

Вплив делеційного поліморфізму генів GSTM1 та NAT2 на ефективність лікування хворих на туберкульоз і вибір шляху введення протитуберкульозних препаратів

Тодоріко Л. Д.¹, Антоненко П. Б.², Кужко М. М.³, Сем'янів І. О.², Тлустова Т. В.³

1. ВДНЗ «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці

2. Одеський національний медичний університет, м. Одеса

3. ДУ "Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України", м. Київ

Конфлікт інтересів: відсутній.

ОБГРУНТУВАННЯ. Однією із вагомих причин невдач лікування туберкульозу (ТБ) є недостатня сироваткова концентрація протитуберкульозних препаратів (ПТП) в крові хворих, що сприяє розвитку медикаментозної резистентності штамів *M. tuberculosis* і формуванню мультирезистентного туберкульозу (МРТБ), а також значної кількості випадків резистентного до ізоніазиду форм.

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ полягала в комплексній оцінці ролі визначення типу ацетилятора згідно генотипу N-ацетилтрансферази 2 та впливу поліморфізму генів глутатіон-S-трансферази класу M1 на ефективність лікування хворих на туберкульоз для індивідуальної корекції дози протитуберкульозних препаратів та вибору шляху введення ліків для досягнення пікової сироваткової їх концентрації.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Визначення поліморфізму генів системи детоксикації ксенобіотиків, і зокрема GSTM1, проводилося з використанням набору реагентів «АмпліСенс® GSTM1-EPH», методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Генотип ацетилювання визначався шляхом алель-специфічної ампліфікації NAT2 алелів за ПЛР. Були використані специфічні праймери для дикого (wt) і мутантного алелів M1, M2 і M3. Таким чином, було досліджено NAT2 поліморфізм C>T 481 NAT2*5A, G>A 590 NAT2*6A, G>A 857 NAT2*7A/B M3.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. Наявність делеції функціональної зони поліморфної ділянки гена GSTM1 збільшує ризик низької ефективності лікування хворих на туберкульоз легень (за відсутності Ro-динаміки чи негативної Ro-динаміки) у 1,85 рази [OR = 3,55, p = 0,035] та має найнижчі шанси на часткове [OR = 0,22, p = 0,018] і повне розсмоктування вогнищево-інфільтративних змін в легенях чи загоєння порожнини розпаду після проведеної терапії [OR = 0,15, p = 0,004], супроводжується низькою ймовірністю припинення бактеріовиділення на 60, 90 (для ВДТБ, ПРТБ) дозах [OR = 0,07, p = 0,002 і OR = 0,37, p = 0,04]; 0-генотип гена GSTM1 є протективним щодо появи ВДТБ [OR = 0,37, p = 0,04 і OR = 0,22, p = 0,007]. Відсутність мутації гена GSTM1 навпаки є чинником ризику ВДТБ [OR = 2,67, p = 0,033], однак при цьому підвищує шанси на позитивну Ro-динаміку під впливом лікування із розсмоктуванням (повним / частковим) вогнищево-інфільтративних змін, чи загоєнням порожнини розпаду (у 1,39 і 1,44 рази [OR = 4,50, p = 0,009 і OR = 6,75, p = 0,002, відповідно]), підвищує ймовірність припинення бактеріовиділення вже на 60 дозі у 1,5 рази [OR = 14,06, p = 0,005].

ВИСНОВКИ. Визначення концентрації ізоніазиду через 4 год після прийому препарату може допомогти у прогнозуванні наслідків лікування ТБ і можливої корекції терапії захворювання.

З метою покращання ефективності лікування доцільною є рекомендація щодо збільшення терапевтичної дози ізоніазиду у хворих на ТБ з генотипом «швидких ацетиляторів» принаймні до 7-8 мг/кг на добу та застосування парентерального шляху введення препарату.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: генотип "швидких ацетиляторів", поліморфізм генів, вогнищево-інфільтративні зміни.

Influence of GSTM1 and NAT2 deletion polymorphism on efficiency of TB treatment and selection of way of administration of anti-TB reparations

Todoriko L. D.¹, Antonenko P. B.², Kuzhko M. M.³, Semianov I. O.², Tlustova T. V.³

1. Bukovynsky State Medical University, Chernivtsi

2. Odessa National Medical University, Odessa

3. SO «National Institute of Phthisiology and Pulmonology named after F.G. Yanovsky NAMS of Ukraine», Kyiv

CONFLICT OF INTERESTS: none.

BACKGROUND. One of the important reasons of treatment failures of tuberculosis (TB) is insufficient serum concentration of anti-TB drugs in the blood of patients which contributes to the development of drug resistance strains of *M. tuberculosis* and the formation of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), as well as a significant number of forms resistant to isoniazid.

THE PURPOSE of the study was to assess the role of determining the type of acetylator according to the N-acetyltransferase 2 genotype and the influence of the M1 class glutathione-S-transferase gene on the efficacy of treatment for TB patients for the individual dose adjustment of anti-TB drugs and the choice of the route of administration of drugs to achieve peak serum concentrations.

MATERIAL AND METHODS. Determination of the polymorphism of the genes of the xenobiotic detoxification system, and in particular GSTM1, was carried out using the AmpliSense® GSTM1-EPh reagent set by the Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The genotype of acetylation was determined by allele-specific amplification of NAT2 alleles by PCR. Specific primers for wild (wt) and mutant alleles M1, M2 and M3 were used. Thus, the NAT2 polymorphism C>T 481 NAT2*5A, G>A 590 NAT2*6A, G>A 857 NAT2*7A/B M3 was investigated.

RESULTS AND DISCUSSION. The presence of deletion of the functional zone of the polymorphic site of the GSTM1 gene increases the risk of a low efficiency of treatment for patients with pulmonary tuberculosis (in the absence of Ro-dynamics or negative Ro-dynamics) by 1.85 times [OR = 3.55, p = 0.035] and has the lowest chances on partial [OR = 0.22, p = 0.018] and complete resorption of focal-infiltrative changes in the lungs or healing of the cavity of decay after treatment [OR = 0.15, p = 0.004], accompanied by a low probability of stopping bacterial secretion by 60, 90 (for VDTB, PRTB) at doses [OR = 0.07, p = 0.002 and OR = 0.37, p = 0.04]; The 0-genotype of the GSTM1 gene is protective against the appearance of VDTB [OR = 0.37, p = 0.04 and OR = 0.22, p = 0.007]. The absence of mutation in the GSTM1 gene, on the contrary, is a risk factor for VDTB [OR = 2.67, p = 0.033], however, it increases the chances for positive Ro-dynamics under the influence of treatment with resorption (full / partial) focal-infiltrative changes, or healing of the decay cavity (1.39 and 1.44 times [OR = 4.50, p = 0.009 and OR = 6.75, p = 0.002, respectively]), increases the likelihood of a bacterial withdrawal of at least 60 doses of 1.5 times [OR = 14.06, p = 0.005].

CONCLUSIONS. Determining the concentration of isoniazid 4 hours after taking the drug can help predict the effects of TB treatment and possible correction of the treatment of the disease. In order to improve the efficacy of treatment, it is advisable to increase the therapeutic dose of isoniazid in patients with TB with the genotype of "fast acetylators" at least 7-8 mg/kg per day and the use of the parenteral route of administration.

Влияние делеционного полиморфизма генов GSTM1 И NAT2 на эффективность лечения больных туберкулезом и на выбор пути введения противотуберкулезных препаратов

Тодорико Л. Д^{1.}, Антоненко П. Б^{2.}, Кужко М. М^{3.}, Семьянив И. А^{2.}, Тлустова Т. В.³

1. ВДНЗ «Буковинский государственный медицинский университет», г. Черновцы

2. Одесский национальный медицинский университет, г. Одесса

3. ДУ "Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии им. Ф. Г. Яновского НАМН Украины", г. Киев

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ: отсутствует.

ОБОСНОВАНИЕ. Одной из весомых причин неудач лечения туберкулеза (ТБ) является недостаточная концентрация противотуберкулезных препаратов (ПТП) в крови больных, что способствует развитию лекарственной резистентности штаммов *M. tuberculosis* и формированию мультирезистентного туберкулеза (МРТБ), а также значительного количества случаев резистентных к изониазиду форм.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ заключалась в комплексной оценке роли определения типа ацетиляторов согласно генотипа N-ацетилтрансферазы 2 и влияния полиморфизма генов глутатион-S-трансферазы класса M1 на эффективность лечения больных ТБ для индивидуальной коррекции дозы ПТП и выбора пути введения лекарств для достижения максимальной сывороточной их концентрации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Определение полиморфизма генов системы детоксикации ксенобиотиков, и в частности GSTM1, проводилось с использованием набора реагентов «АмплиСенс® GSTM1-EPh», методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Генотип ацетилирования определялся путем аллель-специфической амплификации NAT2 аллелей по ПЦР. Были использованы специфические праймеры для дикого (wt) и мутантного аллелей M1, M2 и M3. Таким образом, было исследовано NAT2 полиморфизм C>T 481 NAT2*5A, G>A 590 NAT2*6A, G>A 857 NAT2*7A/B M3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Наличие делеции функциональной зоны полиморфной участка гена GSTM1 увеличивает риск низкой эффективности лечения больных туберкулезом легких (при отсутствии Ro-динамики или негативной Ro-динамики) в 1,85 раза [OR = 3,55, p = 0,035] и имеет самые низкие шансы 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], сопровождается низкой вероятностью прекращения бактериовыделения на 60, 90 (для ВДТБ, ПРТБ) дозах [OR = 0,07, p = 0,002 и OR = 0,37, p = 0,04]; 0-генотип гена GSTM1 является эффективным предупреждением относительно появления ВДТБ [OR = 0,37, p = 0,04 и OR = 0,22, p = 0,007]. Отсутствие мутации гена GSTM1 наоборот является фактором риска ВДТБ [OR = 2,67, p = 0,033], однако при этом повышает шансы на положительный Ro-динамика 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 дозе в 1,5 раза [OR = 14,06, p = 0,005].

ВЫВОДЫ. Определение концентрации изониазида через 4 часа после приема препарата может помочь в прогнозировании последствий лечения ТБ и возможной коррекции терапии заболевания.

С целью улучшения эффективности лечения целесообразна рекомендация по увеличению терапевтической дозы изониазида у больных ТБ с генотипом «быстрых ацетиляторов» по крайней мере до 7-8 мг / кг в сутки и применения парентерального пути введения препарата.

Вступ. Парадигма антропоцентричного менеджменту у сучасних реаліях піднімає проблему ефективної і безпечної фармакотерапії, зокрема у фтизіатрії [15].

Однією із вагомих причин невдач лікування туберкульозу (ТБ) є недостатня сироваткова концентрація протитуберкульозних препаратів (ПТП) в крові хворих, яка, у значній мірі (близько третини усіх повторних випадків), сприяє розвитку медикаментозної резистентності штамів *M. tuberculosis* і формуванню мультирезистентного туберкульозу (МРТБ), а також значної кількості випадків резистентного до ізоніазиду форм [5].

Аналіз доступних наукових джерел дозволив зробити висновки, що дослідження значимості впливу сироваткової концентрації протитуберкульозних препаратів (ПТП) на ефективність лікування та прогноз формування хіміо-резистентності, а також вивчення шляхів щодо підвищення концентрації антимікобактеріальних препаратів (АМБП) до їх пікових значень не чисельна [7,9].

Відомо, що індивідуальна фармакологічна відповідь залежить від сукупності чисельних факторів, серед яких важливе місце займає генетична характеристика пацієнта [10]. Одним із перспективних шляхів підвищення ефективності і безпеки лікування є впровадження в клінічну практику технологій персоналізованої медицини, що базуються на індивідуальному підході до вибору препарату та режиму дозування [Heller F., 2013].

На сьогоднішній день недостатньо даних щодо асоціації делеційного поліморфізму генів детоксикації та антиоксидантного захисту GSTM1 із частотою поширеності туберкульозу легень [6,13]. Потребують вивчення генетично-молекулярні предиктори прогнозу ефективності лікування за динамікою клінічних та рентгенологічних ознак, з метою оптимізації комплексного лікування хворих на ТБ [3,4].

Генетичний поліморфізм впливає на активність низки цитохромів (CYP), таких як CYP 2D6, 2C9, 2C19, які по різному можуть змінювати ефективність багатьох препаратів (варфарин, клопідогрель, тамоксифен, кодеїн тощо) [Mirghani R. A. et al., 2011]. Оприлюднено дані про значні міжетнічні відмінності щодо поширеності тих або інших генотипів CYP, що визначає розбіжності в активності препарату в різних країнах [Dandara C. et al., 2011]. Тому слід проводити національні скринінгові дослідження для з'ясування особливостей генотипу в окремих регіонах світу [1,8].

Результатами низки досліджень доведено, що поліморфізм гена N-ацетилтрансферази 2 (NAT2) визначає швид-

кість інактивації протитуберкульозного препарату ізоніазиду [Sim E. et al., 2014].

У зв'язку з вище зазначеним, однією із перспективних задач фтизіатрії та клінічної фармакології ТБ, яка дозволить підвищити ефективність лікування туберкульозної інфекції до моніторингових ВООЗ, є використання результатів генетичного тестування хворих на ТБ.

Мета дослідження полягала в комплексній оцінці ролі визначення типу ацетилятора згідно генотипу N-ацетилтрансферази 2 та впливу поліморфізму генів глутатіон-S-трансферази класу M1 на ефективність лікування хворих на туберкульоз для індивідуальної корекції дози протитуберкульозних препаратів та вибору шляху введення ліків для досягнення пікової сироваткової їх концентрації.

Матеріали та методи. В основу клінічного дослідження покладено комплексне обстеження та спостереження за пацієнтами, які знаходилися на стаціонарному лікуванні у обласних протитуберкульозних диспансерах м. Чернівців (56 хворих) та м. Одеси (86 хворих), у яких вперше діагностовано ТБ легень і які не виділяли мультирезистентних штамів МБТ. Відбір учасників дослідження в обох групах проводили методом «поперечного зрізу» без вікових чи статевих обмежень. Критеріями виключення учасників з дослідження в обох групах була наявність верифікованої ВІЛ-інфекції, вірусних гепатитів. Дослідження проведені упродовж 3-річного періоду. Дизайн дослідження відповідав відкритому порівняльному рандомізованому спостереженню.

Критерії включення у дослідження: хворі на вперше діагностований туберкульоз (ВДТБ) зі збереженою чутливістю; наявність мікобактерій туберкульозу (МБТ) у харкотині (за мазком та засівом на твердих та рідких (ВАСТЕС) живильних середовищах).

Критерії виключення з дослідження: відсутність МБТ у харкотині (за мазком та/або засівом на живильні середовища).

У 100 % обстежуваних пацієнтів туберкульозний процес характеризувався наявністю порожнини розпаду, масивними дисемінаціями вогнищ, інфільтративними та пневмосклеротичними змінами в обох легенях; вираженими грудними скаргами та інтоксикаційним синдромом (кашель, задуха, фебрильна температура, збільшенням кількості еритроцитів та нейтрофілних гранулоцитів і ШОЕ). У 15 % хворих туберкульозний процес не виходив за межі

однієї чи двох долей з наявністю порожнин розпаду та був помірно виражений інтоксикаційний синдром. У більшості пацієнтів показники периферичної крові були незначно змінені або без вагомих змін.

Визначення поліморфізму генів системи детоксикації ксенобіотиків, і, зокрема GSTM1, проводилося з використанням набору реагентів «АмпліСенс® GSTM1-EPH», який призначений для виявлення делеційних поліморфізмів в генах глутатіон-S-трансфераз GSTM1 людини методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на базі центральної науково-дослідної лабораторії ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет».

Генотипування виконували для 96 хворих на ТБ і 50 практично здорових осіб. Виявлення делеційних поліморфізмів в генах GSTM1 методом ПЛР з електрофоретичною детекцією включає в себе 3 етапи: екстракція (виділення) ДНК із периферичної крові, ПЛР-ампліфікація ділянок генів, та електрофоретична детекція продуктів ампліфікації в агарному гелі. З пробамі виділеної ДНК проводиться реакція ампліфікації фрагментів генів GSTM1, які містять делеційні поліморфізми, за допомогою специфічних праймерів і фермента Taq-полімерази. В якості внутрішнього контролю використовується ген альбуміну (після ампліфікації фрагмент присутній завжди). Гомозиготні форми із делецією GSTM1 ідентифікували за відсутності відповідного фрагменту на електрофореграмі. Такі генотипи позначали як GSTM1-. Делеції гена відповідає відсутність відповідної смужки на електрофореграмі.

Для вивчення особливостей поліморфізму генів біотрансформації у хворих на ТБ легень, а також вмісту ізоніазиду проводили забір венозної крові на базі ООПТД на початку стаціонарного лікування. Рівень ізоніазиду вивчали через 2, 4, 6 і 24 год після застосування препаратів у кожного пацієнта. Усі хворі на туберкульоз отримували у складі комплексної терапії ізоніазид внутрішньо з розрахунку 4-6 мг/кг маси тіла (загалом 300-400 мг) на добу згідно чинно діючого наказу МОЗ України.

Генотип ацетилювання визначався шляхом алель-специфічної ампліфікації NAT2 алелів з ПЛР. Були використані специфічні праймери для дикого (wt) і мутантного алелів M1, M2 і M3. Таким чином, було досліджено NAT2 поліморфізм C>T 481 NAT2*5A, G>A 590 NAT2*6A, G>A 857 NAT2*7A/B M3 [3].

Вміст ізоніазиду вимірювали в сироватці хворих згідно методики С. Wollenberg в модифікації Р. І. Шендерової (1975) [2]. Біохімічні та молекулярно-генетичні дослідження проводили на лабораторних базах Одеського національного медичного університету.

Для збору анкетних, епідеміологічних даних і даних щодо особливостей захворювання на кожного хворого була заповнена анкета, до якої увійшли анкетні дані, дані клініко-лабораторних і інструментальних досліджень на початку і при завершенні стаціонарного лікування.

Наукова робота проведена з урахуванням основних «Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини», затверджених Гельсінською декларацією (1964-2013 рр.), ICH GCP (1996 р.), Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986 р.), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р., за позитивним висновком комісії

з біоетики Буковинського державного медичного університету (протокол № 2 від 20 жовтня 2011 р.).

Дослідження передбачало дотримання концепції інформованої згоди пацієнта, оцінки ризику шкоди та користі, принципу конфіденційності та поваги до особистості пацієнтів, які виступають об'єктом медичного дослідження.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного пакета «Statistica 13» (версія 10.0.228.8, StatSoft, Inc.) з використанням χ^2 критерію та тесту Манна-Уїтні. Для характеристики ступеню взаємозв'язку між перемінними величинами застосовували коефіцієнти кореляції Пірсона та Спірмена (при нормальному розподілі вибірки та відмінного від нормального).

Результати та їх обговорення. Незважаючи на те, що активність ферменту глутатіон-S-трансферази класу М кодується п'ятьма генами GST класу М (M_1 - M_5), домінантною причиною генетично зумовленої дисрегуляції антиоксидантної активності, є делеційний (нульовий) поліморфізм гена GSTM₁ [1, 4, 11, 15].

Відсутність суттєвої рентгенологічної динаміки на тлі протитуберкульозної терапії у хворих на ТБ легень асоціює з більшою частотою делеційного генотипу в обстежених (у 2 рази; ($\chi^2=4,0$; $p=0,045$)). Натомість, серед пацієнтів із хорошим ефектом лікування, що проявлялося позитивною динамікою рентгенологічної картини за рахунок часткового розсмоктування вогнищево-інфільтративних змін у легенях, чи/або загоєння порожнини розпаду, навпаки, переважували особи із функціональним алелем гена GSTM₁, відповідно, у 8 і 8,67 рази ($p<0,001$). Установлено, що серед хворих із повним розсмоктуванням вогнищево-інфільтративних змін у легенях на фоні стандартної хіміотерапії були виключно особи із відсутністю несприятливої гомозиготної делеції. Отже, відсутність 0-генотипу у картованій ділянці гена GSTM₁ асоціює із хорошою позитивною рентгенологічною динамікою під впливом лікування (часткова, чи повна елімінація вогнищево-інфільтративних змін та загоєння порожнини розпаду) – у 1,67-5,33 рази ($p\leq 0,003-0,001$), а наявність 0-генотипу характеризується частішим переважанням осіб, котрі не відповідали достатньо на лікування АМБП (за даними рентгенологічного дослідження), відповідно, у 3 і 4 рази, ($p<0,001$), чи навіть давали картину негативної Ro-динаміки ($n = 3$): 66,67 % проти 33,33 % у власників функціонального алеля.

Аналіз гетерозиготності нульового поліморфізму гена GSTM₁ з урахуванням ефективності лікування хворих на ТБ легень за даними Ro-динаміки засвідчив вірогідний дефіцит гетерозиготності в осіб без вагомих Ro-змін ($F = 0,55$, $p = 0,008$), із її надлишком у пацієнтів із Ro-картиною повного розсмоктування вогнищево-інфільтративних вогнищ ($F = -0,33$, $p = 0,012$), що загалом нівелювалося нормальним алельним розподілом у решти хворих і зберігало алельну рівновагу Hardy-Weinberg в обстеженій популяції.

Ефективність лікування хворих на ТБ легень за основним епідеміологічним показником - припинення бактеріовиділення, з урахуванням алельного стану гена GSTM₁ наведено в таблиці 1. Відсутність делеції у ділянці хромосоми 1p13.3 аналізованого гена протяжністю 10 000 п.н. асоціює із частішим припиненням бактеріовиділення: на 60 дозі у 25 разів ($p<0,001$) у домінуючій кількості пацієнтів ($n=46$). Частота припинення бактеріовиділення на 90

Таблиця 1. Ефективність лікування хворих на туберкульоз легень залежно від нульового генотипу гена $GSTM_1$

Припинення бактеріовиділення під впливом лікування	Відсутність 0-генотипу, (%)	0-генотип, (%)	ВШ [95% ДІ]	χ^2 p
Припинення бактеріовиділення на 60 дозі (+++), n=26 (%)	25 (96,15)	1 (3,85)	-	$\chi^2=44,31$ p<0,001
Припинення бактеріовиділення на 90 (для ВДТБ), n=46 (%)	28 (82,61)	18 (17,39)	22,6 [7,68-66,3]	$\chi^2=39,13$ p<0,001
Неефективне лікування, n=9 (%)	3 (33,33)	6 (66,67)	0,10 [0,02-0,46]	p=0,003

Примітка: ВШ — відношення шансів; ДІ — довірчий інтервал; p — вірогідність різниць показників

дозі при лікуванні ВДТБ не залежала від наявної / відсутньої делеції в картованій ділянці хромосоми гена $GSTM_1$: 9 (60,0 %) проти 6 (40,0 %) ($\chi^2=1,20$, p>0,05). Однак, неефективне лікування хворих на туберкульоз легень асоціювало з більшою частотою 0-генотипу: 6 (66,67 %) проти 3 (33,33 %) (p = 0,003) (табл. 1).

Присутність гомозиготної делеції функціональної зони гена $GSTM_1$ збільшує ризик низької ефективності лікування хворих на ТБ легень (за відсутності Ro-динаміки, чи негативної Ro-динаміки) у 1,85 рази [OR = 3,55, p = 0,035] та найнижчих шансів на часткове [OR = 0,22, p = 0,018] і повне розсмоктування вогнищево-інфільтративних змін легень, чи загоєння порожнини розпаду після проведеної терапії [OR = 0,15, p = 0,004]. За відсутності мутації гена $GSTM_1$ навпаки — вірогідно зростає ймовірність позитивної Ro-динаміки із розсмоктуванням (повним/частковим) вогнищево-інфільтративних змін, чи загоєнням порожнини розпаду в 1,39 і 1,44 рази [OR = 4,50, p = 0,009 і OR = 6,75, p = 0,002, відповідно] за низьких шансів на негативну Ro-динаміку на лікування [OR = 0,28, p = 0,018]. Окрім того, є високі шанси добитись припинення бактеріовиділення вже на 60 дозі за відсутньої мутації — 14,06 [95 % CI=1,76-65,6, p=0,005], тоді як наявність 0-генотипу гена $GSTM_1$ у хворих на ТБ легень робить шанси на припинення бактеріовиділення на 60, 90 (для ВДТБ) найнижчими в обстеженій популяції [OR = 0,07, p = 0,002 і OR = 0,37, p = 0,04].

На початку стаціонарного лікування процеси деструкції спостерігались у 51,5 % «швидких ацетиляторів» (ША) і 39,6 % «повільних ацетиляторів» (ПА). Згідно клінічної форми, дисемінація туберкульозного процесу спостерігалась більш, ніж в 3 рази частіше у ША порівняно з ПА (P<0,05; $\chi^2=3,94$ при критичному значенні тут і далі 3,84) (рис. 1). У 22,0 % ПА туберкульозний процес мав вогнищевий характер, водночас серед ША на початку лікування він не відзначався взагалі (P<0,05; $\chi^2=4,94$).

Незалежно від генотипу ацетилювання бактеріовиділення відзначалось у 48,0 % (за даними мікроскопії) і 61,0 % (за даними культурального методу) хворих на початку лікування.

Таким чином, на початку лікування хворі, що мали генотип ША мали тенденцію до більш важкого і генералізованого перебігу ТБ легень. Тривалість стаціонарного лікування вірогідно не відрізнялась між різними типами ацетилювання і становила $95,73 \pm 4,13$ дня для ША ацетиляторів і $92,43 \pm 3,89$ дня для ПА.

Наприкінці стаціонарного лікування процеси деструкції зберігались у чверті хворих незалежно від генотипу ацетилювання. Серед ША процеси деструкції спостерігались в 1,9 рідше, ніж на початку лікування (P<0,05; $\chi^2=4,06$); серед ПА — в 1,6 рази (P>0,05). Зникнення процесів деструкції мало місце у 47,1 % «швидких» і 38,1 % «повільних ацетиляторів» (табл. 2). При цьому, припинення процесів деструкції у ША зайняло в 1,3 разу довший час, ніж у ПА (P<0,05; CI = 2,44...31,64).

На початку і наприкінці стаціонарного лікування дисемінований туберкульоз легень спостерігався в 4 рази частіше у «швидких ацетиляторів», ніж у «повільних ацетиляторів» (P<0,05; $\chi^2=6,40$) (рис. 1). Водночас серед ПА на 22,0 % частіше спостерігався вогнищевий туберкульоз, ніж у «швидких ацетиляторів», де вогнищевий ТБ легень був відсутній взагалі (P<0,05; $\chi^2=6,40$). У результаті стаціонарного лікування явища дисемінації серед ША повністю зникли (P<0,05; $\chi^2=14,77$) і серед ПА зменшилась в 14,9 рази (P<0,05; $\chi^2=14,43$). Наприкінці стаціонарного лікування частка ША і ПА з явищами розпаду в легеневій тканині зменшилась в 3 і 2 рази відповідно (P<0,05) відносно вихідного рівня. Водночас процеси розсмоктування на моменти виписки зі стаціонару спостерігались у 84,8 % ША і 86,8 % ПА — на початку лікування ці явища були відсутні взагалі (P<0,05; $\chi^2=48,63$ і $\chi^2=81,27$ відповідно).

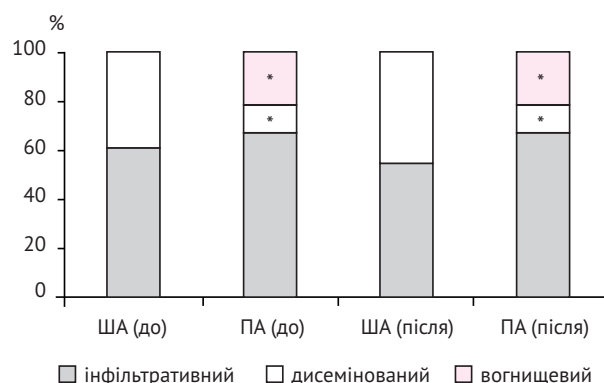


Рис. 1. Характер ураження легень з урахуванням генотипу NAT2 на початку (до) і наприкінці (після) стаціонарного лікування.

* — P<0,05 (відносно групи ША)

Таблиця 2. Припинення процесу деструкції і бактеріовиділення в залежності від генотипу NAT₂

Група хворих	Припинення процесу деструкції		Припинення бактеріовиділення за даними			
	кількість хворих (%)	тривалість (днів) ± SEM	кількість хворих (%)	тривалість (днів) ± SEM	кількість хворих (%)	тривалість (днів) ± SEM
ША, n=33	8/17 (47,1)	71,75±6,28	15/16 (93,8)	67,14±3,31	7/20 (35,0)	82,67±5,94
ПА, n=53	8/21 (38,1)	54,71±2,83*	25/25 (100)	60,08±2,65	11/32 (34,4)	67,14±3,31*

Примітка. * – P<0,05 (відносно групи ША).

За даними мікроскопії бактеріовиділення на момент виписки зі стаціонару було відсутнім у 100 % ПА і 97,0 % ША. Припинення бактеріовиділення при цьому відбулось у 93,8 % ША і 100 % ПА, тривалість конверсії для першої групи склало 60 днів, для другої – 67 днів. Згідно даних культурального методу наприкінці стаціонарного лікування бактеріовиділення спостерігалось приблизно у 40 % хворих незалежно від генотипу ацетилювання, припинення бактеріовиділення відбувалось у 35 % хворих. При цьому для ПА припинення бактеріовиділення було в 1,2 рази швидшим, ніж для ША (67 проти 82 днів, P<0,05; CI 2,25...28,81) (табл. 2).

Аналіз ефективності лікування ТБ легень, залежно від концентрації ізоніазиду в крові, проводився у декілька етапів. На першому етапі ми виокремили групу хворих, які мали субефективну концентрацію ізоніазиду через 2 год (<3 мкг/мл), 4 год (<1,5 мкг/мл), 6 год і 24 год (<0,5 мкг/мл) [329]. Але виявилось, що лише близько 20 % хворих мали субефективну концентрацію на відрізок часу 2-6 год, що ускладнило їх статистичне порівняння з хворими, які мали терапевтичну концентрацію.

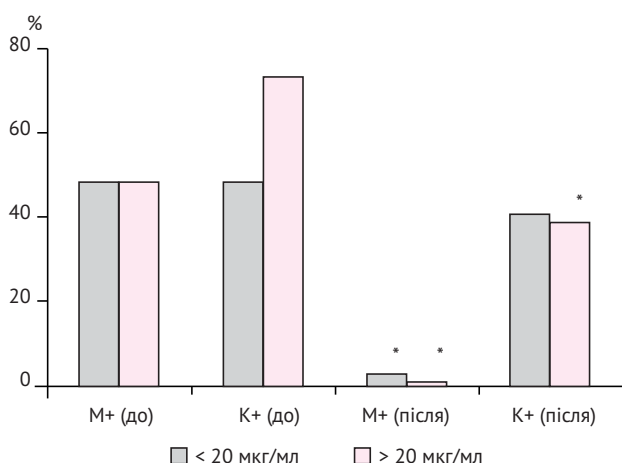


Рис. 2. Кількість хворих, які виділяли збудник туберкульозу згідно бактеріоскопії (M+) або культурального методу (K+) залежно від концентрації ізоніазиду через 4 год. після введення (< або > 2,00 мкг/мл) на початку (до) або наприкінці (після) стаціонарного лікування.

* – P<0,05 (відносно відповідної групи на початку лікування)

Тому вирішено було розділити хворих на дві групи згідно концентрації ізоніазиду порівну. Попередньо було встановлено, що найбільш наочною була різниця щодо вмісту ізоніазиду через 4 год після прийому препарату.

Відповідно до концентрації ізоніазиду через 4 год після його введення 42 хворих (48,8 %) мали концентрацію менш, ніж 2 мкг/мл (0,48-1,99 мкг/мл) (НКІ), решта – 44 хворих (51,2 %) мали концентрацію понад 2 мкг/мл (2,02-6,54 мкг/мл) (ВКІ). На початку стаціонарного лікування у хворих з НКІ дещо частіше спостерігався інфільтративний туберкульоз, ніж у хворих з ВКІ (P>0,05). Водночас в групі ВКІ у 22,7 % хворих відзначалось вогнищеве ураження легень, при цьому серед хворих з НКІ така форма взагалі була відсутня (P<0,05; $\chi^2=7,64$ при критичному значенні тут і далі $\chi^2=3,84$). На початку стаціонарного лікування за даними мікроскопії бактеріовиділення відзначалось приблизно у 47 % хворих з високою і низькою концентрацією ізоніазиду. Згідно посіву 47,6 % хворих з НКІ і 72,7 % хворих з ВКІ виділяли збудника туберкульозу (рис. 2).

Таким чином, на початку лікування хворі, які мали різну концентрацію ізоніазиду, не мали істотних відмінностей щодо важкості і особливостей перебігу ТБ легень на початку лікування. Тривалість стаціонарного лікування у хворих з високою і низькою концентрацією ізоніазиду практично не відрізнялись між собою (91,37±3,69 і 94,70±5,26 дня).

Наприкінці стаціонарного лікування явища туберкульозної деструкції легень зустрічались дещо частіше у хворих з НКІ, ніж у індивідів з ВКІ – 33,3 % проти 18,2% (P>0,05). Отже, конверсія процесів деструкції у хворих з ВКІ відбувалась в 1,6 рази частіше, ніж у хворих з НКІ – 57,9 % проти 26,3 % (P<0,05; $\chi^2=3,89$), при цьому тривалість припинення бактеріовиділення практично не відрізнялась (табл. 2). Як і на початку, так і при завершенні стаціонарного лікування у більшості хворих з ВКІ і НКІ (61,4 і 82,8 % відповідно) спостерігалась інфільтративна форма туберкульозного процесу. Серед хворих з ВКІ вогнищова форма ТБ спостерігалась у 22,7 %, водночас серед хворих з НКІ ця форма взагалі була відсутня (P<0,05; $\chi^2=7,64$).

За результатами закінчення інтенсивної фази (ІФ) лікування явища розсмоктування і ущільнення в легеневій тканині спостерігалось у 73,8 % пацієнтів з НКІ і 97,7 % пацієнтів з ВКІ (P<0,05; $\chi^2=49,13$ і $\chi^2=84,09$ відповідно). Таким чином, процеси розсмоктування при високій концентрації ізоніазиду спостерігались в 1,3 рази частіше, ніж при низькій концентрації ізоніазиду (P<0,05; $\chi^2=10,24$).

Таблиця 3. Припинення процесів деструкції і бактеріовиділення залежно від концентрації ізоніазиду

Концентрація ізоніазиду	Кількість хворих, у яких припинились процеси деструкції (%)	Припинення бактеріовиділення за даними мікроскопії			
		кільк. хворих (%)	тривалість (днів) ± SEM	кільк. хворих (%)	тривалість (днів) ± SEM
<2,00 мкг/мл, n=42	5/19 (35,7)	19/20 (95,0)	59,0±1,6	3/20 (15,0)	65,1±2,8
>2,00 мкг/мл, n=44	11/19 (57,9)*	21/21 (100)	60,9±4,0	15/32 (46,9)*	64,3±7,3

Примітка. * - $P < 0,05$ (відносно відповідної групи <2,00 мкг/мл).

За даними мікроскопії бактеріовиділення на момент виписки зі стаціонару було відсутнім у 100 % хворих з ВКІ і 97,6 % хворих з НКІ. Згідно даних культурального методу наприкінці стаціонарного лікування бактеріовиділення спостерігалось приблизно у 40 % хворих на ТБ легень незалежно від концентрації ізоніазиду. Припинення бактеріовиділення спостерігалось в 3,1 рази частіше у хворих з ВКІ, ніж в групі з НКІ (46,9 проти 15,0 %; $P < 0,05$; $\chi^2 = 5,53$). Тривалість припинення бактеріовиділення вірогідно не відрізнялась між групами і була близько 65 днів.

Таким чином, на початку лікування хворі на ТБ легень, які у подальшому мали різну концентрацію ізоніазиду, практично не відрізнялись щодо особливостей туберкульозного процесу. Наприкінці ІФ лікування у хворих з високою концентрацією ізоніазиду конверсія процесів деструкції відбувалась в 1,6 рази частіше, а процеси розсмоктування спостерігались в 1,3 рази частіше, ніж у хворих з низькою концентрацією ізоніазиду. Згідно культурального методу на момент завершення лікування припинення бактеріовиділення спостерігалось в 3,1 рази частіше у хворих з ВКІ.

З метою покращання ефективності лікування доцільною є рекомендація щодо збільшення терапевтичної дози

ізоніазиду у хворих на ТБ з генотипом «швидких ацетиляторів» принаймні до 7-8 мг/кг на добу. Контрольну групу можуть скласти носії генотипу «швидких ацетиляторів», які отримують стандартну дозу ізоніазиду (5 мг/кг) (табл.4).

Таким чином, визначення концентрації ізоніазиду через 4 год після прийому препарату може допомогти у прогнозуванні наслідків лікування ТБ і можливої корекції терапії захворювання.

Згідно даних літератури, індивідуальна корекція дози ізоніазиду відповідно до генотипу NAT₂ забезпечила покращення ефективності та зменшення токсичності протитуберкульозного лікування. Зокрема, збільшення дози ізоніазиду у носіїв генотипу «швидких ацетиляторів» до 6 мг/кг [6,14]; 7,2-7,5 мг/кг [5,9] забезпечує поліпшення ефективності лікування; збільшення дози ізоніазиду до 16-18 мг/кг у поєднанні з антимікобактеріальними препаратами II^{ого} покращує лікування хіміорезистентних форм ТБ [12,16]. Водночас, для носіїв генотипу «повільних ацетиляторів» пропонується зберігати стандартну дозу ізоніазиду 5 мг/кг [9] або зменшити її до 2-2,5 мг/кг [6,9,12,14], що дозволяє зберігати терапевтичний ефект і зменшити токсичність ізоніазиду.

Таблиця 4. Корекція дози ізоніазиду згідно генотипу NAT₂

№ КОРЕКЦІЯ ДОЗИ ІЗОНІАЗИДУ ЗГІДНО ГЕНОТИПУ NAT ₂	
1	Будь яке зниження дози ізоніазиду нижче від 6 мг/кг призводить до недостатнього вмісту Н у крові хворих на ТБ з генотипом «швидких ацетиляторів». Водночас доза 3 мг/кг забезпечує достатній вміст Н у крові хворих на ТБ з генотипом «повільних ацетиляторів».
2	Оптимальна доза Н у хворих на ТБ з генотипом «швидких ацетиляторів» становить 430 мг (7,2 мг/кг), що забезпечує AUC, однакову з «помірними ацетиляторами» при дозі 300 мг.
3	Для досягнення однакового ефекту дії Н треба стандартну дозу препарату або зменшити на 50 % (у «повільних ацетиляторів»), або підвищити на 50 % (у «швидких ацетиляторів»).
4	Використання наступних доз: 7,5 мг/кг у «швидких ацетиляторів» (NAT ₂) зменшувало ризик невдач лікування у «швидких ацетиляторів» (15 % проти 38 % при стандартній терапії); 2,5 мг/кг — у «повільних ацетиляторів» попереджало розвиток ураження печінки (нуль проти 78 % при стандартній терапії); у «помірних ацетиляторів» зберігалась доза 5 мг/кг.
5	Дозу Н у хворих на ТБ, які перебувають на гемодіалізі, слід знизити до 2,5 мг/кг
6	Зменшення дози Н (до 150 мг/добу) у «повільних ацетиляторів» згідно генотипу NAT ₂ значно зменшує ризик побічних ефектів, водночас зберігаючи достатню ефективність лікування. Навпаки, збільшення дози Н (до 1200 мг/добу) або перехід на дворазове на день (300 мг 2 рази на день) введення Н у помірних і швидких ацетиляторів забезпечує краще лікування.
7	Використання більшої дози Н (16-18 мг/кг) у поєднанні з препаратами II ^{ого} ряду в хворих на хіміорезистентний ТБ припиняло бактеріовиділення (через 6 міс. лікування) в 2,4 рази частіше, ніж при використанні звичайних доз Н, а також мали ліпші результати згідно динаміки рентгенологічного дослідження без збільшення ризику розвитку токсичності.
8	Використання Н в комплексній терапії є ефективним при наявності штамів <i>M. tuberculosis</i> з низькою ізоніазид-резистентністю (MIK від 0,2 до 5 мкг/мл)

Літературні джерела: Azuma J. et al., 2013, [8]; Cordes H. et al., 2016, [3].

Висновки. 1. Наявність делеції функціональної зони поліморфної ділянки гена $GSTM_1$ збільшує ризик низької ефективності лікування хворих на туберкульоз легень (за відсутності Ro-динаміки чи негативної Ro-динаміки) у 1,85 рази [OR = 3,55, p = 0,035] та має найнижчі шанси на часткове [OR = 0,22, p = 0,018] і повне розсмоктування вогнищевово-інфільтративних змін в легенях чи загоєння порожнини розпаду після проведеної терапії [OR = 0,15, p = 0,004], супроводжується низькою ймовірністю припинення бактеріовиділення на 60, 90 (для ВДТБ, ПРТБ) дозах [OR = 0,07, p = 0,002 і OR = 0,37, p = 0,04]; 0-генотип гена $GSTM_1$ є протективним щодо появи ВДТБ [OR = 0,37, p = 0,04 і OR = 0,22, p = 0,007]. Відсутність мутації гена $GSTM_1$ навпаки є чинником ризику ВДТБ [OR = 2,67, p = 0,033], однак при цьому підвищує шанси на позитивну Ro-динаміку під впливом лікування із розсмоктуванням (повним / частковим) вогнищевово-інфільтративних змін, чи загоєнням порожнини розпаду (у 1,39 і 1,44 рази [OR = 4,50, p = 0,009 і OR = 6,75, p = 0,002, відповідно]), підвищує ймовірність припинення бактеріовиділення вже на 60 дозі у 1,5 рази [OR = 14,06, p = 0,005].

Літературні джерела

1. Тодоріко ЛД. Алейний стан генів біотрансформації ксенобіотиків глутатіон-S-трансферази класів T1 ($GSTM1$) та M1 ($GSTM1$) у хворих на туберкульоз легень. Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. 2016; (2):73-8.
2. Шендерова РИ. Определение активного тубазида в сыворотке крови методом Вилленберга. Лабораторное дело. 1975;(2):114-6.
3. Azuma J, Ohno M, Kubota R, Yokota S, et al. NAT2 genotype guided regimen reduces isoniazid-induced liver injury and early treatment failure in the 6-month four-drug standard treatment of tuberculosis: a randomized controlled trial for pharmacogenetics-based therapy. Eur J Clin Pharmacol. 2013;69(5):1091-101.
4. Çelîk SK, Aras N, Yildirim Ö, et al. Glutathione-S-transferase $GSTM1$ null genotype may be associated with susceptibility to age-related cataract. Adv Clin Exp Med. 2015;24(1):113-9.
5. Cordes H, Thiel C, Aschmann HE, Baier V. Physiologically Based Pharmacokinetic Model of Isoniazid and Its Application in Individualizing Tuberculosis Chemotherapy. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(10): 6134-45.
6. Donald PR, Parkin DP, Seifart HI, Schaaf HS, et al. The influence of dose and N-acetyltransferase-2 ($NAT2$) genotype and phenotype on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of isoniazid. Eur J Clin Pharmacol. 2007;63(7):633-9.
7. Gupta VH, Singh M, Amarapurkar DN, et al. Association of GST null genotypes with anti-tuberculosis drug induced hepatotoxicity in Western Indian population. Ann Hepatol. 2013;12(6):959-65.
8. He L, Gao L, Shi Z, Li Y, Zhu L, Li S, et al. 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).

2. На початку лікування хворі на ТБ легень, які у подальшому мали різну концентрацію ізоніазиду, практично не відрізнялись щодо особливостей туберкульозного процесу. Наприкінці ІФ лікування у хворих з високою концентрацією ізоніазиду конверсія процесів деструкції відбувалась в 1,6 рази частіше, а процеси розсмоктування спостерігались в 1,3 рази частіше, ніж у хворих з низькою концентрацією ізоніазиду. Згідно культурального методу на момент завершення лікування припинення бактеріовиділення спостерігалось в 3,1 рази частіше у хворих з ВКІ.

3. Визначення концентрації ізоніазиду через 4 год після прийому препарату може допомогти у прогнозуванні наслідків лікування ТБ і можливої корекції терапії захворювання.

4. З метою покращення ефективності лікування доцільною є рекомендація щодо збільшення терапевтичної дози ізоніазиду у хворих на ТБ з генотипом «швидких ацетиляторів» принаймні до 7-8 мг/кг на добу та застосування парентерального шляху введення препарату.

9. Kabbaj D, Aatif M, Moussa LA, Khassouani CE, et al. Measurement of plasma levels of isoniazid for dose adjustment in the hemodialysis patients. Saudi J Kidney Dis Transpl. 2009;20:666-7.
10. Kasthurinaidu SP, Ramasamy T, Ayyavoo J, et al. GST M1-T1 null allele frequency patterns in geographically assorted human populations: a phylogenetic approach. PLoS One. 2015;10(4): 23-7.
11. Li C, Long J, Hu X, Zhou Y. $GSTM1$ and $GSTT1$ genetic polymorphisms and risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity: an updated meta-analysis. European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2013;32(7):859-68.
12. Ramachandran G, Swaminathan S. Role of pharmacogenomics in the treatment of tuberculosis: a review Pharmacogenomics and Personalized Medicine. 2012;(5):89-98.
13. Tang SW, Lv XZ, Zhang Y, et al. CYP2E1, $GSTM1$ and $GSTT1$ genetic polymorphisms and susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: a nested case-control study. J Clin Pharm Ther. 2012;37(5): 588-93.
14. Teixeira RL, Morato RG, Cabello PH, et al. Genetic polymorphisms of $NAT2$, CYP2E1 and GST enzymes and the occurrence of antituberculosis drug-induced hepatitis in Brazilian TB patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(6):716-24.
15. Todoriko L. Analysis of the $GSTM1$ gene polymorphism in patients with tuberculosis with regard to the version of MBT resistance. Science and Education a New Dimension. Natural and Technical Sciences. 2016;83(IV-9): 61-3.
16. Um SW, Lee SW, Kwon SY, Yoon HI, et al. Low serum concentrations of anti-tuberculosis drugs and determinants of their serum levels. Int J Tuberc Lung Dis. 2007;11(9): 972-8.

КОНТАКТНА ІНФОРМАЦІЯ / CORRESPONDENCE TO:

Тодоріко Лілія Дмитрівна

ВДНЗ «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці, завідувачка кафедри фтизіатрії та пульмонології.

Д. мед. н., професор
pulmonology@bsmu.edu.ua

Todoriko L. D.

Bukovynsky State Medical University,
pulmonology@bsmu.edu.ua