

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ  
УКРАЇНСЬКИЙ ЦЕНТР НАУКОВОЇ МЕДИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ  
ТА ПАТЕНТНО-ЛІЦЕНЗІЙНОЇ РОБОТИ

**СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ  
ТА БЕЗПЕЧНОСТІ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ  
НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ,  
ЩО ВПЕРШЕ ДІАГНОСТОВАНО**

*(Методичні рекомендації)*  
**(71.15/137.15)**

Київ — 2015

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ  
УКРАЇНСЬКИЙ ЦЕНТР НАУКОВОЇ МЕДИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ  
ТА ПАТЕНТНО-ЛІЦЕНЗІЙНОЇ РОБОТИ

"УЗГОДЖЕНО"

Начальник Лікувально-  
організаційного управління  
НАМН України  
В.В. Лазорішинець

№ 05 2015



"УЗГОДЖЕНО"

В.С. директора Департаменту  
медичної допомоги  
управління  
СПРАВАМ  
МОЗ України  
В.М. Коломейчук

№ 05 2015



**СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ  
ТА БЕЗПЕЧНОСТІ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ  
НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ,  
ЩО ВПЕРШЕ ДІАГНОСТОВАНО**

*(Методичні рекомендації)  
(71.15/137.15)*

Київ – 2015

**Установа-розробник:**

Одеський національний медичний університет МОЗ України  
ДУ Національний інститут фтизіатрії та пульмонології  
ім. Ф. Г. Яновського НАМН України

**Укладачі:**

Д.мед.н., професор, академік НАМН України Фешенко Ю. І.

Д.мед.н., професор, чл.-кор. НАМН України Кресюн В. Й.

Д.мед.н., професор Бажора Ю. І.

Д.мед.н., професор Годован В. В.

К.мед.н., доцент Антоненко П. Б.

К.б.н. Антоненко К. О.

Контактний телефон (048)728-54-74

**Рецензенти:**

Голова експертної проблемної комісії МОЗ та НАМН  
України «Клінічна фармакологія і клінічна фармація»,  
з.д.н.т. України, д.мед.н., проф. Зупанець І. А.

Завідувач кафедри фтизіатрії та пульмонології Харківського  
національного медичного університету, д.мед.н.,  
проф. Шевченко О. С.

# Зміст

|  |    |
|--|----|
| Перелік умовних скорочень .....                                  | 4  |
| Вступ .....  | 5  |
| Клінічне обґрунтування дослідження<br>генотипу <i>NAT2</i> ..... | 6  |
| Устаткування і матеріали,<br>необхідні для виділення ДНК .....   | 12 |
| Виділення ДНК з лейкоцитів крові людини .....                    | 13 |
| Устаткування і матеріали,<br>необхідні для виконання ПЛР:.....   | 15 |
| Виконання ПЛР для визначення генотипу <i>NAT2</i> .....          | 16 |
| Висновок .....   | 18 |
| Перелік рекомендованої літератури .....                          | 19 |

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

|       |   |
|-------|---|
| АлАТ  | аланінамінотрансфераза  |
| АсАТ  | аспартатамінотрансфераза  |
| ВКО   | внутрішній контроль   |
| ГГТ   | гамма-глутамілтрансфераза   |
| НКО   | негативний контроль   |
| ПА    | повільні ацетилятори  |
| ПКО   | позитивний контроль   |
| ПЛР   | полімеразна ланцюгова реакція   |
| п. н. | пар нуклеотидів   |
| ТБ    | туберкульоз   |
| ША    | швидкі ацетилятори  |
| DOTS  | Directly Observed Treatment Short course (безпосереднє контрольоване лікування коротким курсом) |
| CI    | confidence interval (довірчий інтервал)   |
| IA    | помірні ацетилятори   |
| NAT2  | N-ацетилтрансфераза 2   |
| SEM   | Standard error of the mean (стандартна похибка середньої)                                       |

## ВСТУП

Захворювання на туберкульоз залишаються важливою медико-соціальною проблемою України. За рівнем захворюваності на туберкульоз, який у 2012 р. становив 68,1 випадка на 100 тис. населення, Україна відноситься до країн з високою захворюваністю. Туберкульозний процес на теперішній час часто є ускладненим поєднанням з ВІЛ-інфекцією і вірусними гепатитами, що значно знижує ефективність лікування і погіршує перебіг хвороби. Особливою проблемою є поширення штамів збудника туберкульозу з мультирезистентністю (одночасна резистентність до ізоніазиду і рифампіцину) або розширеною резистентністю (додаткова резистентність до фторхінолонів і аміноглікозидів). Згідно з даними ВООЗ, в Україні мультирезистентну форму збудника визначають у 16 % хворих із новими (первинна резистентність) та 44 % хворих з повторними (вторинна або набута резистентність) випадками туберкульозу. У хворих з розширеною резистентністю досягти повної санації процесу значно важче, ніж у хворих з мультирезистентністю збудника туберкульозу — відповідно у 20–30 % випадків проти 60–70 %.

Серед причин розвитку хіміорезистентності збудника туберкульозу найчастіше є недостатня прихильність хворих до хіміотерапії, низькі дози препаратів тощо. Також важливим фактором розвитку хіміорезистентності є поліморфізм генів, що впливають на метаболізм і транспорт ліків або їх фармакологічну активність. Значні варіації щодо концентрації ліків в організмі людини пов'язані з поліморфізмом гена *N*-ацетилтрансферази 2 (*NAT2*), що визначає швидкість ацетилювання низки фармакологічних препаратів, зокрема найбільш ефективного протитуберкульозного препарату ізоніазиду. Поліморфізм гена *NAT2* визначає швидкий, помірний і повільний типи його ацетилювання. На початку 2000-х років добова доза ізоніазиду становила 5–15 мг/кг ваги на добу (600–900 мг в середньому), що дозволяло ігнорувати генотип ацетилювання, оскільки така доза забезпечувала досягнення терапевтичної концентрації ізоніазиду незалежно від генотипу *NAT2*. Але після запровадження в 2006 р. DOTS-стратегії лікування туберкульозу в Україні дозу ізоніази-

ду скоротили до 4–6 мг/кг на добу (300–400 мг в середньому). Водночас досліджень щодо значення поліморфізму гена *NAT2* для перебігу протитуберкульозної терапії в Україні практично не проводили. Також необхідно враховувати значні міжетнічні відмінності щодо поширеності тих або інших генотипів ферментів біотрансформації ліків, які визначають різну активність препарату серед різних етнічних груп. Однак в Україні дослідження, присвячені особливостям поліморфізму гена *NAT2* серед хворих на ТБ і його впливу на перебіг лікування, майже відсутні.

Таким чином, у методичних рекомендаціях наведено метод прогнозування ефективності і безпечності хіміотерапії хворих на туберкульоз легень, що вперше виявлено, шляхом визначення поліморфізму гена *NAT2*.

Методичні рекомендації видаються вперше, призначені для лікарів-фтизіатрів і клінічних фармакологів.

## КЛІНІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНОТИПУ *NAT2*

Для доведення інформативності запропонованого методу було проведено співставлення даних медичних карток хворих на ТБ, що вперше діагностовано, до і після закінчення стаціонарного лікування з урахуванням поліморфізму гена *NAT2* у хворих, який визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Загалом досліджено 86 зразків ДНК хворих на ТБ, серед яких 3 (3,5 %) індивіди були носіями генотипу «швидких ацетиляторів» (ША), 30 (34,9 %) становили особи «помірні ацетилятори» (ІА) і решта – 53 (61,6 %) особи були носіями генотипу «повільних ацетиляторів» (ПА) (табл. 1). Серед здорових донорів до «швидких ацетиляторів належало» 8,2 %, до «помірних» і «повільних ацетиляторів» – 37,7 і 54,1 % відповідно. У подальшому, зважаючи на відносну малу чисельність групи хворих з генотипом ША, було об'єднано хворих цієї групи з хворими, що мали генотип ІА.

На початку стаціонарного лікування процеси деструкції легеневої тканини спостерігались у 51,5 % «швидких ацетиляторів» і 39,6 % «повільних ацетиляторів» (табл. 1). Менше половини хворих мали двохстороннє ураження легень (36,4 % ША і 45,3 % ПА).

**Характеристика туберкульозного процесу  
в залежності від генотипу *NAT2***

| Характеристика туберкульозного процесу |                | На початку лікування, (%) |           | Наприкінці стаціонар. лікування, (%) |            |
|--|----------------|---------------------------|-----------|--------------------------------------|------------|
|  |                | ША, n=33                  | ПА, n=53  | ША, n=33                             | ПА, n=53   |
| Поширення                              | обидві легені  | 12 (36,4)                 | 24 (45,3) | 11 (33,3)                            | 20 (37,7)  |
|  | частини легені | 21 (63,6)                 | 29 (54,7) | 22 (66,7)                            | 33 (62,3)  |
| Деструкція                             | є              | 17 (51,5)                 | 21 (39,6) | 9 (27,3)*                            | 13 (24,5)  |
|  | нема           | 16 (48,5)                 | 32 (60,4) | 24 (72,7)                            | 40 (75,5)  |
| Стадія ураження                        | інфільтрація   | 15 (45,5)                 | 30 (56,6) | 3 (9,1)*                             | 2 (3,8)*   |
|  | розпад         | 6 (18,2)                  | 8 (15,1)  | 2 (6,1)                              | 4 (7,5)    |
|  | обсміненіння   | 12 (36,4)                 | 15 (28,3) | 0*                                   | 1 (1,9)*   |
|  | розсмоктування | —                         | —         | 28 (84,8)*                           | 46 (86,8)* |
| Категорія хворих                       | 1              | 26 (78,8)                 | 36 (67,9) | 19 (57,6)                            | 39 (73,6)  |
|  | 2              | 3 (9,1)                   | 5 (9,4)   | 1 (3,0)                              | 3 (5,7)    |
|  | 3              | 4 (12,1)                  | 12 (22,6) | 2 (6,1)                              | 6 (11,3)   |
|  | 4              | —                         | —         | 11 (33,3)*                           | 5 (9,4)*#  |

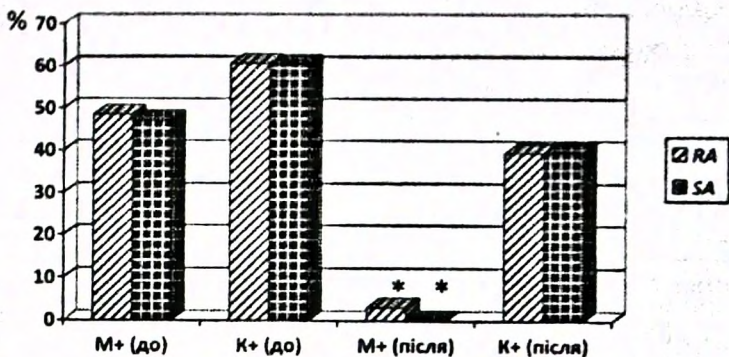
Примітки:

# —  $P < 0,05$  (відносно ША)\* —  $P < 0,05$  (відносно вихідного рівня).

Серед «швидких ацетиляторів» процеси обсміненіння і розпаду легеневої тканини мали місце у 36,4 і 18,2 % відповідно. В той же час серед «повільних ацетиляторів» вказані процеси спостерігались у 28,3 і 15,1 % відповідно. Незалежно від генотипу ацетилювання бактеріовиділення відзначалось у 48 % (за даними мікроскопії) і 61 % (за даними культурального методу) хворих на початку лікування (рис. 1).

Таким чином, на початку лікування у хворих з генотипом «швидкого ацетилювання» відзначалася тенденція до більш важкого і генералізованого перебігу туберкульозу легень. Тривалість стаціонарного лікування вірогідно не відрізнялась між різними типами ацетилювання і становила  $95,7 \pm 4,1$  дня для «швидких ацетиляторів» і  $92,4 \pm 3,9$  дня для «повільних ацетиляторів».





\* —  $P < 0,05$  відносно відповідної групи на початку лікування

Рис. 1. Кількість хворих, які виділяли збудника туберкульозу згідно з даними бактеріоскопії (M+) або культурального методу (K+) залежно від генотипу *NAT2* на початку (до) або наприкінці (після) стаціонарного лікування.

Наприкінці стаціонарного лікування процеси деструкції легеневої тканини зберігались у чверті хворих незалежно від генотипу ацетилювання. Серед ША процеси деструкції спостерігались в 1,9 раза рідше, ніж на початку лікування ( $P \leq 0,05$ ;  $\chi^2 = 4,06$ ); серед ПА також спостерігалась тенденція до зниження частоти деструкції легеневої тканини. Зникнення деструкції мало місце у 47,1 % «швидких ацетиляторів» і 38,1 % «повільних ацетиляторів» (табл. 1). При цьому припинення деструкції легеневої тканини у ША зайняло у 1,3 раза більше часу, ніж у ПА ( $P < 0,05$ ;  $SI = 2,44 \dots 31,64$ ) (табл. 2).

Наприкінці стаціонарного лікування відсоток хворих з інфільтрацією легеневої тканини зменшився майже в 5 разів серед «швидких» і в 14,9 раза серед «повільних ацетиляторів», у порівнянні з вихідним рівнем ( $P < 0,05$ ;  $\chi^2 = 11,00$  і  $\chi^2 = 32,08$  відповідно). В результаті стаціонарного лікування явища обсіменіння легеневої тканини серед ША повністю зникли ( $P < 0,05$ ;  $\chi^2 = 14,77$ ), а серед ПА — зменшилися в 14,9 раза ( $P < 0,05$ ;  $\chi^2 = 14,43$ ) відносно початкового стану. Водночас процеси розсмоктування туберкульозного інфільтрату на моменти виписки зі стаціонару спостерігались у 84,8 % ША і 86,8 % ПА, тоді як на початку лікування ці прояви були взагалі відсутні ( $P < 0,05$ ;  $\chi^2 = 48,63$  і  $\chi^2 = 81,27$  відповідно).

### Конверсія процесу деструкції і бактеріовиділення в залежності від генотипу *NAT2*

| Група хворих | Припинення процесу деструкції |                             | Припинення бактеріовиділення за даними |                             |                       |                             |
|--------------|-------------------------------|-----------------------------|--|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|
|              | кількість хворих, (%)         | тривалість (днів) $\pm$ SEM | мікроскопії                            |                             | посіву                |                             |
|              |                               |                             | кількість хворих, (%)                  | тривалість (днів) $\pm$ SEM | кількість хворих, (%) | тривалість (днів) $\pm$ SEM |
| ША, n=33     | 8/17 (47,1)                   | 71,75 $\pm$ 6,28            | 15/16 (93,8)                           | 67,14 $\pm$ 3,31            | 7/20 (35,0)           | 82,67 $\pm$ 5,94            |
| ПА, n=53     | 8/21 (38,1)                   | 54,71 $\pm$ 2,83*           | 25/25 (100)                            | 60,08 $\pm$ 2,65            | 11/32 (34,4)          | 67,14 $\pm$ 3,31*           |

Примітка: \* –  $P < 0,05$  (відносно ША)

За даними мікроскопії, на момент виписки зі стаціонару бактеріовиділення було відсутнім у 100 % «повільних ацетиляторів» і 97,0 % «швидких ацетиляторів» (рис. 1). Згідно даними культурального методу дослідження наприкінці стаціонарного лікування бактеріовиділення спостерігалось приблизно у 40 % хворих незалежно від генотипу ацетилювання, конверсія бактеріовиділення відбувалась у 35 % хворих (табл. 2). При цьому для «повільних ацетиляторів» припинення бактеріовиділення було в 1,2 раза швидшим, ніж у «швидких ацетиляторів» (67,1 проти 82,7 дня,  $P \leq 0,05$ ;  $CI = 2,25 \dots 28,81$ ).

Якщо на початку лікування понад 90 % хворих незалежно від генотипу ацетилювання належала до 1-ї або 3-ї категорії, то наприкінці лікування 33,3 % ША і 9,4 % ПА переходили до 4-ї категорії ( $P < 0,05$ ;  $\chi^2 = 13,20$  і  $\chi^2 = 5,25$  відповідно та відносно початку лікування), до якої відносяться хворі з хіміорезистентним туберкульозом (табл. 1). Причому серед «швидких ацетиляторів» мультирезистентна форма туберкульозу спостерігалась в 3,5 раза частіше, ніж у «повільних ацетиляторів» ( $P < 0,05$ ;  $\chi^2 = 7,67$ ).

На початку лікування вірогідна різниця між дослідженими групами щодо біохімічних показників крові була відсутня (табл. 3). На момент завершення стаціонарного лікування у ША на 18,6 % знизився рівень білірубіну ( $P < 0,05$ ;  $CI = 0,33 \dots 3,95$ ) відносно початкового показника. У ША за час стаціонарного лікування також відзначалась тенденція до зростання активності АЛАТ, ГГТ.

Наприкінці лікування у пацієнтів з генотипом ПА наступало вірогідне зростання активності більшої частини біохімічних показників крові відносно початкового рівня, крім білірубину, вміст якого дещо зменшувався ( $P > 0,05$ ). Так, рівень АлАТ зріс на 17,5 % ( $P < 0,05$ ;  $CI = -7,19 \dots -0,83$ ), рівень АсАТ збільшився на 18,7 % ( $P < 0,05$ ;  $CI = -8,53 \dots -1,03$ ), рівень ГГТ – на 25,3 % ( $P < 0,001$ ;  $CI = -0,17 \dots -3,79$ ).

Таблиця 3

Біохімічні показники крові до початку та після стаціонарного лікування в залежності від генотипу *NAT2* ( $Mean \pm SEM$ )

| Біохімічний показник                 | Група хворих |              |
|--------------------------------------|--------------|--------------|
|                                      | ША, n=33     | ПА, n=53     |
| <b>НА ПОЧАТКУ ЛІКУВАННЯ</b>          |              |              |
| Білірубин, мкМ/л                     | 13,65±0,83   | 14,57±0,63   |
| Тимолова проба, Од                   | 1,75±0,30    | 2,18±0,13    |
| АлАТ, Од/л                           | 21,23±0,17   | 22,87±1,08   |
| АсАТ, Од/л                           | 26,33±1,54   | 25,62±1,15   |
| ГГТ, Од/л                            | 28,5±1,54    | 27,58±1,18   |
| <b>ПІСЛЯ СТАЦІОНАРНОГО ЛІКУВАННЯ</b> |              |              |
| Білірубин, мкМ/л                     | 11,51±0,37*  | 13,53±0,54*# |
| Тимолова проба, Од                   | 1,66±0,12    | 2,32±0,16#   |
| АлАТ, Од/л                           | 21,82±1,19   | 26,88±1,22*# |
| АсАТ, Од/л                           | 24,05±0,72   | 30,40±1,50*# |
| ГГТ, Од/л                            | 30,39±1,83   | 34,56±1,09*# |

Примітки:

\* –  $P < 0,05$  відносно відповідної групи на початку лікування

# –  $P < 0,05$  відносно групи ША після стаціонарного лікування.

У «повільних ацетиляторів» на момент виписки зі стаціонару рівень білірубину був на 17,5 % більшим ( $P < 0,01$ ;  $CI = -3,48 \dots -0,55$ ), тимолова проба – на 39,8 % ( $P < 0,01$ ;  $CI = -1,10 \dots -0,22$ ), активність АлАТ і АсАТ – на 23,2 % ( $P < 0,01$ ;  $CI = -8,56 \dots -1,56$ ) і 26,4 % ( $P < 0,01$ ;  $CI = -10,24 \dots -2,46$ ) відповідно, ГГТ – на 13,7 % ( $P < 0,05$ ;  $CI = -8,15 \dots -0,19$ ), ніж у «швидких ацетиляторів».

Отже, на початку лікування у хворих на туберкульоз, що належали до «швидких ацетиляторів», в 3 рази частіше спостерігались ознаки дисемінації туберкульозного процесу, ніж у «повільних ацетиляторів». Під час стаціонарного лікування у ПА в 1,3 і 1,2 рази швидше припинялись процеси деструкції легеневої тканини і бактеріовиділення, за даними культурального методу, відповідно, ніж у ША. На момент виписки зі стаціонару «швидкі ацетилятори» в 2,2 рази частіше мали мультирезистентну форму туберкульозу, ніж «повільні ацетилятори».

Маркери токсичного ураження печінки (АлАТ, АсАТ, ГГТ, тимолова проба) практично не змінились у хворих групи ША, в той час вірогідно зросли у хворих групи ПА, що відображає більш високий ризик ураження печінки під час хіміотерапії туберкульозу у ПА, що, можливо, пов'язано з повільною біотрансформацією ізоніазиду.

Отримані дані співпадають з літературними даними, згідно з якими підбір дози ізоніазиду, враховуючи генотип ацетилювання хворого, зменшує токсичність і покращує ефективність лікування туберкульозу. Тому встановлення генотипу *NAT2* у хворих на туберкульоз може бути корисним як предиктор перебігу і ефективності лікування.

## **УСТАТКУВАННЯ І МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ ДНК**

1. Клінічний матеріал, що підлягає дослідженню (кров)
2. Мікропробірки типу «Еппіндорф» на 1,5 мл
3. Мікротермостат
4. Вортекс
5. Центрифуга під пробірки «Eppendorf»
6. Дозатори автоматичні
7. Вакуумний відсмоктувач
8. Холодильник на 2–8°C з морозильною камерою для зберігання зразків ДНК
9. Наконечники з аерозольним бар'єром 100–200 та 200–1000 мкл
10. Штативи для мікропробірок типу «Eppendorf»
11. Одноразові гумові рукавички у достатній кількості
12. Маркер для підписування
13. Набір реагентів для виділення ДНК з лейкоцитів АмплиСенс «ДНК сорб-В»
14. Ємність з дезінфікуючим розчином (5%-й розчин хлораміну).

## ВИДІЛЕННЯ ДНК З ЛЕЙКОЦИТІВ КРОВІ ЛЮДИНИ

Виділення ДНК з лейкоцитів проводять в бактеріологічній лабораторії з використанням набору реагентів АмплиСенс «ДНК сорб-В» згідно з інструкцією наданою фірмою-виробником. Для виділення ДНК використовують зразки крові хворих, що знаходяться на лікуванні в протитуберкульозних стаціонарах.

Дослідження виконують тільки в одноразових гумових рукавицках з використанням одноразових пластикових наконечників з аерозольним бар'єром, які змінюють після кожної операції. Використаний одноразовий пластиковий посуд (пробірки, наконечники) скидають у спеціальну ємність, що містить дезінфікуючий розчин (5%-й розчин хлораміну).

1. Мокротиння об'ємом не менше ніж 500 мкл зібрати у одноразові ємності.
2. У ємності з мокротинням додати «Муколізін» у співвідношенні 1:5. Суміш залишити на 20–30 хв, періодично струшуючи.
3. Відібрати необхідну кількість чистих (пустих) помічених пробірок. У кожену пробірку внести по 10 мкл внутрішнього контролю (ВКО) *Mycobacterium tuberculosis complex* та по 300 мкл лізуючого розчину.
4. В пробірки з лізуючим розчином та ВКО *Mycobacterium tuberculosis complex* внести по 100 мкл матеріалу (див. п. 2). У пробірку негативного контролю внести 100 мкл НКО. У пробірку позитивного контролю внести 90 мкл НКО та 10 мкл ПКО ДНК *Mycobacterium tuberculosis H37Ra*.
5. Усі проби старанно перемішати на вортексі та центрифугувати для видалення крапель з кришок пробірок.
6. Усі проби прогріти 5 хв при 65°C.
7. У кожену пробірку додати 25 мкл універсального сорбенту. Перемішати на вортексі та залишити у штативі на 2 хв. Ще раз перемішати та залишити на 5 хв.
8. Проби центрифугувати при 5 тис. об/хв протягом 30 с. Видалити надосадну рідину.
9. До осаду додати по 300 мкл розчину 1 для відмивання, перемішати на вортексі до повного ресуспендирування універсального сорбенту. Центрифугувати при 5 тис. об/хв протягом 30 с. Видалити надосадну рідину.

10. До осаду додати по 500 мкл розчину 2 для відмивання, перемішати на вортексі до повного ресуспендування універсального сорбенту. Центрифугувати при 10 тис. об/хв протягом 30 с. Видалити надосадну рідину.
  11. Повторити відмивання, слідуючи п. 10.
  12. Помістити пробірки з відкритими кришками в термостат на 5–10 хв при 65°C.
  13. Додати в кожен пробірку по 50 мкл ТЕ-буферу для елюції ДНК. Перемішати на вортексі. Помістити в термостат на 5 хв при 65°C, періодично струшуючи на вортексі.
  14. Центрифугувати при 16 тис. об/хв протягом 1 хв. Надосадна рідина містить очищену ДНК. Проби готові для виконання ПЛР.
- Очищену ДНК можливо зберігати протягом тижня при 2–8°C, чи протягом року при мінус 20°C.

## УСТАТКУВАННЯ І МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ ДЛЯ ВИКОНАННЯ ПЛР

1. Зразок ДНК, що досліджується
2. Мікропробірки типу «Eppendorf» на 0,5 мл
3. Вортекс
4. Ампліфікатор
5. Центрифуга під пробірки «Еппіндорф»
6. Трансілюмінатор з у/ф світлом
7. Пристрій для фіксування результатів електрофорезу (наприклад, відео-система «DNA-Analyzer»)
8. Персональний комп'ютер
9. Блок живлення для проведення електрофорезу
10. Кювета для проведення горизонтального електрофорезу в агарозовому гелі з набором гребінців
11. Дозатори автоматичні
12. Наконечники з аерозольним бар'єром 1–10 мкл, 10–200 мкл та 200–1000 мкл
13. Штативи для мікропробірок типу «Eppendorf»
14. Одноразові гумові рукавички у достатній кількості
15. Маркер для підписування
16. Набір реагентів для проведення ПЛР зі специфічними праймерами
17. 1,5% агорозовий гель
18. ТВЕ-буфер з доданням 1%-го бромистого етідія.
19. Ємність з дезінфікуючим розчином (5%-й розчин хлораміну).



## ВИКОНАННЯ ПЛР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНОТИПУ *NAT2*

Генотип ацетилювання визначався шляхом алель-специфічної ампліфікації *NAT2* алелів з використанням полімеразної ланцюгової реакції. Були використані специфічні праймери для дикого (wt) і мутантного (mut) алелей M1, M2 і M3. Праймер «M1 wt» (CTGATTTGGTCCAG) є комплементарним до гена *NAT2* в положенні 481–494, праймер «M1 mut» (CTGATTTGGTCCAA) розпізнає мутацію C481T в M1; праймери «M2 wt» (TTTACGCTTGAACCTCG) є комплементарним до гена *NAT2* в положенні 574–590 і «M2 mut» (TTTACGCTTGAACCTCA) розпізнає мутацію G590A в M2; праймери «M3 wt» (AATAGTAAGGGGATC) є комплементарним до гена *NAT2* в положенні 857–870 і «M3 mut» (857–870, AATAGTAAGGGGATT) розпізнає мутацію G857A для M3. Таким чином, було досліджено *NAT2* поліморфізм C>T 481 *NAT2*\*5A, G>A 590 *NAT2*\*6A, G>A 857 *NAT2*\*7A/B. Загальний праймер, використаний з праймерами M1 wt, M1 mut, M3wt і M3mut, є «праймер 1» (-74 до -58, AATTAGTCACACGAGGA), для реакцій з праймерами M2 wt і M2 mut – «праймер 2» (1119–1138, TCTAGCATGAATCACTCTGC).

Реакційна суміш (кінцевий об'єм 50 мкл) для визначення генотипу *NAT2* містила 10 мМ (трис-НСl при рН 8,3; 50 мМ КСl, 0,01% желатин, 0,2 мМ кожного dNTP, кожного праймера 0,5 мкМ, 1,25 Од. Таq ДНК полімерази, 300–600 нг геномної ДНК, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub> (M1 wt, M1 mut), 1,25 мМ MgCl<sub>2</sub> (M2 wt, M2 mut) або 1,75 мМ MgCl<sub>2</sub> (M3 wt, M3 mut). Реакція була виконана на термоциклері «Терцик» «ДНК-технологія» за наступними умовами: 30 циклів 94°C – 1 хв, 48°C – 90 сек (для M1) / 55°C (для M2) / 35°C (для M3), 72°C – 3 хв. з фінальною екстензією 72°C – 7 хв. 10 мкл кожного зразка в 1,5% агарозному гелі з доданням 1% бромистого етідія з подальшою візуалізацією під ультрафіолетовим світлом. У разі наявності «диких» чи мутованих алелів генів M1, M2 та M3 були ампліфіковані фрагменти з молекулярною вагою 568; 565 та 944 п. н. відповідно.

На рис. 2 зображено результати електрофорезу гена *NAT2* (виявлення дикої алелі M1). Літерою М позначено маркер молекулярної ваги, який дозволяє визначити молекулярну вагу фрагментів, що ампліфікуються. За умов ампліфікації утворювався

ДНК-фрагмент в 568 п. н., що свідчить про наявність дикої алелі M1, при відсутності рестрикції доводила відсутність алелі M1. Наприклад, на доріжках 1, 2, 4, 5, 7–10 ампліфікувалися фрагмент в 568 п. н., що свідчить про наявність дикої алелі M1 (можливий генотип дикий/дикий або дикий/мутантний), на доріжках 3 і 6 ампліфікація не відбулась (генотип мутантний/мутантний).

Зазвичай в практичній діяльності прогнозування ефективності і токсичності лікування хворих на туберкульоз спирається на клінічні дані, результати інструментальних і лабораторних досліджень хворих (біохімічних, мікроскопічних), а також результати виявлення медикаментозної чутливості штамів збудника туберкульозу.

Наявність  
дикої алелі M1  
*katG*

Відсутність  
дикої алелі M1

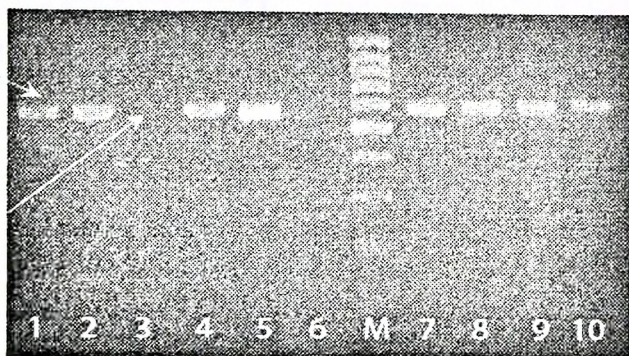


Рис. 2. Електрофореграма визначення поліморфізму гена *NAT2* (дика алель M1) (пояснення в тексті)

Водночас дані щодо поліморфізму генів, що визначають біотрансформацію ліків у хворих на ТБ, в клінічній практиці не використовуються. Тому запропонований спосіб прогнозування ефективності і токсичності лікування хворих на ТБ шляхом визначення в них поліморфізму гену *NAT2* є інформативним, надійним, відтворюваним і тому може рекомендуватись як додатковий показник разом із звичними клінічними, інструментальними і лабораторними дослідженнями, що має покращити ефективність і знизити токсичність лікування.

## ВИСНОВОК

У методичних рекомендаціях наведено нове вирішення актуальної проблеми прогнозування ефективності і безпеки хіміотерапії у фтизіатрії, яке полягає у визначенні поліморфізму гена *NAT2* у хворих на туберкульоз.

1. Визначення поліморфізму гена *NAT2* у хворих на туберкульоз разом зі звичайними клінічними, лабораторними і інструментальними методами дозволяє виділити групу хворих на ТБ, які мають високий ризик розвитку мультирезистентності у збудника туберкульозу і несприятливий перебіг лікування захворювання.

2. Під час стаціонарного лікування у хворих з генотипом «повільних ацетиляторів» в 1,3 раза швидше припинявся процес деструкції легень і в 1,2 раза – бактеріовиділення, за даними культурального методу відносно «швидких ацетиляторів». На момент виписки зі стаціонару «швидкі ацетилятори» в 2,2 раза частіше мали мультирезистентну форму туберкульозу, ніж «повільні ацетилятори».

3. Наприкінці стаціонарного лікування маркери гепатотоксичності були більш високими у хворих з генотипом *NAT2* «повільні ацетилятори», ніж у хворих з генотипом «швидкі ацетилятори», що відображає більш високий ризик ураження печінки під час хіміотерапії туберкульозу у «повільних ацетиляторів».

## ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Епідеміологічні та організаційні аспекти надання інтегрованої медичної допомоги хворим на ВІЛ/СНІД, туберкульоз, інфекційний гепатит та наркотичну залежність в Україні / Ю. І. Фещенко, А. М. Вієвський, В. М. Мельник, Л. В. Турченко [та ін.] // Український пульмонологічний журнал. – 2013. – № 3 (додаток). – С. 34–46.
2. Оцінка результатів лікування хворих на вперше діагностований туберкульоз легень та з рецидивами захворювання за показниками когортного аналізу / В. М. Петренко, С. О. Черенько, Н. А. Литвиненко, Л. М. Циганкова [та ін.] // Український пульмонологічний журнал. – 2011. – № 3. – С. 5–10.
3. Фещенко Ю. І. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Туберкульоз»: особливості його підготовки та чим відрізняється від попередніх клінічних протоколів / Ю. І. Фещенко, С. О. Черенько, А. І. Барбова // Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. – 2013. – № 2 (13). – С. 8–18.
4. Наказ МОЗ України №318 від 24.05.2006 «Про затвердження Проколу по впровадженню ДОТС-стратегії в Україні»: зб. нормат. док. з охорони здоров'я / скл. Ю. І. Фещенко, С. О. Черенько, В. М. Мельник // Київ, 2006. – 49 с. (Нормативні директивні правові документи).
5. Matsumoto T. Future of pharmacogenetics-based therapy for tuberculosis / T. Matsumoto, M. Ohno, J. Azuma // Pharmacogenomics. – 2014. – Vol. 15, N 5. – P. 601–607.
6. Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans / M. Blum, A. Demierre, D. M. Grant, M Heim [et al.] // Proc. Nati. Acad. Sci. USA – 1991. – Vol. 88. – P. 5237–5241.
7. Pharmacometabonomic characterization of xenobiotic and endogenous metabolic phenotypes that account for inter-individual variation in isoniazid-induced toxicological response / K. Cunningham, S. P. Claus, J. C. Lindon [et al.] // J. Proteome Res. – 2012. – Vol. 9, N 11. – P. 4630–4642.

*Довідкове видання*

**СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ  
ТА БЕЗПЕЧНОСТІ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ  
НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ,  
ЩО ВПЕРШЕ ДІАГНОСТОВАНО**

*Методичні рекомендації*

*Укладачі:*

**ФЕЩЕНКО Юрій Іванович  
КРЕСЮН Валентин Йосипович  
БАЖОРА Юрій Іванович  
та ін.**

Завідувачка редакції *Т. М. Забанова*  
Дизайнер обкладинки *О. А. Кунтарас*  
Технічний редактор *Н. С. Жукова*  
Коректор *І. В. Шепельська*

---

Формат 60×84/16. Ум. друк. арк. 1,16. Тираж 300 прим. Зам. № 399.

Видавництво і друкарня «Астропринт», 65091, м. Одеса, вул. Разумовська, 21  
Тел.: (0482) 37-07-95, 37-14-25, 33-07-17, (048) 7-855-855. [www.astroprint.odessa.ua](http://www.astroprint.odessa.ua)  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1373 від 28.05.2003