały transformowane do bezwymiarowego wskaźnika Z (stosunek indywidualnego wyniku minus średni wynik w grupie do odchylenia standardowego w grupie), według metody podanej przez Tassignon'a i wsp. [40].

#### Omówienie wyników

W badaniu bezpośrednio skonfrontowaliśmy metody detekcji IFN $\gamma$  produkowanego pod wpływem stymulacji lekiem wewnątrzkomórkowo (FACS), wydzielanego na poziomie pojedynczych komórek (ELISpot), zawartego w nadsączu hodowli (ELISA) oraz porównaliśmy te metody z LTT i testem ECL, który nie był dotychczas opisywany w takim kontekście.

Wszystkie testy były ujemne w grupie kontrolnej, co oznacza, że nie odnotowano wyników fałszywie dodatnich a swoistość każdego testu osiągnęła 100%. W grupie pacjentów najwyższy wskaźnik dodatnich odpowiedzi na lek odnotowano dla testów ELISA i ECL (po 56,25%), a w dalszej kolejności dla testów ELISpot i FACS po 37,5%. Przypuszczamy, że podstawową przyczyną tej różnicy jest fakt, że pomiary ELISA i ECL odzwierciedlają produkcję IFN $\gamma$  w całym czasie trwania hodowli, podczas gdy pomiary w ELISpot i FACS obejmują jedynie ograniczone i znacznie krótsze okresy. Taką interpretację potwierdzają wyniki innych autorów, uzyskiwane z użyciem metod wykorzystujących pomiar IFN $\gamma$  w nadsączu hodowli komórkowej [46, 47, 49].

Test LTT jest uważany za metodę diagnostyczną pomocną w różnych DHR, w naszym badaniu miał czułość 37,5%, a zatem nie okazał się skuteczniejszy niż alternatywne oceniane metody. Technologia oparta na elektrochemiluminescencji daje możliwość pomiaru bezwzględnych stężeń IFN $\gamma$  poniżej progu detekcji ELISA, jednak aby uznać wynik testu za dodatni opieramy się na wartościach względnych - różnicy pomiędzy wytwarzaniem IFN $\gamma$  po stymulacji lekiem a jego wydzielaniem w warunkach podstawowych. Stwierdziliśmy, że w sytuacji, gdy o wyniku stanowi

różnica między stężeniami IFN $\gamma$  przy stymulacji i bez niej, a nie bezwzględna wartość stężenia, test ECL nie wykazuje przewagi nad testem ELISA.

Wyniki w grupie pacjentów przedstawione za pomocą wskaźnika Z na wspólnym wykresie pozwalają na porównanie ocenianych testów. U poszczególnych pacjentów największy względny wzrost wydzielania IFN $\gamma$  po stymulacji lekiem był osiągany przez różne spośród ocenianych testów, co oznacza, że badani mogą niekiedy potrzebować do wykrycia lekowo-swoistej odpowiedzi indywidualnie dobranego testu. Każdy z pacjentów uzyskał dodatni wynik przynajmniej w jednym z czterech ocenianych testów, zatem czułość kombinacji wszystkich testów zastosowanych łącznie osiąga 100%, ale taka strategia diagnostyczna jest raczej odpowiednia przy wybranych, zagrażających życiu DHR, jak wspomniano wcześniej. Natomiast obecne badanie ukierunkowane było na wskazanie metody pierwszego wyboru do codziennej praktyki w diagnostyce pospolitych manifestacji DHR, czyli osutek płamisto-grudkowych.

## Wnioski

Po raz pierwszy u pacjentów z nadwrażliwością na leki przeprowadziliśmy równoległe porównanie czterech różnych metod *in vitro* wykorzystujących oznaczanie IFN $\gamma$ : technologii elektrochemiluminescencji (ECL), która nie była dotychczas opisywana w diagnostyce opóźnionych DHR; metod ELISpot, ELISA i cytometrii przepływowej (do detekcji IFN $\gamma$  w komórkach T CD4 $^{+}$ ). Wykazaliśmy, że metoda ELISA jest równie skuteczna pod względem czułości i swoistości jak metoda ECL, a przy tym łatwo dostępna i stosunkowo tania, co czyni ją wartościową metodą skriningową do wykrywania wydzielania IFN $\gamma$  pod wpływem stymulacji lekiem.

W ostatniej publikacji "**The role of IL-7 and IL-15 in the ELISpot detection of drug-specific response**" mieliśmy na celu zbadanie jak ekspozycja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej na IL-7 i IL-15 wpływa na lekowo-swoistą odpowiedź, przy zmodyfikowanym układzie eksperymentalnym w porównaniu z wcześniej opisanym w pracy na temat identyfikacji leków sprawczych w zespole Stevensa-Johnsona.

## Założenia

- Reakcje nadwrażliwości na leki są ważnym problemem systemu opieki zdrowotnej, jak opisano wyżej. Ich diagnostyka jest poważnym wyzwaniem, ponieważ - w odróżnieniu



od większości pospolitych alergii - pacjenci są ekspozowani na leki sprawcze tylko przez bardzo ograniczony czas. Dlatego zidentyfikowanie tych leków przy pomocy dostępnych testów jest trudne i celowe byłoby zwiększenie czułości istniejących metod diagnostycznych.

- Testy *in vitro* mają na celu wykrycie we krwi uczulonych pacjentów komórek reagujących na stymulację danym lekiem. Wcześniejsze badania wskazały, że nawet u pacjentów z przekonującym wywiadem, testy *in vitro* często nie przynoszą dodatnich wyników, prawdopodobnie z powodu niewielkiej ilości lekowo-swoistych komórek [21, 22, 35, 50].
- IL-15 i IL-7 są istotnymi cytokinami w rozwoju i aktywacji komórek T. IL-7, ważna cytokina o działaniu antyapoptotycznym, wzmacnia żywotność limfocytów i ich funkcje efektorowe [51]. IL-15 odpowiada za przeżycie i proliferację komórek T CD4+ i CD8+ oraz komórek NK [27]. Wstępne obserwacje sugerują, że inkubacja PBMC z IL-7 i IL-15 może być pomocna w identyfikacji leków sprawczych w opóźnionych polekowych reakcjach nadwrażliwości [26], ale dostępne dane nie są rozstrzygające.

#### Pytania badawcze

Czy u pacjentów z indukowaną lekami osutką płamisto-grudkową dodanie IL-7 i IL-15 do hodowli komórkowej zwiększy produkcję IFN $\gamma$  przez PBMC pod wpływem stymulacji lekiem, bez zwiększenia wydzielania tej cytokiny w warunkach podstawowych, a co za tym idzie, czy taka modyfikacja warunków hodowli zwiększy możliwość identyfikacji lekowo-swoistych PBMC?

#### Metody

Badano jedenastu chorych z osutką płamisto-grudkową. Leki sprawcze (lamotrygina, karbamazepina, okskarbazepina) zostały określone na podstawie charakterystycznego wywiadu: typowy odstęp czasowy pomiędzy przyjęciem leku a wystąpieniem objawów oraz typowa manifestacja kliniczna. Jedenaście osób, które stosowały testowane leki i dobrze je tolerowały posłużyło jako grupa kontrolna.

PBMC były poddane hodowli w obecności leków sprawczych, dodatniej i ujemnej kontroli oraz z dodatkiem i bez dodatku IL-7 i IL-15 w stężeniu po 25 ng/ml. Jako systemem odczytu do

pomiaru odpowiedzi komórkowej posłużono się oznaczaniem IFNg metodą ELISpot (IFNg-ELISpot).

Punkty odcięcia dla dodatniej odpowiedzi zdefiniowano, jak poprzednio, jako średnia delta (liczba plamek/spotów na dołek w obecności leku minus liczba plamek/spotów na dołek w kontroli ujemnej) +2SD obliczone na podstawie danych z grupy kontrolnej, osobno dla eksperymentów bez i z użyciem IL7 i IL-15.

#### Omówienie wyników

Przy niemodyfikowanych warunkach eksperymentów, obserwowaliśmy znamieny wzrost wydzielania IFNg przez PBMC pod wpływem stymulacji lekiem w grupie pacjentów, ale nie w grupie kontrolnej. Uzyskane wyniki pozwoliły przy pomocy testu IFNg-ELISpot identyfikować uczulonych pacjentów z czułością 54,5%. U żadnego badanego z grupy kontrolnej nie stwierdzono dodatniego wyniku (swoistość 100%). Zarówno w grupie chorych, jak i kontrolnej wydzielanie IFNg w warunkach podstawowych (kontrola ujemna - medium hodowlane) było na niskim poziomie.

Następnie wykonano testy z dodatkiem IL-7 i IL-15. Zaobserwowano wyraźny wzrost wydzielania IFNg w kontroli dodatniej i ujemnej oraz przy stymulacji lekiem, zarówno w grupie pacjentów, jak i w grupie kontrolnej, co oznacza, że efekt wzmocnionej aktywacji komórek nie był swoisty dla stymulacji lekiem lub peptydem kontrolnym, ale reprezentował zjawisko antygenowo nieswoiste. Punkt odcięcia dla dodatniej odpowiedzi w testach wykorzystujących IL-7 i IL-15 był znacznie wyższy, co istotnie obniżyło czułość metody (18%). Co więcej pacjenci zidentyfikowani jako dodatni przez zmodyfikowany test, byli już uprzednio dodatni w teście bez modyfikacji, zatem dodanie cytokin nie pozwoliło na wykrycie nowych prawdziwie dodatnich przypadków uczulenia na lek w grupie pacjentów. Z kolei w grupie kontrolnej u jednej osoby stwierdzono dodatni wynik, co skutkowało spadkiem swoistości metody po modyfikacji do 91%.

W naszych wcześniejszych eksperymentach [49] IL-7 i IL-15 w stężeniu 1 ng/ml okazały się niewystarczające do uzyskania stabilnego efektu wzmocnienia lekowo-swoistej odpowiedzi. W obecnym badaniu zastosowaliśmy stężenie 25 ng/ml, na podstawie miareczkowania tych cytokin w podobnych eksperymentach raportowanego przez Jennesa i wsp. [52]. W niektórych przypadkach, zgodnie z oczekiwaniem, kombinacja cytokin przyniosła dodatkowe swoiste wzmocnienie odpowiedzi, ale przeważający sposób reakcji obserwowany w badaniu polegał na

wzroście wydzielania IFNg w obecności IL-7 i IL-15 zarówno w warunkach stymulacji, jak i niestymulowanych, czego skutkiem był spadek czułości i swoistości zmodyfikowanego testu. Przyszłe kierunki badań w tym zakresie mogłyby objąć ocenę innych modyfikacji warunków hodowli PBMC z uwzględnieniem innych rodzajów i stężeń cytokin [53].

## Wnioski

Uzyskane wyniki nie pozwalają na podtrzymanie hipotezy roboczej, że dodanie IL-7 i IL-15 do hodowli PBMC nasili u pacjentów z polekową osutką plamisto-grudkową odpowiedź na lek sprawczy mierzoną metodą IFNg-ELISpot. Zmiany w wydzielaniu IFNg pod wpływem bodźca swoistego pozostały niewykrywalne z powodu zwiększonego podstawowego wydzielania IFNg. Zatem zastosowanie ocenianych cytokin nie miało korzystnego wpływu na czułość i swoistość testu IFNg-ELISpot w badanych warunkach.

## GLÓWNE OSIĄGNIĘCIA BADAWCZE OPISANYCH WYŻEJ PRAC

- 1) Nasze wyniki dowiodły, że łączenie różnych testów komórkowych opartych na mechanizmach cytotoksycznych pomaga przełamać lub obejść zmniejszoną reaktywność PBMC u chorych z SJS/TEN. Ekspresja granulizyny w komórkach T CD4+, granzymu B mierzonego metodą ELISpot i stężenie IFNg w nadsączu hodowli PBMC analizowane łącznie zapewniają 80% czułość i 95% swoistość wobec 27% swoistości w standardowym teście LTT. W przyszłości proponowany zestaw testów laboratoryjnych może posłużyć jako czułe narzędzie diagnostyczne do identyfikacji leków sprawczych u indywidualnego pacjenta, ale również do wykrywania reakcji wywoływanych przez nowo wprowadzane leki, co ma szczególne znaczenie dla firm farmaceutycznych wdrażających leki innowacyjne i instytucji nadzorujących bezpieczeństwo farmakoterapii.
- 2) W dobrze zdefiniowanej grupie pacjentów - dorośli z osutką plamisto-grudkową indukowaną lekami przeciwpadaczkowymi, wykazaliśmy, że pod wpływem stymulacji lekiem sprawczym komórki efektorowe z krwi obwodowej produkują granzym B, granulizynę, a w mniejszym stopniu perforynę. Testy Gr1-NK, a szczególnie GrB-ELISpot oferują poważne korzyści w porównaniu ze standardowym LTT (nie tylko krótszy czas trwania i brak potrzeby użycia radioizotopów, ale przede wszystkim wyższą czułość przy utrzymanej wysokiej swoistości), co przemawia za ich wprowadzeniem do praktyki diagnostycznej.

Potwierdziliśmy, że Gr1-NK i GrB-ELISpot mają znacznie wyższe wskaźniki dodatnich wyników niż testy płatkowe z lekiem, co dotyczy również pacjentów w długotrwałej remisji po objawach nadwrażliwości. Stanowią one zatem obiecującą alternatywę wobec najczęściej stosowanych obecnie testów płatkowych.

W końcu, chociaż odsetek dodatnich wyników w testach *in vitro* silnie maleje w czasie, opisane tu Gr1-NK i GrB-ELISpot pozwalały na wykrycie lekowo-swoistych komórek T po wielu miesiącach od pierwotnej reakcji, w warunkach, w których swoista odpowiedź na niskim poziomie była niewykrywalna standardowymi technikami.

- 3) W przeprowadzonym badaniu, po raz pierwszy bezpośrednio porównującym ultraczuły test oparty na wprowadzanej coraz szerzej technologii elektrochemiluminescencji oraz 3 kolejne testy wykrywające IFN $\gamma$  na różnych etapach jego produkcji i uwalniania: w komórkach T CD4 $^{+}$  (cytometria przepływowa), wydzielanie na poziomie pojedynczych komórek (ELISpot) i stężenie w nadsączu hodowli (ELISA); wykazaliśmy, że metoda ELISA jest równie czuła i swoista, co metoda ECL w identyfikacji leku sprawczego u pacjentów z polekową osutką płamisto-grudkową. Biorąc pod uwagę jej dobrą dostępność i niskie koszty, może posłużyć w przyszłości jako wartościowy test skriningowy do diagnostyki opisywanych pacjentów w oparciu o wykrywanie IFN $\gamma$  wydzielanego pod wpływem stymulacji lekiem.
- 4) Wykazaliśmy, że dodanie IL-7 i IL-15 w ustalonych stężeniach nie zwiększa selektywnie wydzielania IFN $\gamma$  przez stymulowane lekiem sprawczym jednojądrzaste komórki krwi obwodowej pacjentów z polekową osutką płamisto-grudkową z powodu wysokiego nieswoistego sygnału tła - zwiększonego podstawowego wydzielania IFN $\gamma$ . W związku z tym oceniana modyfikacja układu eksperymentalnego nie poprawiła detekcji swoistej odpowiedzi w zastosowanym systemie odczytu (IFN $\gamma$ -ELISpot) i nie wykazała przewagi nad rutynowymi warunkami eksperymentalnymi.

#### Skróty

AUC, pole powierzchni pod każdą krzywą ROC (area under curve); DHR, polekowe reakcje nadwrażliwości (drug hypersensitivity reactions); ECL, test elektrochemiluminescencji; ELISpot, test: enzyme-linked immunospot assay; FACS, cytometria przepływowa (fluorescence-activated cell sorting); GrB, granzym B; Gr1, granulizyna; IFN $\gamma$ , interferon gamma; LPP, leki przeciwpadaczkowe; LTT, test transformacji limfocytów (lymphocyte transformation test); MPE, osutki płamisto-grudkowe (maculopapular exanthema); PBMC, jednojądrzaste komórki krwi

obwodowej (peripheral blood mononuclear cells); Per, perforyna; SJS, zespół Stevensa-Johnsona (Stevens-Johnson syndrom); TEN, toksyczna epidermoliza naskórka

## Piśmiennictwo

1. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998; 279:1200-5.
2. Pirmohamed M, James S, Meakin S et al. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ* 2004; 329:15-9.
3. Hunziker T, Bruppacher R, Kuenzi UP et al. Classification of ADR: a proposal for harmonization and differentiation based on the experience of the comprehensive hospital drug monitoring Bern/St. Gallen, 1974–1993. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2002; 11:159-63.
4. Romano A, Blanca M, Torres MJ et al. Diagnosis of nonimmediate reactions to beta-lactam antibiotics. *Allergy* 2004; 59:1153–60.
5. Padial A, Antunez C, Blanca-Lopez N et al. Non-immediate reactions to betalactams: diagnostic value of skin testing and drug provocation test. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:822-8.
6. Bousquet PJ, Pipet A, Bousquet-Rouanet L et al. Oral challenges are needed in the diagnosis of beta-lactam hypersensitivity. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:185-90.
7. Aberer W, Bircher A, Romano A et al. Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations. *Allergy* 2003; 58:854-63.
8. Schnyder B, Porebski G, Pichler WJ. Allergy workup of severe cutaneous adverse drug reactions: a light at the end of the tunnel? *Br J Dermatol.* 2013; 168:463-464.
9. Demoly P, Adkinson NF, Brockow K et al. International Consensus on drug allergy. *Allergy* 2014; 69: 420-437.
10. Agache I, Bilò M, Braunstahl GJ et al. In vivo diagnosis of allergic diseases - allergen provocation tests. *Allergy* 2015; 70:355-365.
11. Chung WH, Hung SI, Yang JY et al. Granulysin is a key mediator for disseminated keratinocyte death in Stevens- Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Nat Med* 2008; 14:1343-50.
12. Yawalkar N, Egli F, Hari Y et al. Infiltration of cytotoxic T cells in drug-induced cutaneous eruptions. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:847-55.
13. Nassif A, Bensussan A, Boumsell L et al. Toxic epidermal necrolysis: effector cells are drug-specific cytotoxic T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1209-15.
14. Schmid S, Kuechler PC, Britschgi M et al. Acute generalized exanthematous pustulosis: role of cytotoxic T cells in pustule formation. *Am J Pathol* 2002; 161:2079-86.
15. Kuechler PC, Britschgi M, Schmid S et al. Cytotoxic mechanisms in different forms of T-cell-mediated drug allergies. *Allergy* 2004; 59:613-22.
16. Schlapbach C, Zawodniak A, Pichler WJ et al. NKp46+ cells express granulysin in multiple cutaneous adverse drug reactions. *Allergy.* 2011; 66:1469-76.
17. Bastuji-Garin S, Rzany B, Stern RS et al. Clinical classification of cases of toxic epidermal necrolysis, Stevens-Johnson syndrome, and erythema multiforme. *Arch Dermatol* 1993; 129:92-6.
18. Le Cleach L, Delaire S, Boumsell L et al. Blister fluid T lymphocytes during toxic epidermal necrolysis are functional cytotoxic cells which express human natural killer (NK) inhibitory receptors. *Clin Exp Immunol* 2000; 119:225-30.
19. Viard I, Wehrli P, Bullani R et al. Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin. *Science* 1998; 282:490-3.
20. Abe R, Shimizu T, Shibaki A et al. Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome are induced by soluble Fas ligand. *Am J Pathol* 2003; 162:1515-20.
21. Tang YH, Mockenhaupt M, Henry A et al. Poor relevance of a lymphocyte proliferation assay in lamotrigine-induced Stevens-Johnson syndrome or toxic epidermal necrolysis. *Clin Exp Allergy* 2012; 42:248-5420.

22. Kano Y, Hirahara K, Mitsuyama Y et al. Utility of the lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug sensitivity: dependence on its timing and the type of drug eruption. *Allergy* 2007; 62:1439-44.
23. Cooper MA, Bush JE, Fehniger TA et al. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood* 2002; 100:3633-8.
24. Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:657-79.
25. Rubinstein MP, Lind NA, Purton JF et al. IL-7 and IL-15 differentially regulate CD8 + T-cell subsets during contraction of the immune response. *Blood* 2008; 112:3704-12.
26. Zawodniak A, Lochmatter P, Yerly D et al. In vitro detection of cytotoxic T and NK cells in peripheral blood of patients with various drug-induced skin diseases. *Allergy* 2010; 65:376-84.
27. Gu XX, Yue FY, Kovacs CM et al. The role of cytokines which signal through the common gamma chain cytokine receptor in the reversal of HIV specific CD4+ and CD8+ T cell anergy. *PLoS ONE* 2007; 2:e300.
28. Sassolas B, Haddad C, Mockenhaupt M et al. ALDEN, an algorithm for assessment of drug causality in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: comparison with case control analysis. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 88:60-8.
29. Lochmatter P, Beeler A, Kawabata TT et al. Drug-specific in vitro release of IL-2, IL-5, IL-13 and IFN-gamma in patients with delayed-type drug hypersensitivity. *Allergy* 2009; 64:1269-78.
30. Rajaratnam R, Mann C, Balasubramaniam P et al. Toxic epidermal necrolysis: retrospective analysis of 21 consecutive cases managed at a tertiary centre. *Clin Exp Dermatol* 2010; 35:853-62.
31. Norris S, Coleman A, Kuri-Cervantes L et al. PD-1 Expression on Natural Killer Cells and CD8(+) T Cells During Chronic HIV-1 Infection. *Viral Immunol* 2012; 25:329-32.
32. Sullivan JA, Kim EH, Plisch EH et al. FOXO3 Regulates the CD8 T cell response to a Chronic Viral Infection. *J Virol* 2012; 86:9025-34.
33. de Groot MC, Schuerch M, de Vries F et al. Antiepileptic drug use in seven electronic health record databases in Europe: a methodologic comparison. *Epilepsia*. 2014; 55:666-673.
34. Italiano D, Capuano A, Alibrandi A et al. Indications of newer and older antiepileptic drug use: findings from a southern Italian general practice setting from 2005-2011. *Br J Clin Pharmacol*. 2015; 79:1010-1019.
35. Porebski G, Gschwend-Zawodniak A, Pichler WJ. In vitro diagnosis of T cell-mediated drug allergy. *Clin Exp Allergy*. 2011; 41: 461-470.
36. McCormack M, Alfirevic A, Bourgeois S et al. HLA-A\*3101 and carbamazepine-induced hypersensitivity reactions in Europeans. *N Engl J Med*. 2011; 364:1134-1143.
37. Rozieres A, Hennino A, Rodet K et al: Detection and quantification of drug-specific T cells in penicillin allergy. *Allergy* 2009; 64:534-542.
38. Polak ME, Belgi G, McGuire C et al: In vitro diagnostic assays are effective during the acute phase of delayed-type drug hypersensitivity reactions. *Br J Dermatol*. 2013; 168:539-549.
39. Tanvarasethee B, Buranapraditkun S, Klaewsongkram J. The potential of using enzyme-linked immunospot to diagnose cephalosporin-induced maculopapular exanthems. *Acta Derm Venereol*. 2013; 93:66-69.
40. Tassignon J, Burny W, Dahmani S et al: Monitoring of cellular responses after vaccination against tetanus toxoid: comparison of the measurement of IFN-gamma production by ELISA, ELISPOT, flow cytometry and real-time PCR. *J Immunol Methods* 2005; 305:188-198.
41. Pichler WJ, Tilch J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy*. 2004; 59:809-820.
42. Barbaud A, Goncalo M, Bruynzeel D et al. Guidelines for performing skin tests with drugs in the investigation of cutaneous adverse drug reactions. *Contact Dermatitis*. 2001; 45:321-328.
43. Beeler A, Engler O, Gerber BO et al. Long-lasting reactivity and high frequency of drug-specific T cells after severe systemic drug hypersensitivity reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117:455-462.

44. Liu CC, Walsh CM, Young JD. Perforin: structure and function. *Immunol Today*. 1995; 16:194-201.
45. Yawalkar N. Maculopapular drug eruptions. In: *Drug hypersensitivity*. Pichler WJ (ed.). Basel Karger. 2007: 242-250.
46. Khalil G, El-Sabban M, Al-Ghadban S et al: Cytokine expression profile of sensitized human T lymphocytes following in vitro stimulation with amoxicillin. *Eur Cytokine Netw*. 2008; 19:131-141.
47. Martin M, Wurpts G, Ott H et al. In vitro detection and characterization of drug hypersensitivity using flow cytometry. *Allergy* 2010; 65: 32-39.
48. Nyfeler B, Pichler WJ. The lymphocyte transformation test for the diagnosis of drug allergy: sensitivity and specificity. *Clin Exp Allergy*. 1997; 27:175-181.
49. Porebski G, Pecaric-Petkovic T, Groux-Keller M et al. In vitro drug causality assessment in Stevens-Johnson syndrome - alternatives for lymphocyte transformation test. *Clin Exp Allergy* 2013; 43:1027-1037.
50. Barna BP, Gogate P, Deodhar SD et al. Lymphocyte transformation and radioallergosorbent tests in drug hypersensitivity. *Am J Clin Pathol* 1980; 73:172-6.
51. Caserta S, Luttmann W. Roles of IL-7 and IL-2 in preserving T cell viability, *Modern Aspects in BioMedicine* 4, 2010, 1-2.
52. Jenness W, Kestens L, Nixon DF et al. Enhanced ELISPOT detection of antigen-specific T cell responses from cryopreserved specimens with addition of both IL-7 and IL-15 - the Amplispot assay. *J Immunol Methods* 2002; 270:99-108.
53. Spiewak R, Moed H, von Blomberg BM et al. Allergic contact dermatitis to nickel: modified in vitro test protocols for better detection of allergen-specific response. *Contact Dermatitis* 2007; 56:63-9.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).**

Moja aktywność naukowa koncentruje się na dwóch podstawowych obszarach badawczych: nadwrażliwości na leki i wrodzonym obrzęku naczynioruchowym.

PRACE NAUKOWO-BADAWCZE NAD NADWRAŻLIWOŚCIĄ NA LEKI NIEZWIĄZANE Z OPISANYM WYŻEJ CYKLEM PUBLIKACJI:

- Genotyp wolnej acetylacji jako czynnik indywidualnej nadwrażliwości skórnej na niesteroidowe leki przeciwzapalne

Oznaczono polimorfizm N-acetylacji w grupie chorych z pokrzywką i obrzękiem indukowanym niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi, w tym aspiryną i porównano z grupą kontrolną. Allele \*4, \*5, \*6 i \*7 N-acetylotransferazy 2 (NAT2) określano metodą łańcuchowej reakcji polimerazowej (PCR). Do oceny danych genetycznych wykorzystano procedurę CASECONTROL zaimplementowaną w programie statystycznym SAS/GENETICS. W grupie chorych stwierdzono statystycznie znamiennej dominację "wolnych" acetylatorów w porównaniu z grupą kontrolną. Trend ten był jeszcze wyraźniejszy, gdy analizowano chorych z silną

nadwrażliwością na aspiryną potwierdzoną doustnymi testami prowokacyjnymi. Wykazano dodatnią korelację pomiędzy występowaniem wolnego genotypu acetylacji (polimorfizm genu NAT2) ze skórą postacią nadwrażliwości na kwas acetylosalicylowy.<sup>1</sup>

- Modelowanie struktur przestrzennych metabolitów aspiryny oraz komputerowa symulacja kompleksów metabolitów aspiryny z albuminą

Dokonano oceny możliwego wpływu związania ligandów będących metabolitami aspiryny (kwas salicylowy, salicyluran, kwas gentyzynowy, kwas O-metylo-salicylowy) na zmianę właściwości konformacyjnych albuminy. Przeprowadzono analizę konformacyjną układów albumina – wybrane ligandy. Przy pomocy dokowania molekularnego sprawdzano jakie konformacje układu ligand-receptor są optymalne pod względem energetycznym dla stabilności kompleksów. Strukturę albuminy pozyskano z bazy struktur białkowych PDB. Zaobserwowane nieznaczne zwiększenie mobilności domen albuminy (odległości i kąty między wybranymi domenami) bez i ze związanymi ligandami nie uzasadnia hipotezy, że metabolity kwasu acetylosalicylowego po związaniu z albuminą mogą wywoływać IgE-zależną reakcję alergiczną.<sup>2</sup>

- Zastosowanie testu aktywacji bazofilów w diagnostyce nadwrażliwości na niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ)

Wstępne prace posłużyły identyfikacji chorych spełniających restrykcyjne kryteria włączenia (pokrzywka i/lub obrzęk naczynioruchowy wstępujący do godziny od przyjęcia jednego z czterech NLPZ: kwas acetylosalicylowy, ibuprofen, diklofenak i metamizol, weryfikowane testem doustnej prowokacji i wykluczenie chorych z astmą aspirynową lub przewlekłą pokrzywką zaostrzaną przez NLPZ) oraz opracowaniu technicznych aspektów testów, w tym doborowi stężeń poszczególnych leków.<sup>3,4</sup>

W wyselekcjonowanej na podstawie wcześniejszych badań jednorodnej klinicznie grupie chorych ze stwierdzoną nadwrażliwością na NLPZ i w grupie kontrolnej wykonano testy aktywacji bazofilów (zestawy *Flow2CAST*, Buhlmann) z kwasem acetylosalicylowym, ibuprofenem, diklofenakiem i metamizolem. Stwierdzono, że test aktywacji bazofilów skutecznie różnicował pacjentów z nadwrażliwością na NLPZ bez przewlekłej podstawowej choroby zapalnej (astmy

---

<sup>1</sup> Porębski G, Obtulowicz K i wsp. *Bio-Algorithms Med-Syst.* 2008 (wykaz publikacji II.B.17)

<sup>2</sup> Jurkowski W, Porebski G i wsp. *Curr. Drug Metab.* 2009 (wykaz publikacji II.A.4)

<sup>3</sup> Porębski G, Piotrowicz-Wójcik K i wsp. *Alergol. Immunol.* 2010 (wykaz publikacji II.B.12)

<sup>4</sup> Piotrowicz-Wójcik K, Porębski G i wsp. *Alergol. Immunol.* 2010 (wykaz publikacji II.B.13)



oskrzelowej, przewlekłej pokrzywki) od osób zdrowych. Wykazał dość dobrą zdolność identyfikacji przypadków prawdziwie dodatnich (czułość) oraz wysoką swoistość. Oznacza to, że wprawdzie ujemny wynik testu aktywacji bazofilów nie wyklucza z całą pewnością istnienia nadwrażliwości na NLPZ, ale wynik dodatni daje podstawę do rozważenia odstąpienia od prowokacji *in vivo*. Przy czym ekstrapolacja tych stwierdzeń na całą populację chorych z nadwrażliwością na NLPZ nie jest uprawniona, a dodatni test aktywacji bazofilów nie jest dowodem IgE-zależnego mechanizmu reakcji (różne możliwe mechanizmy aktywacji bazofilów). U części chorych obserwowano reakcje krzyżowe pomiędzy różnymi testowanymi NLPZ, ale uzyskane wyniki nie pozwalają na sformułowanie wiążących twierdzeń w tym zakresie.<sup>5</sup>

- System ekspercki wspomagający rozpoznawanie i leczenie skórnej nadwrażliwości na aspirynę

Na podstawie utworzonej na wstępie komputerowej medycznej bazy wiedzy (usystematyzowanych rekordów danych klinicznych i laboratoryjnych poszczególnych pacjentów) zbudowano ścieżki wspomaganie decyzji diagnostyczno-terapeutycznych, które mają służyć optymalizacji postępowania uwzględniającej indywidualną sytuację poszczególnych chorych z obrzękiem i/lub pokrzywką. System komputerowy na podstawie wprowadzanych danych (wywiadu, badania fizykalnego oraz wyników dodatkowych badań laboratoryjnych i pracownianych) przedstawia sugestie dotyczące postępowania, jednak ostateczne decyzje należą do lekarza prowadzącego pacjenta. System został wyposażony w elementy edukacyjne, które mogą zostać wykorzystane jako materiały informacyjne dla pacjenta oraz moduł do rejestracji kolejnych przypadków skórnej nadwrażliwości na aspirynę wprowadzanych do bazy wiedzy po weryfikacji przez eksperta.<sup>6</sup>

- Częstość raportowania alergii na leki u dzieci

W porównaniu z danymi epidemiologicznymi pochodzącymi z populacji osób dorosłych dane o częstości występowania alergii na leki w populacjach pediatrycznych są bardzo skąpe. Jednocześnie pacjenci pediatryczni różnią się od dorosłych pod względem metabolizmu leków, jak i profilu stosowanej farmakoterapii, powinni być zatem rozpatrywani jako odrębna grupa.

---

<sup>5</sup> Porębski G, Piotrowicz-Wójcik K i wsp. *Alergol. Immunol.* 2010 (wykaz publikacji II.B.15)

<sup>6</sup> Porębski G, Walecki P i wsp. *Bio-Algorithms Med-Syst.* 2006 (wykaz publikacji II.B.21)

W przekrojowym badaniu kwestionariuszowym populacji ogólnej dzieci sześć- i siedmioletnich oceniono częstość alergii na leki raportowanej przez rodziców na podstawie 4080 zebranych ankiet. Wyniosła ona 3,38% (najczęściej wymienianymi lekami były antybiotyki i NLPZ). Chociaż wyniki opierają się jedynie na opinii rodziców, to wskazują skalę zapotrzebowania na diagnostykę wykluczającą lub potwierdzającą alergię na leki.<sup>7</sup>

Projekt kolejnego badania oparto na ocenie spontanicznych raportów przysyłanych przez lekarzy do regionalnego Ośrodka Monitorowania Działań Niepożądanych Leków, obejmującego zasięgiem działania obszar zamieszkały przez około 4 mln osób. Analizą objęto raporty dotyczące polekowe reakcje nadwrażliwości u pacjentów poniżej 18 rż. zgłoszone w ciągu czterech lat (2008-2011). Średnia wieku badanych wyniosła 6,6 lat, najczęstszymi manifestacjami klinicznymi były objawy skórne (pokrzywka i osutka plamisto-grudkowa), a najczęściej zgłaszanymi lekami - jak poprzednio - antybiotyki i NLPZ.<sup>8</sup>

#### PRACE NAUKOWO-BADAWCZE NAD WRODZONYM OBRZĘKIEM NACZYNIORUCHOWYM:

- Badania jakości życia związanej ze zdrowiem u chorych z wrodzonym obrzękiem naczynioruchowym

Wrodzony obrzęk naczynioruchowy (hereditary angioedema, HAE) to schorzenie rzadkie, lecz potencjalnie zagrażające życiu, manifestujące się napadami zlokalizowanych obrzęków m.in. twarzy, gardła, krtani, kończyn, ściany przewodu pokarmowego. Dane o wpływie schorzenia na jakość życia pacjentów są bardzo ograniczone, chociaż wiedza ta, w przypadku chorób rzadkich, ma kluczowe znaczenie w identyfikacji celów edukacyjnych dla personelu medycznego i w strategii postępowania z chorymi.

Na podstawie badania reprezentatywnej próby z populacji chorych zidentyfikowano ich kluczowe problemy zdrowotne, a następnie poddano walidacji utworzone na tej podstawie pytania ankietowe i sformułowano swoisty kwestionariusz jakości życia dla chorych z wrodzonym obrzękiem naczynioruchowym (HAE-QoL) uwzględniający specyfikę schorzenia, zarówno bezpośrednio w aspekcie klinicznym, jak i społecznym i psychologicznym. Uzyskane wyniki wskazują, że wpływ wrodzonego obrzęku naczynioruchowego na życie chorych nie ogranicza się

---

<sup>7</sup> Porębski G, Czarnobilska E. Przegl Lek 2015 (wykaz publikacji II.B.2)

<sup>8</sup> Porębski G, Woron J i wsp. Alergol. Immunol. 2012 (wykaz publikacji II.B.8)

jedynie do dolegliwości związanych z epizodycznymi nawrotami objawów (uniemożliwienie wykonywania codziennych zajęć), ale ma charakter globalny i wielokierunkowy (np. ograniczenia zdolności do nawiązywania relacji społecznych, wpływ na decyzje o posiadaniu dzieci). Wyniki HAE-QoL wykazują znamienne różnice pomiędzy grupami pacjentów zależnie od ciężkości przebiegu schorzenia, wdrożonej profilaktyki przewlekłej i opieki psychologicznej.<sup>9</sup>

- Rekombinowany C1-inhibitor jest skuteczny w leczeniu ostrych napadów wrodzonego obrzęku naczynioruchowego

Przyczyną HAE jest niedobór lub upośledzona funkcja inhibitora składowej C1 układu dopełniacza. W 2004 roku zastosowano po raz pierwszy w Polsce terapię substytucyjną rekombinowanym C1-inhibitorem (rhC1-INH) do leczenia ciężkich napadów HAE. Lek wykazał skuteczność i był dobrze tolerowany.<sup>10</sup> Dalsze badania w większych grupach chorych potwierdziły wysoką skuteczność<sup>11</sup> i dobry profil bezpieczeństwa rhC1-INH, także przy kolejnych nawracających napadach obrzęków.<sup>12</sup>

- Opisy szczególnych sytuacji klinicznych

Unikalne doniesienia opisujące: (i) bezpieczne zastosowanie rhC1-INH do leczenia napadów obrzęku u kobiet w ciąży z powodu niedostępności standardowego leczenia<sup>13</sup>; (ii) przemijające objawy neurologiczne towarzyszące napadom obrzęku u chorych z HAE<sup>14</sup>; (iii) zespół przeciekania włóscinkowego w przebiegu chemioterapii leczony z powodzeniem substytucją C1-INH<sup>15</sup>; (iv) niską predykcję ujemną oznaczania poziomu składowej C4 układu dopełniacza w diagnostyce wrodzonego obrzęku naczynioruchowego.<sup>16</sup>

---

<sup>9</sup> Prior N, Remor E i wsp. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2016 (wykaz publikacji II.B.1)

<sup>10</sup> Porębski G, Bilo B i wsp. *Prz. Lek.* 2005 (wykaz publikacji II.B.28)

<sup>11</sup> Choi G, Soeters M i wsp. *Transfusion* 2007 (wykaz publikacji II.A.5)

<sup>12</sup> Li H, Moldovan D i wsp. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2015 (wykaz publikacji II.B.3)

<sup>13</sup> Stobiecki M, Porebski G i wsp. *Journal of Angioedema* (wykaz publikacji III.A.2)

<sup>14</sup> Porebski G, Pera J i wsp. *Journal of Angioedema* (wykaz publikacji III.A.3)

<sup>15</sup> Piatkowska-Jakubas B, Skotnicki AB i wsp. *4th C1 Inhibitor Deficiency Workshop 2005* (wykaz publikacji III.A.37)

<sup>16</sup> Porebski G, Bilo B i wsp. *Cent.-Eur. J. Immunol.* 2008 (wykaz publikacji III.B.6)

## INNE PRACE NAUKOWO-BADAWCZE:

- Zmiany wskaźników czynnościowych dróg oddechowych w teście nadreaktywności oskrzeli z metacholiną

U chorych z astmą skrzelową przy pomocy modelu regresji logistycznej wyznaczono najważniejsze czynniki predykcyjne wystąpienia nadreaktywności oskrzeli: wskaźnik spirometryczny "PEF minus MEF50" (przy prawidłowych wartościach natężonej pojemności życiowej wydechowej), czas trwania dolegliwości astmatycznych oraz liczba alergenów, dla których występują w surowicy swoiste IgE w klasie II i wyższych.

Ustalono, że za optymalny próg zmiany oporu dróg oddechowych (mierzonego metodą przerywanego przepływu) świadczący z wysoką czułością i swoistością o dodatnim wyniku testu metacholinowego należy przyjąć wartość 30%.

Stwierdzono, że podczas wziewnego testu prowokacyjnego z metacholiną znamienne spadki maksymalnych przepływów środkowo-wydechowych nie poprzedzają znamiennego spadku wartości FEV1, a zatem nie są dla niej wartościową alternatywą w monitorowaniu drożności oskrzeli w trakcie prowokacji.<sup>17</sup>

- Ekspozycja na spaliny samochodowe a częstość objawów alergicznych ze strony układu oddechowego.

Na podstawie badań kwestionariuszowych wykonanych na populacji siedmio- i szesnastolatków liczącej łącznie 8290 badanych, wykazano, że w obu grupach wiekowych dzieci mieszkające w bliższej odległości od drogi o dużym natężeniu ruchu mają znacznie zwiększoną częstość występowania objawów astmy oskrzelowej i alergicznego nieżyty nosa.<sup>18</sup>

- Test aktywacji bazofilów w diagnostyce alergii wziewnej

Porównano test aktywacji bazofilów z testem prowokacji donosowej i rutynowymi metodami diagnostycznymi. Opisano wykorzystanie testu aktywacji bazofilów w kwalifikacji do alergenowo-swoistej immunoterapii w wątpliwych diagnostycznie przypadkach klinicznych. Wykazano, że indeks stymulacji bazofilów nie zmniejsza się znamienne przez 24 godziny od pobrania krwi wykorzystywanej do badania, co ma istotne znaczenie praktyczne.<sup>19, 20</sup>

---

<sup>17</sup> Porębski G. *Alergol. Immunol.* 2004 (wykaz publikacji II.C.64)

<sup>18</sup> Porebski G, Woźniak M i wsp. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2014 (wykaz publikacji II.A.1)

<sup>19</sup> Leśniak M, Wojciech Dyga W i wsp. *Przegl Lek* 2015 (wykaz publikacji II.B.4)

<sup>20</sup> Czarnobilska E, Aleksandra Gregorius A i wsp. *Przegl Lek* 2012 (wykaz publikacji II.B.10)

## PODSUMOWANIE

Poza omówionym powyżej cyklem 5 publikacji, opublikowałem 27 prac oryginalnych pełnotekstowych (w tym 9 jako pierwszy autor), 27 prac poglądowych (13 jako pierwszy autor). Jestem współautorem 3 rozdziałów w monografiach, 3 listów do redakcji oraz 54 streszczeń ze zjazdów międzynarodowych (24 pierwszy autor) i 36 ze zjazdów krajowych (13 pierwszy autor). Sumaryczny Impact Factor publikacji (z dn. 1.02.2016) wynosi 30,061 (w tym IF=11,477 stanowią publikacje przedkładane jako osiągnięcie naukowe), prace były cytowane 140 razy (Web of Science Core Collection z dnia 29.01.2016), współczynnik Hirsha: 4.

Większość mojego dorobku naukowego dotyczy problematyki nadwrażliwości na leki i wrodzonego obrzęku naczynioruchowego. Uzyskanie grantu MNiSW umożliwiło mi odbycie 12-miesięcznego stażu podoktorskiego w wiodącym w dziedzinie alergii na leki ośrodku w Bernie w zespole prof. Pichlera<sup>21</sup>. Zapoznałem się w jego trakcie z laboratoryjnymi narzędziami badawczymi (przebieg stażu - zał. 9), co w połączeniu z praktyką lekarską zapewniło mi dużą samodzielność w realizacji swoich badań naukowych, począwszy od konstruowania projektów opartych o realną ocenę możliwości wykonawczych, poprzez rekrutację pacjentów, aż do wykonania eksperymentów *in vitro*. Wyniki swoich prac prezentowałem podczas referatów konferencyjnych w kraju<sup>22</sup> i za granicą<sup>23</sup>. Moja aktywność w dziedzinie alergii na leki została również doceniona poprzez zaproszenia do prowadzenia sesji tematycznych<sup>24</sup> i wygłoszenia wykładów<sup>25</sup> na konferencjach międzynarodowych.

Moje pierwsze wystąpienia dotyczące wrodzonego obrzęku naczynioruchowego miały miejsce na konferencji "C1-Inhibitor Deficiency Workshop", która jest największym spotkaniem poświęconym obrzękom bradykinino-zależnym, gromadzącym w Budapeszcie co

---

<sup>21</sup> Program "Wsparcie międzynarodowej mobilności naukowców" (III edycja), 2010

<sup>22</sup> Skin Allergy Meeting EAACI, Kraków 2014; (zał. 6. pkt. A.19, 20)

<sup>23</sup> ENDA Meeting, Madryt 2015; Joint Annual Meeting of the Swiss Society for Allergology and Immunology and the Swiss Respiratory Society, Berno 2013; 4.EuroBAT Meeting, Monachium 2010 (zał. 6. pkt. A.18, 21, 23)

<sup>24</sup> "Drug allergy and the skin" K. Brockow, G. Porebski, Skin Allergy Meeting EAACI, Krakow, 2014

<sup>25</sup> "Skin tests are useful in the diagnosis of drug allergy" pro-con session: Pro: G. Porebski, Con: C. Bindslev-Jensen; "The most severe drug hypersensitivity reactions in research and practice"; "Delayed drug hypersensitivity reactions: Distinct clinical features require distinct in vitro approaches" (zał. 6. pkt. A. 2-4)

dwa lata badaczy z całego świata. Wygłosiłem wówczas referaty prezentujące obserwacje i wyniki badań oryginalnych zespołu macierzystej jednostki<sup>26</sup>. Później wielokrotnie uczestniczyłem aktywnie w tych konferencjach, również jako prowadzący sesje plenaryjne<sup>27</sup> oraz wykładowca.<sup>28</sup> W 2005 roku we wspomnianej wyżej pracy opisałem, zastosowaną po raz pierwszy w Polsce, terapię innowacyjną napadów obrzęku rekombinowanym C-inhibitorem. Moje ostatnie aktywności poświęcone wrodzonemu obrzękowi naczynioruchowemu związane były z realizacją wieloletniego międzynarodowego projektu dotyczącego jakości życia chorych<sup>29</sup>, w którym odpowiadałem za polską część badań. Swoje doświadczenia związane z wrodzonym obrzękiem naczynioruchowym prezentowałem wielokrotnie w kraju i za granicą podczas wykładów i referatów.<sup>30</sup>

W ramach zajęć dydaktycznych na macierzystej uczelni prowadzę zajęcia dla studentów kierunku lekarskiego, lekarsko-dentystycznego, dietetyki, elektroradiologii na Wydziale Lekarskim i Wydziale Nauk o Zdrowiu. Ponadto prowadzę ćwiczenia, seminaria i wykłady dla studentów School of Medicine in English UJ. Opracowałem sylabusy modułów kształcenia i koordynuję zajęcia z pięciu prowadzonych w jednostce macierzystej kursów przedmiotowych.<sup>31</sup> Studenci prowadzonego przeze mnie Studenckiego Koła Naukowego zdobywali nagrody i wyróżnienia na międzynarodowych konferencjach studenckich<sup>32</sup>. W latach 2006-2009 w Krakowskiej Wyższej Szkole Promocji Zdrowia prowadziłem wykłady autorskie z alergologii oraz byłem promotorem siedemnastu i recenzentem trzynastu licencjackich prac dyplomowych. W ramach kształcenia podyplomowego prowadzę szkolenia doskonalące dla lekarzy w formie warsztatów i wykładów na konferencjach naukowo-szkoleniowych i zebraniach towarzystw naukowych, a także wykłady na kursach

---

<sup>26</sup> "The C4 serum level in Polish patients with hereditary angioedema", "Diagnostic and therapeutic problems in management of patients with HAE registered in Krakow/Poland", Budapeszt 2005 (zał. 6. pkt. A. 29, 30)

<sup>27</sup> "Management fine-tuned" J. Bernstein, G. Porebski, 2013; "Pregnancy, Quality of Life, Clinical Aspects" N. Prior, G. Porebski, U. Huffer, Budapeszt 2009 (zał. 6. pkt. B.2, 4)

<sup>28</sup> "Recombinant C1-inhibitor in real life", Budapeszt 2015

<sup>29</sup> "Development and Cross-cultural Validation of an International Specific Questionnaire (IHAE-QoL) for Assessment of Health Related Quality of Life in adult patients with Hereditary Angioedema due to C1 Inhibitor Deficiency" (zał. 6. pkt. D.5)

<sup>30</sup> Warszawa 2015, Łódź 2014, Bydgoszcz 2013, Wilno 2013, Kopenhaga 2012, Kraków 2009, Budapeszt 2009 i inne (zał. 6. A.5, 6-10, 13, 22, 24)

<sup>31</sup> "Dental Allergology", "Environmental Allergology", "Occupational Medicine", "Wybrane zagadnienia z alergologii", "Alergologia w stomatologii" (zał. 6, K.4)

<sup>32</sup> International Student's Conference of Medical Sciences, Krakow 2005, 2007, 2016 (zał. 6, F.7)

specjalizacyjnych z chorób wewnętrznych, alergologii i chirurgii stomatologicznej (zał. 6. K.1). Od 2003 roku prowadzę prelekcje i spotkania edukacyjne popularyzujące wiedzę medyczną wśród chorych z wrodzonym obrzękiem naczynioruchowym i pyłkowicą (zał. 6. K.6-7). Wykonywałem ekspertyzy, recenzje projektów i opracowania na zamówienie dla agencji rządowych i innych podmiotów<sup>33</sup>. Recenzowałem publikacje w czasopismach krajowych i międzynarodowych z bazy Journal Citation Reports. Brałem również udział w pracach międzynarodowych zespołów eksperckich i konkursowych<sup>34</sup>. Aktywnie uczestniczę w pracach sieci badawczych i specjalistycznych grup zainteresowań przy towarzystwach naukowych, których jestem członkiem.<sup>35</sup>



---

<sup>33</sup> Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, Agencja Oceny Technologii Medycznych i Taryfikacji, Centrum Egzaminów Medycznych w Łodzi i inne (zał. 6. O.1-6, R.1-3)

<sup>34</sup> Juror w konkursie "Grant for Young Investigators" podczas "9th C1-Inhibitor Deficiency Workshop" Budapeszt 2015; członek grupy roboczej "Education and training of Patient Organizations on all aspects of drug and therapy development" w ramach warsztatów projektu "Patient Partner" (7. Program Ramowy Unii Europejskiej), Bruksela 2009; uczestnik "Key Opinion Leader Meeting" nt. "Recombinant human C1 inhibitor for the treatment of acute attacks in patients with HAE", Lejda 2007 (zał. 6. P.1-3)

<sup>35</sup> ENDA (European Network of Drug Allergy) EAACI, HAWK (Hereditary Angioedema International Working Group), sekcje Nadwrażliwości na leki i Wrodzonego obrzęku naczynioruchowego PTA (zał. 6. J.1-4, H.1-3)