УДК: 616-002.5:615.065:612.017.3:616.079.3

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ НЕПЕРЕНОСИМОСТИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЛИМФОЦИТОВ РЕКОМБИНАНТНЫМ ИНТЕРЛЕЙКИНОМ-2

М.М. Авербах, Г.А. Космиади, В.Я. Гергерт, Л.В. Панова
ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва

Цель. *Изучение возможности усиления активности ответа лимфоцитов периферической крови больных с явлениями непереносимости противотуберкулезных препаратов (ПТП) при добавлении в культуру рекомбинантного интерлейкина 2 (ИЛ-2) человека.*

Материал и методы. *Исследовали иммунный ответ лимфоцитов на ПТП первого ряда у 7 больных с клиническими признаками непереносимости ПТП и 13 больных без клинических и лабораторных признаков непереносимости. Определяли содержание иммунных к ПТП лимфоцитов в крови, для чего применяли тест бласттрансформации в культуре лимфоцитов in vitro. Для повышения достоверности учета бласттрансформации пролиферативную активность усиливали с помощью рекомбинантного ИЛ-2 человека.*

Результаты. *Показано, что добавление ИЛ-2 в контрольные культуры без ПТП слабо влияло на содержание бластов. Бластообразование лимфоцитов больных контрольной группы усиливалось в 1,5–2 раза, однако индекс стимуляции никогда не превышал 2. Добавление ИЛ-2 в культуры лимфоцитов больных с гепатотоксическими реакциями вызывало увеличение содержания бластов до 4,5–5%, причем у разных больных ответ мог увеличиваться на один и более ПТП одновременно. В трех случаях наблюдали повышенный ответ на разные комбинации ПТП, применявшихся у больных: R+Z+E, H+R+E или R+Z+H. Заключение: примененный метод позволяет выявить иммунный ответ лимфоцитов на ПТП у больных с гепатотоксическими реакциями.*

Ключевые слова: *туберкулез, противотуберкулезные препараты, нежелательные реакции, тест бласттрансформации лимфоцитов*

Для цитирования: Авербах М.М., Космиади Г.А., Гергерт В.Я., Панова Л.В. Модифицированный метод иммунологической диагностики непереносимости противотуберкулезных препаратов с использованием дополнительной стимуляции культивируемых лимфоцитов рекомбинантным интерлейкином-2 // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2024. – Т. 12, № 1. – С. 25–29. http://doi.org/10.54921/2413-0346-2024-12-1-25-29

A MODIFIED METHOD OF IMMUNOLOGICAL DIAGNOSIS OF INTOLERANCE TO ANTI-TUBERCULOSIS DRUGS USING ADDITIONAL STIMULATION OF CULTURED LYMPHOCYTES WITH RECOMBINANT INTERLEUKIN-2

M.M. Averbakh, G.A. Kosmiadi, V.Ya. Gergert., L.V. Panova
Federal State Budgetary Scientific Institution «Central Tuberculosis Research Institute», Moscow, Russian Federation

This study is aimed to enhance the immune response to anti-TB drugs (anti-TBD) in vitro of circulating blood lymphocytes from patients with adverse reactions.

Methods. *The immune response of lymphocytes to first-line anti-TBD was studied in 7 patients with hepatotoxic reactions (test group) and 13 patients without reactions (control group). The modified blast transformation test was used in a culture of lymphocytes in vitro; proliferative activity was increased using recombinant IL-2.*

Results. *The addition of IL-2 to control cultures with no anti-TBD had almost no effect on the blastogenic response of lymphocytes while the response to anti-TBD was increased 1,5–2 times. However, the stimulation index never exceeded 2. The addition of IL-2 to lymphocyte cultures of patients with hepatotoxic reactions caused an increase in the content of blasts to 4.5–5%. Different patients showed immune response simultaneously to 1 or more anti-TBD. In 3 cases the lymphocytes reacted to 3 drug combinations: R+Z+E, H+R+E and R+Z+H.*

Conclusion. *The modified blast transformation test is useful to identify the immune response of lymphocytes to anti-TBD in patients with hepatotoxic reactions.*

Key words: *tuberculosis, antituberculosis drugs, adverse reactions, lymphocytes blast transformation test.*

For citation: Averbakh M.M., Kosmiadi G.A., Gergert V.Ya., Panova L.V. A modified method of immunological diagnosis of intolerance to anti-tuberculosis drugs using additional stimulation of cultured lymphocytes with recombinant interleukin-2. *Tuberculosis and socially significant diseases*, 2024, vol. 12, no. 1, pp. 25–29. (In Russ.) http://doi.org/10.54921/2413-0346-2024-12-1-25-29

Введение

Клинические признаки непереносимости противотуберкулезных препаратов (ПТП) встречаются у 6–20% больных, и степень их выраженности обусловлена как индивидуальными особенностями реагирования иммунной системы на химическую структуру того или иного препарата, так и наличием сопутствующей патологии со стороны печени, почек, желудочно-кишечного тракта и сопутствующих вирусных инфекций [7]. К настоящему моменту оценку непереносимости ПТП с помощью иммунологических методов преимущественно исследовали в отношении изониазида, рифампицина, рифампина, этамбутола и пиразинамида.

Основным и наиболее доступным методом *in vitro* диагностики непереносимости больными противотуберкулезных препаратов являлась реакция бласттрансформации лимфоцитов, которая применяется в России с 1984 г. [2]. Пролиферативный ответ лимфоцитов, культивируемых с лекарственными препаратами в течение трех суток, оценивался цитологически по подсчету бластных форм лимфоцитов при окраске мазков азур-2-эозином.

Учет пролиферативной активности лимфоцитов зарубежными исследователями проводился по включению H3 тимидина в ДНК клеток. Результаты теста выражались в виде индекса стимуляции (включение метки в лимфоциты, с добавлением лекарства / включение метки в лимфоциты без лекарства). На основании многочисленных исследований установлено, что значимым является индекс 2 и более [6]. Поскольку предполагается, что число лимфоцитов, способных реагировать пролиферацией в ответ на лекарственные вещества, невелико по сравнению со стимуляцией митогенами или другими поликлональными стимулами (например, анти-CD3 антитела), срок культивирования клеток увеличивали до 5–6 суток [8].

В 1988 г. Rosenberg S.A. и соавт. [9] применили ИЛ-2 для стимуляции размножения *in vitro* лимфоцитов, выделенных из опухоли (меланомы). В последнее десятилетие в иммунотерапии различных онкологических заболеваний используется метод клеточной иммунотерапии на основе культивируемых *in vitro* цитотоксических лимфоцитов, дендритных клеток или мононуклеарных клеток периферической крови [3, 5]. Одним из современных подходов к лечению пациентов со злокачественными новообразованиями является метод активации и длительного размножения мононуклеаров периферической крови онкологических больных с использованием цитокинов IL-2 и IL-15 [1].

Поскольку противотуберкулезные препараты по химической структуре являются гаптенами (и в связи с этим слабыми стимулами пролиферации сенсибилизированных к ним лимфоцитов), дополнительное добавление в культуры клеток активированных ПТП интерлейкинов может стимулировать пролиферативный ответ.

Цель исследования

Изучение возможности усиления активности ответа лимфоцитов периферической крови больных с явлениями непереносимости ПТП при добавлении в культуру рекомбинантного ИЛ-2 человека.

Материалы и методы

В исследование были включены 20 больных туберкулезом органов дыхания в возрасте 14–17 лет. Структура клинических форм: инфильтративный туберкулез – 10 случаев, первичный туберкулезный комплекс – 2, туберкулез внутригрудных лимфатических узлов (ТВГЛУ) – 4, туберкулема – 1, казеозная пневмония – 1 и эмпиема плевры – 2 случая. Химиотерапия назначалась по индивидуальным режимам, с учетом теста на лекарственную чувствительность МБТ, сопутствующих заболеваний, и корректировалась в зависимости от наличия данных о непереносимости в анамнезе или в период нахождения в отделении.

Сформированы две группы наблюдения: 13 пациентов (контрольная группа) не имели лабораторных признаков непереносимости ПТП после 4-недельного курса химиотерапии, и 7 человек (основная группа) – с гепатотоксическими реакциями. При развитии гепатотоксической реакции оценивали уровни АЛТ (норма 31 Е/л) и АСТ (норма 31 Е/л). У пациентов основной группы отмечено увеличение показателей АЛТ и АСТ в 3–10 раз по сравнению с нормой. У трех пациентов этой группы иммунологический анализ на непереносимость ПТП был взят в динамике через 3 месяца после первого тестирования. При этом у данных пациентов было отмечено снижение показателей АЛТ и АСТ до нормальных показателей.

Непереносимость ПТП изучалась для изониазида (H) (Isoniazid (Sigma-Aldrich I3377), этамбутола (E) (Ethambutol dihydrochloride (Sigma-Aldrich E4630), пиразинамида (Z) (Pyrazinecarboxamide (Sigma-Aldrich P7136), которые растворяли в стерильной дистиллированной воде до концентрации 1000 мкг/мл и использовали как сток-растворы. Рифампицин (R) (Rifampicin (Sigma-Aldrich R3501) первоначально растворяли в 5 мл этилового спирта 96%, а затем разбавляли

Таблица 1. Показатели бластообразования в культуре лимфоцитов крови контрольной группы
Table 1. Indicators of blastogenesis in the blood lymphocyte culture of the control group

Группы исследования Research groups	Спонтанное и ПТП стимулированное бластообразование Spontaneous and ATD stimulated blastogenesis	ИЛ-2 усиленное бластообразование IL-2 enhanced blast formation	P R
Лимфоциты • Lymphocytes	0,92 ± 0,13	2,14 ± 0,55	0,008
Лимфоциты + R • Lymphocytes + R	1,14 ± 0,12	2,1 ± 0,62	0,472
Лимфоциты + Z • Lymphocytes + Z	1,28 ± 0,14	2,1 ± 0,62	0,004
Лимфоциты + H • Lymphocytes + H	1,05 ± 0,19	2,35 ± 0,37	0,003
Лимфоциты + E • Lymphocytes + E	1,53 ± 0,07	2,71 ± 0,41	0,03

ПТП – противотуберкулезные препараты
ATD – anti-tuberculosis drugs

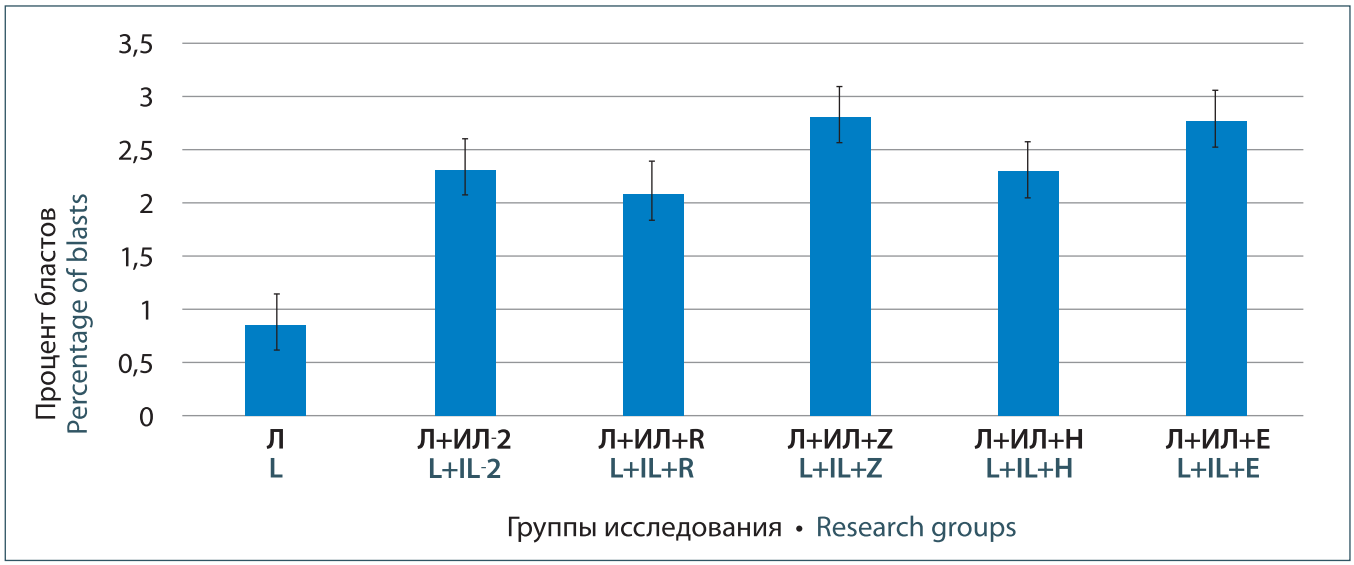

Рисунок 1. Реакция бласттрансформации лимфоцитов крови больных без признаков непереносимости ПТП
Figure 1. The reaction of blast transformation of blood lymphocytes in patients without signs of PTP intolerance

до концентрации 1000 мкг/мл в стерильной дистиллированной воде.

Мононуклеарные клетки периферической крови были изолированы из гепаринизированной крови с помощью Ficoll-Paque™ Premium (плотность 1,007±0,001 г/мл). После трехкратного отмывания в растворе Хенкса клетки ресуспензировали в концентрации 1х106 /мл в среде RPMI 1640 (ПанЭКо, Россия), обогащенной 10% инактивированной эмбриональной телячьей сывороткой (FCS), 2 ммоль L-глютамина (Gibco), 0,1 Моль 2-ME, 1% незаменимых аминокислот и гентамицином (50 мкг/мл). Выделенные клетки помещали в лунки 96-луночного культурального планшета (Costar). Лекарственные средства добавляли в дозах, соответствующих двухкратной концентрации лекарств, имеющихся в крови больных после приема терапевтической дозы (см. справочное руководство РЛС-Доктор). Контрольные образцы инкубировали без добавления лекарств. Рекомбинантный ИЛ-2 (Sci-store, Россия) человека в дозе 500 пг/лунка добавляли на вторые сутки культивирования. Клетки инкубировали 4 дня при 37 °C в инкубаторе с содержанием в атмосфере 5% CO_2. По истечении срока инкубации готовили цитологические препараты, которые фиксировали раствором эозин-метиленовый синий по Май-Грюнвальду и окрашивали раствором азур-эозина по Романовскому. Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета Microsoft Excel 10.0. Для параметрических количественных данных определяли среднее арифметическое значение (M) и ошибку средней арифметической величины (m). При сравнении совокупностей по количественным признакам (параметрический анализ) использовали t-критерий Стьюдента для несвязанных совокупностей. Статистически значимыми считались различия при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Исследование показателей бластообразования (процента бластов) у больных контрольной группы выявило, что спонтанная и ИЛ-2-стимулированная продукция достоверно не различались между собой, и индекс стимуляции не превышал двухкратного показателя (табл. 1, рис. 1). Добавление лекарственных препаратов к культурам клеток также не вызывало стимуляции пролиферации. Добавление в культуру клеток

Таблица 2. Показатели бластообразования в культуре лимфоцитов крови в группе с непереносимостью противотуберкулезных препаратов
Table 2. Indicators of blastogenesis in the culture of blood lymphocytes in the group with intolerance to anti-tuberculosis drugs

Группы исследования Research groups	Спонтанное и ПТП стимулированное бластообразование Spontaneous and ATD stimulated blastogenesis	ПТП + ИЛ-2 усиленное бластообразование ATD + IL-2 enhanced blast formation	P R
Лимфоциты • Lymphocytes	0,85 ± 0,09	2,06 ± 0,16	0,04
Лимфоциты + R • Lymphocytes + R	1,35 ± 0,172	3,25 ± 0,29	0,002
Лимфоциты + Z • Lymphocytes + Z	1,1 ± 0,17	4,13 ± 1,03	0,006
Лимфоциты + H • Lymphocytes + H	1,9 ± 0,25	3,87 ± 0,91	0,032
Лимфоциты + E • Lymphocytes + E	1,76 ± 0,27	3,63 ± 0,61	0,008

ПТП – противотуберкулезные препараты
ATD – anti-tuberculosis drugs

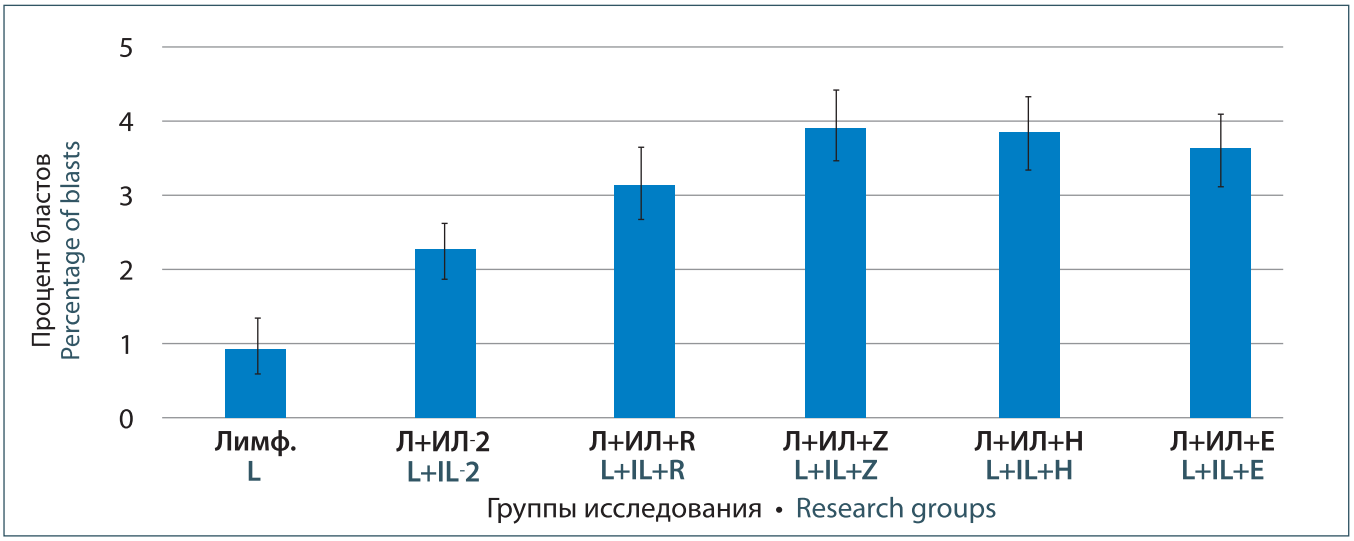

Рисунок 2. Реакция бластрансформации лимфоцитов крови у больных с гепатотоксическои реакцией
Figure 2. Blood lymphocyte blast transformation reaction in patients with hepatotoxic reaction

лекарственных препаратов и ИЛ-2 достоверно увеличивало показатели в комбинации с пиразинамидом и изониазидом, но не влияло на пролиферативную активность клеток в комбинациях с рифампицином и этамбутолом.

Исследование показателей бластообразования у больных с гепатотоксическими реакциями показало, что спонтанное бластообразование не превышало 1,5%, а ИЛ-2 стимулированная продукция бластных форм клеток без добавления ПТП составила 1,5–2% (табл. 2, рис. 2). Культивирование клеток с добавлением только рифампицина не вызывало увеличение бластообразования выше 1–1,5%. Добавление в культуру рифампицина в комбинации с ИЛ-2 достоверно увеличивало процент бластных клеток, и только в двух случаях этот процент не превышал показателя 2%, а в остальных случаях составлял 3,5–5%. Повышенный ответ был отмечен еще на один какой-либо из исследованных препаратов. Комбинация пиразинамида и ИЛ-2 лишь в двух случаях не приводила к увеличению бластов больше 2%; в остальных наблюдениях их процент возрастал до 3,5 и более, причем у одного больного он достиг 13,5%. В трех случаях отмечено одновременное повышение бластов на пиразинамид и изониазид. При добавлении в культуру изониазида процент бластов только в двух случаях превысил показатель 2%, тогда как комбинация ПТП с ИЛ-2 увеличивала процент бластных клеток в 5 случаях до 4,5–5%; в одном случае он достиг 10,5%. При добавлении в культуру этамбутола процент бластов в четырех случаях превысил показатель 2%, тогда как при комбинации ПТП с ИЛ-2 у четырех больных этот процент превысил показатель 5%, причем повышенный ответ сочетался с таковым на изониазид или этамбутол. Кроме того, в трех наблюдениях отмечена одновременная реакция лимфоцитов крови на комбинации из трех препаратов (R+Z+E; R+H+E; R+Z+H).

Заключение

Модифицированный метод постановки реакции бласттрансформации лимфоцитов с использованием дополнительного стимула в виде рекомбинатного ИЛ-2 человека позволяет повысить показатель бластообразования культивируемых клеток больных, имеющих клинические признаки непереносимости ПТП в виде гепатотоксических реакций. При этом процент бластообразования на исследованные ПТП лишь в двух случаях из 10 соответствовал таковому при добавлении в культуру

только ПТП (2%), в остальных превышал этот показатель. Метод также позволяет выявлять сочетанную реакцию лимфоцитов крови больных на двух-трехкомпонентные комбинации ПТП. Наиболее высокий процент бластов в комбинации ПТП+ИЛ-2 выявлен на рифампицин, пиразинамид и этамбутол, но не на изониазид. Ранее зарубежными исследователями также были отмечены различия в уровне пролиферации на указанные препараты, но при этом наиболее низким воздействием на культуры лимфоцитов обладал пиразинамид [10, 11]. Дополнительная стимуляция культур клеток больных в комбинации ПТП+ИЛ-2 достаточно перспективна, поскольку большинство лекарственных средств являются гаптенами, имеющими простые химические формулы и низкую молекулярную массу (около 1000 Da), поэтому сами по себе вызывают слабый иммунный ответ [4], а применение цитокина ИЛ-2 его усиливает, что уточняет результаты данного теста.

Литература

1. *Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Неприна Г.С. Эффективность совместного применения IL-2 и IL-15 для активации цитотоксических лимфоцитов in vitro // Гены & клетки. – 2015. – Т. 10. – № 2. – С. 78-85.*
2. *Дубровская Н.А. Клинико-иммунологические проявления побочного действия рифампицина при лечении больных туберкулезом: Дисс. … канд. мед. наук. – М., 1984.*
3. *Курилин В.В., Хантакова Ю.Н., Облеухова И.А. Шевченко Ю.А., Куликова Е.В., Якушенко В.К., Соколов А.В., Сенников Ю.А. Стимуляция дендритными клетками in vitro противоопухолевой цитотоксической активности мононуклеарных клеток больных колоректальным раком // Мед. иммунология. – 2013. – Т. 15. – № 3. – С. 235-246.*
4. *Маслаускене Т.П., Николаева С.В. Побочное действие противотуберкулезных препаратов // Сибирский мед. журн. – 2005. – Т. 25. – С. 13-19.*
5. *Новиков П.Д., Новиков Д.К. Клиническая иммунопатология. – М., 2009. – 464 с.*
6. *Cheng M., Chen Y., Xiao W. et al. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases // Cell. Mol. Immunol. – 2013. – Vol. 3. – № 10. – P. 1-23.*
7. *Lochmatter P., Zawodniak A., Pichler W.J. In vitro tests in drug hypersensitivity diagnosis // Immunol. Allergy Clin. N. Am. – 2009. – Vol. 29. – P. 537-554. doi:10.1016/j.iac.2009.04.009*
8. *Pichler W.J., Tilch J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity // Allergy. – 2004. – Vol. 59. - P. 809-820.*
9. *Rosenberg S.A., Packard B.S., Aebersold P.M., Solomon D., Topalian S.L., Toy S.T., Simon P., Lotze M.T., Yang J.C., Seipp C..A. et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report // N. Engl. J. Med. – 1988. – Vol. 319. – P. 1676-1680. doi: 10.1056/NEJM198812223192527*
10. *Suzuki Y., Miwa S., Shirai M., Ohba H., Murakami M., Fujita K., Suda T., Nakamura H., Hayakawa H., Chida K. Drug lymphocyte stimulation test in the diagnosis of adverse reactions to antituberculosis drugs // Chest. – 2008. – Vol. 134. – P.1027-1032. doi: 10.1378/chest.07-3088*
11. *Umeki S. Adverse effects of antitubercular drugs and significance of measurement of the drug-stimulating lymphocyte transformation rat // Jpn. J. Med. – 1989. – Vol. 28. – № 3. – P. 335-340. doi: 10.2169/internalmedicine1962.28.335*

Об авторах

Авербах Михаил Михайлович *– главный научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», доктор медицинских наук, профессор*
Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2
Тел. +7 (499) 785-90-72
e-mail: amm50@mail.ru

Космиади Георгий Александрович *– старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», кандидат биологических наук*
Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2
Тел. +7 (499) 785-90-72
e-mail: kosmiadi@mail.ru

Гергерт Владислав Яковлевич *– главный научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», доктор медицинских наук, профессор*
Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2
Тел. +7 (499) 785-90-72
e-mail: hergertv@mail.ru

Панова Людмила Владимировна *– ведущий научный сотрудник детско-подросткового отдела ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», доктор медицинских наук*
Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2
Тел. +7 (499) 785-90-05
e-mail: amm50@mail.ru