

ЧАСТОТА РАЗВИТИЯ ГЕПАТОТОКСИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ С ПРИМЕНЕНИЕМ ГЕПАТОПРОТЕКТИВНОЙ ТЕРАПИИ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Казаков А.В.^{1,4}, Аксенова В.А.^{1,4}, Смердин С.В.³, Можокина Г.Н.¹, Матвеев А.В.²

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» МЗ РФ, Москва, e-mail: alexeykazakov1982@yandex.ru;

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Центр крови, Москва;

³ГБУЗ МО Московский областной противотуберкулезный диспансер, Москва;

⁴ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Институт клинической медицины им. Н.В. Склифосовского, Москва

Цель исследования: оценить частоту развития гепатотоксических реакций при проведении гепатопротективной терапии по результатам генетического исследования SNPs rs1799931, rs1799930 и rs1041983 гена N-ацетилтрансферазы2 (NAT2). В исследовании приняли участие 147 пациентов в возрасте от 5 до 60 лет. В основной группе у 71 пациента проводили профилактику гепатотоксических реакций с учетом генетического исследования, а 76 пациентов (у которых профилактика гепатотоксических реакций проводилась без учета генетического обследования) составили контрольную группу. Основой схемы лечения у пациентов обеих групп были препараты изониазид в дозе 10 мг/кг/сут и рифампицин в дозе 10 мг/кг/сут. В качестве предикторов нежелательных побочных реакций (НПР) по гепатотоксическому типу, которые могут возникнуть при применении указанных противотуберкулезных препаратов первого ряда у больных туберкулезом, мы рассматривали наличие SNPs (олигонуклеотидных последовательностей) AA rs1799931 и SNPs AA и AG rs1799930, которые представляют ген NAT2, а также TT или CT SNPs rs1041983 гена NAT2. Пациентам, имеющим указанные типы мутаций в генах NAT2, в качестве профилактики назначались гепатопротекторы (урсодезоксихолиевая кислота) в дозе 10 мг/кг/сут (максимальная суточная доза – 750 мг). При проведении противотуберкулезной терапии впервые выявленных больных туберкулезом с применением противотуберкулезных препаратов первого ряда (изониазид, рифампицин, пиразинамид) могут возникать НПР по гепатотоксическому типу, что часто требует отмены рифампицина и (или) изониазида. Использование в качестве предикторов НПР по гепатотоксическому типу наличия SNPs AA rs1799931 и SNPs AA и AG rs1799930, а также присутствие SNPs TT или CT rs1041983, определяющих активность фермента NAT2, статистически значимо снижает частоту развития НПР по гепатотоксическому типу при приеме противотуберкулезных препаратов.

Ключевые слова: туберкулез, противотуберкулезные препараты, ферменты биотрансформации, полиморфизм генов, гепатотоксические реакции, факторы риска.

FREQUENCY OF DEVELOPMENT OF HEPATOTOXIC REACTIONS IN TREATMENT OF PATIENTS WITH TUBERCULOSIS USING HEPATOPROTECTIVE THERAPY BY RESULTS OF GENETIC RESEARCH

Kazakov A.V.¹, Aksenova V.A.¹, Smerdin S.V.³, Mozhokina G.N.¹, Matveev A.V.²

¹ Federal State Budgetary Institution Scientific Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, e-mail: alexeykazakov1982@yandex.ru;

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Blood Center, Moscow;

³ GBUZ MO Moscow Regional Tuberculosis Dispensary, Moscow;

⁴ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Institute of Clinical Medicine N.V. Sklifosovsky, Moscow

Objective: to evaluate the incidence of hepatotoxic reactions during hepatoprotective therapy according to the results of a genetic study of SNPs rs1799931, rs1799930 and rs1041983 of the NAT2 gene. The study involved 147 patients aged 5 to 60 years. The main group consisted of 71 patients (in whom the prevention of hepatotoxic reactions was carried out taking into account the genetic study), and 76 patients (in whom the prevention of hepatotoxic reactions was carried out without taking into account the genetic examination) made up the control group. The basis of the treatment regimen in patients of both groups were isoniazid (10 mg / kg / day) and rifampicin (10 mg / kg / day). As a predictor of hepatotoxicity when taking the first-line anti-tuberculosis complex in tuberculosis patients, we examined the presence of SNPs (oligonucleotide sequences) AA rs1799931 of the NAT2 gene and SNPs AA and AG rs1799930 of the NAT2 gene, as well as the presence of TT or CT19 SN19 r

mutations SNp83 the *NAT2* gene. For patients with these types of mutations in the *NAT2* genes, hepatoprotectors (ursodeoxycholic acid) at a dose of 10 mg / kg / day (maximum daily dose of 750 mg) were prescribed as prophylaxis. Treatment of newly diagnosed patients with tuberculosis using first-line anti-TB drugs (isoniazid, rifampicin, pyrazinamide) may be accompanied by the occurrence of hepatotoxic reactions, which often requires the withdrawal of rifampicin and (or) isoniazid. The use of SNPs AA rs1799931 and SNPs AA and AG rs1799930, as well as the presence of SNPs TT or CT rs1041983, which determine the activity of the *NAT2* enzyme, statistically significantly reduce the frequency of the *NAT2* enzyme, which is used to assess the risk of developing hepatotoxic reactions when taking a complex of first-line anti-tuberculosis drugs in tuberculosis patients as predictors of hepatotoxicity the development of hepatotoxic adverse reactions when taking anti-TB drugs.

Keywords: tuberculosis, anti-TB drugs, biotransformation enzymes, gene polymorphism, hepatotoxic reactions, risk factors.

В последние годы в Российской Федерации показатели эффективности противотуберкулезного лечения остаются недостаточно высокими: эффективность курса противотуберкулезной терапии у впервые выявленных больных туберкулезом пациентов без наличия множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) микобактерий туберкулеза (МБТ) отмечалось в 2009 г. – 72,4%; в 2016 г. – 74,3%; в 2017 г. – 71,9% среди всех пролеченных по первому, второму и третьему режимам химиотерапии [1]. При этом рекомендуемая эффективность лечения должна составлять не менее 85% [2]. К объективным причинам снижения эффективности лечения можно отнести возникновение нежелательных побочных реакций (НПР) по гепатотоксическому типу при применении противотуберкулезных препаратов (ПТП) [3].

Во время проведения лечения у впервые выявленных больных туберкулезом без МЛУ используются ПТП основного ряда, такие как изониазид и рифампицин, при применении которых по-прежнему можно достигнуть наилучшего эффекта в лечении пациентов при отсутствии МЛУ у возбудителя туберкулеза. Изониазид может вызывать такие неблагоприятные побочные реакции, как диспепсические расстройства, аллергические, нейротоксические и гепатотоксические реакции [4]. Поражение печени является наиболее распространенной из неблагоприятных побочных реакций на изониазид, так как именно в ней происходят процессы биотрансформации и обезвреживания большинства лекарственных препаратов [5]. Иногда НПР по гепатотоксическому типу при их тяжелом течении могут стать причиной смерти пациентов [6]. При развитии НПР по гепатотоксическому типу противотуберкулезная терапия приостанавливается до устранения НПР, в качестве средств патогенетической терапии назначаются эссенциальные фосфолипиды, орнитин, препараты янтарной кислоты, урсодезоксихолиевой кислоты и др. [7]. В дальнейшем возобновление приема изониазида и рифампицина возможно только под «прикрытием» гепатопротекторами и под контролем уровня aminotransferases. Таким образом, во время, которое требуется на ликвидацию НПР по гепатотоксическому типу, противотуберкулезные препараты пациентом не принимаются, а это способствует увеличению риска развития МЛУ МБТ.

Риск развития гепатотоксических побочных реакций на изониазид связан не только с генетическими, но и с приобретенными факторами, к которым можно отнести сопутствующую патологию печени, злоупотребление алкоголем, прием наркотиков и др. Тем не менее несомненна роль генетических факторов, которые изначально определяют активность процессов, участвующих в полноценной биотрансформации изониазида [6].

N-ацетилтрансфераза 2-го типа (NAT2) остается главным ферментом, ответственным за метаболизм и инактивацию изониазида в организме человека. Этот фермент катализирует перенос ацетильной группы от кофактора ацетил-коэнзима А (ацетил-КоА) к концевому азоту препарата. NAT2 кодируется геном *NAT2*, и в многочисленных генетических исследованиях было показано, что различные варианты гена *NAT2* были непосредственно связаны с появлением различных фенотипов ацетилирования [6].

Гены *NAT2* являются полиморфными, и олигонуклеотидный полиморфизм (SNPs) может привести к изменению активности этого фермента, что является генетической основой для объяснения таких фенотипических особенностей, как наличие так называемых быстрых, промежуточных и медленных ацетиляторов [6].

Наличие полиморфизмов в гене *NAT2* может быть определено с помощью процедур генотипирования, таких как ПЦР, аллельспецифическая ПЦР, или прямого секвенирования. Многочисленные исследования показали, что частота встречаемости различных типов ацетилирования в этнически различных популяциях неодинакова. В азиатской и южноамериканской популяциях фенотип «быстрых» ацетиляторов встречается чаще, тогда как в европейской на долю «медленных» ацетиляторов приходится до 50% исследуемой популяции [6].

В течение длительного времени применение изониазида объясняло наибольшее количество НПР по гепатотоксическому типу при лечении пациентов противотуберкулезными препаратами. Во многих исследованиях была выявлена связь между приемом изониазида на фоне определенного фенотипа ацетилирования и частотой развития НПР по гепатотоксическому типу. В некоторых исследованиях медленный фенотип ацетилирования рассматривался как причина повышенного риска НПР по гепатотоксическому типу. В других исследованиях наблюдалось отсутствие связи между фенотипом ацетилирования и НПР по гепатотоксическому типу при лечении больных туберкулезом, а в некоторых работах полученные результаты свидетельствуют о том, что именно при наличии фенотипов, определяющих быстрые механизмы ацетиляции, наиболее часто развиваются такие НПР. Разница в полученных результатах этих исследований, наиболее вероятно, объясняется использованием различных методов генотипирования в различных популяциях. Например, ферментативный метод, использованный в некоторых

исследованиях, может быть недостаточно точным. Также некоторые исследователи используют небольшое количество SNPs для определения предполагаемого типа ацетилирования у пациентов. Так как в различных популяциях были выявлены неодинаковые SNPs гена *NAT2*, а в некоторых исследованиях также выявились новые мутации, влияющие на активность ферментов *NAT2*, целесообразно проводить поиск связей между генотипом и фенотипом ацетилирования в конкретной исследуемой популяции. В ином случае можно получить неверные результаты о соотношении быстрых и медленных ацетиляторов, а также ошибочные корреляции при их интерпретации. Тем не менее в большинстве исследований получена информация о том, что частота развития НПП по гепатотоксическому типу, которые могут возникнуть при применении изониазида, была значительно выше при наличии медленного фенотипа ацетилирования, в отличие от быстрого или промежуточного фенотипов. Таким образом, показано, что наличие определенного фенотипа ацетилирования может являться фактором риска развития НПП по гепатотоксическому типу при приеме противотуберкулезных препаратов, в частности изониазида. Также имеются результаты метаанализа данных 14 исследований за период 2000–2011 гг., в котором предпринята попытка решить проблему недостаточной статистической мощности на основе накопленных данных из небольших по объему выборок в различных популяциях (в основном азиатских). В результате было показано, что наличие у больных туберкулезом медленного генотипа ацетилирования способствует более высокому риску развития НПП по гепатотоксическому типу, чем у пациентов, имеющих быстрый или промежуточный генотип ацетилирования [8].

Следует отметить, что указанные выше исследования выполнялись в популяциях Африки, Южной Америки и Азии. Таких масштабных исследований на европейской популяции, в том числе и на территории России, практически не проводилось.

В исследовании, проведенном нами ранее, установлено, что на развитие НПП по гепатотоксическому типу при применении противотуберкулезных препаратов первого ряда у впервые выявленных больных туберкулезом влияет наличие таких мутаций в гене *NAT2*, как SNPs AA rs1799931, SNPs AA или AG rs1799930, а также SNPs TT или CT rs1041983, которые определяют активность фермента *NAT2* [9]. Однако исследования генетического полиморфизма гена *NAT2* в указанных SNPs для профилактики НПП по гепатотоксическому типу у больных туберкулезом ранее не проводились.

Цель исследования: оценить частоту развития нежелательных побочных реакций по гепатотоксическому типу при проведении гепатопротективной терапии по результатам генетического исследования SNPs rs1799931, rs1799930 и rs1041983 гена *NAT2*.

Материалы и методы исследования

В исследовании приняли участие 147 пациентов в возрасте от 5 до 60 лет. В основную группу вошел 71 пациент (у которых проводили профилактику гепатотоксических реакций с учетом генетического исследования), а 76 пациентов (у которых профилактика гепатотоксических реакций проводилась без учета генетического обследования) составили контрольную группу.

Пациенты обеих групп получали противотуберкулезные препараты изониазид в дозе 10 мг/кг/сут и рифампицин в дозе 10 мг/кг/сут. Наличие или отсутствие нежелательных побочных реакций по гепатотоксическому типу оценивали по клиническим признакам (наличие жалоб, объективное обследование) и результатам общего и биохимического анализа крови.

НПР по гепатотоксическому типу на противотуберкулезные препараты отмечались при повышении билирубина, АлАТ и АсАТ более чем в 3 раза относительно нормы и (или) при наличии тошноты и (или) рвоты во время лечения.

В качестве предикторов гепатотоксичности при приеме комплекса противотуберкулезных препаратов первого ряда у больных туберкулезом по результатам проведенных ранее исследований мы рассматривали наличие SNPs AA rs1799931 гена *NAT2* и SNPs AA и AG rs1799930 гена *NAT2*, а также присутствие мутаций TT или CT SNPs rs1041983 гена *NAT2* [9].

Пациентам, вошедшим в основную группу, имеющим указанные типы мутаций в генах *NAT2*, в качестве профилактики развития гепатотоксических реакций назначались гепатопротекторы (урсодезоксихолиевая кислота) в дозе 10 мг/кг/сут (максимальная суточная доза – 750 мг). В контрольной группе гепатопротекторы назначались всем пациентам в аналогичных дозировках.

Проведение общего и биохимического анализа крови проводилось на автоматических гематологическом и клиническом анализаторах («Sysmex kx-21», «Sapphire 400») с применением реагентов «Human». Для проведения генетического исследования цельная кровь из вены забиралась в пробирку с этилендиаминтетрауксусной кислотой. Данные образцы подвергались заморозке и хранились при температуре -30°C . Выделение геномной ДНК из этих образцов проводилось с помощью наборов реагентов Arrow Blood DNA 500 на станции NorDiag Arrow. Постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР) осуществлялась согласно протоколу производителя реагентов в режиме реального времени на амплификаторе CFX-96 с применением наборов реагентов для генотипирования SNPs TaqMan по 3 точкам: C_572770_20, C_1204091_10, C_8684085_20. Для получения достоверных результатов с четкой кластеризацией во всех исследуемых образцах концентрация ДНК составляла 5 ng на реакцию.

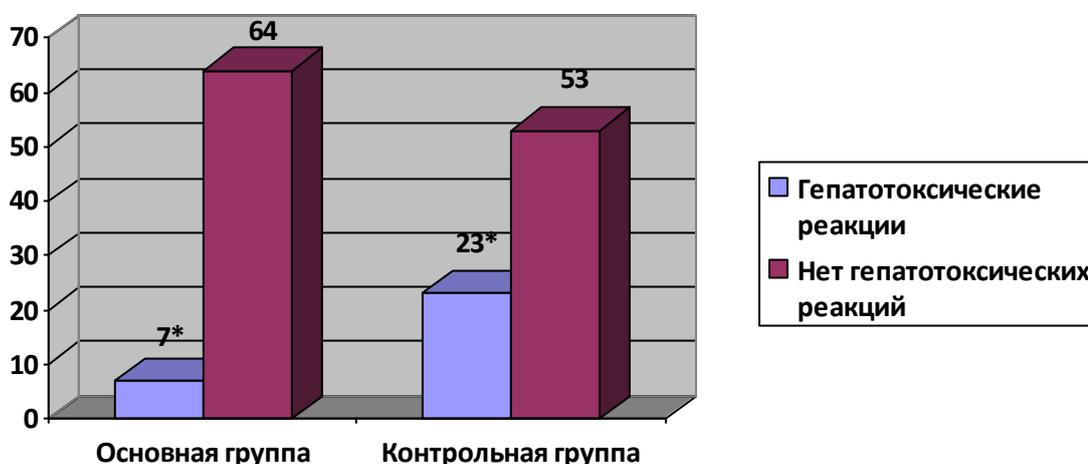
В основной группе в качестве возможных предикторов НПР по гепатотоксическому типу определялось наличие SNPs гена NAT2: rs1799931, rs1799930, rs1041983.

Статистическая обработка полученных данных выполнялась при помощи программы IBM SPSS версии 23.0. Описательная статистика результатов исследования представлена для качественных величин в виде процентных долей и их стандартных ошибок, для абсолютных – в виде средних арифметических (M) и стандартных отклонений (σ). Значимость различий качественных признаков оценивали при помощи критерия χ^2 Пирсона, различия между количественными признаками определяли при помощи U-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считались различия от $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В контрольной группе пациентов, получающих лечение противотуберкулезными препаратами и профилактику гепатотоксических реакций без учета оценки генетического полиморфизма, НПР по гепатотоксическому типу наблюдались у 23 пациентов из 76 ($30,3 \pm 5,3\%$). Больше НПР зафиксировано среди взрослых пациентов – у 17 из 50 ($34,0 \pm 6,7\%$). Среди пациентов детского возраста частота развития НПР по гепатотоксическому типу составила $21,4 \pm 7,8\%$ (у 6 из 28). Однако статистически значимых различий по частоте возникновения гепатотоксических реакций среди детей и взрослых контрольной группы не отмечено (Хи-квадрат с поправкой Йетса 0,827, $p > 0,05$). Из 40 женщин контрольной группы НПР по гепатотоксическому типу были зафиксированы у 15 ($37,5 \pm 7,8\%$), а из 36 мужчин – только у 8 ($22,2 \pm 6,9\%$), однако эти различия оказались статистически не значимы (Хи-квадрат с поправкой Йетса 1,434, $p > 0,05$).

В основной группе пациентов, получающих лечение противотуберкулезными препаратами и профилактику НПР по гепатотоксическому типу с учетом оценки генетического полиморфизма, указанные НПР наблюдались у 7 из 71 ($9,9 \pm 3,5\%$) (рисунок).



Частота развития НПР по гепатотоксическому типу. * – $p < 0,05$

Таким образом, в основной группе пациентов статистически значимо встречались гепатотоксические нежелательные побочные реакции (Хи-квадрат с поправкой Йейтса 8,194, $p < 0,05$).

Нежелательные побочные реакции по гепатотоксическому типу у 15 пациентов из 30 ($50 \pm 9,1\%$) проявлялись в виде таких изменений лабораторных показателей, как повышение АлАТ и АсАТ в биохимическом анализе крови более чем в 3 раза относительно нормы. НПР по гепатотоксическому типу у 11 пациентов ($36,7 \pm 8,8\%$) проявлялись в виде диспепсических явлений, болезненности при пальпации в области живота и изменений лабораторных показателей. У 8 пациентов ($34,8\%$) контрольной группы НПР по гепатотоксическому типу потребовали отмены противотуберкулезных препаратов, изменения схемы лечения и назначения дезинтоксикационной и гепатопротективной терапии. В основной группе у 2 пациентов ($28,6 \pm 8\%$) гепатотоксические реакции потребовали отмены противотуберкулезных препаратов и внесения изменений в схему лечения. Среднее значение АлАТ и АсАТ в основной группе у пациентов с проявлениями НПР по гепатотоксическому типу составило $303,4 \pm 241,1$ ед/л и $118,7 \pm 49,7$ ед/л соответственно. В контрольной группе эти показатели составили $180,7 \pm 113,8$ ед/л и $179,2 \pm 126,1$ ед/л соответственно. В основной группе средний показатель активности АлАТ в биохимическом анализе крови составил $35,8 \pm 20,1$ ед/л, в контрольной группе – $71,8 \pm 68,8$ ед/л (различия в уровнях выборок можно считать несущественными, $U=2239$), а АсАт – $35,8 \pm 20,1$ ед/л и $74,8 \pm 65,6$ (различия в уровнях выборок можно считать несущественными, $U=1817,5$). Следует отметить, что одни лишь результаты биохимического анализа крови не всегда являлись определяющими в констатации НПР по гепатотоксическому типу и часто также сопровождалась клиническими проявлениями, даже если значение показателей АлАТ и АсАТ не превышало 3 значений норм.

Исходя из полученных результатов представляется оптимальным проведение профилактики гепатотоксических реакций у впервые выявленных больных туберкулезом при проведении противотуберкулезной терапии по I и III режиму с учетом данных, полученных при определении мутаций гена NAT2 (SNPs rs1799931, rs1799930 и rs1041983). Данный подход позволяет статистически значимо сократить частоту развития побочных реакций в сравнении с подходом, предполагающим назначение препаратов группы гепатопротекторов всем пациентам.

Выводы

1. Лечение впервые выявленных больных туберкулезом с применением ПТП первого ряда (изониазид, рифампицин, пипразинамид) без использования оценки генетического

полиморфизма сопровождалось возникновением нежелательных побочных реакций по гепатотоксическому типу в 30,3% случаев, а с учетом оценки генетического полиморфизма – в 10,9%.

2. Использование для оценки риска развития НПП по гепатотоксическому типу определения мутаций гена NAT2 (SNPs rs1799931, rs1799930 и rs1041983) у впервые выявленных больных туберкулезом статистически значимо снижает частоту развития данного вида нежелательных побочных реакций в сравнении с подходом, предполагающим назначение препаратов группы гепатопротекторов всем пациентам.

Список литературы

1. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в Российской Федерации в 2018 году. [Электронный ресурс]. URL: https://mednet.ru/images/materials/CMT/2018_god_tuberkulez_epidsituaciya.pdf (дата обращения: 25.08.2020).
2. Global Tuberculosis Report 2019. Geneva: World Health Organization, 2019. [Электронный ресурс]. URL: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en (дата обращения: 25.08.2020).
3. Фатыхова З. М., Абалтусова Т.А., Сысоев П. Г. Гепатотоксические осложнения противотуберкулезной терапии // Colloquium-journal. 2020. №6 (58). С.13.
4. Мордык А.В. Патогенез и обоснование способов коррекции кардиотоксического действия противотуберкулезных препаратов: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 14.00.16, 14.00.26. Омск, 2008. 406 с.
5. Иванова Д.А., Борисов С.Е. Спектр и факторы риска нежелательных побочных реакций при лечении больных туберкулезом // Туберкулез и болезни легких. 2017. Т.95, №6. С.29.
6. Teixeira R.L., Lopes M.Q., Suffys P.N., Santos A.R. Tuberculosis Pharmacogenetics: State of The Art, 2013. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.intechopen.com/books/tuberculosis-current-issues-in-diagnosis-and-management/tuberculosis-pharmacogenetics-state-of-the-art> (дата обращения: 25.08.2020).
7. Суханов Д.С. Лекарственные поражения печени у больных туберкулезом легких и гепатопротективная терапия: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.16. Санкт-Петербург, 2008. 107 с.

8. Wang P.Y., Xie S.Y., Hao Q., Zhang C., Jiang B.F. NAT2 polymorphisms and susceptibility to anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2012. V. 16(5). P. 589-595.
9. Казаков А.В., Можокина Г.Н., Аксенова В.А., Смердин С.В., Попов С.А., Клевно Н.И., Рагимов А.А., Кузнецов О.Е., Козлов В.В. Влияние генетического полиморфизма генов ферментов, ответственных за биотрансформацию противотуберкулезных препаратов на риск развития гепатотоксических реакций у больных туберкулезом // *Антибиотики и химиотерапия*. 2018. Т.63. №5-6. С.24.