

П. Б. Антоненко, В. Й. Кресюн

Концентрація рифампіцину у хворих на туберкульоз з різним генотипом ізоензиму цитохрому Р-450 2С9

Одеський національний медичний університет

Ключові слова: *CYP2C9*, рифампіцин, ізоніазид

Протягом 2006–2011 років захворюваність на всі форми активного туберкульозу (ТБ) в Україні достовірно зменшилась на 19,2 % з 83,2 до 67,2 випадків на 100 тис. населення. Проте ще високі показники захворюваності на всі форми активного туберкульозу (понад 80 на 100 тис. населення) зареєстровано у південно-східних регіонах України [1]. Водночас кількість хворих з резистентним ТБ зростає — частота первинної хіміорезистентності становить від 7 до 25 % хворих у різних регіонах, а вторинна резистентність сягає 75 %, що зумовлює неефективність лікування [2]. Однією з причин недостатньої ефективності хіміотерапії може бути субтерапевтична концентрація протитуберкульозних препаратів в організмі хворого. Водночас в Україні майже відсутні дані щодо концентрації найефективнішого протитуберкульозного антибіотика рифампіцину у хворих під час проведення хіміотерапії. Зважаючи на те, що рифампіцин є потужним індуктором ферментів цитохромів Р-450 (СYP), можливо, що рифампіцин є субстратом для СYP2С9, і його поліморфізм може впливати на вміст рифампіцину [3]. *Мета дослідження* – вивчення концентрації рифампіцину у хворих на туберкульоз з урахуванням генотипу *CYP450 2С9* під час проведення хіміотерапії.

Матеріали та методи. Зразки крові були отримані від 80 хворих на туберкульоз легень, що вперше діагностовано, в Одеському обласному протитуберкульозному диспансері в 2012 році, з яких 37 (46,3 %) становили жінки, решта – 43 (53,7 %) – складала чолові-

ки. Вік хворих становив від 18 до 73 років (середній вік – 35,9 років). ДНК матеріал був екстрагований з крові хворих з використанням набору ДНК-сорбБ (АмпліСенс, Російська Федерація). Генотип *CYP450 2С9* визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та ендонуклеазного аналізу за методом Т. Н. Sullivan-Klose та ін. [4]. Для ПЛР-ампліфікації *CYP2C9*2* і *CYP2C9*3* брали дві пари відповідних специфічних праймерів. ПЛР продукти *CYP2C9*2* і *CYP2C9*3* були піддані рестрикції за допомогою ферментів (рестриктаз) *AvaII* і *NsiI* відповідно. Усі хворі на туберкульоз отримували рифампіцин й ізоніазид внутрішньо з розрахунку 8–12 і 4–6 мг/кг ваги (загалом 450–600 і 300–400 мг) відповідно на добу згідно з наказом МОЗ України від 9 червня 2006 року № 384 [5]. Забір венозної крові проводили у хворих на туберкульоз через 2, 4, 6 і 24 год після прийому рифампіцину й ізоніазиду. Уміст рифампіцину визначали за В. Т. Чубаряном [6]. Метод полягає в екстракції рифампіцину з крові за допомогою хлороформу і КОН та подальшому вимірюванні на спектрофотометрі СФ-46 при 470 нм. Уміст ізоніазиду вимірювали за методикою Волленберга в модифікації Р. І. Шендерової [7]. Метод базується на здатності ізоніазиду утворювати в кислому середовищі з ванадієвокислим амонієм кольорову комплексну сполуку, інтенсивність забарвлення якої вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 при 400 нм. Для ізоніазиду обчислювали $T_{1/2}$ (half-life – період напіввиведення). $T_{1/2} = \ln 2 / k_{el}$, де k_{el} (константу елімінації) обчислювали як тангенс кута нахилу напівлогарифмічної кривої, що відображає фазу кінетики ізо-

ніазиду, до вісі абсцис. Обрахунок фармакокінетичних і статистичних даних проводили із залученням Microsoft Excel, програми «Primer Biostatistica».

Результати та їх обговорення. Відповідно до генотипу *CYP2C9* з 80 хворих на туберкульоз 57,5 % індивідів були носіями гомозиготного дикого типу гена *CYP2C9*1/*1* (табл. 1). Також 27,5 % і 7,5 % хворих були носіями гетерозиготних генів *CYP2C9*1/*2* і *CYP2C9*1/*3*. Носіями гомозиготного мутантного гена *CYP2C9*3/*3* було 5,0 %, гетерозиготний мутантний ген *CYP2C9*2/*3* спостерігали в 2,5 % індивідів. Хворих з гомозиготним мутантним геном *CYP2C9*2/*2* не було зафіксовано. Загалом, з досліджених 160 алелей *CYP2C9*, 75,0 % складала

алель *CYP2C9*1*, по 16,3 % і 8,7 % складали алелі *CYP2C9*2* і *CYP2C9*3* відповідно. У подальшому для зручності згідно з генотипом *CYP2C9* було виділено хворих з немутованими гомозиготами (**1/*1*) (швидкі метаболізатори); хворих з гетерозиготами (**1/*2*; **1/*3*) (помірні метаболізатори); і хворих з мутованими гомозиготами (**2/*3*; **3/*3*) (повільні метаболізатори).

Через 2 год після введення вміст рифампіцину в крові майже не відрізнявся серед носіїв різних генотипів *CYP2C9* і складав близько 12 мкг/мл (табл. 2). Відсутність різниці в концентрації рифампіцину між вказаними групами свідчить про майже однакову біодоступність і первинний розподіл препарату в організмі хворих різних

Таблиця 1

Генотип і алелі гена CYP2C9 у хворих на туберкульоз, %

Генотип <i>CYP2C9</i> (n = 80)					
<i>*1/*1</i>	<i>*1/*2</i>	<i>*1/*3</i>	<i>*2/*2</i>	<i>*2/*3</i>	<i>*3/*3</i>
57,5	27,5	7,5	0	5	2,5
Алель (n = 160)					
<i>CYP2C9*1</i>		<i>CYP2C9*2</i>		<i>CYP2C9*3</i>	
75,0		16,3		8,7	

Таблиця 2

Концентрація рифампіцину в крові хворих на туберкульоз з різним генотипом CYP2C9 або фенотипом ацетилювання, мкг/мл (M ± t)

Генотип	n	Концентрація рифампіцину в крові через					У середньому протягом 24 год
		2 год	4 год	6 год	24 год		
Загалом	80	12,07 ± 1,49	16,16 ± 1,40	11,38 ± 1,38	7,42 ± 1,29	11,67 ± 1,28	
<i>CYP2C9</i>							
<i>*1/*1</i>	46	12,03 ± 1,36	16,03 ± 1,05	11,35 ± 1,22	7,60 ± 1,20	11,75 ± 1,23	
<i>*1/*2</i> ; <i>*1/*3</i>	28	12,12 ± 1,40	15,43 ± 1,42	10,98 ± 1,26	6,47 ± 1,37	11,15 ± 1,33	
<i>*2/*3</i> ; <i>*3/*3</i>	6	12,17 ± 1,52	20,60 ± 1,21*	12,50 ± 1,35	9,65 ± 0,93	13,73 ± 1,23	
Фенотип ацетилювання							
Швидкі/помірні ацетилятори	28	11,39 ± 1,39	16,29 ± 1,44	9,70 ± 1,29	6,42 ± 1,19	10,79 ± 1,28	
Повільні ацетилятори	52	12,17 ± 1,53	15,99 ± 1,39	12,08 ± 1,45	7,95 ± 1,30	12,02 ± 1,16	

Примітка. * $P_1 = 0,047$, CI = -9,08..-0,06 (відносно генотипу **1/*1*); $P_2 = 0,040$, CI = -10,07..-0,27 (відносно генотипу **1/*2* і **1/*3*).

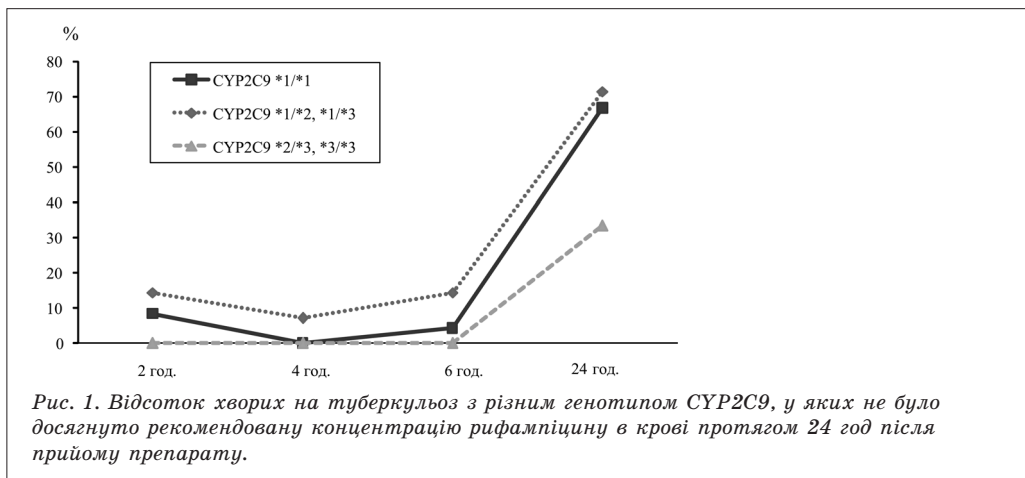
груп. Через 4 год концентрація рифампіцину була найвищою в повільних метаболізаторів і складала 20,60 мкг/мл, що на 25,1 % ($P = 0,040$, $CI = -10,07... - 0,27$) і 22,2 % ($P = 0,047$; $CI = -9,08... - 0,06$) більше, ніж у помірних і швидких метаболізаторів відповідно. Через 6 і 24 год найбільшу концентрацію рифампіцину відзначали у повільних метаболізаторів, найменшу – у помірних метаболізаторів, хоча різниця між групами не була вірогідною (табл. 2). Лише серед повільних метаболізаторів середній уміст рифампіцину через добу після прийому препарату був у межах терапевтичної концентрації (> 8 мкг/мл).

Було обраховано відсоток хворих з різним генотипом *CYP2C9*, концентрація рифампіцину в яких була нижчою від мінімальної терапевтичної концентрації (8 мкг/мл) (рис. 1). Протягом 2–6 год до 14 % хворих мали концентрацію нижчу від мінімальної рекомендованої серед швидких і помірних метаболізаторів. Наприкінці доби близько 71,4 % помірних і 65,3 % швидких метаболізаторів мали субефективну концентрацію рифампіцину. І лише третина хворих, які належали до повільних метаболізаторів, мала субефективний уміст рифампіцину. Різниця була невірогідною в зв'язку з малою кількістю хворих, що належали до повільних метаболізаторів – лише 6 осіб.

Таким чином, загалом очікувана висока концентрація рифампіцину була в повільних метаболізаторів, що може бути пов'язано з повільною біотранс-

формацією рифампіцину. Водночас дещо нижча концентрація в помірних метаболізаторів, ніж у швидких метаболізаторів, оскільки саме в другій групі ми очікували найінтенсивнішу біотрансформацію та найнижчу концентрацію рифампіцину. Можливо це пов'язано з іншими фармакогенетичними і фармакокінетичними факторами, що асоціюються з генотипом *CYP2C9*. Одним з таких факторів може бути вміст ізоніазиду, оскільки відомо, що ця сполука є можливим інгібітором мікосомальних ферментів родини цитохромів, включаючи й *CYP2C9* [8]. Тому швидкість біотрансформації ізоніазиду (головним чином, шляхом ацетилювання) може визначати активність цитохромів, які метаболізують у тому числі й рифампін. З метою уникнення впливу варіативності біодоступності нами було обраховано період напіввиведення ізоніазиду у хворих на туберкульоз, згідно з яким хворі були розподілені на осіб з швидкою/помірною біотрансформацією ($T_{1/2} = 0,62-1,18$ год, $T_{1/2 \text{ серед.}} = 0,86$ год) і повільною біотрансформацією ($T_{1/2} = 1,30-6,75$ год, $T_{1/2 \text{ серед.}} = 2,57$ год) ізоніазиду. Відомо, що основним шляхом біотрансформації ізоніазиду в організмі людини є ацетилювання з утворенням ацетилізоніазиду [9], тому першу групу ми віднесли до фенотипу швидкого/помірного ацетилювання (R/I A), другу – до повільного ацетилювання (SA).

Було встановлено, що через 6 і 24 год після застосування протитуберкульозних препаратів у хворих з



повільною біотрансформацією ізоніазиду вміст рифампіцину був вищим майже на 20 % відносно хворих з швидким/помірним типом ацетилювання, хоча різниця мала невірогідний характер ($P > 0,05$) (табл. 2). Також при обчисленні частки хворих, які мали субефективну концентрацію рифампіцину, було встановлено, що на всіх часових відрізках цей показник був дещо вищим серед швидких/помірних ацетиляторів, ніж серед повільних ацетиляторів з максимумом на 24 год (78,6 % проти 59,3 % відповідно, $P > 0,05$) (рис. 2).

Під час дослідження зв'язку між швидкістю біотрансформації ізоніазиду і генотипом *CYP2C9* було встановлено, що серед диких гомозигот (*1/*1) більшість – 78,3 % – склали повільні ацетилятори, водночас серед гетерозигот (*1/*2; *1/*3) більшість – 64,3 % – склали швидкі/помірні ацетилятори (табл. 3). Тобто, серед гетерозигот швидкий/помірний тип біотрансформації ізоніазиду зустрічався майже втричі частіше, ніж серед носіїв генотипу *CYP2C9* *1/*1 ($P = 0,000$; $\chi^2 = 11,648$). Серед повільних гомозигот 100 % склали носії повільного типу біотрансформації ізоніазиду. Висока концентрація ізоніазиду може уповільнювати метаболізм рифампіцину у зв'язку з пригніченням ферментів родини цитохромів, що можливо є причиною дещо більшої концентрації рифампіцину в носіїв диких гомозигот (*1/*1) і мutowаних гомозигот (*2/*3; *3/*3), ніж у носіїв гетерозигот (*1/*2; *1/*3). Також гальмуючою дією ізоніазиду на ферменти

родини цитохромів можна пояснити досягнення максимальної концентрації рифампіцину в крові лише через 4 год, хоча згідно з даними літератури пік має відзначатися через 2,0–2,5 год [10].

У результаті роздільного обчислення концентрації рифампіцину залежно від швидкості елімінації ізоніазиду було встановлено, що єдиною вірогідною відмінністю була висока концентрація рифампіцину через 4 год у повільних метаболізаторів. Наглядною є концентрація рифампіцину через 6 і 24 год після введення протитуберкульозних препаратів, коли максимальний рівень спостерігався у повільних ацетиляторів і частково в носіїв мутантних алелей *2 і *3. Відповідно до вмісту рифампіцину хворі розташувалися наступним чином: (*2/*3; *3/*3 + SA) > (*1/*2; *1/*3 + SA) > (*1/*1 + SA) > (*1/*1 + R/IA) > (*1/*2; *1/*3 + R/IA). І навіть при такому розподілі ми бачимо, що рифампіцин дещо швидше метаболізується в гетерозигот *CYP2C9*, ніж у диких гомозигот.

Через 24 год після прийому рифампіцину найбільшу кількість випадків субефективної концентрації спостерігали у швидких/помірних ацетиляторів з генотипом немutowаних гомозигот і гетерозигот – 80,0 % і 77,8 % відповідно (рис. 3). Трохи рідше спостерігали випадки субефективної концентрації рифампіцину в носіїв вище вказаних генотипів *CYP2C9*, але з повільною біотрансформацією ізоніазиду – 61,1 % і 60,0 % відповідно. Лише третина хворих, які були носіями мutowаних алелей *2 і *3 і відрізнялись високою

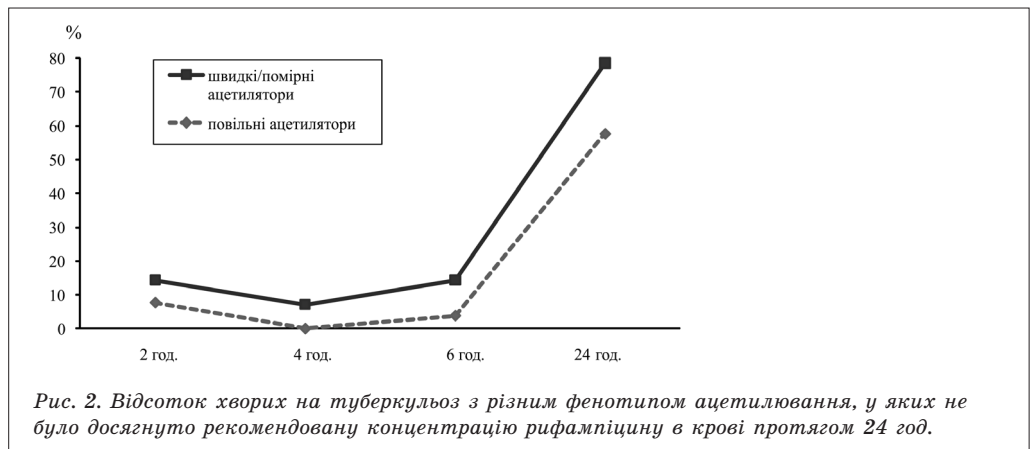


Рис. 2. Відсоток хворих на туберкульоз з різним фенотипом ацетилювання, у яких не було досягнуто рекомендовану концентрацію рифампіцину в крові протягом 24 год.

Концентрація рифампіцину в крові хворих на туберкульоз з різними комбінаціями генотипу CYP2C9 і фенотипу ацетилювання, мкг/мл ($M \pm m$)

Генотип CYP2C9	Фенотип ацетилювання	n	Концентрація рифампіцину в крові через				
			2 год	4 год	6 год	24 год	У середньому протягом 24 год
*1/*1	R/IA	10	11,89 ± 1,27	17,07 ± 1,20	9,94 ± 1,22	6,92 ± 1,20	11,50 ± 1,27
	SA	36	12,93 ± 2,08	15,20 ± 1,01	11,73 ± 1,24	7,80 ± 1,21	11,87 ± 1,19
*1/*2; *1/*3	R/IA	18	11,51 ± 1,41	14,06 ± 1,40	9,75 ± 1,15	6,14 ± 1,15	10,39 ± 1,27
	SA	10	13,22 ± 1,36	16,02 ± 1,41	12,68 ± 1,16	8,13 ± 3,48	12,51 ± 1,35
*2/*3; *3/*3	SA	6	12,17 ± 1,52	20,60 ± 1,21*	12,50 ± 1,45	9,65 ± 0,93	13,73 ± 1,23

Примітка. *P = 0,018, CI = 1,25..11,83 (відносно генотипу *1/*2; *1/*3+ R/IA); P = 0,040, CI = 0,26..10,54 (відносно генотипу *1/*1+SA); P = 0,043, CI = 0,16..9,00 (відносно генотипу *1/*2; *1/*3+SA).

концентрацією ізоніазиду, мали суб-ефективну концентрацію рифампіцину.

На рисунку 4 представлено графік концентрації рифампіцину двох груп хворих, які відрізнялися найбільшою різницею в кінетиці рифампіцину – (*2/*3; *3/*3 + SA) і (*1/*2; *1/*3 + R/IA). Якщо в другій групі концентрація рифампіцину в середньому зберігається протягом усієї доби, то в першій групі – зниження середнього рівня рифампіцину нижче рекомендованої терапевтичної концентрації через 15 год.

У подальших дослідженнях планується дослідити зв'язок між концентрацією та ефективністю протитуберкульозних лікарських засобів.

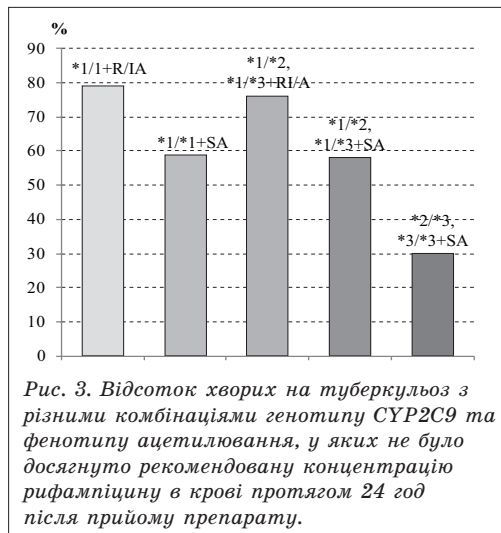


Рис. 3. Відсоток хворих на туберкульоз з різними комбінаціями генотипу CYP2C9 та фенотипу ацетилювання, у яких не було досягнуто рекомендовану концентрацію рифампіцину в крові протягом 24 год після прийому препарату.

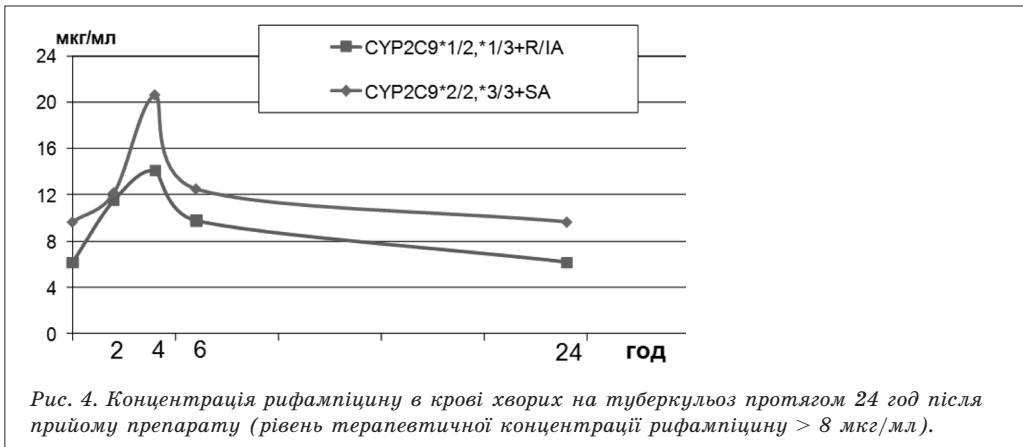


Рис. 4. Концентрація рифампіцину в крові хворих на туберкульоз протягом 24 год після прийому препарату (рівень терапевтичної концентрації рифампіцину > 8 мкг/мл).

Висновки

1. Концентрація рифампіцину через 4 год після прийому препарату згідно з генотипом *CYP2C9* була найвищою в повільних метаболізаторів (*2/*3; *3/*3) і складала 20,60 мкг/мл, що на 25,1 % і 22,2 % більше, ніж у помірних (*1/*2; *1/*3) і швидких (*1/*1) метаболізаторів відповідно.

2. Швидкий/помірний тип біотрансформації ізоніазиду зустрічався майже втричі частіше серед помірних метаболізаторів (*CYP2C9**1/*2; *1/*3), ніж серед носіїв генотипу швидкого метаболізму (*CYP2C9**1/*1).

3. Швидкий/помірний тип біотрансформації ізоніазиду асоціювався з низькою концентрацією рифампіцину.

1. Оцінка контролю за туберкульозом в Україні за період 2006–2010 роки [Текст] / Ю. І. Фещенко [та ін.] // Український пульмонологічний журнал. – 2011. – № 4. – С. 5–10.
2. Аналітичний погляд на проблему хіміорезистентного туберкульозу: нинішній стан, досягнення та деякі невирішені питання [Текст] / В. М. Мельник [та ін.] // Український пульмонологічний журнал. – 2012. – № 1. – С. 5–7.
3. *Castillejos-Lopez Mde J.* Cytochrome P450 and NAT2 polymorphisms and drug metabolism in DOTS / *Mde J. Castillejos-Lopez, M. C. Garcia-Sancho, F. Quinones-Falconi, J. R. Perez-Padilla* // *Rev. Invest. Clin.* – 2008. – V. 60, № 1. – P. 47–57.
4. The role of the *CYP2C9*-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism / *T. H. Sullivan-Klose, B. I. Ghanayem, D. A. Bell* [et al.] // *Pharmacogenetics.* – 1996. – V. 6, № 4. – P. 341–349.
5. Наказ МОЗ України № 384 від 09.06.2006 р. «Про затвердження протоколу надання медичної допомоги хворим на туберкульоз» [Текст]: нормативні директивні правові документи. – Київ, 2006. – 87 с.
6. *Чубарян В. Т.* Клинико-фармакологический подход к индивидуальному дозированию изониазида и рифампицина у больных туберкулезом легких: автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук: спец. 14.00.42 «Клиническая фармакология» / *В. Т. Чубарян.* – Ростов-на-Дону (РФ), 1994. – 20 с.
7. *Шендерова, Р. И.* Определение активного тубазида в сыворотке крови методом Вилленберга [Текст] / *Р. И. Шендерова* // *Лабораторное дело.* – 1975. – № 2. – С. 114–116.
8. *Кресюн В. И., Бажора Ю. И.* – Одесса: Одес. гос. мед. ун-т, 2007. – 164 с.
9. *Bing C.* Gene dose effect of NAT2 variants on the pharmacokinetics of isoniazid and acetylisoniazid in healthy Chinese subjects / *C. Bing, C. Xiaomeia, L. Jinhenga* // *Drug Metabol. Drug Interact.* – 2011. – V. 26, № 3. – P. 113–118.
10. КОМПЕНДИУМ 2012 — лекарственные препараты [Электронный ресурс]: справочник / под редакцией В. Н. Коваленко, А. П. Викторова. – Режим доступа: <http://compendium.com.ua/akt/82/2826/rifampicinum>

П. Б. Антоненко, В. И. Кресюн

Концентрация рифампицина у больных туберкулезом с разным генотипом цитохрома P-450 2C9

Одной из причин развития хіміорезистентного туберкулеза может быть субтерапевтическая концентрация противотуберкулезных препаратов, в том числе и рифампицина в организме больного. В то же время в Украине практически отсутствуют данные относительно концентрации рифампицина у больных во время проведения химиотерапии. Поэтому целью данной работы было исследование концентрации рифампицина у больных туберкулезом с учетом генотипа цитохрома (*CYP*) 2C9, который может принимать участие в метаболизме рифампицина. Генотип *CYP450 2C9* определяли с помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР) и эндонуклеазного анализа. Концентрацию рифампицина и изониазида измеряли в венозной крови через 2, 4, 6 и 24 ч после приема стандартных доз с использованием спектрофотометрии. Для изониазида обчисляли $T_{1/2}$ (период полувыведения), согласно которому больные были разделены на две группы – с быстрой/умеренной биотрансформацией изониазида (R/IA) и с медленной биотрансформацией (SA). Образцы крови были получены от больных с впервые диагностированным туберкулезом легких в Одесском областном противотуберкулезном диспансере в 2012 году. Среди 80 больных туберкулезом легких согласно генотипа *CYP2C9* 57,5 % составляли быстрые метаболізаторы (*1/*1), 35,0 % – умеренные метаболізаторы (*1/*2, *1/*3), остальные – 7,5 % – медленные метаболізаторы (*2/*3, *3/*3). Концентрация рифампицина через 4 ч после приема препарата согласно генотипа *CYP2C9* была наибольшей у медленных метаболізаторов и составляла 20,60 мкг/мл, что на 25,1 % и 22,2 % больше, чем у умеренных и быстрых метаболізаторов соответственно. Медленный тип биотрансформации изониазида встречался почти в три раза чаще среди носителей генотипа быстрого метаболизма, чем среди носителей генотипа умеренных метаболізаторов. Быстрый/умеренный тип биотрансформации изониазида ассоциировался с низкой концентрацией рифампицина.

Ключевые слова: *CYP2C9*, рифампицин, изониазид

P. B. Antonenko, V. I. Kresyun

Rifampicin concentration in tuberculosis patients with different cytochrome P-450 2C9 genotype

One is the putative reason of the development of drug-resistant tuberculosis (TB) is a under-effective concentration of antituberculosis agents, including in rifampicin in the patients. However the lack of researches dedicated to rifampicin concentration in TB-patients in Ukraine. The aim of the present work was to investigate of rifampicin concentration in TB-patients with consideration of genotype of cytochrome (CYP) 2C9 that involved in rifampicin metabolism. The *CYP450 2C9* genotype was detected with the help of polymerase chain reaction (PCR) combined with endonuclease analysis. Rifampicin and isoniazid concentration were detected in venous blood 2, 4, 6 and 24 hrs. after ingestion of standard doses with spectrophotometer. It has been calculated $T_{1/2}$ (half-life) for isoniazid according to which the patients were divided into two groups – with rapid/intermediate biotransformation of isoniazid (R/IA) and with slow biotransformation (SA). The blood samples were obtained from patients with new cases of pulmonary TB from Odesa regional antituberculous dispensary in 2012y. Among 80 TB-patients according to *CYP2C9* genotype 57,5 % individuals belong to rapid metabolizers (**1/*1*), 35,0 % – to intermediate metabolizers (**1/*2*, **1/*3*), others – 7,5 % – to slow metabolizers (**2/*3*, **3/*3*). Rifampicin concentration 4 hours after its intake according to *CYP2C9* genotype has reached the highest level in slow metabolizers – 20,60 mcg/ml and it was 25,1 % and 22,2 % more than in intermediate and rapid metabolizers correspondently. Slow biotransformation of isoniazid has been observed almost 3 times more frequently in the individuals with rapid metabolism genotype than in the individuals with intermediate metabolism. Rapid/intermediate biotransformation of isoniazid associated with lower rifampicin concentration.

Key words: CYP2C9, rifampicin, isoniazid

Надійшла: 14.06.2013 р.

Контактна особа: Антоненко Петро Борисович, кандидат медичних наук, доцент, кафедра загальної та клінічної фармакології, Одеський національний медичний університет, м. Одеса. Тел.: +38 048 712 31 03.