

ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИОННОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ GSTM1 И NAT2 НА ПРОГНОЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА

¹Тодорико Л. Д., ¹Семянив И. А., ²Кужко М. М.

¹Буковинский государственный медицинский университет, Черновцы, Украина

²Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии
им. Ф. Г. Яновского АМН Украины, Киев, Украина

Цель исследования. Влияние полиморфизма генов глутатион-S-трансферазы классов M1 и NAT2 на эффективность лечения чувствительного туберкулеза (ТБ).

Материал и методы. Полиморфизм генов системы детоксикации ксенобиотиков определялся с применением полимеразной цепной реакции.

Результаты. Наличие делеции функциональной зоны полиморфного участка гена GSTM1 увеличивает риск низкой эффективности лечения пациентов с туберкулезом и имеет более низкие шансы на рассасывание очагово-инфильтративных изменений в легких, сопровождается низкой вероятностью прекращения бактериовыделения [OR=0,07, p=0,002]. 0-генотип гена GSTM1 является предиктором относительно возникновения впервые диагностированного туберкулеза (ВДТБ).

Выводы. 0-генотип гена GSTM1 является предиктором относительно возникновения туберкулеза. Наличие делеции функциональной зоны полиморфного участка гена GSTM1 увеличивает риск низкой эффективности лечения туберкулеза, самые низкие шансы на рассасывание очагово-инфильтративных изменений в легких, сопровождается низкой вероятностью раннего прекращения бактериовыделения. Процессы деструкции при туберкулезе наблюдались в 51,5% «быстрых ацетиляторов» и 39,6% – «медленных».

Ключевые слова: туберкулез, ген глутатионтрансферазы, ацетилтрансфераза, прогноз.

Для цитирования: Тодорико, Л. Д. Влияние делеционного полиморфизма генов GSTM1 и NAT2 на прогноз эффективности лечения чувствительного туберкулеза / Л. Д. Тодорико, И. А. Семянив, М. М. Кужко // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2019. Т. 17, № 5. С. 518-522. <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2019-17-5-518-522>

Введение

На сегодняшний день недостаточно данных об ассоциации делеционного полиморфизма генов детоксикации и антиоксидантной защиты GSTM1 с частотой распространенности туберкулеза легких [1, 2]. Требуют изучения генетические молекулярные предикторы прогноза эффективности лечения, динамики клинических и рентгенологических признаков с целью оптимизации комплексного лечения ТБ [3].

Результатами ряда исследований доказано, что полиморфизм гена N-ацетилтрансферазы 2 (NAT2) определяет скорость инактивации противотуберкулезного препарата изониазида [4].

Цель исследования заключалась в комплексной оценке роли определения типа ацетиляторов согласно генотипу N-ацетилтрансферазы 2 и влияния полиморфизма генов глутатион-S-трансферазы класса M1 на эффективность лечения туберкулеза.

Материал и методы

В основу клинического исследования положено комплексное обследование и наблюдение пациентов, которые находились на стационарном лечении в областном противотуберкулезном диспансере г. Черновцы (81 чел.), у которых впервые диагностирован туберкулез легких (ВДТБ) и которые не выделяли мультирезистентных штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ). Отбор участников исследования проводили методом «поперечного среза» без возраст-

ных или половых ограничений. Дизайн исследования соответствовал открытому сравнительному рандомизированному наблюдению.

Критерии включения в исследование: пациенты с ВДТБ с сохраненной чувствительностью; наличие МБТ в мокроте (по мазкам и посеву на твердых и жидких (ВАСТЕС) питательных средах).

У 91,1% обследованных пациентов туберкулезный процесс характеризовался наличием полости распада, массивными диссеминациями очагов, инфильтративными и пневмосклеротическими изменениями в обоих легких; выраженными бронхолегочными жалобами и интоксикационным синдромом (кашель, одышка, фебрильная температура, увеличение количества лейкоцитов и нейтрофилов, СОЭ). У 15% туберкулезный процесс не выходил за пределы одной или двух долей с наличием полостей распада, был умеренно выраженный интоксикационный синдром. У большинства пациентов показатели периферической крови были незначительно изменены или без веских изменений.

Определение полиморфизма генов системы детоксикации ксенобиотиков, в частности GSTM1, проводилось с использованием набора реагентов «АмплиСенс® GSTM1-EPH», который предназначен для выявления делеционных полиморфизмов в генах глутатион-S-трансферазы GSTM1 человека с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) на базе центральной научно-исследовательской лаборатории ВГУЗ

Украины «Буковинский государственный медицинский университет».

Генотип ацетилирования определялся путем аллель-специфической амплификации NAT2 аллелей с ПЦР. Были использованы специфические праймеры для дикого (wt) и мутантного аллелей M1, M2 и M3. Таким образом, был исследован NAT2 полиморфизм C>T 481 NAT2 * 5A, G>A 590 NAT2 * 6A, G>A 857 NAT2 * 7A/B M3.

Для сбора анкетных, эпидемиологических данных и данных об особенностях заболевания каждого пациента была заполнена анкета в начале и после завершения стационарного лечения.

Научная работа проведена с учетом основных Правил этических принципов проведения научных медицинских исследований с участием человека, утвержденных Хельсинкской декларацией (1964-2013 гг.), ICH GCP (1996 г.), Директивы ЕЭС № 609 (от 24.11.1986 г.) с положительным заключением комиссии по биоэтике ВГУЗ Украины «Буковинский государственный медицинский университет» (протокол № 4 от 23.04.2019 г.).

Исследование предусматривало соблюдение концепции информированного согласия пациента, оценки риска вреда и пользы, принципа конфиденциальности и уважения к личности пациентов, выступающих объектом медицинского исследования. Работа выполнена за средства государственного бюджета (№ госрегистрации 0114U002473).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного пакета «Statistica 13» (версия 10.0.228.8 (StatSoft, Inc.)).

Результаты и обсуждение

Несмотря на то, что активность фермента глутатион-S-трансферазы класса M кодируется пятью генами GST класса M (M1-M5), доминантной причиной генетически обусловленной дисрегуляции антиоксидантной активности является делеционный (нулевой) полиморфизм гена GSTM1 [5].

Отсутствие существенной рентгенологической динамики на фоне противотуберкулезной терапии у пациентов с ТБ легких ассоциирует с

большой частотой делеционного генотипа у обследованных (в 2 раза, ($\chi^2=4,0$; $p=0,045$)). Зато среди пациентов с хорошим эффектом лечения, проявляющимся положительной динамикой рентгенологической картины за счет частичного рассасывания очагово-инфильтративных изменений в легких и/или заживления полости распада, наоборот, превалировали лица с функциональным аллелем гена GSTM1, соответственно, в 8 и 8,67 раза ($p<0,001$).

Установлено, что среди пациентов с полным рассасыванием очагово-инфильтративных изменений в легких на фоне стандартной химиотерапии были исключительно лица с отсутствием неблагоприятной гомозиготной делеции. Следовательно, отсутствие 0-генотипа в картированном участке гена GSTM1 ассоциирует с хорошей положительной рентгенологической динамикой под влиянием лечения (частичная или полная элиминация очагово-инфильтративных изменений и заживления полости распада) – в 1,67-5,33 раза ($p\leq 0,003-0,001$), а наличие 0-генотипа характеризуется частым преобладанием лиц, которые недостаточно отвечали на лечение (по данным рентгенологического исследования), соответственно, в 3 и 4 раза ($p<0,001$), или даже давали картину негативной Ro-динамики ($n=3$): 66,67% против 33,33% у владельцев функционального аллеля.

Анализ гетерозиготности нулевого полиморфизма гена GSTM1 с учетом эффективности лечения ТБ легких, по данным Ro-динамики, показал вероятный дефицит гетерозиготности у лиц без веских Ro-изменений ($F=0,55$, $p=0,008$), с ее избытком у пациентов с Ro-картиной полного рассасывания очагово-инфильтративных очагов ($F=0,33$, $p=0,012$), что в целом нивелировалось нормальным аллельным распределением у остальных пациентов и сохраняло аллельное равновесие Hardy-Weinberg в обследованной популяции.

Эффективность лечения ТБ легких по основному эпидемиологическому показателю – прекращению бактериовыделения – с учетом аллельного состояния гена GSTM1 приведена в таблице 1.

Таблица 1. – Эффективность лечения пациентов с туберкулезом легких в зависимости от нулевого генотипа гена GSTM1

Table 1. – The effectiveness of the treatment of patients with pulmonary tuberculosis, depending on the 0-genotype of the GSTM1 gene

Прекращение бактериовыделения под действием лечения (n=81)	Отсутствие 0-генотипа, (%)	0-генотип, (%)	ОШ [95% ДИ]	χ^2 p
Прекращение бактериовыделения на 60-й дозе (+++), n=46 (%)	45 (96,15)	1 (3,85)	-	$\chi^2=44,31$ $p<0,001$
Прекращение бактериовыделения на 90-й дозе (для ВДТБ), n=26 (%)	14 (53,8)	12 (46,2)	22,6 [7,68-66,3]	$\chi^2=39,13$ $p<0,001$
Неэффективное лечение, n=9 (%)	3 (33,33)	6 (66,67)	0,10 [0,02-0,46]	$p=0,003$

Примечание: ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал; p – вероятность разницы показателей

Отсутствие делеции в области хромосомы 1p13.3 анализируемого гена протяженностью 10000 п.н. ассоциирует с прекращением бактериовыделения на 60-й дозе у 57% от всех обследуемых и составляет 96,15% у пациентов с 0-генотипом ($p < 0,001$).

Частота прекращения бактериовыделения на 90-й дозе при лечении ВДТБ составляла 32,1% и не имела столь выраженной зависимости от имеющейся/отсутствующей делеции в картированном участке хромосомы гена GSTM1 (53,8% против 46,2%) ($\chi^2=1,20$, $p>0,05$). Однако неэффективное лечение в 11,1% случаев ассоциировало с большей частотой 0-генотипа: 6 (66,67%) против 3 (33,33%) ($p=0,003$) (табл. 1).

Присутствие гомозиготной делеции функциональной зоны гена GSTM1 увеличивает риск низкой эффективности лечения ТБ легких (при отсутствии Ro-динамики или при негативной Ro-динамике) в 1,85 раза [OR=3,55, $p=0,035$] и низких шансов на частичное [OR=0,22, $p=0,018$] и полное рассасывание очагово-инфильтративных изменений в легких или заживления полости распада после проведенной терапии [OR=0,15, $p=0,004$]. При отсутствии мутации гена GSTM1, на оборот, достоверно возрастает вероятность положительной Ro-динамики с рассасыванием (полным/частичным) очагово-инфильтративных изменений, или заживлением полости распада в 1,39 и 1,44 раза [OR=4,50, $p=0,009$ и OR=6,75, $p=0,002$, соответственно] при низких шансах на негативную Ro-динамику лечения [OR=0,28, $p=0,018$].

Кроме того, имеются высокие шансы добиться прекращения бактериовыделения уже на 60-й дозе при отсутствующей мутации – 14,06 [95% CI=1,76-65,6, $p=0,005$], тогда как наличие 0-генотипа гена GSTM1 делает шансы на прекращение бактериовыделения на 60-й, 90-й дозах (для ВДТБ) самыми низкими в обследованной популяции [OR=0,07, $p=0,002$ и OR=0,37, $p=0,04$].

В начале стационарного лечения процессы деструкции наблюдались у 51,5% «быстрых ацетиляторов» (БА) и 39,6% – «медленных ацетиляторов» (МА). Согласно клинической форме, диссеминация туберкулезного процесса наблюдалась более чем в 3 раза чаще у БА по сравнению с МА ($p<0,05$; $\chi^2=3,94$ при критическом значении здесь и далее 3,84) (рисунок). В 22,0% МА туберкулезный процесс

носил очаговый характер, тогда как среди БА в начале лечения он не выявлялся вообще ($p<0,05$; $\chi^2=4,94$).

Независимо от генотипа ацетилирования бактериовыделение отмечалось в 48,0% от всех случаев (по данным микроскопии) и в 81,1% – от всех случаев (по данным жидкостного культурального метода ВАСТЕС). Согласно тесту медианентозной чувствительности, у всех обследованных, которые вошли в исследовательскую выборку, в начале лечения чувствительность была сохранена.

Таким образом, в начале лечения пациенты с генотипом БА имели тенденцию к более тяжелому и генерализованному течению ТБ легких. Продолжительность стационарного лечения достоверно не различалась между разными типами ацетилирования и составила $95,73 \pm 4,13$ дня для БА ацетиляторов и $92,43 \pm 3,89$ дня – для МА.

В конце стационарного лечения процессы деструкции сохранились у четверти пациентов независимо от генотипа ацетилирования. Среди БА процессы деструкции наблюдались в 1,9 раза реже, чем в начале лечения ($p<0,05$; $\chi^2=4,06$) среди МА – в 1,6 раза ($p>0,05$). Исчезновение процессов деструкции имело место в 47,1% «быстрых» и 38,1% «медленных ацетиляторов» (табл. 2). При этом прекращение процессов деструкции в БА заняло в 1,3 раза больше времени, чем в МА ($P<0,05$; СИ=2,44 ... 31,64).

В начале и в конце стационарного лечения диссеминированный туберкулез легких наблюдался в 4 раза чаще у «быстрых ацетиляторов», чем у «медленных ацетиляторов» ($p<0,05$; $\chi^2=6,40$) (рисунок). В то же время среди МА на 22,0% чаще выявлялся очаговый туберкулез по сравнению с группой «быстрых ацетиляторов», где последний отсутствовал вообще ($p<0,05$;

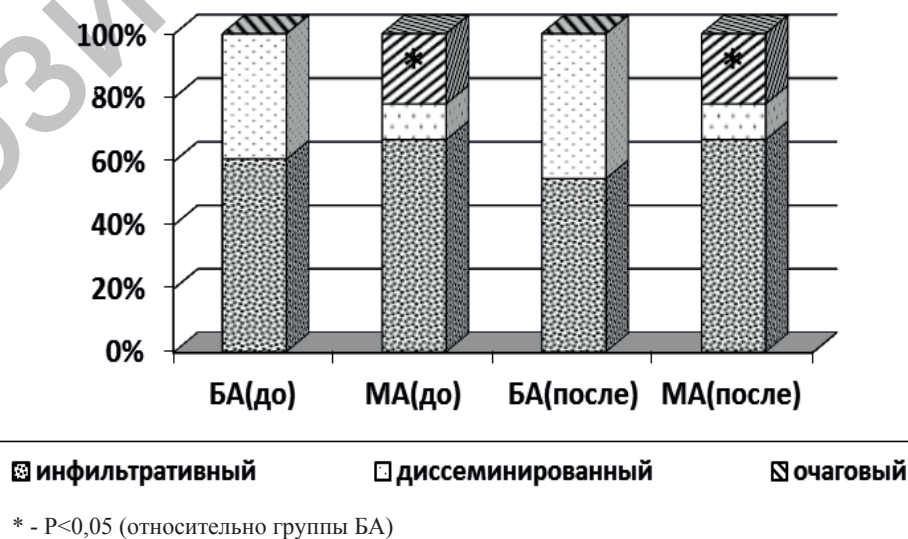


Рисунок. – Характер поражения легких с учетом генотипа NAT2 в начале (до) и в конце (после) стационарного лечения

Figure. – Lung injury based on the genotype NAT2 in the beginning (before) and at the end (after) the inpatient treatment

Таблица 2. – Прекращение процесса деструкции и бактериовыделения в зависимости от генотипа NAT2**Table 2.** – Termination of the process of destruction and bacterial excretion depending on the genotype NAT2

Группа пациентов	Прекращение процесса деструкции		Прекращение бактериовыделения, по данным			
	количество пациентов (%)	микроскопии		посева		
		продолжительность (дней) $\pm$ SEM	количество пациентов (%)	продолжительность (дней) $\pm$ SEM	количество пациентов (%)	продолжительность (дней) $\pm$ SEM
БА, n=33	8/17 (47,1)	71,75 $\pm$ 6,28	15/16 (93,8)	67,14 $\pm$ 3,31	7/20 (35,0)	82,67 $\pm$ 5,94
МА, n=53	8/21 (38,1)	54,71 $\pm$ 2,83*	25/25 (100)	60,08 $\pm$ 2,65	11/32 (34,4)	67,14 $\pm$ 3,31*

Примечание: * - $p < 0,05$ (относительно группы БА)

$\chi^2=6,40$). В динамике лечения на конец интенсивной фазы явления диссеминации по рентгенологической картине среди БА полностью исчезли ($p < 0,05$; $\chi^2=14,77$), а среди МА уменьшилась в 1,9 раза ($p < 0,05$; $\chi^2=14,43$). В конце стационарного лечения доля БА и МА с явлениями распада в легочной ткани уменьшилась в 3 и 2 раза, соответственно ($p < 0,05$), относительно исходного уровня. В то же время процессы рассасывания на момент выписки из стационара наблюдались у 84,8% БА и 86,8% МА – в начале лечения эти явления отсутствовали вовсе ($p < 0,05$; $\chi^2=48,63$ и $\chi^2=81,27$, соответственно).

По данным микроскопии, бактериовыделение на момент выписки пациентов из стационара отсутствовало в 100% МА и 97,0% БА, продолжительность конверсии для группы 1 составила 60 дней, для группы 2 – 67 дней. Согласно данным культурального метода, в конце стационарного этапа лечения бактериовыделение наблюдалось примерно у 40% пациентов (независимо от генотипа ацетилирования), бактериовыделение прекратилось у 35%. При этом для МА прекращение бактериовыделения произошло в 1,2 раза быстрее, чем для БА (67 дней против 82, $p < 0,05$; СИ 2,25 ... 28,81) (табл. 2).

Выводы

1. Наличие делеции функциональной зоны полиморфного участка гена *GSTM1* увеличивает риск низкой эффективности лечения пациентов с туберкулезом легких (при отсутствии Ro-динамики, или при негативной Ro-динамике) в 1,85 раза [$OR=3,55$, $p=0,035$], имеет самые низкие шансы на частичное [$OR=0,22$, $p=0,018$] и полное рассасывание очагово-инфильтративных изменений в легких, сопровождается низкой вероятностью прекращения бактериовыделения [$OR=0,07$, $p=0,002$ и $OR=0,37$, $p=0,04$].

2. Отсутствие мутации гена *GSTM1* повышает шансы на положительную Ro-динамику под влиянием лечения с рассасыванием (полным/частичным) очагово-инфильтративных изменений, или заживлением полости распада (в 1,39 и 1,44 раза [$OR=4,50$, $p=0,009$ и $OR=6,75$, $p=0,002$, соответственно]), повышает вероятность прекращения бактериовыделения уже на 60-й дозе в 1,5 раза [$OR=14,06$, $p=0,005$].

2. Процессы деструкции при чувствительном туберкулезе наблюдались у 51,5% «быстрых ацетиляторов» (БА) и 39,6% «медленных ацетиляторов» (МА). Согласно клинической форме, диссеминация туберкулезного процесса наблюдалась более чем в 3 раза чаще у БА по сравнению с МА ($P < 0,05$; $\chi^2=3,94$).

Литература

1. Glutathione S-transferase *GSTM1*, null genotype may be associated with susceptibility to age-related cataract / S. K. Celik [et al.] // *Adv. Clin. Exp. Med.* – 2015. – Vol. 24, iss. 1. – P. 113-119. – doi: 10.17219/acem/38143.
2. GST M1-T1 null allele frequency patterns in geographically assorted human populations: a phylogenetic approach / S. P. Kasthurinaidu [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, iss. 4. – P. e0118660. – doi: 10.1371/journal.pone.0118660.
3. Тодоріко, Л. Д. Адельний стан генів біотрансформації ксенобіотиків глутатіон-S-трансферази класів T1 (*GSTT1*) і M1 (*GSTM1*) у хворих на туберкульоз легень / Л. Д. Тодоріко, І. О. Сем'янів // *Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція.* – 2016. – № 2 (25). – С. 73-78.
4. Involvement of Cytochrome P450 1A1 and Glutathione S-Transferase P1 Polymorphisms and Promoter Hypermethylation in the Progression of Anti-Tuberculosis Drug-Induced Liver Injury: A Case-Control Study / L. He

[et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, iss. 3. – P. e0119481. – doi: 10.1371/journal.pone.0119481.

5. Todoriko, L. D. Analysis of the *GSTM1* gene polymorphism in patients with tuberculosis with regard to the version of MBTresistance / L. D. Todoriko, I. O. Semianiv // *Science and Education a New Dimension. Natural and Technical Sciences.* – 2016. – Vol. 9, iss. 83. – P. 61-63.

References

1. Celik SK, Aras N, Yildirim Ö, Turan F, Görür A, Yildirim H, Tamer L. Glutathione S-transferase *GSTM1*, null genotype may be associated with susceptibility to age-related cataract. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2015;24(1):113-119. doi: 10.17219/acem/38143.
2. Kasthurinaidu SP, Ramasamy T, Ayyavoo J, Dave DK, Adroja DA. GST M1-T1 null allele frequency patterns in geographically assorted human populations: a phylogenetic approach. *PLoS One.* 2015;10(4):e0118660. doi: 10.1371/journal.pone.0118660.

3. Todoriko LD, Semianiv IO. Alelnyj stan geniv biotransformacii ksenobiotykyv glutathione-S-transferazy klasiv T1 (GSTT1) i M1 (GSTM1) u hvoryh na tuberkuloz legen [Allele of xenobiotics metabolism genes of glutathione-S-transferase classes T1 (GSTT1) and M1 (GSTM1) in patients with pulmonary tuberculosis]. *Tuberkuloz, legenevi hvoroby, VIL-infekcija* [Tuberculosis, Lung Diseases, HIV Infection]. 2016;2(25):73-78. (Ukrainian).
4. He L, Gao L, Shi Z, Li Y, Zhu L, Li S, Zhang P, Zheng G, Ren Q, Li Y, Hu B, Feng F. Involvement of Cytochrome P450 1A1 and Glutathione S-Transferase P1 Polymorphisms and Promoter Hypermethylation in the Progression of Anti-Tuberculosis Drug-Induced Liver Injury: A Case-Control Study. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119481. doi: 10.1371/journal.pone.0119481.
5. Todoriko LD, Semianiv IO. Analysis of the GSTM1 gene polymorphism in patients with tuberculosis with regard to the version of MBTresistance. *Science and Education a New Dimension. Natural and Technical Sciences*. 2016;9(83):61-63.

INFLUENCE OF DELETION POLYMORPHISM OF GSTM1 AND NAT2 GENES ON THE PREDICTION OF DRUG-SENSITIVE TUBERCULOSIS TREATMENT EFFICACY

¹Todoriko L. D., ¹Semianiv I. A., ²Kuzhko M. M.

¹Bukovinian State Medical University, Chernovtsy, Ukraine

²National Institute of Phthisiology and Pulmonology named after F.G. Yanovsky NAMS of Ukraine, Kiev, Ukraine

The aim of the study. To determine the effect of polymorphism of glutathione-S-transferase class M1 and NAT2 genes on the efficacy of tuberculosis treatment.

Material and methods. The genes polymorphism of the xenobiotic detoxification system was determined with polymerase chain reaction.

Results. The presence of deletion of the functional zone in GSTM1 gene polymorphic sites increased the risk of low efficacy of tuberculosis treatment and indicated lower chances of resorption of focal-infiltrative changes in the lungs. It was also associated with a low probability of termination of bacterial excretion [OR = 0.07, p = 0.002]. The 0-genotype of the GSTM1 gene was protective against the onset of PDTB.

Conclusions. The 0-genotype of the GSTM1 gene is protective against the appearance of tuberculosis. The presence of deletion of the functional zone of the polymorphic site of the GSTM1 gene increases the risk of low efficacy of tuberculosis treatment, is associated with the lowest chances of resorption of focal-infiltrative changes in the lungs, and is accompanied by a low probability of early termination of bacterial excretion.

Keywords: tuberculosis, glutathione S-transferase gene, acetyltransferase, prediction.

For citation: Todoriko LD, Semianiv IA, Kuzhko MM. Influence of polymorphism genes GSTM1 and NAT2 on the forecast of efficiency of treatment sensitive tuberculosis. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2019;17(5):518-522. <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2019-17-5-518-522>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.
Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee.

Об авторах / About the authors

*Тодорико Лилия Дмитриевна / Todoriko Liliya, e-mail: pulmonology@bsmu.edu.ua, ORCID 0000-0001-9042-0073

Семянив Игорь Александрович / Semianiv Igor, e-mail: igor_semianiv@ukr.net, ORCID 0000-0003-0340-0766;

Researcher ID: B-9386-2017

Кужко Михаил Михайлович / Kuzhko Mikhail, e-mail: kuzhko@ifp.kiev.ua, ORCID 0000-0003-0340-0761;

Researcher ID: B-9286-2016

* – автор, ответственный за переписку / corresponding author

Поступила / Received: 10.05.2019

Принята к публикации / Accepted for publication: 19.09.2019