

Казаков Алексей Владимирович

**Оптимизация гепатопротективной терапии у больных туберкулезом
органов дыхания с учетом оценки генетического полиморфизма
генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с помощью
биологических чипов**

14.01.16 – Фтизиатрия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) и Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Смердин Сергей Викторович

Официальные оппоненты:

Морозова Татьяна Ивановна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фтизиатрии, заведующая кафедрой

Ставицкая Наталия Васильевна – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулёза» Министерства здравоохранения Российской Федерации, директор

Шовкун Людмила Анатольевна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра туберкулеза, заведующая кафедрой

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

Защита состоится «23» июня 2021 года в 11.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.06 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119435, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д.6, стр. 1

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, ул. Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте организации www.sechenov.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2021г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук



Павлова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы. Туберкулез является глобальной проблемой общественного здравоохранения. В Российской Федерации эпидемиологическая обстановка по туберкулезу в последние годы стабилизировалась, но остается весьма напряженной. На крайне низком уровне остаются показатели эффективности лечения больных туберкулезом. Эффективность курса противотуберкулезной терапии у впервые выявленных больных туберкулезом пациентов без наличия множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) микобактерий туберкулеза (МБТ) отмечалось в 2009 г. – 72,4 %; в 2016 г. – 74,3 %; в 2017 г. – 71,9 % среди всех пролеченных по первому, второму и третьему режимам химиотерапии (ВОЗ. Доклад о глобальной борьбе с туберкулезом 2018 год; Эпидемическая ситуация по туберкулезу в Российской Федерации в 2018 году). При этом, рекомендуемая эффективность лечения должна составлять не менее 85 % (Global Tuberculosis Report, 2019).

В современных условиях одной из причин недостаточно высокой эффективности лечения такого социально значимого заболевания, как туберкулёз, являются частые нежелательные побочные реакции (НПР) на противотуберкулезные препараты, в основном гепатотоксические (Иванова Д. А., 2017; Фатыхова З. М., 2020). Основными противотуберкулезными препаратами для лечения туберкулеза (при сохраненной лекарственной чувствительности возбудителя) являются изониазид и рифампицин. Они до сих пор остаются самыми эффективными по отношению к возбудителю туберкулеза – микобактерии туберкулеза. Изониазид может вызывать такие неблагоприятные побочные реакции, как диспепсические расстройства, аллергические, нейротоксические и гепатотоксические реакции (Мордык А. В., 2008).

Наиболее распространенной из неблагоприятных побочных реакций на изониазид является поражение печени, так как именно в ней происходят процессы биотрансформации и обезвреживания большинства лекарственных препаратов (Garibaldi R. A., 1972; Saukkonen J. J., 2006). Иногда нежелательные

побочные реакции по гепатотоксическому типу, при их тяжелом течении, могут стать причиной смерти пациентов (Teixeira R. L., 2011). На сегодняшний день гепатотоксические побочные реакции на изониазид достигают 30 % в различных популяциях (гепатотоксичность определяется по уровню повышения в сыворотки крови аланинаминотрансферазы (АЛТ) (более 3 норм) в сочетании с клиническими симптомами, или повышение в 5 раз выше нормы без клинических проявлений) (Saukkonen J. J., 2006).

При развитии нежелательных побочных реакций по гепатотоксическому типу противотуберкулезная терапия приостанавливается до устранения НПР и назначаются в качестве средств патогенетической терапии эссенциальные фосфолипиды, орнитин, препараты янтарной кислоты, урсодезоксихолиевой кислоты и др. (Суханов Д. С., 2008). В дальнейшем возобновление приема изониазида и рифампицина возможно только под «прикрытием» гепатопротекторами и под контролем уровня аминотрансфераз. Таким образом, за время, которое требуется на ликвидацию нежелательных побочных реакций по гепатотоксическому типу, противотуберкулезные препараты пациентом не принимаются, а это способствует увеличению риска развития МЛУ МБТ. Риск развития гепатотоксических побочных реакций на изониазид связан не только с генетическими, но и с приобретенными факторами, к которым можно отнести сопутствующую патологию печени, злоупотребление алкоголем, прием наркотиков и др. Тем не менее, несомненна роль генетических факторов, которые изначально определяют активность процессов участвующих в полноценной биотрансформации изониазида (Teixeira R. L., 2011).

В то же время у больных туберкулезом, особенно с лекарственной устойчивостью (зачастую множественной), имеется целый ряд сопутствующих хронических заболеваний (гастриты и гастродуодениты, язвенная болезнь, ХОБЛ, алкоголизм, наркомания, а также ВИЧ-инфекция), что часто сопровождается патологией печени (вирусные и лекарственные гепатиты), что приводит к увеличению частоты побочных реакций на противотуберкулезные препараты (Saukkonen J. J., 2006; Суханов Д. С., 2008; Соколова Г. Б., 2000).

N-ацетилтрансфераза 2 типа (NAT2) остается главным ферментом, ответственным за метаболизм и инактивацию изониазида в организме человека. Этот фермент катализирует перенос ацетильной группы от кофактора ацетил-коэнзима А (ацетил-КоА) к концевому азоту препарата. NAT2 кодируется геном *NAT2* и в многочисленных генетических исследованиях было показано, что различные варианты гена *NAT2* были непосредственно связаны с появлением различных фенотипов ацетилирования (Teixeira R.L., 2011).

Гены *NAT2* являются полиморфными и олигонуклеотидный полиморфизм (ОНП) может привести к изменению активности этого фермента, что является генетической основой для объяснения таких фенотипических особенностей, как наличие так называемых быстрых, промежуточных и медленных ацетиляторов (Teixeira R. L., 2011).

Наличие полиморфизмов в гене *NAT2* может быть определено с помощью процедур генотипирования, таких как ПЦР, аллельспецифическая ПЦР или прямого секвенирования. Многочисленные исследования показали, что частота встречаемости различных типов ацетилирования в этнически различных популяциях различна. В азиатской и южноамериканской популяциях фенотип «быстрых» ацетиляторов встречается чаще, тогда как в европейской на долю «медленных» ацетиляторов приходится до 50 % исследуемой популяции (Teixeira R. L., 2011).

В течение длительного времени применение изониазида объясняло наибольшее количество НПР по гепатотоксическому типу при лечении пациентов противотуберкулезными препаратами. Во многих исследованиях была выявлена связь между приемом изониазида на фоне определенного фенотипа ацетилирования и частотой развития НПР по гепатотоксическому типу. В некоторых исследованиях медленный фенотип ацетилирования рассматривался как причина повышенного риска НПР по гепатотоксическому типу. В других исследованиях наблюдалось отсутствие связи между фенотипом ацетилирования и НПР по гепатотоксическому типу при лечении больных туберкулезом, а в некоторых исследованиях полученные результаты

свидетельствуют о том, что именно при наличии фенотипа, определяющего быстрые механизмы ацетиляции, наиболее часто развиваются такие НПР. . Разница в полученных результатах этих исследований, наиболее вероятно, объясняется в использовании различных методов генотипирования в различных популяциях. Например, ферментативный метод, использованный в некоторых исследованиях, может быть недостаточно точным. Также некоторые исследователи используют небольшое количество ОНП для определения предполагаемого типа ацетилирования у пациентов. Так как в различных популяциях были выявлены различные ОНП гена *NAT2*, а в некоторых исследованиях также выявились новые мутации, влияющие на активность ферментов *NAT2*, целесообразно проводить поиск связей между генотипом и фенотипом ацетилирования в конкретной исследуемой популяции. В обратном случае можно получить неверные результаты о соотношении быстрых и медленных ацетиляторов, а также к ошибочным корреляциям при их интерпретации. Тем не менее, в большинстве исследований получена информация о том, что частота развития НПР по гепатотоксическому типу, которые могут возникнуть при применении изониазида, была значительно выше при наличии медленного фенотипа ацетилирования, в отличие от быстрого или промежуточного фенотипа. Таким образом, показано, что наличие определенного фенотипа ацетилирования может являться фактором риска развития НПР по гепатотоксическому типу при приеме противотуберкулезных препаратов, в частности изониазида. Также имеются результаты мета-анализа из данных 14 исследований за период 2000–2011 гг., в которых предпринята попытка решить проблему недостаточной статистической мощности на основе накопленных данных из небольших по объему выборок в различных популяциях (в основном азиатских). В результате было показано, что наличие у больных туберкулезом не только фенотипа, но и соответствующего ему медленного генотипа ацетилирования способствует более высокому риску развития НПР по гепатотоксическому типу, чем у пациентов имеющих генотип, определяющий быстрый или промежуточный фенотип ацетилирования (Wang P. Y. et al., 2012).

Следует отметить, что указанные выше исследования выполнялись в популяциях Африки, Южной Америки и Азии. Таких масштабных исследований на европейской популяции, в том числе на территории России, практически не проводилось.

Степень разработанности темы диссертации. Учитывая актуальность проблемы гепатотоксических нежелательных побочных реакций при лечении больных туберкулёзом, отсутствие эффективных современных инструментов для оценки риска их возникновения у пациентов, наличия разнообразных данных, зачастую противоречивых, о влиянии различных генетических факторов на возникновение таких реакций, несмотря на их большое влияние на непрерывность курса противотуберкулезного лечения, а значит и на эффективность терапии у больных туберкулезом. Так же следует отметить, что исследование генома у больных туберкулезом и поиск связанных с риском гепатотоксических нежелательных побочных реакций проводились на различных популяциях без применения биологических чипов, что определяет недостаточную разработанность выбранной темы, делая ее областью интереса фтизиатрии.

Цель исследования. Снижение частоты нежелательных побочных реакций по гепатотоксическому типу при лечении больных туберкулезом органов дыхания путем применения дифференцированного подхода к назначению гепатопротекторов с учетом оценки генетического полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с помощью биологических чипов.

Задачи исследования

- 1) Изучить частоту развития нежелательных побочных реакций по гепатотоксическому типу на противотуберкулёзные препараты.
- 2) Провести оценку генетического полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков у больных туберкулёзом органов дыхания.
- 3) Выявить связь полиморфных вариантов генов с частотой развития нежелательных побочных реакций по гепатотоксическому типу на

противотуберкулёзные препараты.

4) Определить показания к назначению гепатопротективной терапии в зависимости от результатов оценки генетического полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков у больных туберкулёзом органов дыхания.

5) Изучить частоту возникновения нежелательных побочных реакций по гепатотоксическому типу у больных туберкулёзом легких с применением оптимальной гепатопротективной поддержки, основанной на определении генетического полиморфизма, и сравнить их с результатами стандартной терапии.

Научная новизна. В диссертационной работе впервые использован метод оценки генетического полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков при помощи биологических чипов.

Впервые разработан алгоритм назначения гепатопротективной терапии в зависимости от генетического полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с целью профилактики и коррекции побочного действия противотуберкулёзных препаратов. Установлено, что генотипы *AA* олоигонуклеотидной последовательности rs1799931 и генотипы *AA* и *AG* олоигонуклеотидной последовательности rs1799930, а также генотипы *TT* или *CT* олоигонуклеотидной последовательности rs1041983, определяющие активность фермента NAT2, статистически значимо увеличивают риск гепатотоксичности при приеме противотуберкулёзных препаратов.

Разработана база данных «Прогноз развития гепатотоксических реакций при проведении химиотерапии у пациентов, страдающих туберкулёзом органов дыхания» от 08.07.2019 (получено свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2019621214).

Теоретическая и практическая значимость работы. Выявление основных генетических факторов развития побочных гепатотоксических реакций на противотуберкулёзные препараты первого ряда (изониазид и рифампицин) с помощью биологических чипов до начала противотуберкулёзной

химиотерапии позволяет дифференцированно подходить к назначению гепатопротекторов с учетом оценки генетического полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков, что позволяет проводить своевременную профилактику побочных гепатотоксических реакций на противотуберкулезные препараты.

Методология и методы диссертационного исследования. Теоретико-методологической базой диссертационной работы являются труды российских и зарубежных ученых, посвященные проблемам туберкулеза, нежелательных побочных явлений при лечении противотуберкулезными препаратами, определения генетического полиморфизма у пациентов больных туберкулезом с использованием различных методов. Авторами таких работ являются Иванова Д. А., Борисов С. Е., Грядунов Д. А., Зименков Д. В., Михайлович В. М., Макарова С. И., Мордык А. В., Суханов Д. С., Сычев Д. А., Раменская Г. В., Игнатьев И. В., Кулес В. Г. и др.

При решении поставленных задач использованы общенаучные (анализ, формализация, эксперимент, индукция, дедукция) и специальные методы (обработка вариационного ряда, вычисление выборочной средней ошибки, средний непараметрический критерий согласия Пирсона, индивидуальный анализ качественных признаков, логистический регрессионный анализ). Реализация ряда методов была осуществлена с помощью пакета программ MicrosoftExcel для Windows 10 Pro. Статистическая обработка полученных параметров осуществлялась в программах STATISTICA (StatSoftInc., USA, версия 6.0), MicrosoftOffice для дома и бизнеса 2016, Excel 2016 MSO (16.0.13029.20232) 32-разрядная версия.

Положения, выносимые на защиту

1) Статистически значимым фактором риска развития гепатотоксических реакций при приеме комплекса противотуберкулезных препаратов первого ряда у больных туберкулезом является наличие генотипа *AA* олигонуклеотидной последовательности rs1799931 и *AA* или *AG* олигонуклеотидной последовательности rs1799930 гена *NAT2*.

2) Статистически значимым фактором риска развития гепатотоксических реакций при приеме комплекса противотуберкулезных препаратов первого ряда у больных туберкулезом является наличие генотипа *TT* или *CT* олигонуклеотидной последовательности rs1041983 гена *NAT2*.

3) Связи между концентрацией изониазида и рифампицина в плазме крови у пациентов, получающих лечение по 1 и 3 режиму химиотерапии, и побочными гепатотоксическими реакциями не выявлено, коррекция дозировки препарата для предотвращения гепатотоксических реакций нецелесообразна.

4) Назначение гепатопротективной терапии у больных туберкулезом органов дыхания с учетом оценки генетического полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с помощью биологических чипов позволяет снизить частоту возникновения гепатотоксических реакций на противотуберкулезные препараты.

Степень достоверности. Степень достоверности результатов определяется соответствием дизайна исследования критериям доказательной медицины, достаточным объемом наблюдений, репрезентативностью комплексного обследования пациентов с использованием современных лабораторных и инструментальных методов исследования и обработки полученных данных в соответствии с поставленными задачами, методами статистического анализа. Статистическая обработка полученных параметров осуществлялась в программах STATISTICA (StatSoftInc., USA, версия 6.0), MicrosoftOffice для дома и бизнеса 2016, Excel 2016 MSO (16.0.13029.20232) 32-разрядная версия. Сформулированные задачи соответствуют цели исследования. Результаты исследования, положения, выводы и практические рекомендации аргументированы фактическим материалом и логически вытекают из анализа полученных данных. Размер выборки пациентов (184 пациента), достаточный для получения доказательных данных, в исследование были включены все пациенты, находящиеся на стационарном лечении и соответствующие критериям включения/исключения.

Апробация работы. Основные положения и результаты проведенного

исследования доложены и обсуждены в виде постерных докладов на: «The frequency of cases of hepatotoxic reactions in first diagnosed patients with pulmonary tuberculosis» на ERS International Congress 2018 (Paris, 2018); «Experimental justification choose to prevent hepatotoxic reactions to anti-TB drugs based on gene-phenotypic characteristics» на ERS International Congress 2019 (Madrid, 2019); «Hepatotoxic reactions in rats after administration of component schemes of reserve Anti-TB drugs with different safety profile» на ERS International Congress 2019 (Madrid, 2019); в виде устных докладов на: 5-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы профилактики, диагностики и лечения туберкулеза у детей и подростков» (Казань, 2017); 6-м съезде фтизиатров России (Владикавказ, 2019).

Диссертационная работа апробирована на заседании кафедры фтизиопульмонологии и торакальной хирургии им. М. И. Перельмана Института клинической медицины им. Н. В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) совместно с сотрудниками ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России (Москва, 2020).

Внедрение результатов исследования. Основные методы и результаты исследования внедрены в клиническую практику детского туберкулезного отделения ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России, г. Москва, а также в учебный процесс кафедры фтизиопульмонологии и торакальной хирургии им. М. И. Перельмана Института клинической медицины им. Н. В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины фтизиатрия по направлению подготовки (специальности) 31.05.01 Лечебное дело и 31.05.02 Педиатрия.

Личный вклад автора. Автор осуществлял разработку общей концепции и дизайна исследования, лично проводил выполнение всех этапов работы: сбор биологического и клинического материала, статистическую обработку данных,

обобщение, интерпретацию научных результатов, обсуждение результатов исследования и формирование выводов. В соавторстве написал и опубликовал печатные работы в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, в которых отражены полученные результаты исследования.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 18 научных работ, в том числе 12 статей в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из них 6 статей в журналах, входящих в международную реферативную базу данных и систем цитирования (Scopus); 1 свидетельство о государственной регистрации базы данных.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту научной специальности 14.01.16 – Фтизиатрия. Фтизиатрия – область медицинской науки о туберкулезе как инфекционном заболевании человека. Область исследований – клинические проявления туберкулеза органов дыхания у детей, подростков и взрослых, нарушения функции других органов и систем при туберкулезе, лечение туберкулеза органов дыхания: химиотерапия, патогенетическая терапия.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 176 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, изложения материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения результатов и заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Список литературы представлен 193 источниками, из которых 177 в зарубежных изданиях. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 27 таблиц и 21 рисунка.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика группы обследованных больных.

Исследование выполнено в период с 2016 по 2019 годы. Группу наблюдения составили 184 пациента с туберкулезом органов дыхания, получавших противотуберкулезные препараты по I и III режимам химиотерапии.

В соответствие с задачами исследования больные были разделены на следующие группы (рисунок 1):

Группа А – 95 пациентов находящихся на стационарном лечении и получающих лечение по I и III режимам химиотерапии, получающих гепатопротективную терапию без учета генетических факторов риска:

подгруппа IA – 23 пациента, у которых по результатам биохимического анализа крови выявлялось повышение уровня АлАТ и АсАТ более 3-х норм, и (или) возникали жалобы диспептического характера (тошнота, рвота) на фоне приема противотуберкулезных препаратов;

подгруппа IIА – 72 пациента, у которых не наблюдалось гепатотоксических реакций на фоне приема противотуберкулезных препаратов;

Группа Б – 71 пациент, находящийся на стационарном лечении и получающие лечение по I и III режимам химиотерапии, у которых проводилось исследование мутаций в ОНП rs1799931, rs1799930 и rs1041983 гена *NAT2* с помощью биологических чипов, по результатам которого осуществлялся персонализированный подход к назначению гепатопротекторов:

подгруппа IB – 32 пациента с повышенным риском возникновения гепатотоксических НПР, которым была назначена гепатопротективная терапии;

подгруппа IIБ – 39 пациентов с низким риском возникновения гепатотоксических НПР, гепатопротективная терапия которым не назначалась;

Группа В пациентов вложенного исследования связи фармакокинетики изониазида и рифампицина и частотой гепатотоксических побочных реакций – 18 пациентов.

На первом этапе (рисунок 1) проводилась оценка генетического полиморфизма у 95 человек (группа А), в которую вошли пациенты, находящиеся на стационарном лечении и получающие лечение по I и III режимам химиотерапии и гепатопротективную терапию без учета генетических факторов риска. В подгруппу I группы А вошли пациенты с проявлениями гепатотоксических НПР ($n = 23$), в свою очередь, в подгруппу II ($n = 73$) – пациенты, у которых прием ПТП не сопровождался возникновением гепатотоксических НПР. На этом этапе изучалась частота и степень выраженности гепатотоксических реакций на противотуберкулезные препараты, а также определение мутаций в олигонуклеотидных последовательностях генов кандидатов и поиск корреляционных связей между генотипом пациента и частотой гепатотоксических нежелательных побочных реакций.

В качестве генов кандидатов рассматривались мутации в олоигонуклеотидных последовательностях гена *NAT2*: rs1801279, rs1799931, rs1799930, rs1799929, rs1801280, rs1208, rs1041983, гена *ABCB1*: rs1045642 и гена *GSTM*: rs74837985.

Учитывая полученные данные, а именно связь мутаций в олоигонуклеотидных последовательностях rs1799931, rs1799930 и rs1041983 гена *NAT2* с повышенным риском гепатотоксических реакций, в дальнейшем проводилась оценка генетического полиморфизма указанных олигонуклеотидных последовательностей генов у находящихся на лечении пациентов в группе Б ($n = 71$).

Исходя из полученных результатов, в подгруппу IB группы Б ($n = 32$) вошли пациенты с высоким риском развития гепатотоксических нежелательных побочных реакций. Этим пациентам в качестве профилактики назначались гепатопротекторы. В подгруппу IIB группы Б ($n = 39$) вошли пациенты, у которых по результатам генетического тестирования не было выявлено риска развития гепатотоксических нежелательных побочных реакций и гепатопротективная терапия им не проводилась (рисунок 1).

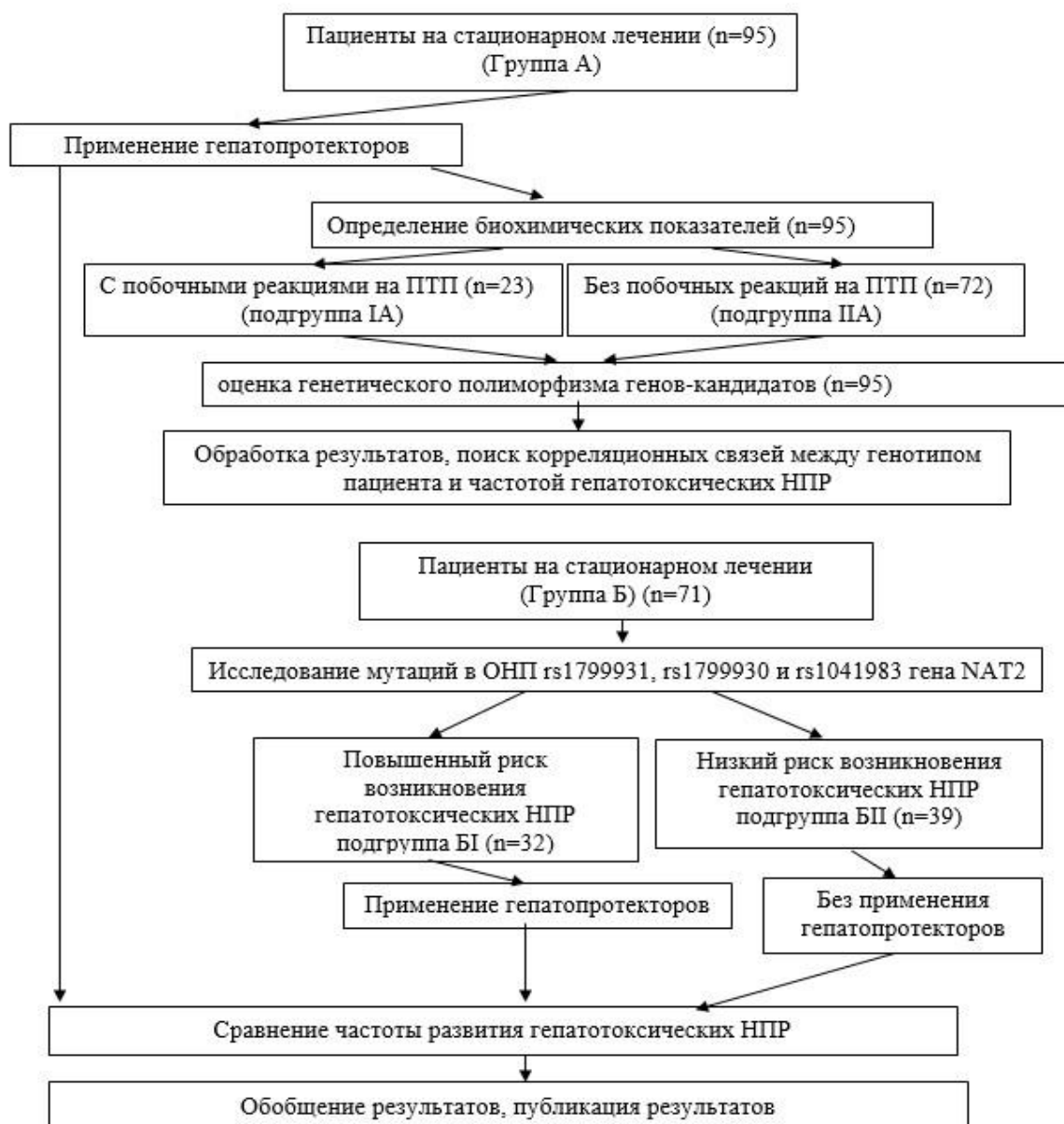


Рисунок 1 – Дизайн исследования

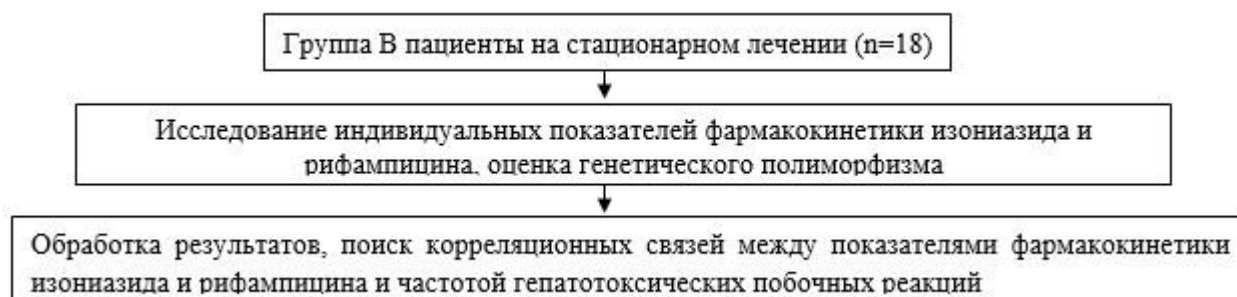


Рисунок 2 – Дизайн вложенного исследования фармакокинетики ПТП

Таким образом, в группу Б вошли пациенты, которым назначались гепатопротекторы в соответствии с прогнозом риска развития гепатотоксических нежелательных побочных реакций, в отличие от группы А ($n = 95$), пациентам которой прием противотуберкулезных препаратов и гепатопротекторов осуществлялся без прогноза развития НПР по гепатотоксическому типу, без учета анализа генетического полиморфизма.

Для оценки возможного влияния индивидуальных особенностей фармакокинетики на развитие гепатотоксических НПР было проведено вложенное исследование по изучению индивидуальных показателей фармакокинетики основных противотуберкулезных препаратов – изониазида и рифампицина (рисунок 2).

У 18 пациентов был проведен поиск корреляционных связей между показателями фармакокинетики изониазида и рифампицина и частотой гепатотоксических побочных реакций.

В дальнейшем проводилась статистическая обработка результатов исследования, разрабатывались методические рекомендации. Дизайн исследования представлен на рисунке 1. Дизайн вложенного исследования представлен на рисунке 2.

Лабораторные исследования выполнялись на автоматическом гематологическом анализаторе «SYSMEX KX-21» и на автоматическом клиническом анализаторе «SAPPHIRE 400» с использованием реагентов для диагностики «Human».

Для проведения молекулярно-генетических исследований у пациентов производился забор цельной крови в пробирку с ЭДТА, после чего выделяли геномную ДНК с помощью наборов реагентов Arrow Blood DNA 500 из цельной крови (на станции NorDiag Arrow). Далее проводили постановку полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на амплификаторе CFX-96 (BIO-RAD) с использованием наборов реагентов для генотипирования SNPs TaqMan по 9 точкам: C_572771_10, C_572770_20, C_1204091_10, C_1204092_20, C_1204093_20, C_572769_20, C_8684085_20, C__7586657_20, C_44202997_20.

Постановка проводилась согласно протоколу производителя реагентов.

Полногеномное секвенирование с помощью биологических чипов с определением однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) rs1799931, rs1799930 и rs1041983 проводилось у пациентов после забора цельной крови. Ее замораживали при температуре $-20...-70^{\circ}\text{C}$, и в последующем доставляли в лабораторию для проведения генетического исследования. Выделение ДНК проводилось с использованием набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Контроль качества полученной ДНК был проведен с помощью электрофореза в агарозном геле, концентрация была измерена на приборе Qubit 3.0. Генотипирование ДНК проводилось на чипах Infinium Global Screening Array-24. Пробоподготовка образцов и сканирование на приборе HiScan (Illumina) были проведены согласно протоколу Infinium HTS Assay Guide. Итого для каждого образца исследовано не менее 635 562 митохондриальных и аутосомных маркеров. Маркеры собраны из 31 базы данных, включая NHGRI-EBI GWAS catalog, PharmGKB, RefSeq и других.

Исследование фармакокинетики изониазида и рифампицина у пациентов с туберкулезом органов дыхания, получающих лечение по I и III режимам химиотерапии, проводилось после забора крови в 4 временных точках (до приема ПТП, через 2, 4 и 24 часа после приема ПТП), далее отделялась сыворотка путем центрифугирования, которая замораживалась. Дальнейшее исследование содержания изониазида и рифампицина проводилось на хроматографическом комплексе Agilent Infinity 1290 с масс-детектором Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/M, методом положительной ионизации и детектирование в режиме MRM (multi reaction monitoring).

Результаты исследований были оценены согласно общепринятым методам статистического анализа. Анализ проведен на IBM-совместимом компьютере на базе процессора Intel Pentium CPU G4560T с использованием пакета программ Microsoft Excel для Windows 10 Pro. Статистическая обработка полученных параметров осуществлялась в программах STATISTICA (StatSoftInc., USA, версия 6.0), Microsoft Office для дома и бизнеса 2016, Excel 2016 MSO

(16.0.13029.20232) 32-разрядная версия: обработка вариационного ряда, вычисление выборочной средней (M), ошибки средней (m) и пороговый уровень статистической значимости $p = 0,05$. Достоверность различий оценивали по непараметрическому критерию согласия Пирсона (χ^2). Для получения объективных результатов был применён индивидуальный анализ качественных признаков, которые выражали в цифровых данных (% и n).

Для прогнозирования развития гепатотоксичности при применении противотуберкулезных препаратов, в зависимости от наличия или отсутствия в геноме пациента определенных генотипов, использовали метод логистического регрессионного анализа. В качестве отклика рассматривалась бинарная переменная, где 0 – отсутствие гепатотоксичности (ССУ), 1 – ее наличие.

Модель логистической регрессии представлена в виде зависимости логарифма шанса наступления прогнозируемого события (логита) от линейной комбинации факторных переменных, и может быть выражена следующим уравнением:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(b_0 + b_1 x_1 + \dots + b_n x_n)}}$$

где p – вероятность прогнозируемого события;

e – математическая константа 2,72;

b_0 – константа модели;

b_1 – коэффициент при предикторной переменной x_1 , показывающий изменение логарифмических шансов, вызванное единичным изменением независимых переменных;

n – порядковый номер предиктора, включенного в уравнение.

Проводилось построение моделей логистической регрессии с поочередным включением каждого предиктора. Построение логистической регрессионной модели осуществляли методом пошагового включения прогностических факторов с оценкой значения коэффициента детерминации R^2 , показывающего долю влияния всех предикторов модели на дисперсию

зависимой переменной. Проверка статистической значимости модели осуществлялась при помощи критерия χ^2 . При значении $p < 0,05$, гипотеза о незначимости модели отвергалась.

Соответствие модели использованным данным характеризовали с помощью критерия согласия Хосмера – Лемешева. При $p > 0,05$ принималась гипотеза о согласованности модели. Интерпретация параметров логистической регрессии производилась на основе величины $\exp(b)$. При положительном коэффициенте b , $\exp(b)$ больше 1, что указывает на повышение шансов наступления прогнозируемого события. Если коэффициент b отрицательный, $\exp(b)$ меньше 1, то шансы наступления события снижаются. Чувствительность и специфичность предикторов оценивали при помощи ROC-анализа. Количественная интерпретация результатов проводилась по ROC-кривым с оценкой показателя AUC (Area under ROC curve – площадь под ROC-кривой).

Исследование проводилось на базе ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России (до 2018 года – УКБ Фтизиопульмонологии Сеченовского Университета) за период с 2016 по 2019 гг. Определение генетического полиморфизма проводилось на базе Центра коллективного пользования Сеченовского Университета в 2016–2019 гг. Проведение полногеномного анализа с помощью ДНК-микрочипов проводилось на базе ООО «Генотек» в 2019 г. Изучение концентрации основных противотуберкулезных препаратов в плазме крови методом хроматографического анализа проводили в группе аналитической биохимии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» в 2019 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование. Распределение по полу и возрасту в группах на первом этапе исследования (группы AI, AII) представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Распределение больных по полу (абс., %)

Показатели		Группы больных		χ^2	Р
		АІ n = 23	АІІ n = 72		
Пол	Мужчины	8 (34,8 ± 9,9) %	37 (51,4 ± 5,9) %	1,928	0,165
	Женщины	15 (65,2 ± 9,9) %	35 (48,6 ± 5,9) %		
Примечание: * – достоверность различий в группах АІ, АІІ (p < 0,05); критическое значение коэффициента χ^2 при p < 0,05 равно 5,99 (число степеней свободы – 2).					

Согласно данным, представленным в таблице 1, в АІ группе было 8 (34,8 %) пациентов мужского пола и 15 (65,2 %) женского; в АІІ группе – 37 (51,4 %) мужского пола и 35 (48,6 %) – женского. В группах АІ и АІІ различий по полу выявлено не было ($\chi^2 = 1,928$; p < 0,05), хотя следует отметить тенденцию к преобладанию у лиц женского пола повышенной частоты развития НПР по гепатотоксическому типу. Таким образом, в исследовательских группах пациенты были сопоставимы по полу.

Таблица 2 – Распределение больных по возрасту

Показатели		Группы больных		χ^2	Р
		АІ n = 23 (абс., %)	АІІ n = 72 (абс., %)		
Возраст, лет	3–17	6 (26,1 ± 9,2) %	23 (31,9 ± 5,5) %	1,098	0,778
	18–35	4 (17,4 ± 7,9) %	17 (23,6 ± 5,0) %		
	36–55	9 (39,1 ± 10,2) %	21 (29,2 ± 5,4) %		
	56–70	4 (17,4 ± 7,9) %	11 (19,4 ± 4,7) %		
Средний возраст, лет		35 ± 17,6	30 ± 19,6	—	—
Примечание: * – достоверность различий в группах АІ и АІІ – критическое значение коэффициента χ^2 при p < 0,05 равно 1,098 (число степеней свободы – 3).					

Исходя из представленных данных в таблице 2, средний возраст пациентов в АІ группе составил – (35 ± 17,6) лет, в АІІ группе – (30 ± 19,6) лет. Пациенты

детского и подросткового возраста составили в AI группе 6 (26,1 %), а в AII группе 23 (31,9 %). В исследовательских AI и AII группах различий по возрасту выявлено не было ($\chi^2 = 1,098$; $p > 0,05$). Также после проведения анализа данных о возрастном составе групп с помощью критерия Краскела – Уоллиса статистически значимых различий между группами выявлено не было ($p = 0,11624$). Таким образом, пациенты в группах были сопоставимы по возрасту.

Клинико-рентгенологические характеристики туберкулезного процесса у больных с впервые выявленным туберкулезом легких на первом этапе исследования представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Клинико-рентгенологические характеристики туберкулезного процесса у больных

Признаки	Группы больных		χ^2	P
	AI = 23 абс., (%)	AII = 72 абс, (%)		
Распространенность процесса:				
внутригрудные ЛУ	4 (17,4 ± 7,9) %	13 (18,1 ± 4,5) %	0,142	0,932
1-2 сегмента	18 (78,3 ± 8,6) %	57 (79,2 ± 4,8) %		
1 доля	1 (4,3 ± 7,9) %	2 (2,8 ± 1,9) %		
2 доли и более	0	0		
Распад легочной ткани	3 (13,0 ± 7,0) %	8 (11,1 ± 3,7) %	0,064	0,801
Бактериовыделение	4 (17,4 ± 7,9) %	10 (13,9 ± 4,1) %	0,006	0,941
Осложнения	1 (4,3 ± 4,3) %	4 (5,6 ± 2,7) %	0,096	0,757
Сопутствующие заболевания	5 (21,7 ± 8,6) %	13 (18,1 ± 4,5) %	0,154	0,695
Примечание: * – достоверность различий в группах сравнения.				

Как видно из таблицы 3, у пациентов AI и AII групп статистически значимых отличий по распространенности туберкулезного процесса выявлено не было ($\chi^2 = 0,142$; $p = 0,9325$). В частности, объем туберкулезного процесса в обеих группах в подавляющем большинстве случаев не превышал 1-2 сегментов (78,3 % и 79,2 % соответственно), кроме того в этих группах наблюдались пациенты, у которых туберкулезный процесс локализовался во

внутригрудных лимфатических узлах (17,4 %, 18,1 %). Поражение в объеме одной доли наблюдалось в АІ группе в 4,3 %, а в АІІ – в 2,8 %. Более распространенных процессов в обеих группах отмечено не было.

Доля пациентов, у которых был выявлен распад легочной ткани, также была одинакова во обеих группах: в АІ группе – 13 %, в АІІ – 11,1 % больных ($\chi^2 = 0,064$; $p = 0,801$).

Бактериовыделение было зарегистрировано у 17,4 % пациентов АІ группы и 13,9 % пациентов АІІ группы ($\chi^2 = 0,006$; $p = 0,941$), что также не является статистически значимым отличием. Одинаковой была и частота встречаемости осложнений, которые были представлены экссудативным плевритом: у 4,3 % пациентов АІ группы и у 5,6 % пациентов АІІ группы ($\chi^2 = 0,096$; $p = 0,757$). Других осложнений в исследуемых группах не встречалось.

Сопутствующие заболевания в АІ группе отмечались у 21,7 % и были представлены миопией слабой и средней степени тяжести и хроническим тонзиллитом. В АІІ группе указанные сопутствующие заболевания наблюдались у 18,1 % пациентов. Достоверных различий по частоте выявления сопутствующих заболеваний в исследуемых группах не выявлено ($\chi^2 = 0,154$; $p = 0,695$).

Таким образом, в исследовательских группах пациенты были сопоставимы по полу, возрасту, распространенности процесса, наличию деструкции легочной ткани, частоте развития осложнений, сопутствующей патологии.

Пациенты группы А (АІ и АІІ) получали противотуберкулезные препараты в соответствие с I и III режимами химиотерапии в соответствие с приказом Минздрава России от 29.12.2014 № 951. Изониазид в дозе 10 мг/кг/сут, рифампицин в дозе 10мг/кг/сут, пиразинамид в дозе 20 мг/кг/сут, этамбутол 25 мг/кг/сут. При невозможности применения этамбутола из-за малого возраста пациентов (до 13 лет) в схеме лечения применялся амикацин (канамицин) – 15 мг/кг/сут.

Наличие или отсутствие нежелательных побочных реакций по

гепатотоксическому типу оценивали по клиническим признакам (наличие жалоб, объективное обследование) и результатам общего и биохимического анализа крови.

Нежелательные побочные реакции по гепатотоксическому типу на противотуберкулезные препараты отмечались при повышении билирубина, АлАТ и АсАТ более 3-х норм и (или) при наличии тошноты и (или) рвоты во время лечения, других диспепсических явлений.

Все пациенты в группе А получали в качестве стандартной патогенетической терапии препараты гепатопротекторов (урсодезоксихолиевая кислота) в дозе 10 мг/кг/сут (максимальная суточная доза – 750 мг).

В группу Б вошел 71 пациент (у которых проводили профилактику гепатотоксических реакций с учетом генетического исследования проведенного с применением биологических чипов).

Также в исследовании фармакокинетики приняли участие 18 пациентов (группа В), у которых на фоне приема противотуберкулезных препаратов (в соответствии с I и III режимами химиотерапии, в соответствии с приказом Минздрава России от 29.12.2014 № 951) оценивалась концентрация изониазида и рифампицина в плазме крови до приема ПТП, через 2, 4 и 24 часа после приема ПТП.

Результаты исследования. На первом этапе среди пациентов группы А, получавших лечение противотуберкулезными препаратами по I-III режимам химиотерапии, НПР по гепатотоксическому типу наблюдались у 23 из 95 пациентов ($24,2 \pm 4,4$ %). Большинство реакций зафиксировано среди взрослых пациентов – у 17 из 66 ($25,8 \pm 5,4$ %). Среди детей частота развития НПР составила ($20,7 \pm 7,5$ %) (у 6 из 29). Однако статистически значимых различий по частоте возникновения НПР среди детей и взрослых не отмечено ($\chi^2 = 0,175$, $p = 0,676$).

По гендерному признаку достоверных различий в частоте возникновения НПР по гепатотоксическому типу не выявлено: у лиц мужского пола данный вид НПР отмечен у 8 пациентов из 45 ($17,8 \pm 5,7$ %), а у пациентов женского пола –

15 из 50 ($30 \pm 6,5$ %) ($\chi^2 = 1,928$, $p = 0,165$). Однако в некоторых исследованиях женский пол рассматривается как фактор риска развития гепатотоксических реакций.

У 14 из 23 ($60,9 \pm 10,2$ %) пациентов гепатотоксические реакции проявлялись в виде изменений лабораторных показателей: повышение АЛАТ и АсАТ более 3-х норм обычно в сроке от 1 до 4 недель. Гепатотоксические реакции у 9 пациентов ($39,1 \pm 10,2$ %) проявлялись в виде клинических симптомов (диспепсические явления, болезненность при пальпации в области живота), однако при этом превышение уровня АЛАТ и АсАТ могло не превышать 2-х норм.

Гепатотоксические реакции у 15 из 23 пациентов носили устранимый характер ($65,2 \pm 10,2$ %), купировались дополнительным назначением гепатопротекторов и не потребовали отмены ПТП. У 8 пациентов ($34,8 \pm 9,9$ %) гепатотоксические реакции потребовали отмены рифампицина и (или) изониазида, изменения схемы лечения и назначения дополнительной дезинтоксикационной терапии. В качестве гепатопротекторов в группе А использовали препараты урсодезоксихолиевой кислоты.

Таким образом, полученные данные показали, что статистически значимых различий по частоте развития гепатотоксических НПР в зависимости от пола и возраста не наблюдалось. Возникновение гепатотоксических НПР обычно проявлялось до 1 месяца после начала лечения и чаще всего носило устранимый характер.

Для выявления возможных предикторов гепатотоксических реакций у 23 пациентов группы AI и 72 группы AII определяли олигонуклеотидные последовательности rs1801279, rs1799931, rs1799930, rs1799929, rs1801280, rs1208, rs1041983, определяющие активность гена *NAT2*, который влияет на полноценность функционирования фермента *NAT2*, олигонуклеотидную последовательность rs1045642, определяющую активность гена *ABCB1*, который оказывает влияние на систему цитохрома P450, и rs74837985 (с 2015 года rs1065411), определяющую активность гена *GSTM1*, влияющего на активность

фермента глутатион-S-трансферазы.

В дальнейшем, при проведении логистического регрессионного анализа получены 2 статистически значимые модели.

Первая модель отражает ассоциированность генотипа *AA* олигонуклеотидной последовательности rs1799931 гена *NAT2* и генотипов *AA* и *AG* олигонуклеотидной последовательности rs1799930 гена *NAT2* с гепатотоксичностью противотуберкулезных препаратов. Данная модель представлена следующим уравнением:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-4,114 + 1,075 x_1 + 1,088 x_2)}}$$

где p – вероятность развития гепатотоксичности;

x_1 – наличие генотипа *AA* ОНП rs1799931 ($\text{Exp}(b) = 2,930$, ДИ 95 % 1,163–7,385);

x_2 – наличие генотипов *AA* или *AG* ОНП rs1799930 ($\text{Exp}(b) = 2,968$, ДИ 95 % 1,033–8,527).

Вычисленный коэффициент детерминации для данной модели ($R^2 = 0,144$) показывает, что вероятность связи данных генетических факторов и риска гепатотоксичности противотуберкулезных препаратов у исследованной группы составляет 14,4 %. При этом модель обладает высокой специфичностью в плане предсказания отсутствия появления гепатотоксичности (97,2 %). Чувствительность модели (правильное предсказание случаев развития гепатотоксичности) – 17,4 %. Общее число корректных предсказаний составило 77,9 %.

По результатам построения ROC-кривой показатель AUC составил $0,685 \pm 0,064$ (ДИ 95 %, 0,560–0,811), что является статистически значимым ($p = 0,008$) и соответствует среднему качеству модели для предсказания гепатотоксичности, в соответствии с рисунком 3.

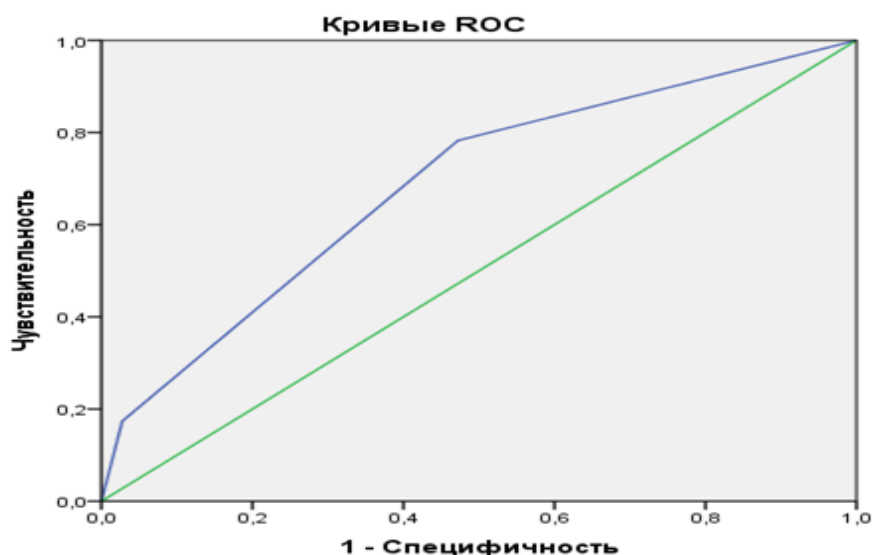


Рисунок 3 – ROC-кривая регрессионной модели развития гепатотоксического действия противотуберкулезных препаратов в зависимости от присутствия генотипа *AA* олигонуклеотидной последовательности rs1799931 и генотипов *AA* или *AG* олигонуклеотидной последовательности rs1799930 гена *NAT*

Вторая модель показывает связь проявления гепатотоксичности противотуберкулезных препаратов с генотипами *TT* и *CT* олигонуклеотидной последовательности rs1041983 гена *NAT2*. Данная модель представлена следующим уравнением:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-3,420 + 1,392x_1}}$$

где p – вероятность развития гепатотоксичности;

x_1 – наличие генотипов *TT* или *CT* ОНП rs1041983 ($\text{Exp}(b) = 4,024$, ДИ 95 % 1,348–12,009).

Для данной модели коэффициент детерминации $R^2 = 0,109$, что дает статистически значимый прогноз вероятности развития гепатотоксичности по данным предикторам у 10,9 % исследуемой группы пациентов. Модель обладает 100 %-й специфичностью в прогнозировании отсутствия рисков гепатотоксичности. Общее число корректных прогнозов отсутствия рисков гепатотоксичности составило 75,8 %.

По результатам построения ROC-кривой показатель AUC являлся статистически значимым ($p = 0,026$) и составил $0,655 \pm 0,063$ (ДИ 95 %

0,532–0,779), что указывает на среднее качество прогностической модели в соответствии с рисунком 4.

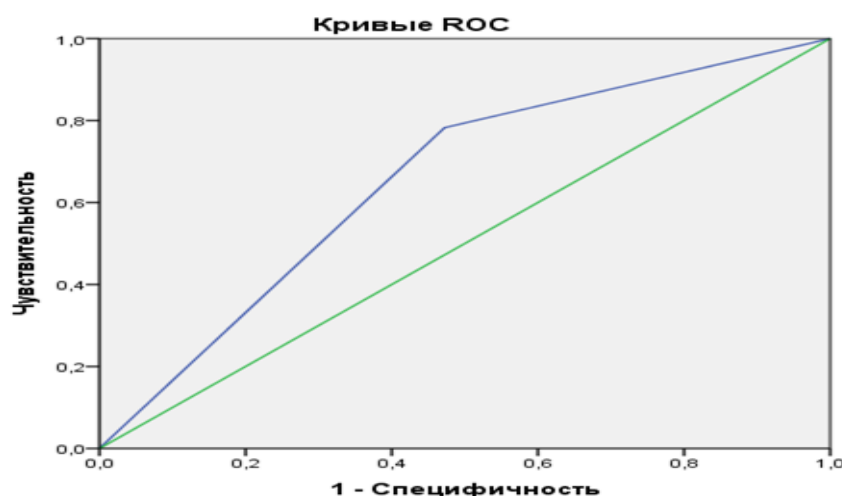


Рисунок 4 – ROC-кривая регрессионной модели по оценке рисков развития гепатотоксических эффектов противотуберкулезных препаратов в зависимости от присутствия генотипов *TT* или *CT* олигонуклеотидной последовательности rs1041983 гена *NAT2*

Таким образом, генотипы *AA* олигонуклеотидной последовательности rs1799931 и генотипы *AA* и *AG* олигонуклеотидной последовательности rs1799930, а также генотипы *TT* или *CT* олигонуклеотидной последовательности rs1041983, определяющие активность фермента *NAT2*, статистически значимо увеличивают риск гепатотоксичности при приеме противотуберкулезных препаратов у 14,4 % и 10,9 % (соответственно) больных туберкулезом легких. Отсутствие данных предикторов на 97 % и 100 % (соответственно) не прогнозирует риск гепатотоксических реакций.

При проведении логистического регрессионного анализа не было выявлено взаимосвязи между мутациями в олигонуклеотидной последовательности rs1801279, rs1799929, rs1801280, rs1208 гена *NAT2*, в *CT* олигонуклеотидной последовательности rs1045642 гена *ABCB1* и мутациями в гене *GSTM1* (олигонуклеотидной последовательности ОНП rs74837985) с риском гепатотоксических нежелательных побочных реакций.

На 3 этапе было выполнено исследование мутаций с помощью биологических чипов в ОНП rs1799931, rs1799930 и rs1041983 гена *NAT2* у

впервые выявленных пациентов с туберкулезом органов дыхания ($n = 71$), получающих лечение по 1 или 3 режиму химиотерапии, для выявления генетических факторов риска побочных гепатотоксических реакций и их профилактики у пациентов с высоким риском.

Выявлено 32 пациента ($45,1 \pm 4,8$ %), имеющих повышенный риск возникновения побочных НПР по гепатотоксическому типу. Этим пациентам были назначены гепатопротекторы (урсодезоксихолиевая кислота). Пациентам без риска НПР по гепатотоксическому типу по результатам генетического обследования ($n = 39$) противотуберкулезные препараты назначались без гепатопротективной поддержки.

В результате, во время дальнейшего лечения у пациентов с повышенным риском развития побочных гепатотоксических реакций ($n = 32$) на фоне приема урсодезоксихолиевой кислоты, возникновение гепатотоксических реакций отмечалось у 6 пациентов ($18,8 \pm 6,9$ %), а в группе пациентов с низким риском развития НПР по гепатотоксическому типу без применения гепатопротекторов отмечалось у 1 пациента ($2,6 \pm 2,5$ %).

Таким образом, в группе пациентов, получающих гепатопротективную терапию, по результатам генетического анализа ОНП rs1799931, rs1799930 и rs1041983 гена *NAT2*, частота развития гепатотоксических реакций статистически выше ($\chi^2 = 5,182$, $p = 0,023$), чем у пациентов без факторов генетического риска, при отсутствии гепатопротективной терапии (рисунок 5).

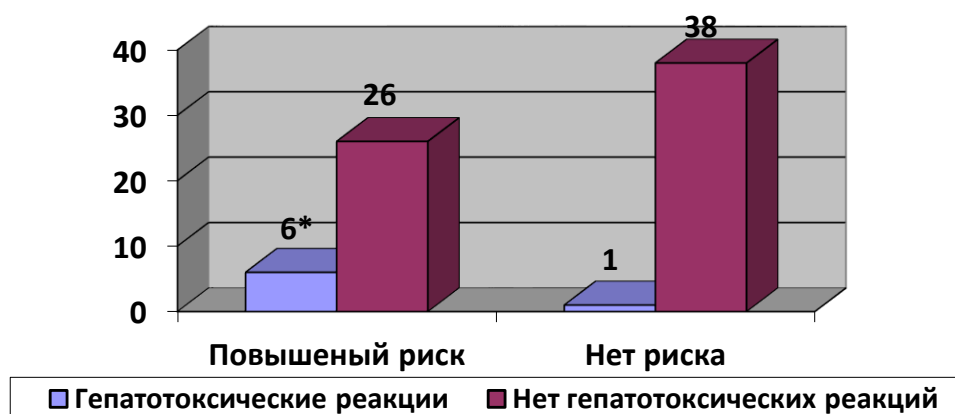


Рисунок 5 – частота развития НПР по гепатотоксическому типу в группах с повышенным риском и без него. * $p < 0,05$

Также было проведено сравнение с пациентами группы А, которые получали лечение противотуберкулезными препаратами и профилактику гепатотоксических реакций без учета оценки генетического полиморфизма. Нежелательные побочные реакции по гепатотоксическому типу в этой группе наблюдались у 23 пациентов из 95 ($24,2 \pm 4,4$ %). Больше НПР зафиксировано среди взрослых пациентов – у 17 из 67 ($25,4 \pm 5,3$ %). Среди пациентов детского возраста частота развития НПР по гепатотоксическому типу составила ($21,4 \pm 7,8$ %) (у 6 из 28). Однако статистически значимых различий по частоте возникновения гепатотоксических реакций среди детей и взрослых контрольной группы не отмечено ($\chi^2 = 0,167$, $p = 0,683$). Преимущественно, НПР по гепатотоксическому типу отмечались у лиц женского пола: из 50 женщин контрольной группы НПР по гепатотоксическому типу были зафиксированы у 15 ($30,0 \pm 6,5$ %), а из 36 мужчин только у 8 ($17,8 \pm 5,7$ %), однако эти различия оказались статистически не значимы ($\chi^2 = 1,168$, $p = 0,280$).

В группе Б у пациентов, получающих лечение противотуберкулезными препаратами и профилактику НПР по гепатотоксическому типу с учетом оценки генетического полиморфизма, указанные НПР наблюдались у 7 из 71 ($9,9 \pm 3,5$ %) (рисунок 6).

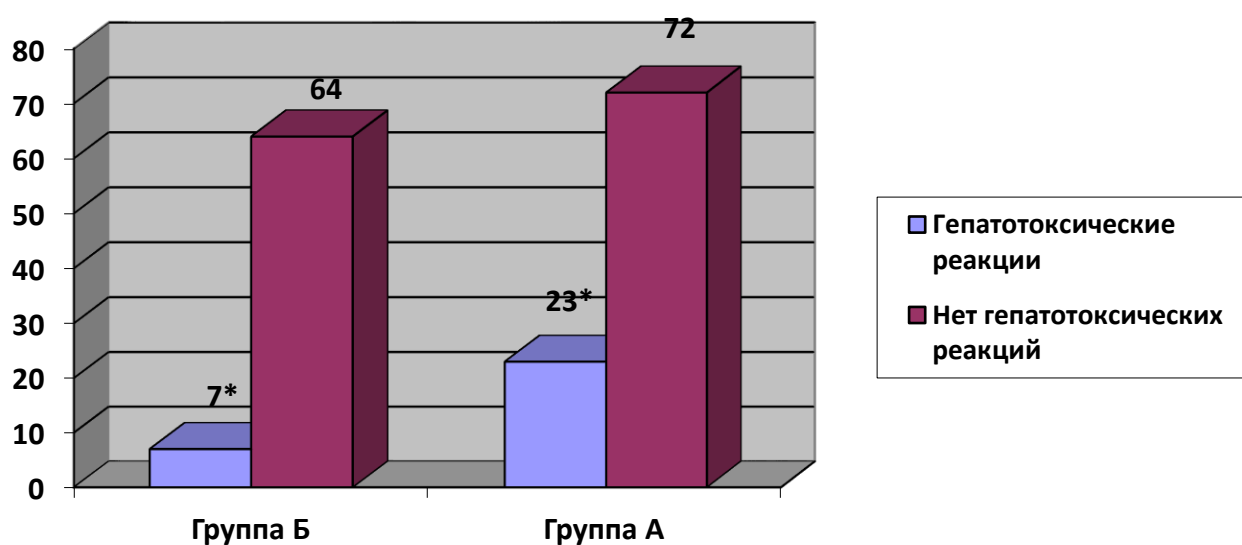


Рисунок 6 – Частота развития НПР по гепатотоксическому типу. * $p = 0,018$

Таким образом, в группе Б у пациентов статистически значимо реже встречались гепатотоксические нежелательные побочные реакции ($\chi^2 = 5,652$, $p = 0,03$).

Нежелательные побочные реакции по гепатотоксическому типу у 15 пациентов из 30 ($50 \pm 9,1$ %) в обеих группах проявлялись в виде таких изменений лабораторных показателей, как повышение АлАТ и АсАТ в биохимическом анализе крови более 3-х норм. Гепатотоксические нежелательные побочные реакции у 11 пациентов ($36,7 \pm 8,8$ %) проявлялись в виде диспепсических явлений, болезненности при пальпации в области живота и изменений лабораторных показателей.

У 8 пациентов ($34,8 \pm 9,9$ %) группы А гепатотоксические нежелательные побочные реакции потребовали отмены противотуберкулезных препаратов, изменения схемы лечения и назначения дезинтоксикационной и гепатопротективной терапии. В основной группе у 2 пациентов ($28,6 \pm 8$ %) гепатотоксические реакции потребовали отмены противотуберкулезных препаратов и внесения изменений в схему лечения. Среднее значение АлАТ и АсАТ в группе Б у пациентов с проявлениями гепатотоксических нежелательных побочных реакций составило ($303,4 \pm 241,1$) ед/л и ($118,7 \pm 49,7$) ед/л соответственно. В группе А эти показатели составили ($180,7 \pm 113,8$) ед/л и ($179,2 \pm 126,1$) ед/л соответственно. В группе Б средний показатель активности АлАТ в биохимическом анализе крови составил ($35,8 \pm 20,1$) ед/л, в группе А – ($71,8 \pm 68,8$) ед/л (различия в уровнях выборок можно считать не существенными, $U = 2239$), а АсАт ($35,8 \pm 20,1$) ед/л и ($74,8 \pm 65,6$) ед/л (различия в уровнях выборок можно считать не существенными, $U = 1817,5$).

Следует отметить, что одни лишь результаты биохимического анализа крови не всегда являлись определяющими в констатации гепатотоксических нежелательных побочных реакций, и, зачастую также сопровождалось клиническими проявлениями, даже если значение показателей АлАТ и АсАТ не превышало 3-х норм.

При исследовании фармакокинетики изониазида в 4 точках у 18 пациентов (до приема ПТП, через 2, 4 и 24 часа после приема ПТП) выявлено, что пик концентрации изониазида в плазме крови приходится на 2 часа после приема препарата, к 24 часам концентрация изониазида находится близко к неопределяемому уровню.

У 2-х пациентов, с наблюдаемыми гепатотоксическими реакциями (на рисунке 10 выделено красным), не отмечалось повышения концентрации изониазида в плазме крови больше, чем у пациентов с хорошей переносимостью ПТП (рисунок 7). Оба пациента являлись носителями мутаций в гене *NAT2* *AA* аллеля А SNP rs1799931. На основании показателей фармакокинетики пациенты с развившимися гепатотоксическими реакциями относились к медленному фенотипу ацетилирования.

У пациентов с генетической предрасположенностью к гепатотоксическим реакциям (генотип *AA* гена rs1799931 и генотип *AA* и *AG* (аллеля А) гена rs1799930, или генотип *TT* или *CT* (аллеля Т) гена rs1041983) и фенотипическими признаками медленного типа ацетилирования необходимо проведение профилактического назначения гепатопротекторов.

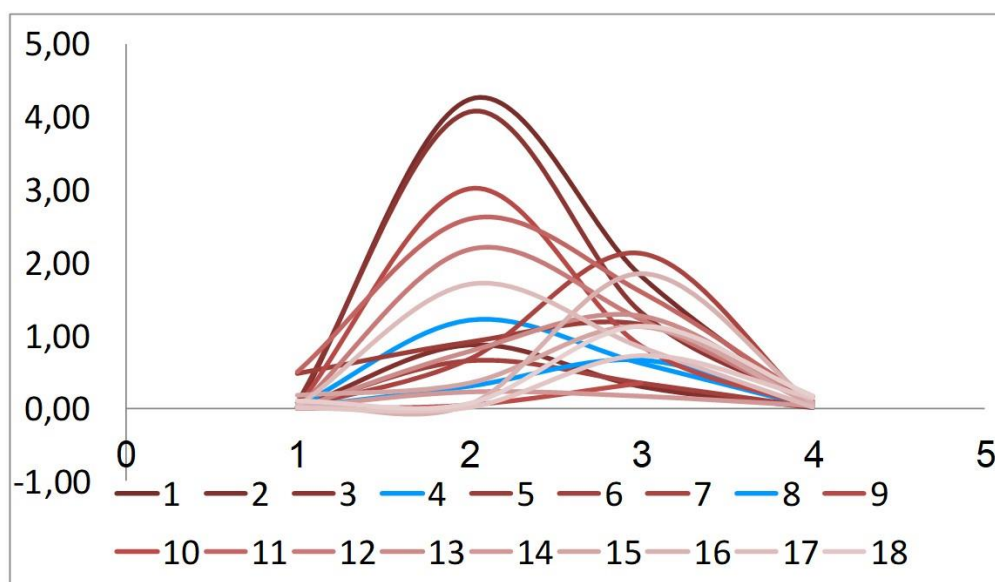


Рисунок 7 – Концентрация изониазида в плазме крови у пациентов (синим отмечены показатели пациентов с проявлениями гепатотоксических нежелательных побочных реакций)

При исследовании фармакокинетики рифампицина в 4 точках у 18 пациентов (до приема ПТП, через 2, 4 и 24 часа после приема ПТП) выявлено, что пик концентрации рифампицина в плазме крови также приходится на 2 часа после приема препарата, и к 24 часам концентрация его находится близко к неопределяемому уровню. У пациентов, с наблюдаемыми гепатотоксическими реакциями, также не отмечалось повышения концентрации рифампицина в плазме крови больше, чем у пациентов с хорошей переносимостью ПТП (рисунок 8). Также не выявили связи между концентрацией рифампицина в плазме крови и гепатотоксической реакцией у пациентов.

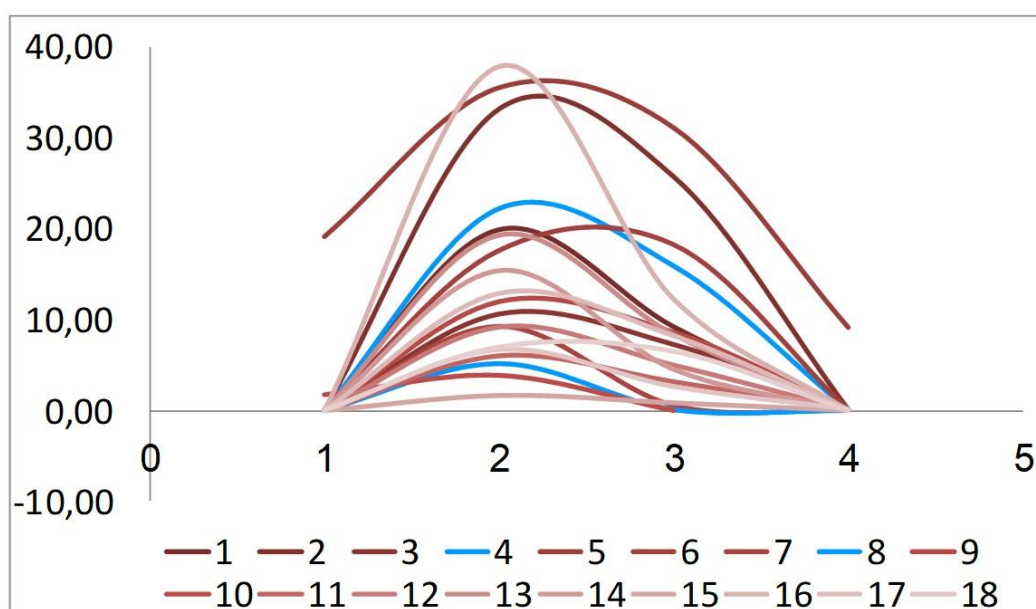


Рисунок 8 – Концентрация рифампицина в плазме крови у пациентов (синим отмечены показатели пациентов с проявлениями гепатотоксических нежелательных побочных реакций)

Полученные результаты не выявили связи между концентрацией рифампицина в плазме крови и гепатотоксической реакцией у пациентов, также не была обнаружена корреляция между показателями фармакокинетики и генетическими предикторами гепатотоксичности.

Обсуждение результатов и заключение. Туберкулез является одной из 10 главных причин смерти в мире и главной причиной смерти от одного определенного возбудителя инфекции (больше, чем ВИЧ/СПИД). Ежегодно туберкулезом заболевают миллионы людей. Согласно оценкам, в 2017 г. от туберкулеза умерло 1,3 млн человек (диапазон значений: 1,2–1,4 млн человек) ВИЧ-отрицательных и 300 000 человек (диапазон значений: 266 000–335 000 человек) ВИЧ-положительных пациентов. По наиболее вероятным оценкам, в 2017 г. туберкулезом во всем мире заболело 10 млн человек (диапазон значений: 9,0–11,1 млн человек): 5,8 млн мужчин, 3,2 млн женщин и 1 млн детей. Случаи заболевания были зарегистрированы во всех странах и возрастных группах, но из общего числа 90 % составляли взрослые (в возрасте ≥ 15 лет), 9 % – люди, живущие с ВИЧ (72 % в Африке), и две трети – люди, проживающие в восьми странах: Индия (27 %), Китай (9 %), Индонезия (8 %), Филиппины (6 %), Пакистан (5 %), Нигерия (4 %), Бангладеш (4 %) и Южная Африка (3 %). В этих и 22 других странах, входящих в составленный ВОЗ список из 30 стран с высоким бременем туберкулеза, было зарегистрировано 87 % всех случаев заболевания в мире. Лишь 6 % от общего числа случаев в мире пришлось на Европейский регион ВОЗ (3 %) и Регион ВОЗ для стран Америки (3 %). Масштаб эпидемии туберкулеза в разных странах существенно разнится. В 2017 г. в большинстве стран с высоким уровнем дохода было зарегистрировано менее 10 новых случаев на 100 000 населения, но в большинстве из 30 стран с высоким бременем туберкулеза – 150–400 новых случаев на 100 000 населения, а в некоторых странах, включая Мозамбик, Филиппины и Южную Африку, – более 500 новых случаев на 100 000 населения (ВОЗ. Доклад о глобальной борьбе с туберкулезом, 2018).

В Российской Федерации эпидемиологическая обстановка по туберкулезу в последние годы стабилизировалась, но остается весьма напряженной. На крайне низком уровне остаются показатели эффективности лечения больных туберкулезом (Эпидемическая ситуация по туберкулезу в Российской Федерации в 2018 году). В современных условиях одной из причин недостаточно

высокой эффективности лечения такого социально значимого заболевания, как туберкулёз, являются частые побочные реакции на противотуберкулезные препараты (Иванова Д. А., 2017). Основными противотуберкулезными препаратами для лечения туберкулеза (при сохраненной лекарственной чувствительности возбудителя) являются изониазид и рифампицин. Они до сих пор остаются самыми эффективными по отношению к возбудителю туберкулеза – микобактерии туберкулеза.

Поражение печени является наиболее распространенной из неблагоприятных побочных реакций на изониазид, так как печень является центральным органом для биотрансформации и выведения большинства препаратов и ксенобиотиков. На сегодняшний день гепатотоксические побочные реакции на изониазид достигают 30 % в различных популяциях. При возникновении гепатотоксических побочных реакций лечение прерывается до их устранения с применением препаратов патогенетической терапии, таких как Эссенциале, Эсливер, Гепат-Мерц, Ремаксол и др. (Иванова Д. А., 2017; Saito Z., 2016). В дальнейшем возобновление приема изониазида возможно только под «прикрытием» гепатопротекторами и под контролем уровня аминотрансфераз. Основная проблема заключается в том, что за время, которое требуется на ликвидацию гепатотоксических реакций, пациент не получает полноценного противотуберкулезного лечения, а кратковременный прием противотуберкулезных препаратов способствует увеличению риска развития лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза.

Риск развития гепатотоксических побочных реакций на изониазид связан как с генетическими, так и с приобретенными факторами. К приобретенным факторам можно отнести: возраст, пол, рацион питания, злоупотребление алкоголем, наркотиками, беременность, а также сопутствующую патологию печени (Araújo-Mariz C., 2016; Nadarajah K., 2019; Bouazzi O. E. 2016). Генетические факторы определяют активность и полноценность функционирования ферментов, участвующих в биотрансформации

противотуберкулезных препаратов (Суханов Д. С., 2008; Sun Q., 2017; Wu S., 2016; Lai Nai-Hua, 2020; Ben Fredj N., 2017).

В связи с этим, нами предпринята попытка изучения возможной связи возникновения нежелательных побочных гепатотоксических реакций на противотуберкулёзные препараты с различными вариантами генома пациентов для снижения частоты и степени выраженности побочных гепатотоксичных эффектов противотуберкулезных препаратов при лечении больных туберкулезом органов дыхания. Для осуществления поставленных задач нами проведено комплексное обследование пациентов с впервые выявленным туберкулезом органов дыхания, которые находились на стационарном лечении в ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России.

Всем пациентам назначались стандартные схемы лечения, включавшие в себя 4 противотуберкулезных препарата (согласно основным положениям приказа Минздрава России от 29.12.2014 № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания»).

При поступлении в стационар, у пациентов с целью контроля в дальнейшем переносимости химиотерапии определяли исходный уровень общего билирубина, активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и активность аспартатаминотрансферазы (АСТ) в крови. А также оценивали клинические проявления гепатотоксических реакций, таких как тошнота, ощущение горечи во рту, ощущение тяжести и боли в правом подреберье и эпигастрии.

При изучении результатов, полученных на первом этапе исследования, следует отметить, что среди пациентов, получавших лечение противотуберкулезными препаратами по I-III режиму химиотерапии, гепатотоксические реакции наблюдались у 23 из 95 пациентов ($24,2 \pm 4,4$ %). Большинство реакций зафиксировано среди взрослых пациентов – у 17 из 66 ($25,8 \pm 5,4$ %). Среди детей частота развития НПР составила ($20,7 \pm 7,5$ %) (у 6 из 29). Однако статистически значимых различий по частоте возникновения НПР среди детей и взрослых не отмечено ($\chi^2 = 0,175$, $p = 0,676$).

По гендерному признаку достоверных различий в частоте возникновения НПР по гепатотоксическому типу не выявлено: у лиц мужского пола данный вид НПР отмечен у 8 пациентов из 45 ($17,8 \pm 5,7$ %), а у пациентов женского пола – 15 из 50 ($30 \pm 6,5$ %) ($\chi^2 = 1,928$, $p = 0,165$). Однако в некоторых исследованиях женский пол рассматривается как фактор риска развития гепатотоксических реакций.

У 14 из 23 ($60,9 \pm 10,2$ %) пациентов гепатотоксические реакции проявлялись в виде изменений лабораторных показателей: повышение АлАТ и АсАТ более 3-х норм обычно в сроке от 1 до 4 недель. Гепатотоксические реакции у 9 пациентов ($39,1 \pm 10,2$ %) проявлялись в виде клинических симптомов (диспепсические явления, болезненность при пальпации в области живота), однако при этом превышение уровня АлАТ и АсАТ могло не превышать 2-х норм.

Гепатотоксические реакции у 15 из 23 пациентов носили устранимый характер ($65,2$ %), купировались дополнительным назначением гепатопротекторов и не потребовали отмены ПТП. У 8 пациентов ($34,8$ %) гепатотоксические реакции потребовали отмены рифампицина и (или) изониазида, изменения схемы лечения, и назначения дезинтоксикационной и гепатопротективной терапии. В качестве гепатопротекторов в основной группе использовали препараты урсодезоксихолиевой кислоты. Следует отметить, что проявления гепатотоксических реакций обычно наблюдались через 1–4 недели от начала лечения.

Для выявления возможных предикторов гепатотоксических реакций было обследовано 95 пациентов группы А. У 23 человек АІ группы и 72 пациентов АІІ группы определяли наличие мутаций в олигонуклеотидных последовательностях rs1801279, rs1799931, rs1799930, rs1799929, rs1801280, rs1208, rs1041983 определяющие активность гена *NAT2*, который влияет на полноценность функционирования фермента *NAT2*, rs1045642, определяющие активность гена *ABCB1*, который оказывает влияние на систему цитохрома P450,

и rs74837985 (с 2015 года rs1065411), определяющую активность гена *GSTM1*, влияющего на активность фермента глутатион-S-трансферазы.

После проведения статистического анализа с применением логистического регрессионного анализа были получены 2 статистически значимые модели. Первая модель отражает связь генотипа AA ОНП rs1799931 и генотипа AA и AG олигонуклеотидной последовательности rs1799930 гена *NAT2* с проявлениями нежелательных побочных реакций по гепатотоксическому типу. Вычисленный коэффициент детерминации для данной модели ($R^2 = 0,144$) показывает, что вероятность связи данных генетических факторов и риска гепатотоксичности противотуберкулезных препаратов у исследовательских групп I и II (95 пациентов) составляет 14,4 %. При этом модель обладает высокой специфичностью в плане предсказания отсутствия появления гепатотоксичности (97,2 %). Чувствительность модели (правильное предсказание случаев развития НПР по гепатотоксическому типу) – 17,4 %. Общее число корректных предсказаний составило 77,9 %. По результатам построения ROC-кривой показатель AUC составил $0,685 \pm 0,064$ (ДИ 95 % 0,560–0,811), что является статистически значимым ($p = 0,008$) и соответствует среднему качеству модели для предсказания НПР по гепатотоксическому типу.

Вторая модель отражает связь проявления НПР по гепатотоксическому типу при приеме противотуберкулезных препаратов с генотипом TT и CT олигонуклеотидной последовательности rs1041983 гена *NAT2*. Для данной модели коэффициент детерминации $R^2 = 0,109$, что дает статистически значимый прогноз вероятности развития НПР по гепатотоксическому типу по данным предикторам у 10,9 % исследуемой группы пациентов. Модель обладает 100 %-й специфичностью в прогнозировании отсутствия рисков НПР по гепатотоксическому типу. Общее число корректных прогнозов отсутствия рисков НПР по гепатотоксическому типу составило 75,8 %. По результатам построения ROC-кривой показатель AUC являлся статистически значимым ($p = 0,026$) и составил $0,655 \pm 0,063$ (ДИ 95 % 0,532–0,779), что указывает на среднее качество прогностической модели.

Таким образом, генотипы АА олигонуклеотидной последовательности rs1799931 и генотипы АА и АГ олигонуклеотидной последовательности rs1799930, а также генотипы ТТ или СТ олигонуклеотидной последовательности rs1041983 гена *NAT2*, определяющие активность фермента *NAT2*, статистически значимо увеличивают риск НПР по гепатотоксическому типу при приеме противотуберкулезных препаратов у 14,4 % и 10,9 % (соответственно) больных туберкулезом легких. Отсутствие данных предикторов на 97 % – 100 % (соответственно) не прогнозирует риск НПР по гепатотоксическому типу.

Другие мутации в олигонуклеотидных последовательностях генов-кандидатов *NAT2*, *ABCB1* и *GSTM1* (rs1801279, rs1799929, rs1801280, rs1208, rs1041983, rs1045642, rs74837985) статистически значимого влияния на частоту развития НПР по гепатотоксическому типу не оказали.

Данная информация легла в основу следующего этапа исследования, на котором было выполнено исследование мутаций с помощью биологических чипов в олигонуклеотидных последовательностях rs1799931, rs1799930 и rs1041983 гена *NAT2* у впервые выявленных пациентов с туберкулезом органов дыхания ($n = 71$), получающих лечение по 1 или 3 режиму химиотерапии, для выявления генетических факторов риска побочных гепатотоксических реакций и их профилактики у пациентов с высоким риском.

Установлено, что в группе пациентов, получающих гепатопротективную терапию, по результатам генетического анализа олигонуклеотидных последовательностей rs1799931, rs1799930 и rs1041983 гена *NAT2*, частота развития гепатотоксических реакций статистически выше ($\chi^2 = 5,182$, $p = 0,023$), чем у пациентов без факторов генетического риска, при отсутствии гепатопротективной терапии.

Однако, при сравнении с пациентами группы А, получавшими лечение противотуберкулезными препаратами и профилактику гепатотоксических реакций без учета оценки генетического полиморфизма показано, что в группе Б, пациентам которой назначались гепатопротекторы по результатам

генетического анализа ОНП rs1799931, rs1799930 и rs1041983 гена *NAT2*, гепатотоксические НПР встречались статистически реже ($\chi^2 = 5,652$, $p = 0,03$).

Таким образом, полученные результаты исследования показали, что для профилактики НПР по гепатотоксическому типу целесообразно назначение гепатопротекторов с профилактической целью пациентам, у которых по результатам генетического исследования выявлен повышенный риск таких реакций. У пациентов с генотипом, соответствующим низкому риску возникновения НПР по гепатотоксическому типу, назначение гепатопротекторов с профилактической целью нецелесообразно.

При проведении фармакокинетического исследования было установлено, что полученные результаты не выявили связи между концентрацией рифампицина в плазме крови и гепатотоксической реакцией у пациентов, также не была обнаружена корреляция между показателями фармакокинетики и генетическими предикторами гепатотоксичности.

Развитие нежелательных побочных реакций по гепатотоксическому типу на противотуберкулезные препараты при лечении по I и III режимам химиотерапии у впервые выявленных пациентов с туберкулезом органов дыхания наблюдалось у 23 из 95 (24,2 %).

Большинство реакций зафиксировано среди взрослых пациентов – у 17 из 66 (25,8 %). Среди детей частота развития гепатотоксических нежелательных побочных реакций составила 20,7 % (у 6 из 29). У 60,9 % НПР по гепатотоксическому типу проявлялись в виде повышения АЛАТ и АсАТ более 3-х норм в период от 1–4 недель, которые самостоятельно не снижались.

Анализ результатов молекулярно-генетического исследования полиморфизмов генов, регулирующих активность ферментов, влияющих на биотрансформацию противотуберкулезных лекарственных средств позволил выявить, что наличие генотипа *AA* олигонуклеотидной последовательности rs1799931 и генотипов *AA* и *AG* олигонуклеотидной последовательности rs1799930 гена *NAT2*, а также присутствие генотипов *TT* или *CT* олигонуклеотидной последовательности rs1041983 гена *NAT2*, статистически

значимо увеличивают риск развития нежелательных побочных реакций по гепатотоксическому типу при приеме противотуберкулезных препаратов у больных туберкулезом легких (14,4 % и 10,9 % соответственно). Отсутствие данных предикторов на 97 % – 100 % не предполагает риска развития гепатотоксических реакций.

Проведение исследования генотипа пациентов с помощью биологических чипов не только позволяет определять мутации в геноме, ответственные за высокий риск реакций, но и фиксировать полный спектр мутаций, позволяющих в дальнейшем проводить поиск корреляций выявленных изменений с другими характеристиками пациента, в том числе и риск возникновения других побочных реакций на противотуберкулезные препараты, прогноз тяжести течения туберкулезного процесса и прогнозируемую эффективность лечения.

ВЫВОДЫ

1. Гепатотоксические нежелательные побочные реакции возникают у $(24,2 \pm 4,4)$ % пациентов, получавших лечение противотуберкулезными препаратами по I-III режиму химиотерапии.

2. Проведена оценка генетического полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков у больных туберкулезом органов дыхания, проведена оценка олигонуклеотидных последовательностей rs1801279, rs1799931, rs1799930, rs1799929, rs1801280, rs1208, rs1041983, определяющих активность гена *NAT2*, который влияет на полноценность функционирования фермента *NAT2*, олигонуклеотидной последовательности rs1045642, определяющей активность гена *ABCB1*, который оказывает влияние на систему цитохрома P450, и олигонуклеотидной последовательности rs74837985 (с 2015 года rs1065411), определяющей активность гена *GSTM1*, влияющего на активность фермента глутатион-S-трансферазы.

3. Генотип AA олигонуклеотидной последовательности rs1799931 и генотипы AA и AG олигонуклеотидной последовательности rs1799930, а также

генотипы ТТ или СТ олигонуклеотидной последовательности rs1041983, определяющие активность фермента NAT2, статистически значимо (на 14,4 % ($p = 0,008$) и 10,9 % ($p = 0,026$) соответственно) увеличивают риск гепатотоксических нежелательных побочных реакций при приеме противотуберкулезных препаратов у больных туберкулезом легких.

4. При проведении гепатопротективной терапии у пациентов с наличием генотипа АА олигонуклеотидной последовательности rs1799931, генотипа АА и АG олигонуклеотидной последовательности rs1799930, а также генотипов ТТ или СТ олигонуклеотидной последовательности rs1041983 гена NAT2, частота развития гепатотоксических нежелательных побочных реакций составила $(18,8 \pm 6,9) \%$, у пациентов с отсутствием данных мутаций и отсутствием гепатопротективной терапии частота развития гепатотоксических нежелательных побочных реакций составила $(2,6 \pm 2,5) \%$ ($\chi^2 = 5,182$, $p = 0,023$).

5. При применении гепатопротективной терапии, основанной на определении генетического полиморфизма у больных туберкулезом, отмечено уменьшение частоты развития гепатотоксических нежелательных побочных реакций до 9,9 % при сравнении с пациентами, которым гепатопротективная терапия назначалась без учета генетических факторов риска (24,2 %) ($\chi^2 = 5,652$, $p < 0,05$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При лечении пациентов больных туберкулезом по I и III режимам химиотерапии целесообразно определение генетического полиморфизма олигонуклеотидных последовательностей rs1799931, rs1799930 и rs1041983 гена NAT2 перед началом терапии.

2. Пациенты с наличием мутаций АА олигонуклеотидной последовательности rs1799931, АА или АG олигонуклеотидной последовательности rs1799930, а также ТТ или СТ олигонуклеотидной последовательности rs1041983 должны быть включены в группу риска по развитию гепатотоксических нежелательных побочных реакций.

3. Для предупреждения реализации генетической информации и развития нежелательных побочных реакций необходимо назначение препаратов группы гепатопротекторов.

4. Пациенты без мутаций типа АА олигонуклеотидной последовательности rs1799931, АА или AG олигонуклеотидной последовательности rs1799930, а также ТТ или СТ олигонуклеотидной последовательности rs1041983 могут не рассматриваться как группа риска по развитию гепатотоксических нежелательных побочных реакций при применении противотуберкулезных препаратов, и проведение гепатопротективной терапии таким пациентам не показано.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Приверженность к лечению туберкулеза при применении диспергируемых таблеток у детей и подростков. С. М. Кавтарашвили, **А. В. Казаков**, И. Е. Мильянова, В. Г. Мадасова // **Медицинский альянс**. – 2015. – № 3. – С. 76–79.

2. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков и персонификация режимов лечения больных туберкулезом. Г. Н. Можокина, **А. В. Казаков**, Н. А. Елистратова, С. А. Попов // **Туберкулез и болезни легких**. – 2016. – Т. 94, № 4. – С. 6–12.

3. Комбинированные противотуберкулёзные препараты как мировая тенденция химиотерапии больных туберкулёзом детей. Н. И. Клевно, В. А. Аксенова, А. Д. Пахлавонова, **А. В. Казаков** // **Туберкулез и социально-значимые заболевания**. – 2017. – № 4. – С. 74–79.

4. Влияние генетического полиморфизма генов ферментов, ответственных за биотрансформацию противотуберкулёзных препаратов на риск развития гепатотоксических реакций у больных туберкулёзом. **А. В. Казаков**, Г. Н. Можокина, В. А. Аксенова, С. В. Смердин, С. А. Попов, Н. И. Клевно, А. А. Рагимов, О. Е. Кузнецов, В. В. Козлов // **Антибиотики и химиотерапия**. – 2018. – Т. 63, № 5-6. – С. 20–25.

5. The frequency of cases of hepatotoxic reactions in first diagnosed patients with pulmonary tuberculosis. **Kazakov A.**, Mojokina G., Smerdin S., Aksenova V., Klevno N. // **European Respiratory Journal**, Supplement. - 2018. - Т. 52. № S62. - С. PA526.
6. Превентивная химиотерапия у детей из очагов туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя. В. А. Аксенова, Н. И. Клевно, **А. В. Казаков**, А.В. Гордина, Р.Х. Фатыхова // **Туберкулез и болезни легких**. – 2019. – Т. 97, № 6. – С. 36–43.
7. Частота гепатотоксических реакций у впервые выявленных больных туберкулезом легких с генетическим полиморфизмом генов-ферментов, ответственных за биотрансформацию ксенобиотиков. **А. В. Казаков**, Г. Н. Можоккина, Н. И. Клевно, С.В. Смердин, А.Д. Пахлавонова, П.В. Сенчихин, Х.Б. Дадашева // **Туберкулез и болезни легких**. – 2019. – Т. 97, № 5. – С. 72–73.
8. Experimental justification choice to prevent hepatotoxic reactions to anti-TB drugs based on gene-phenotypic characteristics. **Kazakov A.**, Mozhokina G., Zyuzya Y., Petrova L. // **European Respiratory Journal**, Supplement. - 2019. - Т. 54, № S63. - С. PA3010.
9. TB infection in children receiving genetically engineered biologic drugs // **European Respiratory Journal**, Supplement. Aksenova V., Klevno N., Dementjeva E., **Kazakov A.** - 2019. - Т. 54, № S63. - С. PA3626.
10. Aksenova V., Klevno N., **Kazakov A.**, Pakhlavonova A. Opportunities for preventive treatment of children with latent tuberculosis infection from focus with MDR-TB // **European Respiratory Journal**, Supplement. - 2019. - Т. 54. № S63. - С. PA3627.
11. Hepatotoxic reactions in rats after administration of component schemes of reserve anti-TB drugs with different safety profile. **Kazakov A.**, Mozhokina G., Zyuzya Y., Petrova L. // **European Respiratory Journal**, Supplement. 2019. Т. 54. № S63. С. PA4604.
12. **Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2019621214**, Российская Федерация. Прогноз развития гепатотоксических

реакций при проведении химиотерапии у пациентов, страдающих туберкулезом органов дыхания / **Казаков А.В.**, Можокина Г. Н.; правообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Министерства здравоохранения Российской Федерации – 2019621072, заявл. 24.06.2019, **опубл. 08.07.2019, Бюл. №7**

13. Иммунологические кожные тесты в дифференциальной диагностике туберкулеза у взрослых. А. В. Лысов, **А. В. Казаков**, С. В. Ситникова, А. С. Безукладова // **Туберкулез и социально-значимые заболевания.** – 2020. – № 1. – Р. 14–19.

14. Особенности фармакокинетики рифампицина и изониазида, входящих в состав комбинированного препарата для лечения детей с туберкулезом органов дыхания. А. Д. Пахлавонова, **А. В. Казаков**, В. А. Аксенова, Н.И. Клевно, С.А. Попов, В.П. Хотченков, А.О. Ружицкий, Т.П. Сабгайда // **Современные проблемы науки и образования.** – 2020. – № 6. – С. 119. – <http://science-education.ru/ru/article/view?id=30258>

15. Частота развития гепатотоксических реакций при лечении больных туберкулезом с применением гепатопротективной терапии по результатам генетического исследования. **А. В. Казаков**, В. А. Аксенова, С. В. Смердин, Г.Н. Можонкина, А.В. Матвеев // **Современные проблемы науки и образования.** – 2020. – № 4. – С. 142. – <http://science-education.ru/ru/article/view?id=30077>.

16. Особенности гепатотоксических реакций, вызванных комплексом противотуберкулезных препаратов первого ряда, у крыс с разным фенотипом ацетилирования. Г. Н. Можокина, **А. В. Казаков**, Ю. Р. Зюзя, Л. Ю. Петрова // **Туберкулез и болезни легких.** – 2020. – № 7. – С. 51–55.

17. Современные подходы к профилактике туберкулеза детей и подростков, получающих генно-инженерные биологические препараты. В. А. Аксенова, **А. В. Казаков**, Н. И. Клевно, Е.К. Дементьева, Т.А. Севостьянова // **Российский вестник перинатологии и педиатрии.** – 2020. – Т. 65, № 4. – С. 314.

18. Превентивное противотуберкулезное лечение снижает риск развития локальных форм туберкулеза у детей, получающих иммуносупрессивную терапию: ретроспективное когортное исследование. В. А. Аксёнова, Н. И. Клевно, **А. В. Казаков**, Д.А. Кудлай, Т.А. Севостьянова, Е.К. Дементьева // **Вопросы современной педиатрии.** – 2020. – № 19 (5). – С. 346–351.