

## ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ФЕНОТИПА N-АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

САТЫРОВА Т.В.\*, МИХАЙЛОВА Е.И.\*, ОСИПЕНКО А.Н.\*\*,  
ОСИПЕНКО Н.Б.\*\*, ВАСЕНДА М.Н.\*

УО «Гомельский государственный медицинский университет»\*,  
УО «Гомельский государственный университет им. Ф.Скорины»\*\*

**Резюме.** Изучена вариабельность фенотипа N-ацетилтрансферазы у 75 пациентов с язвенным колитом и 129 здоровых добровольцев. Фенотип ацетилирования рассчитывали по отношению концентраций ацетилированного и свободного изониазида, которые определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлено наличие бимодального распределения ацетиляторного фенотипа для больных язвенным колитом и тримодальное распределение для здоровых добровольцев. Соотношение медленных и быстрых ацетиляторов у пациентов с язвенным колитом составило 80% и 20%, у здоровых добровольцев – 71% и 29%, соответственно ( $p=0,18$ ). Медленный ацетиляторный фенотип у больных язвенным колитом ассоциирован с развитием побочных эффектов при приеме сульфасалазина ( $\tau=-0,306$ ,  $p=0,0001$ ).

**Ключевые слова:** ацетиляторный фенотип, быстрый ацетилятор, медленный ацетилятор, язвенный колит.

**Abstract.** The variability of N-acetyltransferase phenotype in 75 patients with ulcerative colitis and 129 healthy volunteers is studied. The phenotype of acetylator was counted regarding the concentration of acetylisoniazide and free isoniazide which were defined with a method of high-performance liquid chromatography. The presence of bimodal distribution of the acetylator phenotype for patients with ulcerative colitis and threemodal distribution for healthy volunteers is determined. The parity of slow and fast acetylators in patients with ulcerative colitis is 80% and 20%, in healthy volunteers – 71% and 29%, accordingly ( $p=0,18$ ). The slow acetylator phenotype in patients with ulcerative colitis is associated with the development of side effects on using of sulfasalazine ( $\tau=-0,306$ ,  $p=0,0001$ ).

**Key words:** acetylator phenotype, fast acetylator, slow acetylator, ulcerative colitis.

**Адрес для корреспонденции:** Республика Беларусь, г. Гомель, ул. Ланге, 5, Гомельский государственный медицинский университет, тел. моб. +375297355505. – Сатырова Т.В.

## **Введение**

Язвенный колит является одним из наиболее тяжелых заболеваний органов пищеварения. Хроническое течение, серьезные осложнения, рост заболеваемости, нередко безуспешное применение даже самых современных препаратов в лечении обострения заболевания придают проблеме язвенного колита не только медицинское, но и социальное значение.

Первичная заболеваемость язвенным колитом колеблется от 0,5 до 24,5 на 100 000 населения и ежегодно возрастает [1].

Лечение больных язвенным колитом было и остается одной из самых серьезных проблем клинической гастроэнтерологии. Приоритетным направлением в лечении язвенного колита является консервативная терапия, успех которой зависит от правильного подбора индивидуальных схем лечения для каждого пациента [2]. С одной стороны, проблемы фармакотерапии язвенного колита у части пациентов связаны с развитием большого количества побочных эффектов, а с другой стороны – с низкой эффективностью рекомендуемых доз лекарственных препаратов. Определение активности фермента N-ацетилтрансферазы 2 (NAT2) у пациентов с язвенным колитом позволит частично решить данные задачи и индивидуально подобрать базисную терапию, делая ее эффективной для быстрых и безопасной для медленных ацетиляторов.

N-ацетилтрансфераза 2 (NAT2) – один из ферментов II фазы биотрансформации лекарственных средств, который путем присоединения ацетила к молекулам вещества способствует их конъюгации и прекращению фармакодинамического эффекта. Роль этого фермента в клинической фармакологии велика, так как ацетилированию подвергается большое количество применяемых лекарственных веществ, в том числе и сульфасалазин, являющийся базисным препаратом в фармакотерапии язвенного колита [3].

В настоящее время ведутся исследования по выявлению связи фенотипа ацетилирования с различными заболеваниями. Преобладание медленного типа ацетилирования характерно для больных туберкулезом, ревматоидным артритом, системной красной волчанкой, лекарственным гепатитом, бронхиальной астмой, раком легкого, раком мочевого пузыря, экземой [4].

Цель исследования – изучить вариабельность фенотипа N-ацетилтрансферазы у пациентов с язвенным колитом и установить наличие взаимосвязи заболевания с ацетиляторным фенотипом.

## **Методы**

Группа исследования состояла из 75 пациентов с язвенным колитом (34 мужчины и 41 женщины) в возрасте от 18 до 78 лет (Me=44,0 лет; 95%ДИ:38,0-49,33 и массой тела от 46 до 117 кг (Me=73,0 кг; 95%ДИ:67,67-80,00), которые находились на лечении в гастроэнтерологическом отделении Учреждения «Гомельская областная клиническая больница». Все больные подвергались стандартному обследованию, включающему сбор жалоб, анамнеза, оценку объективного статуса, проведение лабораторных, инструментальных (сигмоили колоноскопия) и морфологических исследований (оценка биоптатов слизистой оболочки толстой кишки). Для определения активности ЯК

использовался индекс Шредера (Mayo Clinic UC DAI), [5]. У 22 пациентов регистрировалась минимальная активность заболевания, у 38 – умеренная, у 10 – высокая активность. Ремиссия наблюдалась у 5 пациентов и определялась при наличии частоты стула 3 раза в день и менее, отсутствии примеси крови в кале и удовлетворительном самочувствии пациентов [5]. По протяженности воспалительных изменений в слизистой оболочке толстой кишки формировались три группы пациентов: с проктитом – 11 человек, с левосторонним колитом – 51 и с распространенным колитом – 13 пациентов. У 53 пациентов имело место хроническое рецидивирующее течение заболевания, у 8 больных – хроническое непрерывное течение, еще у 14 пациентов имел место впервые выявленный язвенный колит. Больные получали стандартное лечение (сульфасалазин, месалазин и преднизолон), из них монотерапия сульфасалазином имела место у 68 пациентов. Нежелательные явления (головная боль, головокружение, тошнота, рвота и др.) на фоне приема сульфасалазина наблюдались у 27 больных язвенным колитом.

Группа контроля включала 129 здоровых добровольцев (45 мужчин и 84 женщины), не имевших признаков заболевания желудочно-кишечного тракта и не подвергавшихся оперативному вмешательству на органах пищеварения, в возрасте от 20 до 58 лет (Me=36,0 лет; 95%ДИ:31,0-40,02). Масса тела индивидов варьировала от 44 до 120 кг (Me=70,0 кг; 95%ДИ:65,00-75,02). Обследование пациентов контрольной группы включало сбор жалоб, анамнеза и оценку объективного статуса. Все обследованные индивиды являлись европеоидами и не состояли в родстве.

Определение фенотипа N-ацетилирования проводилось с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым обнаружением на аппарате «Agilent 1100» с использованием тестового препарата изониазида. Пациенты натошак однократно принимали изониазид в дозе 10 мг/кг. Через 3 часа после приема тестового препарата собирали образцы крови. Концентрацию изониазида и его ацетилированного метаболита определяли при длине волны 275 нм и скорости потока 1,2 мл/мин с использованием колонки Zorbex C8. В качестве мобильной фазы применяли ацетатный буфер аммония на 0,1 М – ацетонитрил – дистиллированная вода (60:1:39).

Фенотип ацетилирования определяли как скорость ацетилирования изониазида и рассчитывали как отношение ацетизониазида к изониазиду.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных статистических программ Statistica 6 и метода расщепления смеси пакета программ многомерного и одномерного анализа данных МОНАДА [6].

Соответствие распределения количественных признаков закону нормального распределения оценивали с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Значения показателей представляли как медиану (Me) и 95% доверительный интервал (95%ДИ) или среднее значение (m) и среднее квадратическое отклонение ( $\sigma$ ). Сопоставление двух независимых выборок по количественному признаку производили с помощью теста Манна-Уитни (U).

Оценка взаимосвязи количественных и/или качественных признаков производили с помощью ранговой корреляции по Кендаллу ( $\tau$ ). Для анализа различия частот значения качественного признака в одной или в двух и более выборках использовали двусторонний тест точного критерия Фишера. Статистически значимыми считали различия при уровне  $p < 0,05$ .

Для оценки эмпирической функции плотности распределения скорости ацетилирования изониазида вместо обычной гистограммы использовали «ядерную» аппроксимацию [7], которая путем «размазывания» имеющихся точек заполняла на гистограмме «впадины» и срезала «пики». Применение «ядерного» сглаживания позволяло использовать особенности функции плотности распределения, площадь под которой равнялась единице. Оценку плотности распределения для выбранного метода «ядерного» типа выражали в виде линейной суммы дельтаобразных функций, порожденных каждой точкой выборки. Интервал «размазывания» дельтаобразных функций подбирали программой в зависимости от объема выборки. Для оценки теоретической функции плотности распределения скорости ацетилирования изониазида использовали программу расщепления смеси, разработанную С.А. Айвазяном с соавторами (1989 г.) [8]. Программа рассчитана на операции как с бимодальными, так и многомодальными распределениями. Минимизацию критерия Колмогорова-Смирнова производили при оценке функции распределения с помощью перебора компонент смеси из нескольких нормальных распределений.

#### Результаты и обсуждение

С помощью программы расщепления многомодальной смеси [6] установили наличие двух одномодальных распределений отношений концентраций АсІNH и ІNH в группе пациентов с язвенным колитом и четырех одномодальных распределений отношений концентраций АсІNH и ІNH в контрольной группе. Их статистические характеристики представлены в таблице 1 и таблице 2.

Таблица 1

#### Результаты расщепления смеси по распределению отношений концентраций АсІNH и ІNH в сыворотке крови больных язвенным колитом

Номер компоненты смеси	Среднее значение ( $m$ )	Среднее квадратическое отклонение ( $\sigma$ )	Вес компоненты смеси	Точка расщепления с правой компонентой смеси
1	0.12	0.11	0.90	0.27
2	0.43	0.13	0.10	-

Таблица 2

**Результаты расщепления смеси по распределению отношений концентраций АсІNH и ІNH в сыворотке крови здоровых добровольцев**

Номер компоненты смеси	Среднее значение (m)	Среднее квадратическое отклонение ( $\sigma$ )	Вес компоненты смеси	Точка расщепления с правой компонентой смеси	Объем
1	0.14	0.05	0.66	0.28	85
2	0.30	0.03	0.13	0.37	16
3	0.47	0.05	0.15	0.58	20
4	0.7	0.05	0.06	-	8

Результаты аппроксимации исходного распределения смесью из двух одномодальных нормальных компонент и исходного распределения смесью из четырех одномодальных нормальных компонент представлены на рисунке 1 и рисунке 2.

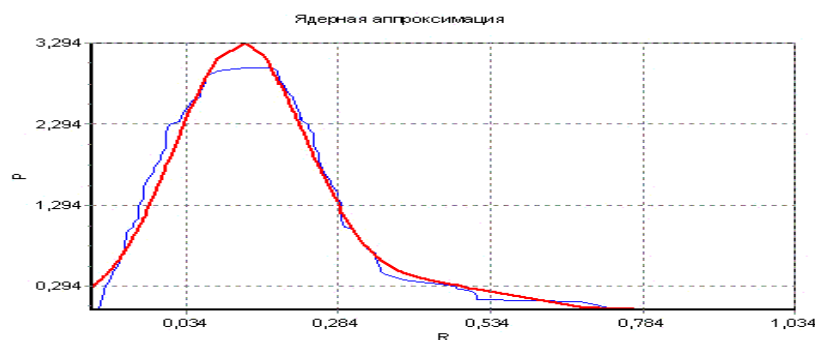


Рисунок 1 - Оценка эмпирического распределения отношений (R) концентраций АсІNH и ІNH теоретической смесью из двух нормальных распределений



Рисунок 2 - Оценка эмпирического распределения отношений (R) концентраций АсІNH и ІNH теоретической смесью из четырех нормальных распределений

У пациентов с язвенным колитом выявили бимодальное распределение ацетиляторного фенотипа, характеризующееся двумя интервалами отношения R: (0 - 0,27]; [0,27 - 1). Левый интервал отнесли к медленным, а правый интервал – к быстрым ацетиляторам. Таким образом, в исследуемой группе статус медленного фенотипа ацетилятора имели 60 (80%) больных с язвенным колитом, статус быстрого ацетилятора – 15 (20%) пациентов с той же патологией. Среди медленных ацетиляторов было 28 (47%) мужчин и 32 (53%) женщины, а среди быстрых – 6 (40%) мужчин и 9 (60%) женщин.

У пациентов с язвенным колитом концентрации AcINH и INH находились в пределах от 0,23 до 7,68 мкг/мл (Me=1,19 мкг/мл; 95%ДИ:0,93-1,36) и от 1,2 до 23,05 мкг/мл (Me=8,7 мкг/мл; 95%ДИ:6,54-9,71), соответственно. Концентрация AcINH у медленных метаболизаторов варьировала от 0,23 до 2,23 мкг/мл (Me=1,00 мкг/мл; 95%ДИ:0,7-1,33) и была статистически достоверно ниже, чем у быстрых ацетиляторов, у которых она колебалась от 0,6 до 7,68 мкг/мл (Me=2,1 мкг/мл; 95%ДИ:1,15-3,56; U=192,5; p=0,00065). Концентрация INH у медленных ацетиляторов менялась в диапазоне от 2,25 до 23,05 мкг/мл (Me=9,34 мкг/мл; 95%ДИ:8,26-10,9) и была достоверно выше, чем у пациентов с быстрым ацетилизацией, где она колебалась от 1,2 до 21,63 мкг/мл (Me=4,1 мкг/мл; 95%ДИ:3,71-5,89; U=168,5; p=0,0002).

Не установлено статистической взаимосвязи активности фермента NAT2 с полом ( $\tau=0,054$ , p=0,50) пациентов с язвенным колитом, их возрастом ( $\tau=0,098$ , p=0,21), массой тела ( $\tau=0,151$ , p=0,06), длительностью анамнеза заболевания ( $\tau=-0,152$ , p=0,053), характером течения язвенного колита ( $\tau=-0,137$ , p=0,08), протяженностью поражения толстой кишки воспалительным процессом ( $\tau=0,034$  p=0,67) и его активностью ( $\tau=0,04$ , p=0,62). Доказана ассоциация медленного ацетиляторного фенотипа с развитием побочных эффектов сульфасалазина ( $\tau=-0,306$ , p=0,0001). Похожие результаты получили в своих исследованиях А.К. Azad Khan с соавторами [9] и К.М. Das с соавторами [10], которые доказали наличие ассоциации медленного фенотипа ацетилирования с возникновением побочных эффектов при приеме сульфасалазина (p<0,05).

Распределение фенотипа ацетилирования в группе здоровых добровольцев имело тримодальный характер с тремя интервалами отношения R: (0 - 0,28]; [0,28 - 0,37]; [0,37 - 1). Левый интервал отнесли к достоверно медленным, правый интервал – к достоверно быстрым, а средний - к промежуточным или предбыстрым ацетиляторам. В группе контроля 91 (71%) человек имел статус медленного ацетилятора, 25 (19%) – быстрого, а 13 (10%) – промежуточного.

Признак быстрого ацетилятора наследуется по аутосомно-доминантному типу. Быстрые ацетиляторы являются либо гомозиготами по гену быстрого ацетилирования, либо гетерозиготами [11]. Некоторые исследователи относят гетерозит по этому признаку к промежуточному (третьему) типу. Однако деление на три фенотипа в литературе встречается реже, так как большинство авторов предпочитают выделять два фенотипа: быстрый и медленный [12]. При

таком делении статус быстрого ацетилятора присущ 29% здоровых добровольцев, включенных в настоящее исследование.

Статистически значимых отличий в распределении быстрых и медленных ацетиляторов между группой пациентов с язвенным колитом и группой контроля не обнаружено ( $p=0,18$ ).

Таким образом, установлено, что соотношение медленных и быстрых фенотипов ацелирования в контрольной группе мало отличается от европейского (около 1:1) и соответствует славянской популяции [13, 14]. В то же время фенотип ацелирования не может быть отнесен к предикторам язвенного колита, так как отсутствуют статистически значимые различия в распределении фенотипа в контрольной и исследуемой группах. Похожие результаты получили в своем исследовании А.К. Azad Khan с соавторами [9], которые доказали, что распределение ацетиляторного фенотипа у пациентов с язвенным колитом не отличается с такового, полученного D. Evans для общей британской популяции [15].

#### Заключение

1. Соотношение медленных и быстрых ацетиляторов у пациентов с язвенным колитом составляло 85% и 15%, у здоровых добровольцев – 71% и 29%, соответственно ( $p=0,18$ ).

2. Медленный ацетиляторный фенотип у больных язвенным колитом ассоциирован с развитием побочных эффектов при приеме сульфасалазина ( $\tau=0,306$ ,  $p=0,0001$ ).

#### Литература

1. Бакулин, И. Г. Современные представления о течении и консервативных методах лечения неспецифического язвенного колита / И. Г. Бакулин, Д. А. Станке // Военно-медицинский журн. – 2008. – №. 11. – С. 50-54.

2. Голофеевский, В. Ю. Опыт применения высоких доз месалазина (салофалька) при лечении тяжелых вариантов обострения язвенного колита / В. Ю. Голофеевский, А. В. Герасимова, С. И. Ситкин // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2002. – №. 4. – С. 20-21.

3. Середенин, С. Б. Лекции по фармакогенетике / С. Б. Середенин. – М.: Мед. информ. агенство, 2004. – 303 с.

4. Evans, D. A. P. Survey of the human acetylator polymorphism in spontaneous disorders / D. A. P. Evans // J. of Med. Genet. – 1984. – №. 21. – С. 243-253.

5. Основанный на доказательствах Европейский консенсус по диагностике и лечению язвенного колита / Нац. группа по воспалительным заболеваниям кишечника Респ. Беларусь; редкол.: Ю. Х. Мараховский [и др.]. – Минск, 2008. – 216 с.

6. Методические и программно-технологические средства оценки и анализа сезонной динамики доз внутреннего облучения жителей населенных

пунктов / Н. Б. Осипенко [и др.] // Известия Гомел. гос. ун-та им. Ф. Скорины. – 2004. – 6 (27). – С. 171-176.

7. Гаскаров, Д. В. Малая выборка / Д. В. Гаскаров, В. И. Шаповалов. – М.: Статистика, 1978. – 220 с.

8. Прикладная статистика: классификация и снижение размерности / С. А. Айвазян [и др.]. – М.: Финансы и статистика, 1989. – 605 с.

9. Azad Khan, A. K. The effect of the acetylator phenotype on the metabolism of sulphasalazine in man / A. K. Azad Khan, M. Nurazzaman, S. C. Truelove // Journal of Medical genetics. – 1983. – Vol. 20. – P. 30-36.

10. The metabolism of salicylazosulphapyridine in ulcerative colitis: I. The relationship between metabolites and the response to treatment in inpatients / K. M. Das [et al.] // Gut. – 1973. – Vol. 14. – P. 631-636.

11. Середенин, С. Б. Лекции по фармакогенетике / С. Б. Середенин. – М.: Мед. информ. агенство, 2004. – 303 с.

12. Deitz, A. C. Impact of Misclassification in Genotype-Exposure Intarection Studies: Example of N-Acetyltransferase 2 (NAT2), Smoking, and Bladder Cancer / A. C. Deitz, N. Rothman, T. R. Rebbeck // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2004. – Vol. 13. – P. 1543-1546.

13. Hildebrand, M. Determination of acetylator phenotype in Caucasians with caffeine / M. Hildebrand, W. Seifert // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 1989. – Vol. 37. – P. 525–526.

14. Яковлева, О. А. Индивидуальные особенности ацетилирования тест-препаратов при бронхообструктивном синдроме / О. А. Яковлева, А. И. Косован, А. А. Пентюк // Клиническая фармакология – 25 лет: материалы междунар. науч.-практ. конф., М.; 1997. – С. 96.

15. Evans, D. A. P. An improved and simplified method of detecting the acetylator phenotype / D. A. P. Evans // J. of Med. Genet. – 1969. – Vol. 6. – P. 405-407.