

УДК 547.484.34:616.152.112(476.2)

**ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ФЕНОТИПА N-АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ
У ЖИТЕЛЕЙ Г. ГОМЕЛЯ И ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ**

Т. В. Сатырова, Е. И. Михайлова, А. Н. Осипенко, Н. Б. Осипенко, М. Н. Васенда

**Гомельский государственный медицинский университет
Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины**

Изучена вариабельность фенотипа N-ацетилтрансферазы у 129 европеоидов г. Гомеля и Гомельской области. Фенотип ацетилирования рассчитывали по отношению концентраций ацетилированного и свободного изониазида, которые определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлено наличие тримодального распределения ацетиляторного фенотипа. Соотношение медленных и быстрых ацетиляторов в популяции составило 66 и 34 %, соответственно. Не доказана статическая взаимосвязь ацетиляторного фенотипа с полом ($\tau = -0,047$, $p = 0,42$), возрастом ($\tau = -0,004$, $p = 0,94$), массой тела ($\tau = -0,01$, $p = 0,86$) и пристрастием к курению исследованных добровольцев ($\tau = -0,112$, $p = 0,08$).

Ключевые слова: N-ацетилтрансфераза, фенотип, быстрый ацетилятор, медленный ацетилятор.

**VARIABILITY OF N-ACETYLTRANSFERASE PHENOTYPE
IN THE CITIZENS OF GOMEL AND GOMEL REGION**

T. V. Satyrova, E. I. Mihailova, A. N. Osipenko, N. B. Osipenko, M. N. Vasenda

**Gomel State Medical University
Gomel State University named after F. Skorina**

The variability of N-acetyltransferase phenotype by 129 Caucasoids, citizens of Gomel and Gomel region has been studied. The phenotype of acetylation has been estimated at the ratio of concentrations of acetylated and free isoniazids, which have been determined by means of high-performance liquid chromatography.

The presence of trimodal distribution of the acetylated phenotype has been determined. The ratio of slow and quick acetylators in the population makes 66 and 34 % correspondingly. The statistic interaction of the acetylated phenotype has not been proved neither with sex ($\tau = -0,047$, $p = 0,42$) or age ($\tau = -0,004$, $p = 0,94$), nor with body weight ($\tau = -0,01$, $p = 0,86$) and the examined volunteers' addiction to smoking ($\tau = -0,112$, $p = 0,08$).

Key words: N-acetyltransferase, phenotype, quick acetylator, slow acetylator.

Введение

Исследования в области фармакогенетики в последние годы приобретают все большую научную значимость. Это способствует повышению интереса к данной проблеме и в Республике Беларусь. Актуальность фармакогенетики обусловлена также тем, что разнообразный состав генофонда отдельных популяций всегда требует уточнения именно для конкретных географических зон, в которых отличия генотипов могут быть весьма значительны [1, 2].

N-ацетилтрансфераза (NAT) 2 — один из ферментов II фазы биотрансформации лекарственных средств, который путем присоединения ацетила к молекулам вещества способствует их конъюгации и прекращению фармакодинамического эффекта. Конъюгации с искусной кислотой подвергаются содержащие аминокислотную группу соединения и аминокислоты самых различных типов, что отражает важное биологическое значение этого фермента как фактора природной защиты. Для славянских популяций наиболее типично бимодальное распределение активности фермента среди быстрых и медленных ацетиляторов — соотношение почти 1:1.

Роль этого фермента в клинической фармакологии значительна, так как ацетилированию подвергаются более 70 % часто применяемых лекарственных средств: сульфаниламиды, изониазид, гидралазин, прокаин, прокаинамид, пенициллины, нитразепам, клоназепам, парааминосалициловая кислота, кофеин, амрилон, аминокислоты и др. Кроме того, ацетилированию подвергаются эндогенные субстраты, содержащие аминокислоты, в том числе и биогенные амины: серотонин, гистамин, аминокислоты, ядерные белки, аминокислоты. Поэтому медленный фенотип NAT2 может ассоциироваться как с развитием ряда заболеваний (это доказано при системной красной волчанке, периодической болезни, синдроме Дауна, ВИЧ-инфекции, наследственном псориазе и др.), так и с токсическими реакциями в результате накопления лекарственных средств в организме из-за медленного их метаболизма [3]. Следовательно, изучение активности NAT2 имеет важное значение для прогнозирования безопасности и эффективности лекарственных средств.

Цель исследования: изучить вариабельность фенотипа N-ацетилтрансферазы у европейцев г. Гомеля и Гомельской области по

отношению ацетилированного изониазида к свободному изониазиду.

Материал и метод исследования

Проведен анализ данных, полученных при обследовании 129 здоровых добровольцев европейской популяции г. Гомеля и Гомельской области. В группу здоровых добровольцев входили лица без признаков заболеваний в возрасте от 20 до 58 лет (Me = 36,0 лет; 95 % ДИ: 31,0–40,02), среди которых было 45 (35 %) мужчин и 84 (65 %) женщины. Масса тела индивидов варьировала от 44 до 120 кг (Me = 70,0 кг; 95 % ДИ: 65,00–75,02).

Обследование пациентов включало сбор жалоб, анамнеза и оценку объективного статуса. Все обследованные индивиды являлись европейцами и не состояли в родстве. К группе курящих относили лиц, курящих на момент исследования, и учитывали суточную дозу в пачках. Таких оказалось 21 (19 %) из 113 опрошенных лиц.

Определение фенотипа N-ацетилирования проводилось с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым обнаружением на аппарате «Agilent 1100» с помощью 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» 6.0 и метода расщепления смеси пакета программ многомерного и одномерного анализа данных МОНАДА [4]. Соответствие распределения количественных признаков закону нормального распределения оценивали с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Значения показателей представлены как медиана (Me) и 95 % доверительный интервал (95 % ДИ). Сопоставление двух независимых выборок по количественному признаку производили с помощью теста Манна-Уитни (U). Оценка взаимосвязи коли-

чественных и (или) качественных признаков производилась с помощью ранговой корреляции по Кендаллу (τ). Статистически значимыми считали различия при уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

С помощью программы расщепления многомодальной смеси [4] установлено наличие че-

тырех одномодальных распределений отношений концентраций АсINH и INH. Их статистические характеристики представлены в таблице 1.

При проведении аппроксимации исходного распределения смесью из четырех одномодальных нормальных компонент получены результаты, представленные на рисунке 1.

Таблица 1 — Результаты расщепления смеси по распределению отношений концентраций АсINH и INH в сыворотке крови здоровых добровольцев

Номер компоненты смеси	Среднее значение (m)	Среднее квадратическое отклонение (σ)	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

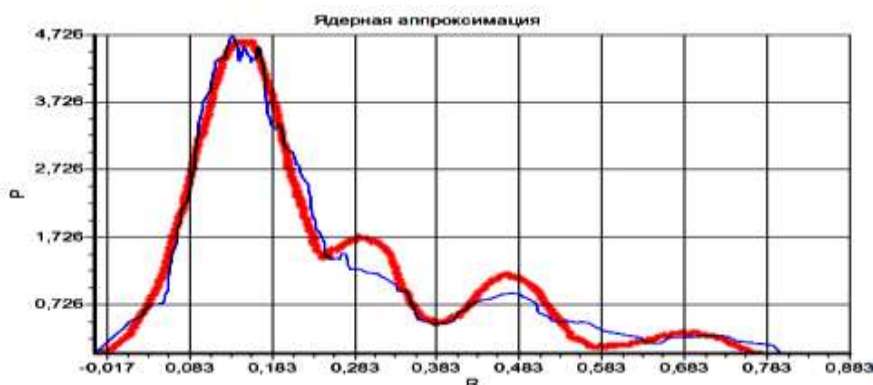


Рисунок 1 — Оценка эмпирического распределения отношений (R) концентраций АсINH и INH теоретической смесью из четырех нормальных распределений

Для последующего практического использования полученной оценки выделены три интервала отношения R: 0–0,28; 0,28–0,37; 0,37–1. При этом левый интервал отнесен к достоверно медленным, правый интервал — к достоверно быстрым, а средний — к промежуточным, или предбыстрым ацетиляторам, т. е. распределение фенотипа ацетилирования имеет тримодальный характер.

Таким образом, в исследуемой группе 91 (71 %) человек определен как медленный ацетилятор, 25 (19 %) — как быстрый, а 13 (10 %) — как промежуточный.

Хотя недавние данные дали основание полагать, что быстрые и средние ацетиляторы все же разные фенотипы, для удобства большинство авторов делят ацетиляторный статус на группы медленных и быстрых ацетиляторов [2], при этом промежуточному типу придают статус быстрого ацетилятора. Это объясняется тем, что способность к быстрому ацетилированию наследуется по аутосомно-доминантному типу, поэтому быстрые ацетиляторы являются либо гомозиготами по гену быстрого ацетилирования, либо гетерозиготами. А гетерозигот по этому признаку ряд авто-

ров относит к промежуточным ацетиляторам. Исходя из этого, по данным настоящего исследования, 29 % здоровых добровольцев имеют статус быстрого ацетилятора. Программа многомерного и одномерного анализа данных МОНАДА [4] позволяет определить соотношение фенотипов ацетилирования у европеоидов Гомельского региона. Медленный тип ацетилирования встречается у 66 % населения, а быстрый — у 34 %.

Соотношение обоих ацетиляторных фенотипов варьирует в различных географических зонах и популяциях [1, 2], однако полученные в этом исследовании результаты сопоставимы с данными других авторов. Например, среди европеоидов Германии частота встречаемости медленных ацетиляторов колеблется от 62 до 71 % [5, 6], у европеоидов Франции данный показатель варьирует от 53 до 61,3 % [7]. В странах СНГ исследования подобного типа весьма немногочисленны, а данные ограничены. Так, И. В. Голденкова-Павлова с соавторами установила, что частота медленных ацетиляторов в московской выборке волонтеров составляет 47 % [8], а согласно результатам исследования С. Ю. Гармонова, медленный тип ацетили-

рования встречается у 55 % здоровых добровольцев Казани [9]. В Республике Беларусь изучение варибельности фенотипа N-ацетилтрансферазы до настоящего времени не проводилось.

Установлено, что среди медленных ацетиляторов было 32 (35%) мужчины и 59 (65 %) женщин, среди быстрых ацетиляторов — 6 (24 %) мужчин и 19 (76 %) женщин, среди промежу-

точных — 8 (62 %) мужчин и 5 (38 %) женщин. Анамнестические и антропометрические характеристики здоровых добровольцев в зависимости от фенотипа ацетилирования представлены в таблице 2. Среди курящих обследованных индивидов 18 (85 %) человек отнесены к медленным ацетиляторам, 2 (10 %) — к быстрым ацетиляторам и 1 (5 %) — к промежуточным.

Таблица 2 — Анамнестические и антропометрические характеристики здоровых добровольцев в зависимости от фенотипа ацетилирования

Параметр	Медленные ацетиляторы	Средние ацетиляторы	Быстрые ацетиляторы
Возраст (лет)	Me = 37,00 95 % ДИ: 26,0–41,21)	Me = 36,00 (95 % ДИ: 22,47–42,45)	Me = 36,00 (95 % ДИ: 28,17–45,22)
Масса тела (кг)	Me = 68,00 (95 % ДИ: 64,00–75,21)	Me = 77,00 (95 % ДИ: 56,00–84,68)	Me = 68,00 (95 % ДИ: 54,39–80,00)

При изучении статистической взаимосвязи фенотипа ацетилятора с характеристиками здоровых добровольцев не установлено ассоциации активности NAT 2 с полом ($\tau = -0,047$, $p = 0,42$) добровольцев, их возрастом ($\tau = -0,004$, $p = 0,94$), массой тела ($\tau = -0,01$, $p = 0,86$) и пристрастием к курению ($\tau = -0,112$, $p = 0,08$).

Полученные результаты сопоставимы с данными других исследований. Например, P. A. Philip с соавторами доказали отсутствие корреляции фенотипа ацетилирования с полом (мужчины — 63:37, женщины — 59:41; $p > 0,05$), возрастом ($t = 0,21$, $p > 0,05$; $\chi^2 = 0,74$, $p > 0,1$) и массой тела ($t = 1,25$, $p > 0,05$; $r_s = -0,053$, $p > 0,5$) обследованных добровольцев [10]. С. В. Ambrosone с соавторами не выявили ассоциации активности NAT2 и курением (отношение быстрый/ медленный ацетилятор составило 37:63 и 41:59 среди курящих и некурящих соответственно, $p > 0,05$) [11].

У здоровых добровольцев концентрации AcINH и INH находились в пределах от 0,66 до 3,5 мкг/мл (Me = 1,4 мкг/мл; 95 % ДИ: 1,24–1,5) и от 1,62 до 77,8 мкг/мл (Me = 8,1 мкг/мл; 95 % ДИ: 5,8–9,53) соответственно. Концентрация AcINH у медленных метаболизаторов варьировала от 0,66 до 2,2 мкг/мл (Me = 1,33 мкг/мл; 95 % ДИ: 1,2–1,5) и была статистически достоверно ниже, чем у быстрых ацетиляторов, у которых она колебалась от 0,75 до 3,5 мкг/мл (Me = 1,6 мкг/мл; 95 % ДИ: 1,2–1,8; $U = 794,00$; $p = 0,02$). В то же время не установлены статистически достоверные различия по этому показателю между медленными и промежуточными ацетиляторами, для которых концентрация AcINH варьировала в интервале от 0,66 до 2,49 мкг/мл (Me = 1,6 мкг/мл; 95 % ДИ: 0,96–2,11; $U = 446,00$; $p = 0,15$). Концентрация INH у медленных ацетиляторов находилась в диапазоне от

3,24 до 77,8 мкг/мл (Me = 10,14 мкг/мл; 95 % ДИ: 9,18–10,99) и была достоверно выше, чем у лиц с быстрым ацетилированием, где она менялась от 1,62 до 6,8 мкг/мл (Me = 2,7 мкг/мл; 95 % ДИ: 2,33–3,41; $U = 69,00$ $p < 0,0001$). Установлены статистически достоверные различия по этому показателю между медленными и промежуточными ацетиляторами, для которых концентрация INH варьировала в интервале от 2,14 до 8,45 мкг/мл (Me = 4,8 мкг/мл; 95 % ДИ: 3,30–7,11; $U = 159,00$; $p < 0,0001$).

Такие результаты соответствуют представлениям о процессах ацетилирования у медленных ацетиляторов, характеризующихся относительно низкой активностью фермента N-ацетилтрансферазы. В этом случае концентрация исходного тест-препарата в биологической жидкости повышена, в то время как концентрация его ацетилированного метаболита снижена по сравнению с быстрыми ацетиляторами. Этот факт подтвержден и результатами других исследований. Например, в исследовании А. К. Azad Khan с соавторами установлены статистически значимые отличия в уровне общего ($t = 3,7$; $p < 0,001$), свободного ($t = 9,2$; $p < 0,0001$) и ацетилированного сульфациридина ($t = 7,1$; $p < 0,001$) между быстрыми и медленными ацетиляторами [12]. По результатам исследования G. Ramachandran с соавторами, средняя концентрация свободного изониазида в моче у медленных ацетиляторов была $29,6 \pm 1,9$ мкг/мл в сравнении с $15,2 \pm 3,0$ мкг/мл у быстрых ацетиляторов ($p < 0,01$) [13].

Опираясь на выделенные три интервала на оси отношения R разработана формула, определяющая адекватную дозу изониазида каждому конкретному пациенту, имеющему свое индивидуальное отношение (r) концентраций AcINH и INH:

$$D_a(r) = \begin{cases} 0, & \text{если } r < 0.28 \text{ и препарат а токсичен,} \\ 0, & \text{если } r > 0.37 \text{ и препарат а не эффективен} \\ \text{иначе} \\ D_{a,min} + (D_{a,cp} - D_{a,min}) \cdot r / 0.28, & \text{если } r \leq 0.28 \\ D_{a,cp} + (D_{a,max} - D_{a,cp}) \cdot (r - 0.28) / 0.52, & \text{если } r > 0.28 \end{cases}$$

где: $D_{a, min}$ — минимальная терапевтическая доза препарата а; $D_{a, max}$ — высшая терапевтическая доза препарата а; $D_{a, cp}$ — средняя терапевтическая доза препарата а.

Применение представленной формулы целесообразно для индивидуализации терапии изониазидом, например, пациентам, страдающим туберкулезом легких, что позволит оптимизировать лечение и избежать развития нежелательных явлений.

Заключение

1. У европеоидов Гомельского региона выявлено тримодальное распределение фенотипа ацетилирования с соотношением медленных, промежуточных и быстрых ацетиляторов — 71, 10 и 19 % соответственно.

2. Не установлена взаимосвязь ацетиляторного фенотипа с полом ($\tau = -0,047$, $p = 0,42$) индивидов, их возрастом ($\tau = -0,004$, $p = 0,94$), массой тела ($\tau = -0,01$, $p = 0,86$) и пристрастием к курению ($\tau = -0,112$, $p = 0,08$).

3. Определение статуса ацетилятора позволяет индивидуализировать терапию и определить для каждого пациента эффективную дозу изониазида.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Бажора, Ю. И. Фармакогенетика: достижения и перспективы / Ю. И. Бажора. — Одесса: Друк, 2003. — 140 с.
2. Середенин, С. Б. Лекции по фармакогенетике / С. Б. Середенин. — М.: Медицинское информационное агенство, 2004. — 303 с.

3. Прогностические фармакогенетические аспекты индивидуальной лекарственной переносимости — нерешенные проблемы и перспективы / О. А. Яковлева [и др.] // Укр. хіміотер. журнал. — 2000. — № 1. — С. 63–70.

4. Осипенко, Н. Б. Методические и программно-технологические средства оценки и анализа сезонной динамики доз внутреннего облучения жителей населенных пунктов / Н. Б. Осипенко и др. // Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины. — 2004. — № 6 (27). — С. 171–176.

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

6. Concordance between the deduced acetylation status generated by high-speed: real-time PCR based NAT2 genotyping of seven single nucleotide polymorphisms and human NAT2 phenotypes determined by a caffeine assay / H. P. Rihs [et al.] // Clin. Chim. Acta. — 2007. — Vol. 376, № 1/2. — P. 240–243.

7. Acetylation phenotypes and biological variation in a French Caucasian population / Z. B. Pontes [et al.] // Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. — 1993. — Vol. 31, № 2. — P. 59–68.

8. Сравнительный анализ результатов фенотипирования и генотипирования по полиморфизму N-ацетилирования у человека / И. В. Голденкова-Павлова [и др.] // Генетика. — 2006. — Т. 42, № 8. — С. 1443–1450.

9. Оценка фенотипов ацетилирования и окисления у больных сахарным диабетом 2 типа / С. Ю. Гармонов [и др.] // Нижегородский медицинский журнал. — 2005. — № 3. — С. 29–35.

10. Influence of age, sex and body weight on the dapsone acetylation phenotype / P. A. Philip [et al.] // Br. J. Clin. Pharmacol. — 1987. — Vol. 23, № 6. — P. 709–713.

11. Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 genetic polymorphisms and breast cancer risk / C. B. Ambrosone [et al.] // J.A.M.A. — 1996. — Vol. 276, № 18. — P. 1494–1501.

12. 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.

13. Urine levels of rifampicin and isoniazid in asymptomatic HIV-positive individuals / G. Ramachandran [et al.] // Indian J. Med. Res. — 2007. — Vol. 125, № 6. — P. 763–766.

Поступила 23.10.2009