

## Выводы

1. У пациентов с рассеянным склерозом преобладает медленный фенотип N-ацетилирования, который имеет место в 89% случаев.

2. Медленный фенотип N-ацетилирования является предиктором развития рассеянного склероза ( $p=0,012$ ).

## Литература

1. Попова, Н. Особенности терапии рассеянного склероза / Н.Попова // Consilium Medicum. – 2004. – Т.3, №8. – С.645.
2. Демина, Л. Симптоматическая терапия рассеянного склероза / Л.Демина // Consilium Medicum. – 2002. – Т.4, №2. – С.324.
3. Шмидт, Т.Е. Рассеянный склероз: руководство для врачей / Т.Е.Шмидт [и др.]; под общ. ред. Т.Е.Шмидта. – 2-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2010. – 272 с.
4. Soppak, F. McDonald criteria in clinic of multiple sclerosis: 5-year active treatment extension of the phase 3 BENEFIT trial / F.Soppak // Lancet Neurol. – 2012. – V.8, No.12. – P.97–99.
5. Инструкция по применению «Метод определения активности N-ацетилтрансферазы 2 в сыворотке крови»: утв. М-вом здравоохран. Респ. Беларусь 29.12.2010г., регистрационный №094-0710 / Т.В.Сатырова, Н.А.Алексеев, Е.И.Михайлова. – Гомель, 2011. – 17 с.
6. Comparison between serum and urinary sulphadimidine acetylators as predictors of isoniazid acetylator status in patients with pulmonary tuberculosis / S.P.N.Singh [et al.] // Indian. J. Chest. Dis. Allied. Sci. – 1996. – Vol.38. – P.5-11.
7. Cigarette smoking, N-acetyltrasferase 2 genetic polymorphisms and breast cancer risk / C.V.Ambrosone [et al.] // JAMA. – 1996. – Vol.276, No.18. – P.1494–1501.

8. Сатырова Т.В. Эффективность и безопасность сульфасалазина у пациентов с язвенным колитом в зависимости от активности N-ацетилтрансферазы 2: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.06 / Т.В.Сатырова; ГГМУ. – Гомель, 2011. – 29 с.

## ROLE OF PHENOTYPE N-ACETYLATION IN THE DEVELOPMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS

<sup>1</sup>E.I.Mikhailova, <sup>2</sup>F.V.Baginski,  
<sup>1</sup>O.L.Palkovsky

<sup>1</sup>Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Gomel Regional Clinical Hospital, Gomel, Republic of Belarus

The aim of this study was to investigate the relationships of N-acetylation phenotype with a predisposition to the development of multiple sclerosis. The study group involved 27 patients with multiple sclerosis, the diagnosis of whom was based on the revised McDonald criteria (2011). Using the HPLC method with UV detection by means of apparatus «Agilent 1100» and the test drug “isoniazid” it was established that the slow phenotype N-acetylation prevailed in patients with multiple sclerosis (88.90%). The slow phenotype of N-acetylation was revealed more often in patients with multiple sclerosis as compared with healthy volunteers residing with them in the same geographical area ( $p=0.012$ ). Therefore, the slow phenotype of N-acetylation is a predictor of the multiple sclerosis development.

## КЛИРЕНС МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ КАК ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАРКЕР В ОПРЕДЕЛЕНИИ ФЕНОТИПА N-АЦЕТИЛИРОВАНИЯ

<sup>1</sup>О.Л.Палковский, <sup>1</sup>Е.И.Михайлова, <sup>2</sup>А.А.Кудря, <sup>1</sup>М.Ю.Шестопапов

<sup>1</sup>Гомельский государственный медицинский университет, г. Гомель, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Гомельская областная клиническая больница, г. Гомель, Республика Беларусь

Целью исследования явилось изучение эффективности метода определения фенотипа N-ацетилирования на основе определения клиренса мочевой кислоты после и до приема кофеина в качестве тестового препарата. Среди 28 здоровых добровольцев, проживающих в юго-восточном регионе Республики Беларусь, выявлено 18 (64,29%) медленных и 10 (35,71%) быстрых ацетиляторов. Распределение фенотипов N-ацетилирования, полученное с помощью апробируемого метода соответствовало таковому, установленному на той же популяции Т.В.Сатыровой с соавт. (2011 г.) путем выявления скорости метаболизма изониазида в качестве тестового препарата с использованием ВЭЖХ (66% медленных ацетиляторов,  $p=0,69$ ). Апробированный метод, позволяющий эффективно определять фенотип ацетилирования без вложения значительных материальных и людских затрат, может быть рекомендован для использования учреждениям практического здравоохранения.

## Введение

Основным путем метаболизма широкого ряда гидразиновых и ариламиновых лекарственных средств и ксенобиотиков, включая канцерогены, является N-ацетилирование, которое происходит при участии фермента N-ацетилтрансферазы 2 (NAT2). Научные исследования показали, что по активности NAT2 всю человеческую популяцию можно разделить на две большие группы: с фенотипом быстрого и медленного N-ацетилирования [1].

Определение фенотипа N-ацетилирования в последние годы чаще всего используется в качестве фенотипического маркера, позволяющего у медленных ацетиляторов избежать развития осложнений фармакотерапии, а у быстрых ацетиляторов сделать ее более эффективной [2].

Фенотип N-ацетилирования, как правило, выявляют путем определения скорости метаболизма тестовых препаратов (например, изониазида, сульфадимезина и т.д.) с использованием спектрофотометрии или высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Однако эти методы не всегда доступны для практического здравоохранения в силу их дороговизны, сложности и трудоемкости процесса.

**Цель исследования:** изучить эффективность метода определения фенотипа N-ацетилирования на основе определения клиренса (Cl) мочевой кислоты после и до приема кофеина в качестве тестового препарата.

## Материал и методы исследования

Группа исследования была образована из 28 здоровых добровольцев (16 мужчин и 12 женщин) в возрасте от 25 до 61 года ( $M=39,25\pm 9,67$  лет), проживающих в юго-восточном регионе Республики Беларусь и имеющих среднюю массу тела на уровне  $70,28\pm 9,67$ . Все здоровые добровольцы являлись европеоидами, не состояли в родстве, не имели клинических симптомов каких-либо заболеваний, не подвергались хирургическим вмешательствам и не принимали никаких лекарственных средств в течение 1 месяца до включения в исследование.

Фенотип ацетилятора устанавливали на основе определения Cl мочевой кислоты после и до приема кофеина в качестве тестового препарата. Кофеин назначали в дозе 4мг/кг массы тела. За пограничное значение разницы Cl мочевой кислоты после и до приема кофеина была принята величина 4,48мл/мин, как минимальное значение показателя для быстрых ацетиляторов [3].

Статистическую обработку результатов исследования проводили в операционной среде Windows XP с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 7.0. Соответствие распределения количественных признаков закону нор-

мального распределения оценивали с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Для показателей, имеющих нормальное распределение признака, вычислялись среднее арифметическое значение (M) и среднее квадратичное отклонение (s). С учетом наличия нормального распределения при анализе первичных данных производилось парное сравнение запланированных независимых и зависимых выборок по количественному признаку с помощью T-теста. Оценка взаимосвязи количественных и/или качественных признаков производилась с помощью ранговой корреляции по Кендаллу с определением коэффициента ранговой корреляции ( $\tau$ ). Статистически значимыми считали различия при уровне  $p<0,05$ .

## Результаты исследования

При использовании метода определения фенотипа N-ацетилирования на основе определения Cl мочевой кислоты после и до приема кофеина в качестве тестового препарата среди здоровых европеоидов, проживающих в юго-восточном регионе Республики Беларусь, выявлено 18 (64,29%) медленных и 10 (35,71%) быстрых ацетиляторов.

Среднее значение Cl мочевой кислоты в группе волонтеров до приема кофеина составляло  $5,43\pm 3,77$ мл/мин, после приема кофеина –  $9,36\pm 5,45$ мл/мин. Различия между группами статистически достоверны ( $p<0,0001$ ). Изменение Cl мочевой кислоты в группе волонтеров до и после нагрузки кофеином находилось в пределах от 0,19 до 9,4мл/мин ( $M=3,93\pm 2,89$ мл/мин). В группе пациентов с медленным фенотипом N-ацетилирования Cl мочевой кислоты до нагрузки кофеином изменялся от 0,24 до 11,38мл/мин при среднем значении  $4,99\pm 3,02$ мл/мин, после нагрузки кофеином от 1,6 до 13,85мл/мин при среднем значении  $7,05\pm 3,49$ мл/мин. Различия между группами статистически достоверны ( $p<0,0001$ ). Cl мочевой кислоты до и после приема кофеина (мл/мин) у волонтеров с медленным фенотипом типом N-ацетилирования представлен на рис. 1.

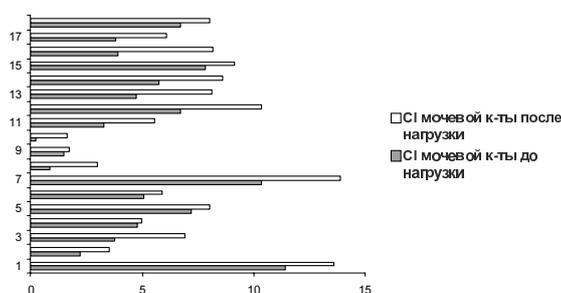


Рис. 1. Клиренс мочевой кислоты до и после приема кофеина (мл/мин) у волонтеров с медленным фенотипом N-ацетилирования

У пациентов с быстрым фенотипом N-ацетилирования CI мочево́й кислоты до нагрузки кофеином варьировал от 1,97 до 16,65мл/мин при среднем значении  $6,23 \pm 4,92$ мл/мин, после нагрузки кофеином – от 7,46 до 25,77 при среднем значении  $13,53 \pm 6,01$ мл/мин. Различия между группами статистически достоверны ( $p < 0,0001$ ). CI мочево́й кислоты до и после приема кофеина (мл/мин) у волонтеров с быстрым фенотипом типом N-ацетилирования представлен на рис. 2.

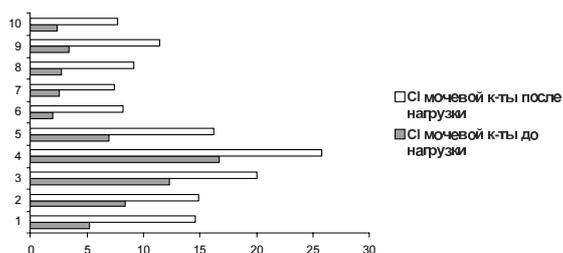


Рис. 2. Клиренс мочево́й кислоты до и после приема кофеина (мл/мин) у волонтеров с быстрым фенотипом N-ацетилирования

Клиренс мочево́й кислоты до нагрузки кофеином у пациентов с быстрым фенотипом ацетилятора не отличался от такового у пациентов с медленным ацетиляторным фенотипом ( $p = 0,41$ ). После нагрузки кофеином CI мочево́й кислоты был статистически достоверно выше у пациентов с быстрым фенотипом ацетилятора ( $p = 0,001$ ).

В группе пациентов с медленным фенотипом N-ацетилирования отмечалось незначительное изменение CI мочево́й кислоты, которое варьировало от 0,19 до 4,28мл/мин и в среднем составляло  $2,06 \pm 1,22$ мл/мин. Вторая группа обследованных здоровых лиц, рассматриваемых как быстрые ацетиляторы, отличалась повышенной скоростью образования мочево́й кислоты. Изменение CI в данной группе варьировало от 5,35 до 9,4мл/мин и в среднем равнялось  $7,56 \pm 1,42$ мл/мин. Различия в разнице CI мочево́й кислоты после и до нагрузки кофеином между медленными и быстрыми ацетиляторами были статистически достоверны ( $p < 0,0001$ ). Разница CI мочево́й кислоты (мл/мин) после и до нагрузки кофеином у медленных и быстрых ацетиляторов представлена на рис. 3.

Полученные данные согласуются с результатами единственного исследования, которое проведено в НИИ детских инфекций г.Санкт-Петербурга. Это исследование основано на определении разницы в CI мочево́й кислоты, но, в отличие от данного исследования, проводилось, во-первых, на детской популяции, а, во-вторых, основывалось на использовании в качестве нагрузки

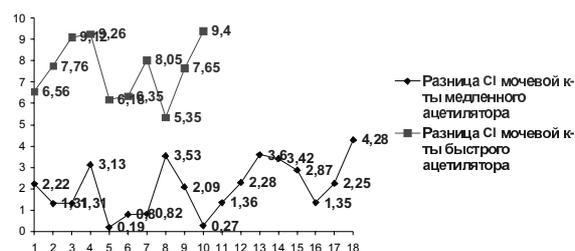


Рис. 3. Разница клиренса мочево́й кислоты (мл/мин) после и до нагрузки кофеином у медленных и быстрых ацетиляторов

кофеиносодержащих напитков. Исследователи получили в группе медленных ацетиляторов изменение CI мочево́й кислоты в среднем на уровне  $1,39 \pm 0,97$ мл/мин. В группе быстрых ацетиляторов изменение CI мочево́й кислоты равнялось  $8,13 \pm 0,76$ мл/мин [3]. Среднее значение разницы CI мочево́й кислоты до и после нагрузки, полученное в разных исследованиях, представлено на рис. 4.

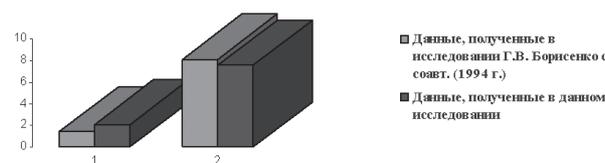


Рис. 4. Среднее значение разницы клиренса мочево́й кислоты до и после нагрузки, полученное в разных исследованиях

Полученные данные согласуются с результатами других исследований. Например, среди европеоидов Германии частота встречаемости медленных ацетиляторов, по данным некоторых авторов, колебалась от 62,0 до 71,0% [4, 5], у европеоидов Франции данный показатель варьировал от 53,0 до 61,3% [6].

Результаты исследования совпадают также с данными, полученными Т.В.Сатыровой с соавт., которые определили распределение фенотипов N-ацетилирования в популяции европеоидов юго-восточного региона Республики Беларусь. Определение фенотипа N-ацетилирования проводили у 129 волонтеров с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым обнаружением на аппарате «Agilent 1100» с помощью тестового препарата «изониазид». Медленный тип ацетилирования имел место у 66,00% населения, а быстрый – у 34,00% [7]. При сравнении результатов исследования Т.В.Сатыровой с соавт. с данными, полученными в предо-

ставленном исследовании, выявлено отсутствие статистически значимых различий ( $p=0,69$ ). Распределение фенотипов ацетилятора в юго-восточном регионе Беларуси, выявленное разными аналитическими методами, представлено на рис. 5.

Установлено, что среди медленных ацетиляторов было 10 (55,56%) мужчин и 8 (44,44%) женщин, среди быстрых ацетиляторов – 6 (60,00%) мужчин и 4 (40,00%) женщины. Среди курящих волонтеров 5 (55,56%) человек отнесены к медленным ацетиляторам, 4 (44,44%) – к быстрым ацетиляторам. Антропометрические характеристики здоровых добровольцев в зависимости от фенотипа N-ацетилирования представлены в таблице.

При изучении статистической взаимосвязи фенотипа N-ацетилирования с характеристиками здоровых добровольцев не установлено ассоциации активности NAT2 с полом ( $\tau=0,11$ ,  $p=0,42$ ) добровольцев, их возрастом ( $\tau=0,14$ ,  $p=0,31$ ), массой тела ( $\tau=-0,03$ ,  $p=0,79$ ), ростом ( $\tau=-0,06$ ,  $p=0,64$ ) и пристрастием к курению ( $\tau=0,15$ ,  $p=0,29$ ). Полученные результаты сопоставимы с данными других исследований. Например, P.A.Philip с соавт. доказали отсутствие корреляции фенотипа N-ацетилирования с полом (мужчины – 63:37, женщины – 59:41;  $p>0,05$ ), возрастом ( $t=0,21$ ,  $p>0,05$ ;  $\chi^2=0,74$ ,  $p>0,10$ ) и массой тела ( $t=1,25$ ,  $p>0,05$ ;  $r_s=-0,053$ ,  $p>0,50$ ) обследованных добровольцев [8]. C.B.Ambrosone с соавт. не выявили ассоциации активности NAT2 с курением (отношение быстрый/медленный ацетилятор составило 37:63 и 41:59 среди курящих и некурящих соответственно,  $p>0,05$ ) [9].

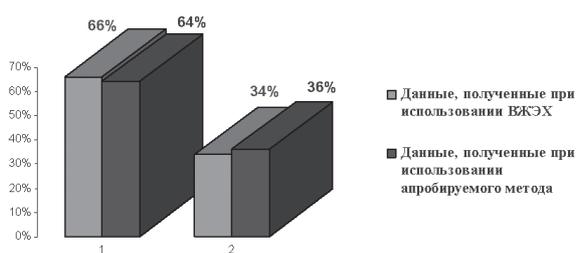


Рис. 5. Распределение фенотипов ацетилятора в юго-восточном регионе Беларуси, выявленное разными аналитическими методами

Таким образом, впервые у здоровых европеоидов, проживающих в юго-восточном регионе Республики Беларусь, установление вариабельности фенотипа N-ацетилтрансферазы 2 проведено на основе определения скорости образования конечного продукта метаболизма кофеина – мочевой кислоты. Установлено, что в популяции юго-восточного региона Республики Беларусь преобладает медленный ацетиляторный статус (64,29%), а соотношение быстрых и медленных ацетиляторов в изученной популяции соответствует таковому для большинства стран Европы.

Результаты определения фенотипа ацетилирования с помощью простого и доступного метода, основанного на разнице С1 мочевой кислоты после и до приема кофеина, сопоставимы с данными, полученными ранее на той же популяции европеоидов юго-восточного региона Республики Беларусь путем выявления скорости метаболизма изониазида в качестве тестового препарата с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии. Этот факт обуславливает возможность использования апробированного метода в учреждениях практического здравоохранения, так как он не требует больших материальных и людских затрат, применим не только в стационарах, но и в поликлиниках, проводится в любых лабораториях.

Метод предполагает замену кофеином нагрузки другими лекарственными препаратами, обладающими по сравнению с ним большим числом побочных эффектов. Кофеин является натуральным природным веществом, алкалоидом пуринового ряда, метаболизм которого проходит с участием фермента N-ацетилтрансферазы 2. Описанный метод дает возможность использования в качестве источников кофеина также и кофеиносодержащих напитков (чай, кофе и др.). Его можно использовать у беременных и детей.

Предложенный метод предоставляет возможность практическому врачу без труда определять фенотип ацетилирования, индивидуализировать фармакотерапию, адекватно оценивать реакцию организма на проводимое лечение и находить оптимальное соотношение между эффективностью и безопасностью терапии. Более того, его можно

#### Антропометрические характеристики здоровых добровольцев в зависимости от фенотипа N-ацетилирования

Признак	Медленные ацетиляторы	Быстрые ацетиляторы
Возраст (M, лет)	38,78±10,92	40,1±7,35
Масса тела (M, кг)	72,53±13,23	69,1±4,90

использовать для определения риска развития целого ряда заболеваний, планировать и проводить в этом направлении различные профилактические мероприятия.

#### Выводы

1. При использовании метода определения фенотипа N-ацетилирования на основе определения Cl мочевого кислоты до и после приема кофеина в качестве тестового препарата среди здоровых европеоидов, проживающих в юго-восточном регионе Республики Беларусь, выявлено 18 (64,29%) медленных и 10 (35,71%) быстрых ацетиляторов.

2. В группе пациентов с медленным типом N-ацетилирования отмечалось незначительное изменение Cl мочевого кислоты, которое изменялось от 0,19 до 4,28мл/мин ( $M=2,06\pm 1,22$ мл/мин). Быстрые ацетиляторы отличались повышенной скоростью образования мочевого кислоты с вариацией изменения Cl от 5,35 до 9,4мл/мин ( $M=7,56\pm 1,42$ мл/мин,  $p<0,0001$ ).

3. Распределение фенотипа N-ацетилирования, полученное с помощью метода, основанного на разнице Cl мочевого кислоты после и до приема кофеина, соответствовало таковому, полученному на той же популяции европеоидов юго-восточного региона Республики Беларусь путем выявления скорости метаболизма изониазида в качестве тестового препарата с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (66% медленных ацетиляторов,  $p=0,69$ ).

#### Литература

1. Кукес, В.Г. Клиническая фармакология и фармакотерапия / В.Г.Кукес [и др.]; под общ. ред. В.Г.Кукеса, А.К.Стародубцева. – 2-е изд., испр. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 640 с.
2. Сатырова, Т.В. Ацетиляторный статус: современный взгляд на проблему (обзор литературы) / Т.В.Сатырова // Проблемы здоровья и экологии. – 2009. – №4 (22). – С.31-36.
3. Буловская, Л.Н. Определение фенотипа N-ацетилтрансферазной активности / Л.Н.Буловская, Г.Н.Борисенко, О.А.Дробаченко, Г.П.Курбатова, В.В.Иванова // Лаб. дело. – 1990. – №10. – С.28–30.
4. Hildebrand, M. Determination of acetylator phenotype in Caucasians with caffeine / M.Hildebrand, W.Seifert // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 1989. – V.37. – P.525-526.
5. 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. – V.376, No.1/2. – P.240-243.
6. Acetylator phenotype and genotype in patients infected with HIV: Discordance between methods for phenotype determination and genotype / W.M.O'Neil [et al.] // Pharmacogenetics. – 2000. – V.10. – P.171-182.
7. Сатырова, Т.В. Эффективность и безопасность сульфасалазина у пациентов с язвенным колитом в зависимости от активности N-ацетилтрансферазы 2: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.06 / Т.В.Сатырова; ГГМУ. – Гомель, 2011. – 29с.
8. Comparison between serum and urinary sulphadimidine acetylators as predictors of isoniazid acetylator status in patients with pulmonary tuberculosis / S.P.N.Singh [et al.] // Indian. J. Chest. Dis. Allied. Sci. – 1996. – Vol.38. – P.5-11.
9. Cigarette smoking, N-acetyltrasferase 2 genetic polymorphisms and breast cancer risk / C.B.Ambrosone [et al.] // JAMA. – 1996. – Vol.276, No.18. – P.1494-1501.

#### CLEARANCE OF URIC ACID AS A PHARMACOGENETIC MARKER IN DETERMINING N-ACETYLATION PHENOTYPE

<sup>1</sup>O.L.Palkovsky, <sup>1</sup>E.I.Mikhailova,  
<sup>2</sup>A.A.Kudrya, <sup>1</sup>M.Y.Shestopalov

<sup>1</sup> Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

<sup>2</sup> Gomel Regional Clinical Hospital, Gomel, Republic of Belarus

The aim of the study was to investigate the effectiveness of the method for determining N-acetylation phenotype based on the measurement of uric acid clearance before and after taking coffee as a test drug. A total of 18 (64.29%) slow and 10 (35.71%) rapid acetylators were identified among 28 healthy volunteers residing in the South-East region of the Republic of Belarus. The distribution of N-acetylation phenotypes obtained by means of the tested method, corresponded to the distribution, established by T.V.Satyrova et al. on the same population (2011) by identifying the metabolic rate of isoniazid as a test preparation using high-performance liquid chromatography (66% of slow acetylators,  $p=0.69$ ). Thus, the tested method allowing to effectively determine the acetylation phenotype without investing the significant financial and human costs can be recommended for the use in practice at the health care institutions.