

УДК: [615+577.21]:616-002.5:615.28

ДИНАМИКА ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА NAT2

Антоненко П.Б.

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

Целью работы было определение особенностей динамики течения туберкулеза легких в зависимости от полиморфизма N-ацетилтрансферазы 2 (NAT2) согласно клеточному составу периферической крови и биохимических показателей крови. Был проведен анализ медицинских карт 84 пациентов с впервые диагностированным туберкулезом легких в начале и при завершении стационарного лечения в Одесском областном противотуберкулезном диспансере в 2012г. Маркеры токсического поражения печени (АлТ, АсТ, ГТ, тимоловая проба) практически не изменились у быстрых ацетиляторов (РА), в то же время достоверно выросли у медленных ацетиляторов (SA), что отражает более высокий риск поражения печени во время химиотерапии туберкулеза у SA.

Ключевые слова: NAT2, туберкулез, гепатотоксичность.

На сегодня туберкулез (ТБ) остается основной причиной смерти среди инфекционных заболеваний в постсоветских странах. За период 2006–2011гг. заболеваемость ТБ в Украине достоверно уменьшилась на 19,2% с 83,2 до 67,2 на 100 тыс. населения [1, 2]. В то же время, увеличилась частота резистентного ТБ - частота первичной химиорезистентности составляет от 7 до 25% в разных регионах, а вторичная резистентность достигает 75% [3]. Также одной из причин неудач терапии является значительная токсичность противотуберкулезных препаратов [4].

Известно, что эффективность лечения болезни, тяжесть ее течения и развитие осложнений в значительной степени зависит от индивидуальных особенностей человека, в частности от полиморфизма генов, определяющих иммунный ответ, детоксикацию ксенобиотиков и т.д. В то же время в Восточной Европе очень мало работ, посвященных влиянию генетического полиморфизма пациентов с туберкулезом на течение заболеваний. В частности, очень важным является полиморфизм N-ацетилтрансферазы 2 (NAT2), который обуславливает разную эффективность известного противотуберкулезного препарата изониазида [5]. Особенно это важно в свете внедрения так называемой ДОТС-стратегии лечения туберкулеза, которая предусматривает уменьшение дозы изониазида в 2-3 раза.

Цель работы: определить особенности динамики течения туберкулеза легких в зависимости от полиморфизма NAT2 согласно клеточному составу периферической крови и биохимических показателей крови.

Материалы и методы. Был проведен анализ медицинских карт 84 пациентов с впервые диагностированным туберкулезом легких в начале и при завершении стационарного лечения в Одесском областном противотуберкулезном диспансере в 2012г., из которых 39 (46,4%) составляли женщины, остальные - 45 (53,6%) - составляли мужчины. Возраст пациентов составлял от 18 до 73 лет (средний возраст - 35,9 лет). Учитывали количество эритроцитов, лейкоцитов, лейкоцитарную формулу, содержание гемоглобина в крови и в эритроците (МСНС), скорость оседания эритроцитов (СОЭ), печеночные пробы (общий билирубин, аланинаминотрансфераза (АлТ), аспартатаминотрансфераза (АсТ), гамма-глутамилтрансфераза (ГТ)).

Согласно Приказу МОЗ Украины № 384 от 9.06.2006 и ДОТС-стратегии, все пациенты с туберкулезом получали стандартную терапию, включая изониазид из расчета 4-6 мг/кг в сутки (300-400 мг в среднем), которая предусмотрена для первой категории пациентов туберкулезом. Использовалась комбинация изониазид+рифампицин+пиразинамид+стрептомицин на протяжении 2-х меся-

цев (у отдельных пациентов могли быть определенные изменения в схеме лечения) с последующим переходом на поддерживающую терапию или продолжением интенсивной фазы лечения. Различий в схемах лечения между группами быстрых и медленных ацетиляторов не было.

На первой неделе стационарного лечения у пациентов определяли генотип NAT2 и показатели прооксидантной и антиоксидантной систем. Для определения полиморфизма NAT2 исследовали возможные замены C>T 481 NAT2*5A, G>A 590 NAT2*6A согласно Blum M. et al., 1991 [6]. ДНК материал был экстрагирован из крови пациентов с туберкулезом с использованием набора ДНК-сорбБ (АмплиСенс, Российская Федерация). Пациенты, которые были гомозиготами хотя бы по одному мутантному гену или гетерозиготами по двум генам, были отнесены к медленным ацетиляторам (SA). Лица, не имевшие ни одной мутации в изученных генах или являвшиеся гетерозиготами только по одному гену, были отнесены к быстрым ацетиляторам (РА).

Уровень диеновых конъюгатов (ДК) измеряли в сыворотке крови с использованием гептан-изопропилового спирта и дальнейшего измерения на СФ-46 при 233 нм [7]. Активность каталазы измеряли в сыворотке крови с использованием перекиси водорода и молибдата аммония и последующим измерением на СФ-46 при 410 нм [8]. Потом высчитывали интегральный показатель - антиоксидантный индекс как соотношение активности каталазы к содержанию ДК. Обработку полученных данных проводили с помощью программ Microsoft Excel, «Primer Biostatistica».

Результаты и их обсуждение. Длительность стационарного лечения достоверно не различалась между разными типами ацетиляторов и составила 95,73±4,13 дней для быстрых ацетиляторов и 92,43±3,89 дней для медленных ацетиляторов.

В начале лечения уровень гемоглобина не различался между быстрыми и медленными ацетиляторами, в то же время количество эритроцитов и средняя концентрация гемоглобина в эритроците была несколько выше у быстрых ацетиляторов, чем у медленных ацетиляторов ($P>0,05$) (табл.1). Также практически группы не различались по количеству и формуле лейкоцитов в периферической крови. Средний показатель СОЭ в обеих группах был выше нормы и несколько больше у медленных ацетиляторов, чем у медленных ацетиляторов ($P>0,05$).

Стационарное лечение у быстрых ацетиляторов в среднем составляло 95,73±4,13 дней, у медленных ацетиляторов - 92,43±3,89 дней ($P>0,05$). В конце стационарного лечения уровень гемоглобина, эритроцитов и МСНС

Таблица 1 - Показатели «красной крови» и СОЭ до начала и после завершения стационарного лечения (Mean±SEM)

Группа	n	Количество эритроцитов, Т/л	Гемоглобин, г/л	МСНС	СОЭ
В НАЧАЛЕ ЛЕЧЕНИЯ					
RA	33	4,75±0,06	123,33±1,74	277,52±1,37	19,75±2,23
SA	51	4,70±0,04	123,51±1,59	274,59±0,96	24,28±2,33
ПОСЛЕ СТАЦИОНАРНОГО ЛЕЧЕНИЯ					
RA	33	4,77±0,07	125,18±1,88	283,00±3,93	10,86±1,34*
SA	51	4,67±0,04	123,55±1,53	281,24±1,91*	9,83±0,91*

Примечание: * $P < 0,05$ относительно соответствующей группы в начале лечения

Таблица 2 - Показатели «белой крови» в начале и после завершения стационарного лечения (Mean±SEM)

Группа	n	Количество лейкоцитов, Г/л	Лимфоциты, %	Моноциты, %	Гранулоциты, %
В НАЧАЛЕ ЛЕЧЕНИЯ					
RA	33	8,14±0,32	29,70±0,06	5,05±0,16	65,14±0,89
SA	51	8,13±1,23	29,97±0,88	4,84±0,15	64,65±0,95
ПОСЛЕ СТАЦИОНАРНОГО ЛЕЧЕНИЯ					
RA	33	6,47±0,18*	34,70±0,97*	5,38±0,21	59,67±1,02*
SA	51	6,53±0,25*	36,89±1,07*	4,79±0,12#	58,08±1,10*

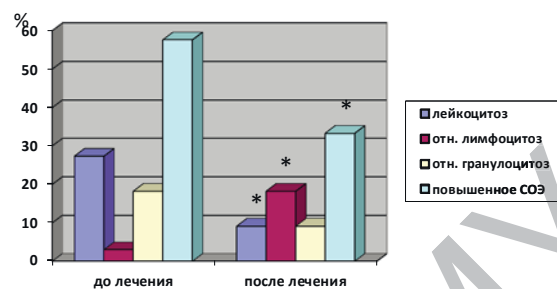
Примечание: * $P < 0,05$ относительно соответствующей группы в начале лечения; # $P < 0,05$ относительно группы RA после стационарного лечения

у быстрых ацетиляторов имели тенденцию к росту, в то же время у медленных ацетиляторов содержание эритроцитов несколько снизилось, однако МСНС, наоборот, вырос на 2,4% ($P=0,002$; CI=-10,89...-2,41). Показатель СОЭ на момент выписки у быстрых ацетиляторов уменьшился в 1,8 раза ($P=0,001$; CI=3,70...14,08), у медленных ацетиляторов – почти в 2,5 раза ($P=0,000$; CI=9,48...19,42). В обеих группах практически одинаково снизилось среднее содержание лейкоцитов – на 20,5% у RA ($P=0,000$; CI=0,88...2,46) и на 19,7% к SA ($P=0,000$; CI=0,92...2,28).

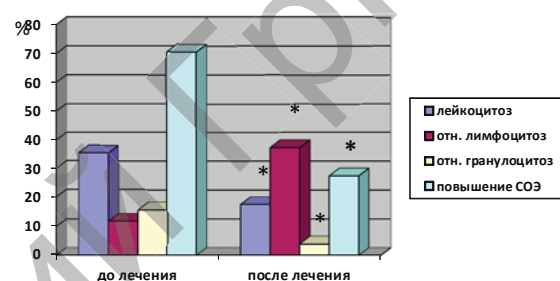
В лейкоцитарной формуле в конце стационарного лечения также произошли определенные сдвиги (табл.2). Во-первых, вырос процент лимфоцитов – на 16,8% у быстрых ацетиляторов ($P=0,000$; CI=-6,93...-3,07) и на 23,1% у медленных ацетиляторов ($P=0,000$; CI=-9,66...-4,18). Во-вторых, уменьшился процент гранулоцитов – на 8,4% у RA ($P=0,000$; CI=2,76...8,18) и на 10,2% у SA ($P=0,000$; CI=3,69...9,45). Относительно процента моноцитов в конце стационарного лечения отмечались разнонаправленные изменения у быстрых и медленных ацетиляторов – у первых относительное количество моноцитов несколько возросло, у вторых – уменьшилось ($P>0,05$). Причем, относительное количество моноцитов у SA была на 11,0% меньше, чем у RA ($P=0,011$; CI=0,14...1,04).

Если в начале лечения явления лейкоцитоза наблюдались у 27,3% быстрых ацетиляторов и 35,3% медленных ацетиляторов, то в конце лечения – у 9,1% и 17,6%, соответственно, причем у SA произошло достоверное снижение количества лейкоцитов ($P<0,05$; $\chi^2=4,08$ при критическом значении тут и далее 3,84) (рис. 1, рис.2). Также в результате проведенного лечения возросло количество пациентов с относительным лимфоцитозом как у быстрых ацетиляторов (с 3,0% до 18,2%, $P<0,05$; $\chi^2=3,99$), так и медленных ацетиляторов (с 11,8% до 37,3%, $P<0,05$;

$\chi^2=8,95$). Причем среди SA количество больных с относительным лимфоцитозом в конце стационарного лечения было практически в два раза выше, чем у RA ($P<0,05$; $\chi^2=4,15$).

**Рисунок 1** - Количество RA с патологическими сдвигами в периферической крови в начале и в конце стационарного лечения.

Примечание: * $P < 0,05$ относительно соответствующей группы в начале лечения

**Рисунок 2** - Количество SA с патологическими сдвигами в периферической крови в начале и в конце стационарного лечения.

Примечание: * $P < 0,05$ относительно соответствующей группы в начале лечения

В начале лечения достоверная разница между быстрыми и медленными ацетиляторами относительно биохимических показателей крови отсутствовала. У SA были несколько выше уровень билирубина, тимоловая проба, АлТ, чем у RA, в то же время у последних были несколько выше АсТ, ГТ ($P>0,05$) (табл.3).

Таблица 3 - Биохимические показатели крови в начале и после завершения стационарного лечения (Mean±SEM)

Группа	n	Количество лейкоцитов, Г/л	Лимфоциты, %	Моноциты, %	Гранулоциты, %
В НАЧАЛЕ ЛЕЧЕНИЯ					
RA	33	8,14±0,32	29,70±0,06	5,05±0,16	65,14±0,89
SA	51	8,13±1,23	29,97±0,88	4,84±0,15	64,65±0,95
ПОСЛЕ СТАЦИОНАРНОГО ЛЕЧЕНИЯ					
RA	33	6,47±0,18*	34,70±0,97*	5,38±0,21	59,67±1,02*
SA	51	6,53±0,25*	36,89±1,07*	4,79±0,12#	58,08±1,10*

Примечание: * $P < 0,05$ относительно соответствующей группы в начале лечения; # $P < 0,05$ относительно группы RA после стационарного лечения

На момент завершения стационарного лечения у быстрых ацетиляторов уровень билирубина снизился на 18,6% ($P=0,022$; CI=0,33...3,95) относительно начального

уровня. Также у RA во время лечения отмечалась тенденция к росту содержания АлТ, ГТ и, наоборот, к уменьшению тимоловой пробы, АсТ.

У медленных ацетиляторов в конце лечения произошло достоверное увеличение большей части биохимических показателей крови относительно начального уровня, кроме билирубина, содержание которого несколько уменьшилось. Так, уровень АлТ возрос на 17,5% ($P=0,014$; $CI=-7,19...-0,83$), уровень АсТ - на 18,7% ($P=0,013$; $CI=-8,53...-1,03$), уровень ГТ - на 25,3% ($P=0,000$; $CI=-10,17...-3,79$).

На момент выписки из стационара SA имели более высокий уровень исследованных биохимических показателей, чем RA. Например, уровень билирубина был на 17,5% выше у SA ($P=0,008$; $CI=-3,48...-0,55$), тимоловая проба - на 39,8% ($P=0,003$; $CI=-1,10...-0,22$), АлТ и АсТ - на 23,2% ($P=0,005$; $CI=-8,56...-1,56$) и 26,4% ($P=0,002$; $CI=-10,24...-2,46$), соответственно, ГТ - на 13,7% ($P=0,040$; $CI=-8,15...-0,19$), чем у RA.

При сравнении показателей про- и антиоксидантной систем у пациентов туберкулезом с разным генотипом NAT-2 было установлено отсутствие достоверных различий между RA и SA.

С целью определения связи показателей состояния про-/антиоксидантной системы с показателями периферической крови и биохимическими показателями был рассчитан индекс корреляции между уровнем диеновых коъюгатов (ДК), активности каталазы, с одной стороны, и уровнем лейкоцитов, маркерами цитолиза и детоксицирующей способности печени (аланин-трасферазы (АлТ) и тимоловой пробы) в начале и в конце стационарного лечения.

В начале лечения было установлено, что активность каталазы плазмы находится в прямой корреляции с относительным количеством гранулоцитов и обратной корреляции с относительным содержанием лимфоцитов (расчетное значение t-критерия составляло 2,525 и -2,419, соответственно, при критическом значении t-критерия тут и далее 1,988).

При завершении стационарного лечения у пациентов туберкулезом количество лейкоцитов была в обратной корреляции с начальным содержанием ДК и прямой корреляции с активностью каталазы (расчетное значение t-критерия составляло - 4,082 и 2,916, соответственно) (рис.3). Начальный уровень ДК был в прямой корреляции с относительным количеством лимфоцитов и обратной корреляции с относительным количеством гранулоцитов в конце лечения (расчетное значение t-критерия составляло 4,130 и -3,950, соответственно). Также содержание ДК в начале лечения было в прямой зависимости с показателями тимоловой пробы и уровнем АлТ в конце стационарного лечения (расчетное значение t-критерия составляло 2,771 и 2,108, соответственно).

Литература

1. Оценка контроля туберкулеза в Украине за период 2006-2010 годы / Ю.И. Фещенко, В.М. Мельник, В.Г. Матусевич, Н.И. Линник и др. // Украинский пульмонологический журнал. - 2011. - №4. - С. 5-10. (укр. язык)
2. WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: 2011 update. / D. Falzon, E. Jaramillo, H.J. Schönmann, M. Arentz // Eur. Respir. J. - 2011. - Vol. 38, N 3. - P. 516-528.
3. Аналитический взгляд на проблему химиорезистентного туберкулеза: современное состояние, достижения и некоторые нерешенные вопросы / В.М. Мельник, И.А. Новожилова, В.Г.

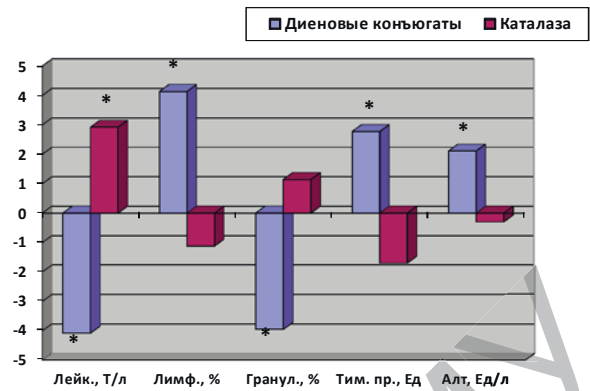


Рисунок 3 - Корреляция между уровнем про-/антиоксидантных маркеров в начале лечения и количеством лейкоцитов, биохимическими показателями в конце стационарного лечения (по оси ординат – расчетный t-критерий)

Примечание: * расчетный t-критерий больше критического значения t-критерия 1,988

Таким образом, было установлено, что в результате стационарного лечения в независимости от генотипа ацетилирования у пациентов с туберкулезом отмечалось снижение СОЭ, количества лейкоцитов, относительного числа гранулоцитов. В то же время выросла насыщенность эритроцита гемоглобином (МСНС) и относительное количество лимфоцитов, что может расцениваться как признак эффективного лечения [9]. Уменьшение относительного моноцитоза во время лечения, что характеризует эффективную терапию, отмечалось у SA.

Маркеры токсического поражения печени (АлТ, АсТ, ГТ, тимоловая проба) практически не изменились у RA, в то же время достоверно выросли у SA. Если в начале лечения достоверная разница между группами ацетиляторов отсутствовала, то в конце стационарного лечения маркеры гепатотоксичности были более высокими у SA, чем у RA, что отражает более высокий риск поражения печени во время химиотерапии туберкулеза у SA, что предположительно, связано со скоростью биотрансформации изониазида [10].

Важно, что уровень ДК в начале лечения ТБ не имел корреляции с лейкоцитарной формулой или печеночными пробами. В то же время, уровень ДК был в прямой корреляции с маркерами гепатотоксичности, ростом количества лимфоцитов, уменьшением количества лейкоцитов и процента нейтрофилов в крови в результате стационарного лечения. Таким образом, содержание ДК в начале лечения ТБ как маркер риска гепатотоксичности, с одной стороны, и более выраженной нормализации количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы, с другой стороны.

Literature

1. Feshchenko Yu. I., Melnyk V. M., Matusevych V. G., Linnik N. I., Novozhylova I. O., Shtanko V. L., Dubrov V. P., Shuripa V. P., Zagorulko V. M., Yegorova O. B., Lishchenko N. V., Kaminskaya V. V., Korotchenko S. P. Assessment of tuberculosis control in Ukraine for period 2006-2010. Ukrainian Pulmonology Journal 2011; 4: 5-10 (Ukr).
2. Falzon D., Jaramillo E., Schönmann H. J., Arentz M. WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: 2011 update. Eur. Respir. J. 2011; 38(3) : 516-528.
3. Melnyk V. M., Novozhylova I. O., Matusevych V. G., Linnik M. I. Analytical view on a problem of drug-resistant tuberculosis:

Матусевич, Н.И. Линник // Украинский пульмонологический журнал. – 2012. – №1. – С. 5-7. (укр. язык)

4. Регистрация побочных реакций противотуберкулезных препаратов при лечении больных туберкулезом / Ю.И. Фещенко, С.А. Черенко, Н.П. Красильникова, В.И. Мальцев и др. // Украинский пульмонологический журнал. – 2008. – №4. – С. 8-13. (укр. язык)

5. The level of isoniazid metabolites in tuberculosis patients depending on acetylation genotype / V.I. Kresyun, V.V. Filuk, P.B. Antonenko, K.K. Rogach, et al. // The International journal of tuberculosis and lung diseases. – 2013. – Vol. 17, № 12 (suppl. 2). – S. 158-159. (44 Union World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union). Paris, France, 30 October–3 November 2013: abstract presentations).

6. Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans / M. Blum, A. Demierre, D. M. Grant [et al.] / Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1991. – Vol. 88. – P. 5237-5241.

7. Стальная И.Д. Современные методы в биохимии. – М., Медицина. – 1977. – С.63.

8. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарева // Лаб. дело. – 1988. – №1. – С. 16-19.

9. Результаты применения ПАСК в комплексной химиотерапии больных деструктивным, ранее неэффективно леченным, химиорезистентным туберкулезом легких / И.Б. Бялик, Л.М. Цыганкова, В.В. Давиденко, И.В. Случ // Украинский пульмонологический журнал. – 2006. – №1. – С. 56-60. (укр. язык)

10. Ramachandran Geetha Role of pharmacogenomics in the treatment of tuberculosis: a review / Geetha Ramachandran, Soumya Swaminathan // Pharmacogenomics and Personalized Medicine. – 2012. – № 5. – P. 89–98.

current status, achievements and unsolved issues. Ukrainian Pulmonology Journal 2012; 1: 5-7 (Ukr).

4. Feshchenko Yu. I., Cherenko S. A., Krasilnikova N. P., Maltsev V. I., Viktorov A. P., Matveeva E. V., Logvina I. A. Registration of side effects of antituberculosis drugs in treatment of the tuberculosis patients. Ukrainian Pulmonology Journal 2008; 4: 8-13 (Ukr).

5. Kresyun V. I., Filuk V. V., Antonenko P. B., Rogach K. K., Danilenko Yu. M., Mozolevich G. V. The level of isoniazid metabolites in tuberculosis patients depending on acetylation genotype. The International journal of tuberculosis and lung diseases 2013; 17(12; suppl. 2): S. 158-159. (44 Union World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union). Paris, France, 30 October–3 November 2013: abstract presentations).

6. Blum M, Demierre A, Grant D M, Heim M, Meyer U A Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88(12): 5237-5241.

7. Stalnaya I. D. Sovremennye metody v biochimii [Modern methods in biochemistry]. Moscow, Medicina, 1977: 63 (Rus.).

8. Korolyk M. A., Ivanova L. I., Mayorova I. G., Tokareva V. E. Metod opredeleniya aktivnosti catalasu [Method of catalase activity detection]. Laboratornoe delo. 1988; 1: 16-19 (Rus.).

9. Byalik I. B., Tsygankova L. M., Davidenko V. V., Slouch I. V. Results of PASA application in complex chemotherapy of patients with destructive, ineffectively treated previously, resistant pulmonary tuberculosis Ukrainian Pulmonology Journal 2006; 1: 56-60 (Ukr).

10. Ramachandran Geetha, Swaminathan Soumya Role of pharmacogenomics in the treatment of tuberculosis: a review. Pharmacogenomics and Personalized Medicine 2012; 5: 89–98.

DYNAMICS OF LABORATORY MARKERS IN PATIENTS WITH TUBERCULOSIS DEPENDING ON NAT2 GENOTYPE

Antonenko P.B.

Educational Establishment "Odessa National Medical University", Odessa, Ukraine

The aim of the work was to detect peculiarities of pulmonary tuberculosis course depending on N-acetyltransferase 2 (NAT2) polymorphism according to cellular content of peripheral blood and biochemical markers of the blood. 84 medical cards of patients with primary pulmonary tuberculosis diagnosed at the beginning and at the end of in-patient treatment in Odessa regional TB dispensary in 2012 were analysed. Markers of hepatotoxicity (alanin aminotransferase, aspartate aminotransferase, γ -glutamate transferase, thymol probe) did not change in rapid acetylators (RA), while significantly increased in slow acetylators (SA) that reflect higher risk of hepatotoxicity during tuberculosis chemotherapy in SA.

Key words: NAT2, tuberculosis, hepatotoxicity

Адрес для корреспонденции: e-mail: antonenko@ukr.net

Поступила 15.11.2013