

ARTICOL DE CERCETARE

## Markerii circulanți ai stresului oxidativ și sistemului antioxidant în tuberculoza pulmonară: studiu prospectiv, tip caz-control

Evelina Lesnic<sup>1\*</sup>, Valeriana Pantea<sup>2</sup>, Veronica Sardari<sup>2</sup>,  
Serghei Ghinda<sup>3</sup>, Valentin Gudumac<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Catedra de pneumoftiziologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;*

<sup>2</sup>*Laboratorul de biochimie, Catedra de medicină de laborator, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;*

<sup>3</sup>*Laboratorul de imunologie și alergologie, Institutul de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”, Chișinău, Republica Moldova.*

Data primirii manuscrisului: 18.12.2017

Dara acceptării spre publicare: 18.05.2018

### Autor corespondent:

Evelina Lesnic, dr. șt. med.

Catedra de pneumoftiziologie

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

e-mail: evelina.lesnic@usmf.md

RESEARCH ARTICLE

## Circulating markers of the oxidative stress and antioxidant system in pulmonary tuberculosis: prospective, case-control study

Evelina Lesnic<sup>1\*</sup>, Valeriana Pantea<sup>2</sup>, Veronica Sardari<sup>2</sup>,  
Serghei Ghinda<sup>3</sup>, Valentin Gudumac<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Chair of pneumophtisiology, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;*

<sup>2</sup>*Biochemistry laboratory, Chair of laboratory medicine, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;*

<sup>3</sup>*Laboratory of immunology and alergology, Institute of Phtisiopneumology Chiril Draganiuc, Chisinau, Republic of Moldova.*

Manuscript received on: 18.12.2017

Accepted for publication on: 18.05.2018

### Corresponding author:

Evelina Lesnic, PhD

Chair of pneumophtisiology

Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy

165, Ștefan cel Mare și Sfânt ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004

e-mail: evelina.lesnic@usmf.md

### Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Cu toate că biomarkerii stresului oxidativ au fost studiați în multiple afecțiuni, particularitățile dereglărilor sistemului oxidant și antioxidant la pacienții cu tuberculoză pulmonară nu au fost, deocamdată, complet elucidate.

#### Ipoteza de cercetare

Stabilirea devierilor homeostaziei biologice la pacienții cu tuberculoză pulmonară permite individualizarea regimului terapeutic pentru îmbunătățirea ratei succesului tratamentului.

#### Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

A fost stabilită creșterea markerilor peroxidării proteice și a peroxidării carbohidraților. Sporirea activității totale antioxidante a serului și a concentrației proteinelor cu capacitate antioxidantă relevă stimularea compensatorie a sistemului antioxidant. Activitatea redusă a glutathion-S-transferazei serice a condiționat hepatotoxicitatea regimului terapeutic, apreciat prin creșterea  $\gamma$ -glutamyltransferazei și transaminazelor serice.

### What is not known yet, about the topic

Despite the oxidative stress biomarkers were studied in multiple diseases, the features of the oxidative and antioxidant system disturbances in patients with pulmonary tuberculosis were not identified.

#### Research hypothesis

The establishment of the biological homeostasis disturbances at patients with pulmonary tuberculosis permits the individualization of treatment and improvement its success rate.

#### Article's added novelty on the scientific topic

There were determined a moderate elevation of the protein oxidation and mild increasing of carbohydrate oxidation. The total serum anti-oxidative activity and the concentration of the proteins with anti-oxidative capacity demonstrated the compensatory hyperactivity of the antioxidative system. Decreased activity of the serum glutathione-S-transferase determined the hepatotoxicity of the applied treatment regimen established through the increasing of the  $\gamma$ -glutamyltransferase and serum transaminases.

## Rezumat

**Introducere.** Evoluția tuberculozei și răspunsul terapeutic sunt determinate de virulența micobacteriilor, mecanismele de protecție, cât și de capacitatea organismului de a contrabalansa agresiunea stresului oxidativ. Scopul studiului a constat în stabilirea particularităților stresului oxidativ și sistemului antioxidant în tuberculoza pulmonară.

**Material și metode.** A fost realizat un studiu prospectiv, de tip caz-control, care a inclus 87 de pacienți, distribuiți în două eșantioane: cel de studiu (n=51), constituit din cazuri noi de tuberculoză pulmonară și cel de control (n=36), format din persoane condiționat sănătoase. Loturile au fost similare conform distribuției după gen și vârstă. Investigarea cazurilor a fost realizată conform protocolului național și standardelor de evaluare biochimică. Intensitatea stresului oxidativ a fost estimată prin determinarea concentrației serice a produșilor proteici de oxidare avansată (AOPP), proteinei C reactive, produșilor finali de glicare avansată (AGEs). Sistemul antioxidant a fost evaluat prin determinarea activității antioxidante totale a serului, activității enzimelor glutatationului și a nivelului proteinelor serice cu rol antioxidant.

**Rezultate.** Markerii peroxidării proteice și proteina C reactivă au demonstrat perturbări semnificative în tuberculoză. Peroxidarea carbohidraților a fost nesemnificativ perturbată. Activitatea antioxidantă totală a serului a fost relevant crescută, ceea ce în asociere cu concentrația mărită a proteinelor cu rol antioxidant, au demonstrat hiperactivitatea sistemului antioxidant ca măsură compensatorie agresiunii stresului oxidativ. Activitatea redusă a glutatation-S-transferazei serice a condiționat creșterea activității transaminazelor hepatice și hepatotoxicitatea regimului terapeutic.

**Concluzii.** Investigarea markerilor biochimici a determinat modificări pronunțate ale peroxidării proteice și moderate ale peroxidării carbohidraților. Activitatea serică antioxidantă sporită și concentrația serică a proteinelor cu rol antioxidant au demonstrat hiperactivitatea sistemului antioxidant la agresiunea stresului oxidativ. Studiul activității glutatation-S-transferazei permite individualizarea regimului terapeutic și reducerea riscului dezvoltării efectelor adverse al medicamentelor.

**Cuvinte cheie:** tuberculoză, stres oxidativ, sistem antioxidant.

## Introducere

Studiile imuno-genetice au demonstrat că tuberculoza (TB) este o boală multifactorială, având o evoluție și răspuns la tratament determinate de interacțiunea continuă a *M. tuberculosis* (MTB) și genotipul uman [1]. Evoluția naturală și particularitățile morfo-clinice ale infecției tuberculoase sunt determinate de virulența, capacitatea de diseminare a MBT și mecanismele de apărare ale gazdei [1]. De asemenea, evoluția infecției depinde de rezistența imună, cât și de capacitatea organismului de a lupta prin mecanisme antioxidante contra stresului oxidativ (SO), determinat de medicația antituberculoasă și exotoxinele MBT. Stresul oxidativ (SO) este cauzat de

## Abstract

**Introduction.** Tuberculosis evolution and treatment response are determined by the mycobacteria virulence, protective mechanisms, as well as the organism's capacity to fight against the aggression of the oxidative stress. The aim of the study was the establishment of the features of the oxidative stress and antioxidative system defence in pulmonary tuberculosis.

**Material and methods.** A prospective, case-control study, which included 87 patients, distributed in 2 groups: study group (n=51), consisting of new cases with pulmonary tuberculosis, and control group (n=36) – conditioned healthy individuals, similarly distributed according to the sex and age. The case investigation was realized according to the national protocol and biochemical assessment standards. The intensity of the oxidative stress was appreciated through the serum concentration of the advanced oxidation protein products (AOPP), C reactive protein, advanced glycation end-products (AGE). The antioxidant system was assessed through the total serum antioxidant activity, levels of the glutathione enzymes and serum proteins with antioxidant role.

**Results.** The products of the protein peroxidation and protein C reactive demonstrated severe disturbances in tuberculosis. Carbohydrates peroxidation was non-significantly modified. The increased total antioxidant activity and the concentration of the proteins with the antioxidant role demonstrated the hyperactivity of the antioxidant system as a compensatory measure against the oxidative stress aggression. The decreased activity of the serum glutathione-S-transferase determined the increasing the activity of the hepatic transaminases and hepatotoxicity of the therapeutic regimen.

**Conclusions.** The assessment of the biochemical markers determined severe disturbances of the protein peroxidation and moderate of the carbohydrate peroxidation. Increased serum antioxidant activity and concentration of the proteins with an antioxidant role demonstrated the hyperactivity of the antioxidant system at the aggression of the oxidative stress. The glutathione-S-transferase enzyme study permits the individualization of the therapeutic regimen for decreasing the risk of development of the adverse drug reactions.

**Key words:** tuberculosis, oxidative stress, antioxidant system.

## Introduction

Immune and genetic studies established that tuberculosis (TB) represent a multifactorial disease, of which evolution and treatment response are determined by the continuous interaction between *Mycobacterial tuberculosis* (MBT) and human genotype [1]. Natural evolution, morphological and clinical features of the tuberculous infection are determined by the virulence, dissemination capacity of MBT and host's defence mechanisms [1]. As well as, the infection evolution depends on the immune resistance, and the organism's capacity to fight through the antioxidant mechanisms against the aggression of the oxidative stress (OS). The oxidative stress

dezechilibrul dintre producția radicalilor liberi de oxigen și capacitatea sistemului biologic de a detoxifia peroxidii și radicalii liberi. SO se manifestă prin peroxidarea ADN-ului celular, proteinelor, lipidelor, glucidelor și altor macromolecule biologice [2]. SO și peroxidarea proteică provoacă dereglări metabolice cronice, cu fibroză extinsă din cauza acumulării de colagen în țesuturi, consecința fiind insuficiența poliorganică. Producții proteice de oxidare avansată (AOPP) sunt toxine uremice care rezultă din interacțiunea dintre oxidanții clorinați (cloramine și acidul hipocloros) cu proteinele plasmatică [3]. Rinichii și ficatul sunt organele principale responsabile de izolarea și excreția lor, iar concentrația serică crescută se identifică în procesele inflamatorii cronice, insuficiența renală cronică, hiperparatiroidism și tratament continuu cu calciu și vitamina D [3]. Producții finali de glicare avansată (AGEs) sunt un grup heterogen de substanțe, care rezultă din glicarea non-enzimatică a proteinelor, lipidelor și acizilor nucleici, în urma unui lanț de reacții definit „reacția Maillard” [4]. Concentrația serică crescută a AGEs se identifică la pacienții cu diabet zaharat și reprezintă un biomarker al hiperglicemiei, glicării neenzimatice a proteinelor și activării excesive a căii polioliol [4, 5]. Proteina C reactivă (PCR) este o proteină neglicozilată plasmatică cu structură pentamerică, produsă de ficat și endoteliul vascular, având o rezistență înaltă la proteoliză [5]. Este considerată un reactant de fază acută, fiind un trigger pro-inflamator, iar producția ei este stimulată de IL-1 $\beta$ , IL-6 și TNF- $\alpha$  [1]. Dovezi convingătoare au demonstrat că PCR reprezintă un biomarker al SO datorită activării fracțiunilor complementului, inducerii apoptozei, activării celulelor endoteliale, recrutării monocitelor, acumulării lipidelor și altor procese de tip redox [5].

Sistemul antioxidant este format din compuși antioxidanți hidrofilii, prezenți în citoplasma celulelor și serul sanguin, precum și din compuși hidrofobi, care se localizează în membranele biologice [7]. Antioxidanții enzimatici din ser și citoplasma celulară sunt: superoxid dismutaza (SOD), catalaza (CAT), glutation reductaza (GR), glutation peroxidaza (GPO) și glutation-S-transferaza (GST) [8]. Glutation-S-transferaza este o enzimă citozolică, mitocondrială și a membranei microsomale, cu rol în detoxifierea xenobioticelor prin catalizarea conjugării glutationului redus în compuși mercapturici [9]. Reglarea și funcționarea GST influențează creșterea celulară, nivelul stresului oxidativ, progresia bolii și rezultatul terapeutic. Evaluarea activității GST reprezintă o metodă de diagnostic al SO și eficienței mecanismelor de detoxifiere dependente de GST [10]. Gama-glutamyltranspeptidaza ( $\gamma$ -GPT) este o enzimă-cheie a ciclului  $\gamma$ -glutamilic, ce catalizează transferul grupării  $\gamma$ -glutamil de la glutation la alți aminoacizi [8]. Este localizată în membrana citoplasmatică, iar centrul activ al enzimei – la exteriorul celulei. Poședă un rol major în metabolismul mediatorilor inflamației (citokinelor, proteinelor de fază acută), substanțelor cancerigene și toxice. Sinteza  $\gamma$ -GPT este indusă de anumite medicamente, colestază, consumul de alcool, tumori hepatice și ciroză [8]. Actualmente,  $\gamma$ -GPT este considerat drept unul dintre cei mai robusți markeri ai stresului oxidativ al întregului organism [2]. Aspartat aminotransferaza

(OS) is caused by the imbalance between the production of the free oxygen radicals and the capacity of the biological system to detoxify the peroxides and free radicals. OS is manifested through the peroxidation of the cellular DNA, proteins, lipids, carbohydrates and other biological macromolecules [2]. OS and protein peroxidation products determine chronic metabolic disturbances with extensive fibrosis and collagen accumulation in the tissues, in consequence developing the multisystemic failure. The advanced oxidation protein products (AOPP) are uremic toxins which result from the interaction between the chlorine oxidants (chloramines and hypochloric acid) with plasmatic proteins [3]. The kidneys and the liver are the major organs responsible for their isolation and excretion, but the increased serum concentration is identified in patients with chronic inflammatory processes, chronic renal failure, hyperparathyroidism and continuous treatment with calcium and vitamin D [3]. The advanced glycation end products (AGE<sub>s</sub>) are a heterogeneous substances, which result from the non-enzymatic glycation of the proteins, lipids and nucleic acid, following a chain of reaction, defined “Maillard reaction” [4]. High serum concentration of AGE<sub>s</sub> is identified in patients with diabetes mellitus and represent an index of the hyperglycaemia, non-enzymatic glycosylation of the proteins and excessive activation of the polyol way [4, 5]. Protein C reactive (PCR) is a plasmatic non-glycosylated protein with pentameric structure, produced by the liver and vascular endothelium, with a high resistance to the proteolysis [5]. Is established as an acute phase protein, being a pro-inflammatory trigger, and its production is stimulated by IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  [1]. Evidence-based data demonstrated that PCR represents a biomarker of the OS, due to the activation of the complement fractions, apoptosis inducing, endothelial cell activation, monocyte recruiting, lipid accumulation and other redox reactions [5].

The antioxidant system is composed by the hydrophilic antioxidant compounds identified in the cytoplasm and blood serum, as well as the hydrophobic compounds, which are localized in the biological membranes [7]. Enzymatic antioxidants from the serum and cell's cytoplasm are: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPO) and glutathione S-transferase (GST) [8]. Glutathione S-transferase is a cytosolic, mitochondrial and microsomal enzyme, involved in the detoxification of the xenobiotics through the conjugation catalysis of the reduced glutathione in mercapturic compounds [9]. Assessment of the GST level represents a diagnostic tool of the OS and efficiency of the detoxification mechanisms related to GST. The  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GPT) is a key-enzyme of the  $\gamma$ -glutamyl cycle, which catalyses the transfer of the  $\gamma$ -glutamyl group from the glutathione to other amino acids [8]. It is localised in the cell's membrane, and the enzyme's active centre at the exterior cell's border. Has a major role in the metabolism of the inflammatory mediators (cytokines, acute phase proteins), carcinogenic substances and toxins. The synthesis of the  $\gamma$ -GPT is induced by drugs, cholestasis, alcohol consumption, hepatic tumours and cirrhosis [8]. Actually, the  $\gamma$ -GPT is considered done of the most important markers of the oxida-



(AST) este o enzimă catalizator al transferul grupării amino de la aspartat la gruparea ceto al cetoglutaratului, cu producerea de acid oxaloacetic și glutamat. AST este un biomarker al patologiilor hepatice, sindromului metabolic, sarcopeniei și stresului oxidativ crescut [8]. Alanin aminotransferaza (ALT) este o enzimă din grupul transferazelor, ce catalizează transferul reversibil al grupării amino de la alanină către  $\alpha$ -cetoglutarat, cu formarea acidului piruvic și glutamat [9]. Deși, ambele enzime fac parte din grupul transmaminazelor hepatice, ALT se localizează în citoplasmă, iar AST atât în citoplasmă, cât și în mitocondrii. Raportul AST/ALT mai mare de 1 este corelat cu risc sporit al mortalității [9].

Medicamentele utilizate în tratamentul antituberculos sunt importanți factori ai perturbărilor homeostaziei organismului pacientului [11]. Tratamentul antituberculos este administrat cu scopul diminuării riscului transmiterii infecției, vindecării, prevenirii decesului și recidivei [12]. Principiile tratamentului antituberculos sunt: inițierea imediat după depistare, administrarea strict supravegheată, asocierea medicamentelor cu administrarea în două faze (intensivă și de continuare), individualizarea tratamentului la apariția fenomenelor adverse și a rezistenței medicamentoase, precum și îmbunătățirea complianței terapeutice a bolnavului prin acordarea asistenței materiale [12]. Durata tratamentului tuberculozei sensibile constă în administrarea, pentru cel puțin 6 luni, a preparatelor antituberculoase de linia 1-a (izoniazidă, rifampicină, pirazinamidă, etambutol și/sau streptomycină), iar în tuberculoza determinată de MBT multidrog-rezistente – pentru o perioadă de 18-24 luni de preparate antituberculoase de linia a 2-a, conform spectrului de sensibilitate medicamentoasă [12, 13]. Tratamentul standardizat al TB-MDR include antibiotice injectabile – aminoglicozide (kanamycină, ampicilină sau capreomicină) și a chimioterapitelor cu administrare orală: fluoroquinolone (levofloxacină, moxifloxacină sau gatifloxacină), etionamidă, protionamidă, acidul paraaminosalicilic și cycloserină [13].

Această cercetare reflectă aspecte comparative ale markerilor circulanți ai SO și sistemului antioxidant la pacienții cu tuberculoză pulmonară pe durata fazei intensive a tratamentului antituberculos, comparativ cu a unui eșantion reprezentativ de persoane condiționat sănătoase. Scopul studiului reprezintă stabilirea particularităților stresului oxidativ și ale sistemului antioxidant în tuberculoza pulmonară.

### Material și metode

A fost realizat un studiu prospectiv, de tip caz-control, care a evaluat particularitățile imuno-biochimice ale 51 de pacienți cu tuberculoză pulmonară (eșantionul de studiu) diagnosticați în instituțiile medicale specializate ale Chișinăului în perioada anului 01.01.2016-31.08.2016 și 36 de persoane condiționat sănătoase conform criteriilor clinice și biochimice (eșantionul de control).

Criteriile de includere în eșantionul de studiu au fost:

- vârsta peste 18 ani;
- pacient diagnosticat cu tuberculoză pulmonară;
- tipul pacientului: „caz nou”;

tive stress of the entire body [2]. Aspartate amino-transferase (AST) is a catalyser enzyme of the transfer of the amino group from the aspartate to keto group of the ketoglutarate, with the production of the oxal-acetic acid and glutamate. AST is a biomarker of the hepatic diseases, metabolic syndrome, sarcopenia and increased OS [8]. Alanine aminotransferase (ALT) is an enzyme from the transferases group, which catalysis the reversible transfer of the amino group from the alanine to  $\alpha$ -ketoglutarate, with the produce of the pyruvic acid and glutamate [9]. Despite, both enzymes are from the group of the hepatic transaminases, ALT is localised in the cytoplasm, but the AST in cytoplasm as well as in mitochondria. The AST/ALT rate more than 1 is correlated with a high risk of the mortality [8].

The drugs used in the treatment of tuberculosis are important factors of patient's organism metabolic homeostasis disturbances [11]. The anti-tuberculosis treatment is used with the aim to reduce the risk of the infection transmission, healing, prevention of the death and recurrence [12]. The principles of the anti-tuberculosis treatment are: onset immediately after detection, strictly supervised administration, drugs association in two phases (intensive and continuation), treatment individualization at the appearance of adverse drug reactions and drug resistance, as well as the improvement of the patient's treatment compliance through the material assistance [12]. Drug susceptible treatment duration consists of the administration for at least 6 months with 1<sup>st</sup> line antituberculosis drugs (isoniazid, rifampicin, ethambutol and/or streptomycin), but in tuberculosis determined by the multidrug resistant MBT for a period of 18-24 months with 2<sup>nd</sup> line antituberculosis drugs according to the drug susceptibility test [12, 13]. The standard treatment of multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) consists of injectable antibiotics – aminoglycosides (kanamycin, amikacin or capreomycin) and orally administrated anti-tuberculosis drugs: fluoroquinolones (levofloxacin, moxifloxacin or gatifloxacin), ethionamide, prothionamide, paraaminosalicylic acid and cycloserine [13]. This study reflects comparative aspects of the circulating markers of the oxidative stress and antioxidant system in patients with pulmonary tuberculosis during the intensive phase of the anti-tuberculosis treatment in comparison with a representative sample of healthy persons. The aim of the study was the establishment of the oxidative stress peculiarities and antioxidant system in pulmonary tuberculosis.

### Material and methods

It was realised a prospective study which assessed the immune biochemical features of 51 patients with pulmonary tuberculosis (study group) diagnosed in the medical specialized institutions of Chisinau during the period 01.01.2016-31.08.2016 and 36 conditioned healthy persons, according to the clinical and biochemical criteria (control group).

Inclusion criteria in the study group were:

- age more than 18 years old;
- patient diagnosed with pulmonary tuberculosis;

- diagnostic confirmat prin metode microbiologice convenționale (examen microbiologic și molecular-genetic al sputei);
- pacient tratat în faza intensivă în cadrul subdiviziunilor clinice ale Spitalului Clinic Municipal de Ftiziopneumologie din Chișinău;
- consimțământul informat semnat.

Ancheta studiului a inclus informații despre sex, vârstă, diagnosticul clinico-radiologic, tipul de caz, statutul microbiologic al pacientului, rezultatele testului de susceptibilitate medicamentoasă, regimul terapeutic și reacțiile adverse.

Toți pacienții eșantionului de studiu au fost diagnosticați și tratați conform protocolului clinic național „*Tuberculoza la adulți*”, elaborat conform recomandărilor OMS [12, 13].

Criteriile de includere în eșantionul de control au constituit:

- vârsta peste 18 ani;
- persoană condiționat sănătoasă conform criteriilor clinice, hematologice (hemoleucograma) și biochimice (transaminazele hepatice, testul bilirubinei);
- consimțământul informat semnat.

Evaluarea indicatorilor biochimici din ser a fost efectuată utilizând metode cu microcantități de material cercetat – ser sanguin și reagenți de lucru. Dozarea s-a efectuat în microplăci cu 96 de godeuri. Procesarea probelor s-a efectuat prin adăugarea reagenților și măsurarea absorbției în condiții de standardizare maximă. Proteinele totale au fost evaluate conform procedurii Lowry modificat [10]. Intensitatea SO a fost analizată prin determinarea concentrației produșilor proteici de oxidare avansată (AOPP) conform procedurii descris de Witko-Sarsat V. modificat [3]. Dozarea produșilor finali de glicare avansată (*advanced glycated end-products AGEs*) a constat în cuantificarea a două tipuri principale: *AGEs pentosidine-like* și *AGEs vesperlysines-like*. Micrometoda s-a bazat pe măsurarea intensității fluorescenței probei de cercetat diluate în tampon fosfat la  $\lambda_{exc}$  335 nm,  $\lambda_{em}$  385 nm (cuantificarea *pentosidine-like AGEs*) și la  $\lambda_{exc}$  370 nm,  $\lambda_{em}$  440 nm (cuantificarea *vesperlysines-like AGEs*), conform procedurii descris de Sero L. modificat [9, 14].

Dozarea activității antioxidante totale (tAOA) s-a efectuat prin: (1) metoda bazată pe degradarea radicalului 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolină 6 sulfonat (ABTS) la interacțiunea cu compușii serici cu proprietăți antioxidante și măsurarea scăderii absorbției la 734 nm [9]; (2) metoda CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*), bazată pe capacitatea de reducere a ionului de Cu prin captarea radicalului hidroxil [7]. Capacitatea antioxidantă a serului a fost evaluată prin dozarea activității enzimelor glutatationului (GST și  $\gamma$ -GTP) cu ajutorul kiturilor de analiză ale firmei Eliteh (Franța) conform instrucțiunilor anexate. Injuria hepatocelulară a fost evaluată prin determinarea transaminazelor serice conform metodelor cinetice cu ajutorul kiturilor de analiză ale firmei Eliteh (Franța) conform instrucțiunilor anexate.

Metodologia lucrării s-a bazat pe tehnicile de colectare, analiză statistică, reprezentare grafică și evaluare analitică. Analiza statistică a fost realizată prin evaluarea comparativă a particularităților cantitative și calitative ale pacienților se-

- patient type „new case”;
- the diagnosis confirmed through the conventional microbiological methods (microbiological examination and molecular genetic test of the sputum);
- patient treated in the intensive phase within clinical subdivisions of the Municipal Clinical Hospital of Phthisiopneumology of Chisinau;
- signed informed consent.

The study investigation schedule included information about sex, age, radiological diagnosis, case type, microbiological patient's status, and results of the drug susceptibility test, treatment regimen and adverse reactions. All patients of the study group were diagnosed and treated according to the national clinical protocol „*Tuberculosis in adults*”, elaborated according to the WHO recommendations [12, 13].

The including criteria in the control group were:

- age more than 18 years old;
- conditioned healthy individual according to the clinical criteria, haematological (CBC) and biochemical (liver transaminases, bilirubin) indices;
- signed informed consent.

The assessment of the biochemical indices in the serum was performed using the methods with micro quantities of the evaluated material – blood serum and work reagents. The dosage was performed in micro plates with 96 wells. The sample processing was performed by the addition of the reagents and assessing the absorbance in the maximum standardization conditions. Total proteins were assessed according to the Lowry modified method [10]. The OS intensity was assessed through the determination of the advanced oxidation protein products (AOPP) according to the Witko-Sarsat V. modified method [3]. The advanced glycated end-products (AGEs) consisted in the quantification of two main types of the AGEs: *pentosidine-like AGEs* and *vesperlysines-like AGEs*. The micro method was based on the fluorescence measure of the intensity of the studied samples diluted in the phosphate tampon at  $\lambda_{exc}$  335 nm,  $\lambda_{em}$  385 nm (quantification of the *pentosidine-like AGEs*) and at  $\lambda_{exc}$  370 nm,  $\lambda_{em}$  440 nm (quantification of the *vesperlysines-like AGEs*), according to the Sero L. modified method [9, 14].

The determination of the total antioxidant activity (tAOA) was performed through two procedures: (1) method based on the degradation of the 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical at the interaction with serum compounds with the antioxidant properties and measure of the decreasing absorbance at 734 nm [9]; (2) method CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) based on the reducing capacity of the Cu ion through the captation of the hydroxyl radical [7]. The serum antioxidant capacity was assessed through the dosage of the activity of the glutathione enzymes (GST and  $\gamma$ -GTP) using the analysis kits of the Eliteh (France) producer, according to the attached instructions. The hepatocellular injury was assessed through the determination of the serum transaminases according to the kinetic methods using the analysis kits of the Eliteh (France) producer according to the annexed instructions.

The study methodology was based on the collection, statistical analysis, graphic representation and analytical estima-

lectați, utilizând programul Microsoft Excel XP. Materialul acumulat a fost sistematizat în grupuri simple și complexe. Pentru testarea diferenței semnificative dintre indicatorii studiați ai loturilor comparate, s-a utilizat testul statistic nonparametric „t test” și pragul de semnificație „p” ( $p < 0,05$ ).

## Rezultate

Segregând pacienții conform caracteristicilor biologice, a fost demonstrată o distribuție similară a bărbaților și femeilor în ambele eșantioane, cu predominarea bărbaților în aceeași proporție, fapt ce a permis comparabilitatea rezultatelor. Aceași proporție a persoanelor tinere, în vârstă de până la 44 de ani, a fost stabilită în ambele eșantioane, condiție care a permis comparabilitatea datelor de laborator (Tabelul 1).

Distribuind pacienții eșantionului de studiu în grupuri socio-economice, am constatat că persoanele neangajate, fără sursă de venit, au constituit două treimi din eșantion, fapt ce demonstrează similitudinea eșantionului cu cohortele evaluate în cercetările autohtone. Pacienții fără asigurare medicală și protecție socială au constituit o jumătate din eșantion. Fiecare al zecelea pacient a fost comorbid. Din focare infecțioase a provenit fiecare al zecelea pacient. Cu istoric recent de migrație și istoric de detenție au fost un număr limitat de pacienți. Câte un pacient a fost bolnav de diabet, patologii psihiatrice sau alcoolism cronic.

Segregarea pacienților conform grupului de risc este redată în Tabelul 2.

Depistarea pasivă a 28 (55%) de cazuri a fost realizată

tion. Statistical analysis was carried out by the comparative assessment of the quantitative and qualitative peculiarities of the selected patients using the Microsoft Excel XP programme. Accumulated material was systematized in simple and complex groups. For the testing of significant differences between the studied indices of the compared samples it was performed the statistic non-parametric „t test” and the significance threshold „p” ( $p < 0.05$ ).

## Results

Distributing patients according to the biological characteristics, it was established a similar rate of men and women in both groups, with the predomination of men in the same proportion, which permitted the comparability of the results. The same proportion of young persons, aged less than 44 years old, was established in both groups, condition which permitted the comparability of the laboratory data (Table 1).

Distributing patients of the study group in socio-economic subgroups, was established that unemployed persons, without personal income, constituted two thirds of the group, what demonstrated the similarity of the group with the assessed cohorts in the national studies. Patients without medical insurance in health and social protection represented one half of the group. Each tenth patient had associated diseases. From the infectious clusters came each tenth patient. With a recent history of migration and a history of detention, there were a limited number of patients. One patient was ill with diabetes, psychiatric pathologies or chronic alcoholism. Patient segregation according to the risk group is shown in Table 2.

**Tabelul 1.** Segregarea pacienților pe sexe și vârstă.

**Table 1.** Segregating patients by sex and age groups.

Segregare biologică <i>Biological segregation</i>	Sexul / Sex	ES / SG n=51	EC / CG n=36	P
Stratificarea pe sexe <i>Stratification by sex</i>	Bărbați / <i>Men</i>	31 (61%)	24 (67%)	<0,001
	Femei / <i>Women</i>	20 (39%)	12 (33%)	
Stratificarea pe grupuri de vârstă <i>Stratification by age groups</i>	18-44 ani / <i>years</i>	39 (76%)	29 (81%)	<0,001
	>45 ani / <i>years</i>	12 (24%)	7 (19%)	

**Tabelul 2.** Segregarea pacienților pe grupuri de risc (n=51).

**Table 2.** Segregating patients by risk groups (n=51).

Statut economic / <i>Economical state</i>		
▪ Neangajați, pensionați, invalizi, studenți / <i>Unemployed, retired, disabled, students</i>		39 (76%)
Statutul de asigurat / <i>Insurance status</i>		
▪ Absența asigurării / <i>Lack of insurance</i>		29 (57%)
Comorbidități / <i>Comorbidities</i>		
▪ Boli asociate / <i>Associated diseases</i>		6 (12%)
Grupuri epidemiologice / <i>Epidemiological groups</i>		
▪ Focare familiare / <i>Family clusters</i>		5 (10%)
▪ Migrație / <i>Migration</i>		4 (8%)
▪ Istoric de detenție / <i>History of detention</i>		2 (4%)
Grupuri cu risc sporit / <i>Group with high risks</i>		
▪ Alcoolism cronic / <i>Chronic alcoholism</i>		2 (4%)
▪ Boli psihiatrice / <i>Psychiatric diseases</i>		1 (2%)
▪ Diabet / <i>Diabetes</i>		1 (2%)



prin examinarea pacienților simptomatici, 7 (14%) – prin examinarea grupurilor cu risc sporit, iar 16 (31%) au fost depistați prin adresare directă la instituțiile medicale specializate. Majoritatea pacienților, 49 (96%), au fost diagnosticați cu tuberculoză infiltrativă și 2 (4%) – cu tuberculoză diseminată. La examenul radiologic s-au constatat distrucții parenchimatose la întregul eșantion de studiu. Examenul microscopic al sputei pentru identificarea bacililor acido-alcool-rezistenți a fost pozitiv în 30 (59%) de cazuri, iar cultura pe mediile convenționale a determinat prezența coloniilor micobacteriene în 26 (51%) de cazuri, inclusiv, 20 (39%) au fost sensibile și 6 (12%) – drog-rezistente. Monorezistența la izoniazidă a fost stabilită în 2 (4%) cazuri, iar polirezistența la izoniazidă și streptomycină – în 3 (6%) cazuri. Tratamentul standardizat pentru tuberculoza sensibilă a fost administrat la 33 (65%) de pacienți. Un tratament standardizat pentru tuberculoza drog-rezistentă (DOTS-Plus) – la 13 (25%) pacienți, și regim individualizat pentru tuberculoză polirezistentă – la 5 (10%). Reacții adverse de hepatotoxicitate au fost observate la 2 (4%) pacienți.

Indicatorii biochimici au fost analizați la 46 de pacienți cu tuberculoză (eșantionul de studiu) și la 36 de persoane condiționat sănătoase (eșantionul de control). Cinci cazuri au fost excluse din analiză din cauza depășirii mai mult de trei ori a erorii medii standard a rezultatelor obținute. Recoltarea materialului biologic (sânge) a fost realizat pe durata fazei intensive, în condiții de spitalizare, în subdiviziunile clinice ale SCMF, pe fond de tratament administrat conform spectrului de sensibilitate medicamentoasă a micobacteriilor izolate.

Evaluând concentrația serică a AOPP, s-au obținut valori semnificativ mai mari în eșantionul pacienților cu tuberculoză față de eșantionul de control. La pacienții bolnavi de tuberculoză, concentrația proteinei C reactive a fost de peste 30 de ori mai mare ( $16,99 \pm 18,57$  mg/dl) decât valorile de referință pentru persoanele sănătoase ( $\leq 0,5$  mg/dl) [15]. Nivelul seric al AGEs *pentosidine-like* a fost ne semnificativ diminuat în eșantionul pacienților cu tuberculoză față de control. Nivelul seric al AGEs *vesperlysines-like* s-a constatat ne semnificativ crescut în eșantionul pacienților cu tuberculoză, comparativ cu eșantionul de control (Tabelul 3).

Activitatea anti-oxidantă totală a serului, evaluată prin me-

Detected by passive way were 28 (55%) patients through the examination of the symptomatic cases, 7 (14%) – through the examination of the high risk groups, but 16 (31%) were detected through the direct addressing to the specialized medical institutions. The majority of patients were diagnosed with pulmonary infiltrative tuberculosis 49 (96%), and 2 (4%) – with disseminated tuberculosis. At the radiological examination was identified lung destruction at patients from the entire study group. Microscopic examination of the smear for acid alcohol-resistant-bacilli was positive at 30 (59%) cases, but the culture on the conventional mediums, determined the presence of the mycobacteria colonies at 26 (51%) cases, including 20 (39%) were sensible and 6 (12%) drug resistant types. Mono resistance to isoniazid was established in 2 (4%) cases, but the poly resistance to isoniazid and streptomycin in 3 (6%) cases. Standardized treatment for sensible tuberculosis was administrated to 33 (65%) patients, standardized treatment for drug resistant tuberculosis (DOTS-Plus) at 13 (25%) patients and individualised regimen for poly resistant tuberculosis at 5 (10%). Hepatotoxicity, as side effect was established in 2 (4%) patients.

Biochemical indices were analysed at 46 patients with tuberculosis (study group), 5 cases being excluded due to of the overpassing more than three times the standard error and at 36 conditioned healthy persons (control group). The collection (harvesting) of the biological material was performed during the intensive phase of the treatment performed in the clinical subdivisions of the hospital (SCMF) according to the drug susceptibility test of the isolated mycobacteria.

When assessing the OS markers through the serum concentration of the AOPP it was established a statistical higher concentration in the group of patients with tuberculosis compared with the control group. The serum concentration of the protein C reactive was 30 times higher ( $16.99 \pm 18.57$  mg/dl) compared with the references values of the healthy individuals ( $\leq 0.5$  mg/dl) [15]. The serum concentration of the pentosidine-like AGEs was not significantly lower in the group of patients with tuberculosis compared with the control group. The serum concentration of the vesperlysines-like AGEs demonstrated a nonsignificant increasing in the group of the patients with tuberculosis compared with the control group (Table 3).

The total antioxidant activity of the serum assessed

**Tabelul 3.** Unii parametri ai stresului oxidativ.

**Table 3.** Some parameters of the oxidative stress.

Sistemul peroxidativ <i>Peroxidative system</i>	Parametru <i>Parameter</i>	ES / SG n=46	EC / CG n=36	p
Peroxidarea proteică <i>Proteic peroxidation</i>	AOPP, $\mu\text{mol/l}$	$44,06 \pm 2,86$ (128%)	$34,349 \pm 3,58$ (100%)	0,032
Peroxidarea carbohidrată <i>Carbohydrate peroxidation</i>	<i>Pentosidine-like AGEs</i> , $\mu\text{mol/l}$	$174,3 \pm 15,41$ (84%)	$208,5 \pm 16,27$ (100%)	0,13
	<i>Vesperlysines-like AGEs</i> , $\mu\text{mol/l}$	$382,2 \pm 25,42$ (111%)	$343,2 \pm 49,63$ (100%)	0,45

**Notă:** AOPP – produși proteici de oxidare avansată; AGEs – produși finali de glicare avansată. Datele sunt prezentate drept medie și eroare standard.

**Note:** AOPP – advanced oxidation protein products; AGEs – advanced glycated end-products. Data are presented as mean and standard error.

todele ABTS și CUPRAC a fost semnificativ mai intensă în eșantionul pacienților cu tuberculoză, comparativ cu eșantionul de control. Concentrația ceruloplasminei, proteină a fazei acute cu rol antioxidant, a fost semnificativ mai mare în eșantionul pacienților cu tuberculoză, comparativ cu eșantionul de control. Concentrația proteinelor serice totale (albumina, globulina  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) cu rol antioxidant a fost semnificativ mai mare în eșantionul pacienților cu tuberculoză față de eșantionul de control (Tabelul 4).

Activitatea serică a GST a fost semnificativ mai redusă în eșantionul pacienților cu tuberculoză față de eșantionul de control. Activitatea  $\gamma$ -GPT a fost mărită veridic în eșantionul

through the ABTS and CUPRAC methods was significantly more increased in the group of patients with tuberculosis in comparison with the control group. The concentration of the ceruloplasmine, known as a protein of the acute phase with antioxidant role was significantly higher in the group of patients with tuberculosis in comparison with the control group. The concentration of the total serum proteins (albumin,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  globulins), which include and those with an antioxidant role were established in a higher concentration in the group of patients with tuberculosis compared with the control group (Table 4).

The serum level of the GST was significantly lower in the

**Tabelul 4.** Unii indicatori ai activității antioxidante.  
**Table 4.** Some parameters of the antioxidative activity.

Rezervele antioxidante / <i>Antioxidant defense</i>	ES / SG	EC / CG	p
	n=46	n=36	
Activitatea antioxidantă totală / <i>Total antioxidant activity</i>			
▪ metoda ABTS / <i>ABTS method, mmol/l</i>	0,77±0,005 (110%)	0,71±0,004 (100%)	<0,0001
▪ Metoda CUPRAC / <i>CUPRAC method, mmol/l</i>	1,09±0,18 (210%)	0,517±0,04 (100%)	0,008
Proteine antioxidante / <i>Antioxidant proteins</i>			
▪ Ceruloplasmina / <i>Ceruloplasmine, mg/l</i>	887,2±36,48 (123%)	724,3±27,8 (100%)	0,0008
▪ Proteina serică totală / <i>Total serum protein, g/l</i>	59,4±3,61 (114%)	57,1±2,3 (100%)	0,001

**Notă:** Datele sunt prezentate drept medie și eroare standard.

**Note:** Data are presented as mean and standard error.

pacienților cu tuberculoză față de control. Nivelul seric al AST a fost semnificativ mai înalt în eșantionul pacienților cu tuberculoză față de cel de control. Similar, nivelul seric al ALT s-a constatat a fi mai înalt în grupul pacienților cu tuberculoză față de control, însă gradul semnificației a fost mai mic, comparativ cu nivelul creșterii AST (Tabelul 5).

group of patients with tuberculosis compared with the control group. The activity of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GPT) was significantly increased in the tuberculosis group in comparison with the control group. The serum level of the AST was significantly higher in the group of patients with tuberculosis towards the control group. As well as the serum level of the ALT was established significantly higher in the tuberculosis group

**Tabelul 5.** Unii indici ai enzimelor glutationului și a clasei transaminazelor.

**Table 5.** Some indices of the glutathion-related enzymes and transaminase classe.

Sistemul enzimatic / <i>Enzymatic system</i>	ES / SG	EC / CG	p
	n=46	n=36	
Enzimele glutationului / <i>Glutathion-related enzymes</i>			
▪ Glutathion-S-transferaza / <i>Glutathione-S-transferase nmol/sxl</i>	16,4±7,42 (76%)	21,5±6,75 (100%)	0,0015
▪ $\gamma$ Glutamyltransferaza / <i><math>\gamma</math> Glutamyltransferase, U/l</i>	62,95±6,56 (147%)	42,7±7,02 (100%)	0,042
Transaminazele serice / <i>Serum transaminases</i>			
▪ Aspartat aminotransferază / <i>Aspartate aminotransferase, U/l</i>	41,74±7,11 (156%)	26,75±2,36 (100%)	<0,0001
▪ Alanin aminotransferază / <i>Alanine aminotransferase, U/l</i>	43,18±4,65 (139%)	30,98±3,38 (100%)	0,035

**Notă:** Datele sunt prezentate drept medie și eroare standard.

**Note:** Data are presented as mean and standard error.

## Discuții

Distribuția pacienților în funcție de sex și vârstă a determinat o predominare a sexului masculin și vârstei economic și reproductiv active (18-44 ani) în ambele eșantioane, fapt ce a permis comparabilitatea rezultatelor. Statutul economic social defavorizat, asociat cu absența asigurării medicale a fost stabilit la majoritatea pacienților cu tuberculoză. Datele sunt similare cu rezultatele studiilor autohtone [16]. Ponderea pacienților cu boli asociate a constituit o parte semnificativă, iar

compared with the control group, with a statistical threshold lower compared with the level of the AST (Table 5).

## Discussion

Distributing of the patients according to the sex and age determined the predomination of the men and economic reproductive age (18-44 years) in both groups, which allowed the comparability of the results. The social, economic disad-



prezența pacienților cu diabet, boli psihice și alcoolism cronic demonstrează că aceste persoane fac parte din grupurile cu risc, stabilite în ghidurile internaționale [17]. Persoanele cu risc epidemiologic precum cele provenite din focare infecțioase, migranții și ex-deținuții au constituit o parte mică din eșantion, similar cu datele studiilor naționale [18]. Depistați și diagnosticați prin cel puțin una din metodele microbiologice a exclus posibilitatea selectării pacienților cu diagnostic eronat de tuberculoză. Diagnosticul de tuberculoză pulmonară infiltrativă și a distrucțiilor parenchimotoase, într-o proporție înaltă, a demonstrat similitudinea eșantionului selectat cu cohorțele naționale [18].

Evaluând markerii circulanți ai SO prin concentrația serică a produșilor proteici de oxidare avansată, a fost demonstrat un nivel semnificativ mai mare în grupul pacienților cu tuberculoză, comparativ cu grupul control. În literatura de specialitate nu au fost identificate studii comparabile privind concentrația AOPP la pacienții cu tuberculoză. Concentrația serică a produșilor finali de glicare avansată *pentosidine-like* a fost ne semnificativ mai mică în serul pacienților cu tuberculoză, fapt ce demonstrează o stare de inaniție a organismului și exacerbarea catabolismului. Concentrația serică a produșilor finali de glicare avansată *vesperlysine-like* a fost ne semnificativ mai înaltă în eșantionul pacienților cu tuberculoză, însă gradul creșterii a fost mult mai mic decât la pacienții comorbizi cu diabet zaharat, asociat tuberculozei, raportați în studiile internaționale [19].

Markerii sistemului antioxidant al serului – activitatea totală antioxidantă, concentrația proteinelor serice cu rol antioxidant au suferit modificări pronunțate în grupul pacienților cu tuberculoză. Rezultatele similare din literatura de specialitate au demonstrat hiperactivitatea mecanismelor defensive împotriva exotoxinelor micobacteriene, cât și intensificarea procesului de detoxifiere a medicației antituberculoase [20].

Activitatea enzimei glutathion-S-transferazei (GST) a fost diminuată semnificativ în eșantionul pacienților cu tuberculoză. Datele din literatura de specialitate corelează cu modificările epigenetice cu nivelul redus al exprimării genei GST, în special, a izoformelor asociate cu hepatotoxicitatea medicamentelor anti-tuberculoase [21, 22, 23, 24]. În consecință, nivelul activității  $\gamma$ -glutamyltransferazei și transaminazelor hepatice au fost semnificativ crescute în serul pacienților cu tuberculoză, investigați pe durata tratamentului antituberculos.

### Concluzii

- 1) În tuberculoză s-a constatat creșterea concentrației markerilor peroxidării proteice și glucidice din cauza intensificării stresului oxidativ.
- 2) Activitatea antioxidantă serică totală crescută și concentrația mărită a proteinelor cu rol antioxidant demonstrează activarea compensatorie a sistemului antioxidant față de agresiunea stresului oxidativ.
- 3) Activitatea redusă a glutathion-S-transferazei serice a condiționat hepatotoxicitatea regimului terapeutic anti-tuberculos, apreciat prin creșterea activității enzimelor  $\gamma$ -glutamyltransferazei și a transaminazelor hepatice.
- 4) Studiul factorilor genetici care condiționează polimorfis-

vantaged state, associated with the absence of the medical insurance was established in the majority patients with tuberculosis. Data are similar to the results of other studies [16]. The rate of patients with associated diseases constituted a significant part, but the presence of the patients with diabetes, psychiatric diseases and chronic alcoholism demonstrated that those persons are part of the risk groups established in the national clinical protocol [17]. The persons with epidemiological risk, as those form infectious clusters, migrants and ex-detainees constituted a little part of the group, similar with data of the national studies [18].

Detected and diagnosed through at least one microbiological method excluded the possibility to select patients with diagnosis of tuberculosis subsequently denied. The diagnosis of the pulmonary infiltrative tuberculosis and lung destruction in a high proportion demonstrated the similarity of the selected group with the national cohorts [18].

Estimation of the level of the OS circulating markers through the serum concentration of the advanced oxidation protein products and products of the protein catabolism demonstrated the presence of a significantly higher level of the protein peroxidation in the group of patients with tuberculosis. In the speciality literature, comparable studies on AOPP concentration in patients with tuberculosis have not been identified. The serum concentration of the *pentosidine-like* advanced glycation end-products determined an insignificant lower in patients with tuberculosis, which demonstrates a state of organism's starvation, but can be explained also by the exacerbation of catabolic processes. The serum level of vesperlysines-like advanced glycation end-products was insignificantly higher in the group of tuberculosis patients, but the degree of increase was much lower than in comorbid diabetic patients associated with tuberculosis reported in the international studies [19].

The markers of the serum antioxidant system – total antioxidant activity, the concentration of the serum proteins with an antioxidant role underwent marked changes in the group of tuberculosis patients. The similar results from the speciality literature demonstrated the hyperactivity of the defensive mechanisms against mycobacterial exotoxins as well as by the intensification of the detoxification metabolic process of the antituberculosis medication [20].

The activity of the glutathione S-transferase enzyme (GST) was significantly diminished in the group of patients with tuberculosis. Speciality literature data correlated the epigenetic disturbances with the low level of the GST gene expression, especially of the isoforms associated with the hepatotoxicity of the anti-tuberculosis drugs [21, 22, 23, 24]. In consequence, the level of the hepatic transaminases and  $\gamma$ -glutamyltransferase at patients with tuberculosis was significantly increased in the serum of the patients with tuberculosis investigated during the antituberculosis treatment.

### Conclusions

- 1) In patients with tuberculosis was established the increased level of the protein and carbohydrates peroxidation, due to the intensification of the oxidative stress.
- 2) The increased total serum antioxidant activity and the proteins with the antioxidant role demonstrates the hy-

mul glutation-S-transferazei devine importantă pentru promovarea terapiei individualizate și reducerea riscului efectelor adverse la regimul terapeutic antituberculos.

### Declarația conflictului de interese

Nimic de declarat.

### Contribuția autorilor

EL a elaborat protocolul de cercetare, colectarea datelor, prelucrarea statistică, scrierea manuscrisului. VP a realizat investigațiile de laborator. VS a participat la scrierea manuscrisului. SG a participat la scrierea manuscrisului. VG a participat la realizarea investigațiilor de laborator, colectarea datelor, prelucrarea statistică, scrierea manuscrisului.

peractivity of the antioxidant system as a compensatory measure against the oxidative stress aggression.

- 3) The low activity of the glutathione S-transferase determined the hepatotoxicity of applied anti-tuberculosis regimen, appreciated through the increasing of the  $\gamma$ -glutamyltransferase and hepatic transaminases.
- 4) The genetic study of the factors influencing the polymorphism of the glutathione S-transferase is important for the establishment of an individualized therapy and reducing the adverse drug reactions of the anti-tuberculosis therapeutic regimen.

### Declaration of conflicting interests

Nothing to declare.

### Authors' contribution

EL has developed the research, data collection, statistical processing and manuscript writing. VP performed laboratory testing. VS participated to the manuscript writing. SG participated to the manuscript writing. VG participated to the laboratory testing, data collection, statistical analysis, manuscript writing.

### Referințe / references

1. Abbas A., Lichtman A., Pillai S. Basic immunology. Functions and disorders of the immune system. Elsevier, 2015; 352 p.
2. Birben E., Sahiner U., Sackesen C. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.*, 2012; 5 (1): 9-19.
3. Witko-Sarsat V., Friedlander M., Capeillère-Blandin C. *et al.* Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.*, 1996; 49 (5): 1304-1313.
4. Makita Z., Vlassara H., Cerami A., Bucala R. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267 (8): 5133-5138.
5. Van Zoelen M., Wieland C., van der Windt G. *et al.* Receptor for advanced glycation end products is protective during murine tuberculosis. *Molecular Immunology*, 2012; 52 (3-4): 183-189.
6. Salazar J., Martinez M., Chavez-Castillo M. *et al.* C-reactive protein: an in-depth look into structure, function and regulation. *Int. Sch. Res. Notices*, 2014; 653045. <http://dx.doi.org/10.1155/214/653045>.
7. Apak R., Güçlü K., Özyürek M. *et al.* Total antioxidant capacity assay of human serum using copper (II)-neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method. *Free Radical Res.*, 2005; 39 (9): 949-961.
8. Andronache L. Protocoale standardizate de cercetare a metabolismului glutationic. Chișinău, 2014.
9. Gudumac V., Rîvneac V., Tagadiuc O. *et al.* Metode de cercetare a metabolismului hepatic. Elaborare metodică USMF „Nicolae Testemițanu”. Tipografia „Tehnica-Info”. Chișinău, 2012; 162 p.
10. Gudumac V., Tagadiuc O., Rîvneac V. *et al.* Investigații biochimice. Elaborare metodică. Micrometode, Vol. II. Tipografia Elena V. SRL. Chișinău, 2010; 104 p.
11. Kehinde A., Adaramoye O. Biochemical changes in blood and tissues of rats following administration of anti-tuberculosis drugs. *African J. Biochemistry*, 2015; 9 (4): 67-72.
12. World Health Organisation. Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care. Geneva, 2017.
13. World Health Organisation. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Geneva, 2014.
14. Séro L., Sanguinet L., Blanchard P. *et al.* Tuning a 96-Well Microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts. *Molecules*, 2013; 18: 14320-14339.
15. Pepys M., Baltz M. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A proteins. *Adv. Immunol.*, 1983; 34: 141-212.
16. Lesnic E., Ustian A., Niguleanu A., Malic A., Paladi C. Social features of patients with pulmonary tuberculosis. *Туберкулез, легеневи хвороби, ВІЛ-інфекція*, 2016; 25 (2): 36-40.
17. Lesnic E., Niguleanu A., Curocichin Gh. Segregation of tuberculosis patients by social, demographic and economic features on the model of Chisinau city and the role of the community support. *Curierul Medical*, 2016; 59 (4): 11-17.
18. World Health Organisation. Systematic screening for active tuberculosis. Principles and recommendation. Geneva, 2011.
19. Nowortny K., Jung T., Hohn A. *et al.* Advanced glycation end-products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules*, 2015; 5 (1): 184-222.
20. Wild I., Seaman T., Hoal E. *et al.* Total antioxidant levels are low during active TB and rise with anti-tuberculosis therapy. *Int. Union for Biochemistry and Molecular Biology*, 2004; 56 (2): 101-6.
21. Habig W., Pabst M., Jakoby W. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 1974; 249 (22): 7130-7139.
22. Todoriko L., Semianiv I., Lesnic E. Analysis of the GSTT-1 gene polymorphism in patients with tuberculosis with regard to the version of *Mycobacterium tuberculosis* resistance. *Буковинський медичний вісник [Bucovina medical courier]*, 2016; 78 (2): 169-172.
23. Liu F., Jiao A., Wu X. Impact of glutathione S-transferase on anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in Chinese pediatric patients. *Plos One*, 2014; 9 (12): e115410.
24. Perry W., Jenkins M. Plasma gamma glutamyltransferase levels during rifampicine therapy for tuberculosis. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, 1987; 25 (1): 7-9.