УДК 616.24-002.5-092:575.174.0153

Ю. І. Бажора, д-р мед. наук, проф.,
О. О. Сметюк

ЗВ'ЯЗОК ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ *GST* ТА *NAT2* З ТИПОМ ПЕРЕБІГУ ТУБЕРКУЛЬОЗНОГО ПРОЦЕСУ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 616.24-002.5-092:575.174.0153
Ю. И. Бажора, О. О. Сметюк
СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ *GST* И *NAT2* С ТИПОМ ТЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРОЦЕССА
Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

В работе были определены частоты null-аллелей *GSTM1, GSTT1* и полиморфизм генов *NAT2 (2*4, 2*5, 2*6, 2*7)* у больных туберкулезом легких. Присутствие null-аллеля *GSTM1* ассоциируется с хронизацией туберкулезного процесса. Процентный вклад медленных ацетиляторов в группе больных туберкулезом легких достоверно выше по сравнению с группой здоровых лиц. Доля полиморфного варианта *NAT2*2*6* в группе больных впервые диагностированным туберкулезом легких значительно выше (p<0,01) таковой в группе здоровых лиц.
Ключевые слова: глутатион-S-трансфераза, *GSTM1*, *GSTT1*, ариламин-N-ацетилтрансферазы 2, *NAT2,* генный полиморфизм, мультиплексная полимеразная цепная реакция.

UDC 616.24-002.5-092:575.174.0153
Yu. I. Bazhora, O. O. Smetyuk
ASSOCIATION OF *GST* TA *NAT2* WITH THE TUBERCULOSIS PROCESS COURSE TYPE
The Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

The work expounds the frequency of null-alleles of *GSTM1, GSTT1* gene polymorphisms and *NAT2 (2*4, 2*5, 2*6, 2*7)* in patients suffering from pulmonary tuberculosis. The presence of GSTM1 null-allele is associated with chronicity of tuberculosis process. Percentage contribution of slow acetylators in the group of patients with pulmonary tuberculosis is significantly higher as compared with the group of healthy individuals. Rate of polymorphic variant *NAT2*2*6* in the group of patients with first diagnosed pulmonary tuberculosis is significantly higher (p<0.01) as compared with healthy individuals.
Key words: glutathione-S-transferase, *GSTM1*, *GSTT1*, *NAT2,* gene polymorphism, multiplex polymerase chain reaction.

Одним з основних принципів антибактеріальної терапії туберкульозу є тривалий і безперервний прийом протитуберкульозних препаратів (ПТП), що обумовлює підвищення токсичного впливу метаболітів ПТП. Ступінь вираженості гепато- та нефротоксичності значною мірою обумовлена індивідуальним поліморфізмом хворого за генами біотрансформації ксенобіотиків.

Печінка, нирки та легені містять такі важливі ензими I і II фаз метаболізму як глутатіон-S-трансферази, ариламін-N-ацетилтрансферази 2, сульфотрансферази, епоксидгідролази та ін. [1]. Важливу роль відіграють ферменти суперсімейства глутатіон-S-трансфераз (GST), а також ариламін-N-ацетилтрансферази 2 (NAT2).

Багатофункціональне суперсімейство глутатіон-S-трансфераз, включно глутатіон-S-трансфераза-μ (*GSTM1*) та глутатіон-S-трансфераза-θ (*GSTT1*) з притаманним їм генетичним поліморфізмом [2], відіграє суттєву роль у забезпеченні резистентності клітин до перекисного окиснення ліпідів, вільних радикалів, алкілуванні білків; метаболізмі великої групи ксенобіотиків, до якої входять хіміотерапевтичні препарати [3]. За результатами багатьох досліджень, поліморфізм глутатіон-S-трансфераз, зокрема, гомозиготних делецій (null-алель) *GSTM1* і *GSTT1*, є однією з причин чутливості до шкідливої дії факторів довкілля і розвитку онкологічних захворювань, ураження легеневої системи та порушень у системі «мати-плацента-плід» [4–8].

Відомо, що NAT2 бере участь у метаболізмі ліків, у тому числі при взаємодії лікарських препаратів. Залежно від варіантів активності гена *NAT2* усіх людей можна розділити на повільних і швидких ацетиляторів. Приблизно 50 % європеоїдів є повільними ацетиляторами, у російській популяції швидкі ацетилятори становлять 37,8 %, повільні — 62,2 % [9], але наявність різних типів ацетиляторів різна залежно від географічного регіону й етнічної групи [10].

Відмічений вплив поліморфізму за генами *GST* і *NAT2* на наявність ускладнень під час лікування туберкульозу. В азіатських популяціях *GSTM1*-null генотип асоційований з підвищеним ризиком гепатотоксичного ефекту протитуберкульозних препаратів, проте для *GSTT1*-null генотипу подібний ефект не виявлений [10]. Проведені дослідження показали, що гідразин, який утворюється внаслідок гідролізації ізоніазиду, має тенденцію до нагромадження власне у хворих з *GSTM1*-null генотипом [11], та моноацетилгідразин, що накопичується у повільних ацетиляторів із наявністю алелів *NAT2*2*5* та *NAT2*2*6* [12], можуть призвести до нефро- та гепатотоксичності. Повільні ацети-

лятори не можуть в потрібній мірі знешкодити відкриті аміногрупи молекул ПТП та їхніх метаболітів, що дуже легко зв'язуються з клітинною мембраною, запускаючи тим самим процес загибелі клітини [13]. Тим же часом, дослідження асоціації серед осіб європеоїдної раси виявили підвищену частоту гепатотоксичних ускладнень у хворих на легеневий туберкульоз із *GSTT1*-null генотипом, а в разі делеції гена *GSTM1* подібний ефект не спостерігався [14]. Показано, що повільні ацетилятори, ідентифіковані на підставі оцінок як генетичного, так і фенотипічного поліморфізму NAT2, більш схильні до гепатотоксичності порівняно зі швидкими ацетиляторами, що проявляється більш вираженим підвищенням активності трансаміназ [15].

Метою роботи було визначення частоти null-алелей глутатіон-S-трансферази-μ, глутатіон-S-трансферази-θ та поліморфізму генів *NAT2 (2*4, 2*5, 2*6, 2*7)* у хворих на легеневий туберкульоз, асоціації між генотипом *NAT2* та фенотипом ацетилування у хворих на легеневий туберкульоз під час лікування ПТП.

Матеріали та методи дослідження

Обстежено 126 хворих на вперше діагностований туберкульоз (ВДТБ) легень і хворих на хронічний туберкульоз (ХТБ) легень, що звернулися до Одеського обласного туберкульозного диспансеру, у яких виділено ДНК лейкоцитів периферійної крові за допомогою реагентів комерційного набору «ДНК-сорб-Б» («Амплисенс», Москва). У 36 здорових осіб (контрольна група) ДНК зскрібків букального епітелію виділяли за допомогою реагентів комерційного набору «ДНК-сорб-А» («Амплисенс», Москва).

Визначення поліморфізму *GSTM1* і *GSTT1* за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) проведено згідно з протоколом для одномоментного аналізу поліморфізму за M. Arand et al. (1996) [16]. Поліморфізм генів *NAT2 (2*4, 2*5, 2*6, 2*7)* визначали за допомогою ПЛР за Nigel K. Spurr et al. (1995) [17]. Реакцію ампліфікації було проведено на ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-технология», Москва) з використанням локусспецифічних олігонуклеотидних праймерів («Литех», Москва). Аналіз продуктів ПЛР проведено шляхом електрофорезу в 1%-му агарозному гелі з подальшим забарвленням етидиумбромідом і візуалізацією в УФ-світлі. Фенотип за *NAT2* визначався через 5 год після одноразового перорального прийому сульфадимезину (субстрату NAT2) у пробах сечі методом спектрофотометрії вимірюванням оптичної густини при довжині хвилі 490 нм.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням критерію Стьюдента (коефіцієнта вірогідності) та критерію Пірсона (критерій відповідності).

Результати дослідження та їх обговорення

Відсотковий розподіл генного поліморфізму в контрольній групі та групі хворих на туберкульоз легень відповідає частоті нуль-алелів, встановленої для європеоїдної раси, для *GSTM1* — 40–45 % і для *GSTT1* — 15–25 % [1]. Частота поліморфізму гена *GSTT1* у хворих на легеневий туберкульоз не відрізнялася від групи контролю та не залежала від типу туберкульозного процесу (табл. 1).

Частота делеції *GSTM1* у групі хворих на легеневий туберкульоз та у хворих на ВДТБ легень не відрізнялася від групи контролю. Частота null-алеля *GSTM1* у групі хворих на ХТБ вірогідно відрізняється від показників у групах контролю та хворих на ВДТБ легень (71,4 %; $p<0,05$ проти 44,4 та 32,6 % відповідно).

Відсотковий розподіл частоти алелів у контрольній групі та групі хворих на туберкульоз легень відповідає частоті алелів, встановленій для європеоїдної раси: *NAT2*2*4* — 20–25 %; *NAT2*2*5* — 32–37 %; *NAT2*2*6* — 28–32 %; *NAT2*2*7* — 0–5 % [18] (табл. 2).

Частота алеля *NAT2*2*4* суттєво нижча (10,6 і 6,3 % відповідно, $p<0,01$, проти 29,2 %) у загальній групі хворих і групі хворих на ВДТБ легень проти контрольної групи. У свою чергу, відсотковий внесок алеля *NAT2*2*4* у групі хворих на ХТБ легень вірогідно вищий (23,7 %, $p<0,05$; проти 6,3 %), ніж у групі хворих на ВДТБ легень.

Таблиця 1

Частота поліморфізму генів *GSTT1* та *GSTM1* у хворих на легеневий туберкульоз

Делеція гена	Частота мутації в обстежуваних групах							
	Контрольна група, n=36	Хворі на туберкульоз легень, n=126	P_1	Хворі на ВДТБ легень, n=98	P_1	Хворі на ХТБ легень, n=28	P_1	P_2
del *GSTT1*	9 (25 %)	30 (23,8 %)	0,88	24 (24,5 %)	0,52	6 (21,4 %)	0,52	0,73
del *GSTM1*	16 (44,4 %)	52 (41,3 %)	0,49	32 (32,6 %)	0,76	20 (71,4 %)	0,03	0,02
del обох генів	5 (13,8 %)	14 (11,1 %)	0,87	10 (10,2 %)	0,73	4 (14,2 %)	0,73	0,54

Примітка. У табл. 1–4: P_1 — рівень значущості; статистичний критерій для порівняння групи хворих і групи контролю; P_2 — рівень значущості; статистичний критерій для порівняння групи хворих на ХТБ легень і групи хворих на ВДТБ легень.

Таблиця 2

Частота алельного поліморфізму за *NAT2* у хворих на туберкульоз

Алель	Частота мутації в обстежуваних групах							
	Контрольна група, n=36	Хворі на туберкульоз легень, n=75	P_1	Хворі на ВДТБ легень, n=56	P_1	Хворі на ХТБ легень, n=19	P_1	P_2
*NAT2*2*4*	21 (29,2 %)	16 (10,6 %)	0,001	7 (6,3 %)	0,003	9 (23,7 %)	0,6	0,04
*NAT2*2*5*	32 (44,4 %)	68 (45,3 %)	0,9	46 (41,1 %)	0,8	22 (57,9 %)	0,3	0,2
*NAT2*2*6*	19 (26,4 %)	64 (42,6 %)	0,1	58 (51,8 %)	0,02	6 (15,8 %)	0,4	0,008
*NAT2*2*7*	0 (0 %)	2 (1,3 %)	0,5	1 (0,9 %)	0,6	1 (2,6 %)	0,3	0,5

Частка поліморфного варіанта *NAT2*2*6* у групі хворих на ВДТБ легень вірогідно відрізняється (51,8 %, p<0,05; проти 26,4 %) від групи контролю та суттєво вища (p<0,01) у хворих на ВДТБ легень (51,8 %) проти групи хворих на ХТБ легень (15,8 %).

Частота гомозигот за алелем дикого типу *NAT2*2*4* (швидкі ацетилятори) в загальній групі хворих на легеневий туберкульоз і групі хворих на ВДТБ легень вірогідно нижча від групи контролю (6,7 і 5,4 % відповідно проти 22,2 %, p<0,05) (табл. 3).

Визначено, що гомозигот за *NAT2*2*5/*2*5, 2*6/2*6, 2*7/2*7* вірогідно більше серед хворих на ХТБ легень і в загальній групі хворих на легеневий туберкульоз порівняно з групою контролю (68,4 і 58,6 % відповідно проти 36,1 %, p<0,05).

Розподіл обстежених за фенотипом *NAT2* (швидкі та повільні ацетилятори) в дослідних групах збігається з розподілом поліморфізму генів *NAT2* (табл. 4). Швидких ацетиляторів у загальній групі хворих на легеневий туберкульоз і групі хворих на ВДТБ легень вірогідно менше, ніж у групі контролю (6,7 і 5,4 % відповідно проти 22,2 %, p<0,05).

У загальній групі хворих на легеневий туберкульоз і групі хворих на ВДТБ легень повільних ацетиляторів вірогідно більше, ніж у групі контролю (93,3 і 94,4 % відповідно проти 77,8 %, p<0,05).

Висновки

1. Збільшення частоти null-алеля *GSTM1* у групі хворих на ХТБ легень свідчить про наявність асоціації між мутацією та хронізацією туберкульозного процесу.

2. Висока частка поліморфних варіантів *NAT2*2*6* та *NAT2*2*6* у групі хворих на легеневий туберкульоз вказує на можливий вплив низької швидкості ацетилування патогенних

Таблиця 3

Частота поліморфних варіантів генотипу за *NAT2* у хворих на туберкульоз

Генотип	Частота мутації в обстежуваних групах							
	Контрольна група, n=36	Хворі на туберкульоз легень, n=75	P_1	Хворі на ВДТБ легень, n=56	P_1	Хворі на ХТБ легень, n=19	P_1	P_2
*NAT2*2*4/2*4*	8 (22,2 %)	5 (6,7 %)	0,02	3 (5,4 %)	0,02	2 (10,5 %)	0,28	0,4
NAT2 гетерозиготи	15 (41,7 %)	26 (34,7 %)	0,47	22 (39,3 %)	0,82	4 (21,1 %)	0,1	0,15
*NAT2*2*5/*2*5, 2*6/2*6,2*7/2*7*	13 (36,1 %)	44 (58,6 %)	0,03	31 (55,3 %)	0,07	13 (68,4 %)	0,02	0,53

Таблиця 4

Частота фенотипу ацетилування у хворих на туберкульоз

Фенотип	Частота фенотипу в обстежуваних групах							
	Контрольна група, n=36	Хворі на туберкульоз легень, n=75	P_1	Хворі на ВДТБ легень, n=56	P_1	Хворі на ХТБ легень, n=19	P_1	P_2
Швидкі ацетилятори, (12,0±1,8) мг/мл	8 (22,2 %)	5 (6,7 %)	0,02	3 (5,4 %)	0,02	2 (10,5 %)	0,3	0,4
Повільні ацетилятори, (33,0±7,9) мг/мл	28 (77,8 %)	70 (93,3 %)	0,02	53 (94,6 %)	0,02	17 (89,5 %)	0,3	0,4

факторів зовнішнього середовища на захворюваність туберкульозом легень.

3. Серед хворих на легеневий туберкульоз повільних ацетиляторів вірогідно більше, ніж у групі здорових осіб, що може мати негативні наслідки токсичної дії ліків при тривалій протитуберкульозній терапії.

4. Фенотип ацетилування у хворих на легеневий туберкульоз, які отримують ПТП, відповідає генотипам за *NAT2*.

У подальших дослідженнях перспективним має бути вивчення впливу поліморфізму генів ферментів детоксикації ксенобіотиків на функції нирок у хворих на легеневий туберкульоз.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Райс Р. Х.* Биологические эффекты токсических соединений : курс лекций [Электронный ресурс] / Р. Х. Райс, Л. Ф. Гуляева. – Новосибирск, 2003. – Режим доступа : http://toxicology.narod.ru/book.html

2. *On-line* Mendelian inheritance in man [Электронный ресурс]. – Режим доступа : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

3. *Ассоциация* полиморфных генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с предрасположенностью к бронхиальной астме у детей с наследственной отягощенностью и без таковой / В. А. Вавилин, С. И. Макарова, В. В. Ляхович, С. М. Гавалов // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 4. – С. 539–545.

4. *Фетисова И. Н.* Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз в семьях с первичным бесплодием / И. Н. Фетисова // Медицинская генетика. – 2006. – Т. 5, № 11 (53). – С. 31–34.

5. *Glutathione S-transferase* GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and colorectal cancer risk: a prospective study / D. M. Gertig, M. Stampfer, C. Haiman [et al.] // Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. – 1998. – Vol. 7. – P. 1001–1005.

6. *Pooled* analysis and meta-analysis of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer / L. S. Engel, E. Taioli, R. Pfeiffer [et al.] // A HuGE review. Am. J. Epidemiol. – 2002. – Vol. 156. – P. 95–109.

7. *The Glutathione* S-transferase M1 Genotype in Ovarian Cancer / Thomas A. Lallas, Sarah K. McClain, Mark S. Shahin [et al.] // Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. – 2000. –Vol. 9. – P. 587–590.

8. *Glutathione S*-transferase mu locus: use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility / S. Zhong, A. F. Howie, B. Ketterer [et al.] // Carcinogenesis. – 1991. – Vol. 12. – P. 1533–1537.

9. *Molecular* genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. / D. W. Hein, M. A. Doll, A. J. Fretland [et al.] // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2000. – Vol. 9. – P. 29–42.

10. *Genotyping* of *N*-Acetyltransferase2 polymorphism in the prediction of adverse drug reaction to Isoniazid in Japanese patients / M. Hiratsuka, Y. Kishikawa, I. Takekuma [et al.] // Drug Metabol. Pharmacokin. – 2002. – Vol. 17, N 4. – P. 357–362.

11. *Increased* risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in individuals with glutathione S-transferase M1 'null' mutation / B. Roy, A. Chowdhury, S. Kundu [et al.] // J. Gastroenterol Hepatol. – 2001. –Vol. 16, N 9. – P. 1033–1037.

12. *Huang Y. S.* Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and the susceptibility to antituberculosis drug-induced liver injury / Y. S. Huang // Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol. – 2007. – Vol. 3, N 1. – P. 1–8.

13. *Drug-metabolising* enzyme polymorphisms and predisposition to anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis / F. Sun, Y. Chen, Y. Xiang [et al.] // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. – 2008. – Vol. 12, N 9. – P. 994–1002.

14. *Influence* of glutathione S-transferase M1 and T1 homozygous null mutations on the risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in a Caucasian population / V. Leiro, A. Fernandez-Villar, D. Valverde [et al.] // Liver Int. – 2008. – Vol. 28, N 6. – P. 835–839.

15. *Effects* of N-acetyltransferase 2 , NAT2), CYP2E1 and Glutathione-S-transferase (GST) genotypes on the serum concentrations of isoniazid and metabolites in tuberculosis patients / K. Fukino, Y. Sasaki, S. Hirai [et al.] // J. Toxicol. Sci. – 2008. – Vol. 33, N 2. – P. 187–195.

16. *A Multiplex* Polymerase Chain Reaction Protocol for the Simultaneous Analysis of the Glutathione-S-Transferase GSTM1 and GSTT1 Polymorphisms / M. Arand, R. Muhlbauer, J. Hengstler [et al.] // Analytical biochemistry. – 1996. – Vol. 236. – P. 184–186.

17. *Polymorphisms* in Drug-Metabolizing Enzymes as Modifiers of Cancer Risk / Nigel K. Spurr, Alan C. Gough, Francis I. Chinegwundoh [et al.] // Clinical chemistry. – Vol. 41, N 12. – 1995. – P. 1864–1869.

18. *Possible* involvement of arylamine N-acetyltransferase 2, Glutathione S-transferase M1 and T1 genes in the development of endjmetriosis / H. Baranova, M. Canis, T. Ivaschenko [et al.] // Molecular Human Reproduction. – 1999. – Vol. 5, N 7. – P. 636–641.

Передплачуйте і читайте журнал

ІНТЕГРАТИВНА АНТРОПОЛОГІЯ

Передплата приймається у будь-якому передплатному пункті

Передплатний індекс 08210

У ВИПУСКАХ ЖУРНАЛУ:

- Методологія інтегративних процесів
- Генетичні аспекти біології та медицини
- Патологічні стани і сучасні технології
- Філософські проблеми геронтології та геріатрії
- Дискусії