

*Anna Zabost, Zofia Zwolska, Ewa Augustynowicz-Kopec

Genotyp i fenotyp acetylacji u chorych na gruźlicę¹⁾

Genotype and phenotype of acetylation in tuberculosis patients

Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy Chorób Płuc w Warszawie
Kierownik Zakładu: prof. nadzw. dr hab. Ewa Augustynowicz-Kopec

Streszczenie

Isoniazyd (INH) jest jednym z głównych leków przeciwprątkowych. W wątrobie człowieka ulega procesowi acetylacji przy udziale enzymu N-acetylotransferazy. Szybkość acetylacji jest cechą zdeterminowaną genetycznie i jest ona stała u każdego człowieka, ale różna u różnych chorych. Ze względu na szybkość przebiegu reakcji acetylacji w populacji ludzkiej wyróżnia się dwie fenotypowe grupy: szybkich i wolnych acetylatorów. Enzym kodowany przez NAT2 wykazuje polimorfizm, który jest wynikiem punktowych mutacji. Aktywność N-acetylotransferazy 2 jest uwarunkowana kombinacjami 53 różnych alleli, zawierających od jednej do czterech zmian w sekwencji nukleotydowej.

Cel pracy. Celem było zbadanie związku pomiędzy genotypem NAT2 a fenotypem acetylacji izoniazylu.

Materiał i metody. Próbkę krwi zostały pobrane od 64 pacjentów przed (czas 0) podaniem leku oraz 1, 3, 6 godzin po podaniu leku. Stężenia INH określano przy użyciu metody chromatograficznej. Genomowe DNA izolowano przy użyciu kitu Blood DNA Kit firmy Qiagen i poddano reakcji amplifikacji ze starterami: NAT1 i NAT2. Uzyskane produkty reakcji poddano działaniu restryktaz (Kpn1, Dde1, Tag1, BamH1). Obecność dwóch zmutowanych alleli określała wolny typ acetylacji, natomiast szybki acetylator posiadał jeden lub dwa allele dzięki NAT2*4.

Wyniki. W badanej grupie chorych na gruźlicę zidentyfikowano 30 szybkich i 34 wolnych acetylatorów. Średnie stężenie izoniazylu w surowicy u 30 szybkich acetylatorów wynosiło w 3 h 1,4 µg/ml, natomiast u 34 wolnych acetylatorów 4,91 µg/ml. Stężenia INH obserwowane u szybkich acetylatorów były znacznie niższe niż u osób z wolnym typem acetylacji ($p < 0,01$). W badanej grupie chorych zidentyfikowano 9 różnych genotypów N-acetylotransferazy 2. Wśród chorych z szybkim typem acetylacji dominował genotyp NAT2*4/5, u wolnych acetylatorów NAT2*5/6.

Wnioski. Oznaczanie mutacji w genie NAT2 umożliwia szybką identyfikację typu acetylacji INH i jest zgodne z typem acetylacji określonym na podstawie kryteriów stosowanych w określaniu biodostępności leku.

Słowa kluczowe: N-acetylotransferaza, izoniazyd, polimorfizm genetyczny

Summary

Isoniazid (INH), an important agent in the treatment of tuberculosis. The major pathway for INH metabolism is acetylation by a non-inducible hepatic and intestinal enzyme, N-acetyltransferase (NAT). The rate of acetylation is genetically determined and is constant in any individual but varies in different patients. According to speed of acetylation human population are divided on two different phenotypic groups: slow and fast acetylators. N-acetyltransferase 2 (NAT2) exhibits polymorphisms, which are the result of point mutations. There are 53 known alleles, and each allelic variant is a combination of one, two, three, or four nucleotide substitutions.

Aim of study. The aim was to investigate the relationship between the NAT2 genotype and acetylator phenotype of INH.

Material and methods. Blood samples were taken from 64 patients before (time 0) and 1, 3, 6 hrs after drug administration. Plasma concentrations of INH were determined with chromatography method. Genomic DNA was extracted by Blood DNA kit and amplified by PCR with two primers: NAT1 and NAT2. After amplification, the PCR product was cut separately with 4 different restriction enzymes: Kpn1, Dde1, Tag1, and BamH1. The presence of any 2 mutant alleles defines the slow acetylator genotype, whereas the rapid acetylators have 1 or 2 wild-type NAT2*4 alleles.

Results. In the group of tuberculosis patients were 30 fast acetylators and 34 patients with slow type of acetylation. INH mean plasma concentration of 30 fast acetylators in 3 h were 1,4 µg/ml, whereas of 34 slow acetylator 4,91 µg/ml. For all treated patients concentrations of INH observed in the fast acetylators were considerably lower than those found in the slow acetylators ($p < 0.01$). In the tested group were 9 different NAT2 genotypes. Among patients with fast type of acetylation predominated genotype NAT2*4/5; in group of slow acetylators NAT2*5/6.

Conclusions. Determination of mutation in NAT2 gene enabled identification of type of INH acetylation and was consistent with type determined on base of criteria used in defining bioavailability of the drug.

Key words: N-acetyltransferase, isoniazid, genetic polymorphism

¹⁾ Praca finansowana ze środków przeznaczonych na działalność statutową Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w ramach planu naukowego – temat nr 1 zadania badawczego nr 3.

WSTĘP

W hierarchii leków przeciwgruźliczych izoniazyd (INH) obok ryfampicyny (RMP) zajmuje najważniejszą pozycję. Szerokie spektrum działania, dobra biologiczna dostępność, umiarkowane działania niepożądane, przenikanie do komórek żernych i niski koszt sprawiają, że izoniazyd stanowi nieomal idealny lek przeciwprątkowy. **Wadą leku jest stosunkowo duża częstość spontanicznie rozwijającej się oporności u prątków 10^5 - 10^7 co wyklucza jego stosowanie w monoterapii (1).**

Skuteczność i bezpieczeństwo stosowania INH w gruźlicy mogą być zakłócone (jak wykazują badania *in vitro*) łatwym nabywaniem oporności przez prątki pod wpływem kontaktu z lekiem, w tym szczególnie z dawkami suboptymalnymi.

Zjawisko acetytacji INH było znane od dawna i intensywnie badane już w pierwszych latach stosowania leku w leczeniu gruźlicy zarówno w aspekcie praktycznym, jak i poznawczym. Badania przeprowadzone w latach 60. przez Evans'a nad acetytacją izoniazylu wykazały bimodalny rozkład populacji jak również to, że szybkość acetytacji izoniazylu jest cechą dziedziczną (2).

Z organizmu człowieka izoniazyl eliminowany jest w postaci zmetabolizowanej, a szybkość tego procesu zależy od aktywności enzymu N-acetylotransferazy (NAT) wyizolowanej po raz pierwszy przez Johna Jenne w 1956 roku (3). N-acetylotransferazy katalizują przeniesienie grupy acetylowej z acetylokoenzymu A do terminalnej grupy aminowej aryloamin, arylohydrazyn i niektórych amin heterocyklicznych. Reakcji acetytacji podlegają leki, jak również znane środowiskowe kancerogeny.

U ludzi reakcje acetytacji katalizowane są przez dwie cytoplazmatyczne N-acetylotransferazy, typu 1 i typu 2, kodowane odpowiednio przez gen NAT1 i NAT2 (4). Geny kodujące oba enzymy zostały po raz pierwszy wyizolowane w 1989 roku przez Grant'a (5).

Badania molekularne wykazały, że produkty genów NAT1 i NAT2 posiadają katalityczną specyficzność do substratów. Obserwowane różnice w tempie metabolizowania substancji zależnych od N-acetylotransferazy 2 (NAT2) zostały powiązane z obecnością polimorfizmu genetycznego. Pierwsze badania przeprowadzone przez Deguchi'ego w 1990 roku zidentyfikowały w obrębie genu trzy mutacje C481T (allel NAT2*5), G590A (allel NAT2*6) i G857A (allel NAT2*7), odpowiedzialne za wolny typ acetytacji (6).

Do chwili obecnej zidentyfikowano 53 allele, które zostały zarejestrowane na stronie internetowej (<http://louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.HTML>). Każdy z wariantu allelu genu NAT2 zawiera od jednej do czterech substytucji nukleotydowych, występujących w pozycjach 111, 190, 191, 282, 341, 364, 411, 434, 481, 499, 590, 759, 803, 845, 857 i 859 (7, 8).

W zależności od szybkości acetytacji INH wyróżnia się w populacji ludzkiej dwie fenotypowo odmienne grupy, szybkich i wolnych acetylatorów; osiągających

po jednakowej dawce różne stężenia leku w surowicy i różną kinetykę wchłaniania i wydalania leku (9). Ludzie określeni fenotypowo jako szybki acetylatorzy mają jeden lub dwa allele genu NAT2 kodujące enzym o wysokiej aktywności. Dominujący allel NAT2*4 warunkuje pełną aktywność enzymu. Wolni acetylatorzy mają dwa allele kodujące białko o obniżonej aktywności (1).

CEL PRACY

Celem pracy było zbadanie korelacji pomiędzy określeniem typu acetytacji metodą fenotypową i genotypową.

MATERIAŁ I METODY

Badania zostały przeprowadzone u 64 pacjentów leczonych na gruźlicę w Mazowieckim Centrum Leczenia Chorób Płuc i Gruźlicy. Krew do oznaczenia biodostępności izoniazylu została pobrana przed (czas 0) podaniem leku oraz 1, 3 i 6 godzin po podaniu leku. Jednocześnie pobierano krew do badania polimorfizmu N-acetylotransferazy 2 metodą genetyczną.

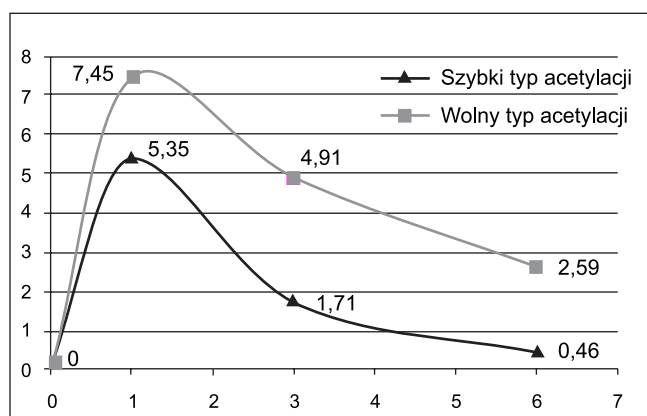
Oznaczenie biodostępności INH wykonywano metodą chromatograficzną (HPLC) według Seifart i wsp. z modyfikacją własną (1). Do określenia fenotypu acetytacji zastosowano dwa kryteria; indeks inaktywacji I_3 (wartość graniczna 0,65) i stężenie resztkowe INH w surowicy po 6 godzinach C_6 (wartość graniczna $0,8 \mu\text{g/ml}$) (9).

W celu zbadania polimorfizmu genu N-acetylotransferazy 2 izolowano genomowe DNA przy użyciu kitu Blood DNA Kit firmy Qiagen. Wyizolowane DNA poddano reakcji amplifikacji ze specyficznymi starterami według metody Spurr i wsp. z modyfikacją własną (1). Produkty reakcji poddawano działaniu 4 enzymów restrykcyjnych BamH1, Dde1, Kpn1 i Tag1 w celu wykrycia zmutowanych alleli genu NAT2. Rozdział uzyskanych produktów trawienia przeprowadzono na 2% żelu agarozowym, otrzymane prążki wizualizowano bromkiem etydydny i poddano analizie w programie LabWork v. 4.5.

WYNIKI

W badanej grupie 64 chorych na gruźlicę **zidentyfikowano 30 (47%) szybkich acetylatorów i 34 (53%) osoby wolno acetylujące.** Szybki acetylatorzy najwyższe stężenie leku osiągnęli w pierwszej godzinie od podania leku – średnio $5,35 \mu\text{g/ml}$ (zakres $0,8$ - $9,2 \mu\text{g/ml}$). Po 3 godzinach średnie stężenie izoniazylu wynosiło $1,71 \mu\text{g/ml}$, a po 6 godzinach wartości stężenia leku wynosiły w granicach 0 - $0,8 \mu\text{g/ml}$. W grupie wolnych acetylatorów maksymalne stężenia INH w surowicy stwierdzono również jedną godzinę od podania leku – $7,45 \mu\text{g/ml}$ (zakres: $1,8$ - $11,4 \mu\text{g/ml}$). Po 3 godzinach po podaniu leku wynosiło ono $4,91 \mu\text{g/ml}$, a po 6 godzinach było w zakresie $1,2$ - $4,3 \mu\text{g/ml}$. Stężenia INH obserwowane u szybkich acetylatorów były znacznie niższe niż u osób z wolnym typem acetytacji (ryc. 1).

W badanej grupie 64 chorych **zidentyfikowano 9 różnych genotypów N-acetylotransferazy 2.**



Ryc. 1. Średnie stężenia izoniazydu w surowicy u szybkich i wolnych acetylatorów.

Pięciu (7,8%) z 64 badanych miało dwa allele wysokiej aktywności, 25 (39,1%) miał jeden allel wysokiej aktywności, natomiast u 34 pacjentów (53,1%) zidentyfikowano mutacje w obu allelach N-acetylotransferazy 2. Trzydziestu pacjentów (46,9%) z genotypami NAT2 *4/4, *4/5, *4/6 i *4/7 zostało sklasyfikowanych jako szybki acetylatorzy, a 34 pacjentów (53,1%) z genotypami NAT2 *5/5, *5/6, *6/6, *6/7 *7/7 zostało zaliczonych do wolnego typu acetytacji (tab. 1).

Tabela 1. Częstość występowania genotypów NAT2 w badanej grupie chorych.

Genotyp	Liczba	%	Fenotyp acetytacji
NAT2*4/*4	5	7,8	Szybki
NAT2*4/*5	15	23,4	
NAT2*4/*6	9	14,1	
NAT2*4/*7	1	1,6	
NAT2*5/*5	6	9,4	Wolny
NAT2*5/*6	16	25,0	
NAT2*6/*6	7	10,8	
NAT2*6/*7	4	6,3	
NAT2*7/*7	1	1,6	

Porównując otrzymane wyniki typowania genetycznego z wynikami uzyskanymi w metodzie chromatograficznej stwierdzono wysoki stopień zgodności w wyznaczaniu typu acetytacji obiema metodami.

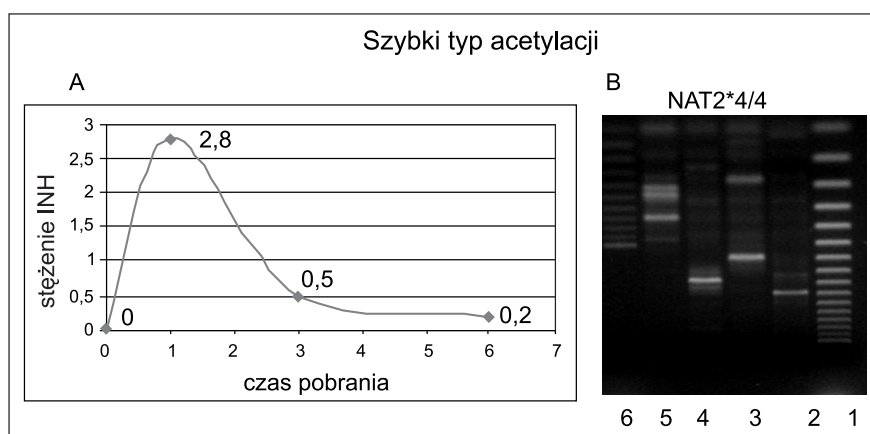
W badaniach molekularnych u chorego szybko acetylującego w genie NAT2 nie stwierdzono obecności mutacji. U badanej osoby stwierdzono genotyp NAT2*4/4 (ryc. 2B) reprezentujący szybki typ acetytacji. Wynik genotypowania potwierdziły wyniki uzyskane metodą HPLC. Wyliczone ze stężeń wskaźniki biodostępności wynosiły $I_3 = 0,3$; $C_6 = 0,2 \mu\text{g/ml}$; określając szybki typ acetytacji INH. Na rycinie 2A przedstawiono przebieg stężeń leku w $\mu\text{g/ml}$ w surowicy.

W badaniu polimorfizmu genu N-acetylotransferazy 2 u chorego z wolnym typem acetytacji stwierdzono obecność dwóch zmutowanych alleli genu NAT2 (mutacja w pozycji 857 (ryc. 3B)). Genotyp NAT2*7/7 klasyfikuje chorego do wolnego typu acetytacji. Wynik genotypowania był zgodny z wynikiem uzyskanym w metodzie chromatograficznej. Na podstawie parametrów biodostępności $I_3 = 1,7$ i $C_6 = 4,3 \mu\text{g/ml}$ wyznaczono u badanego wolny typ acetytacji (ryc. 3A).

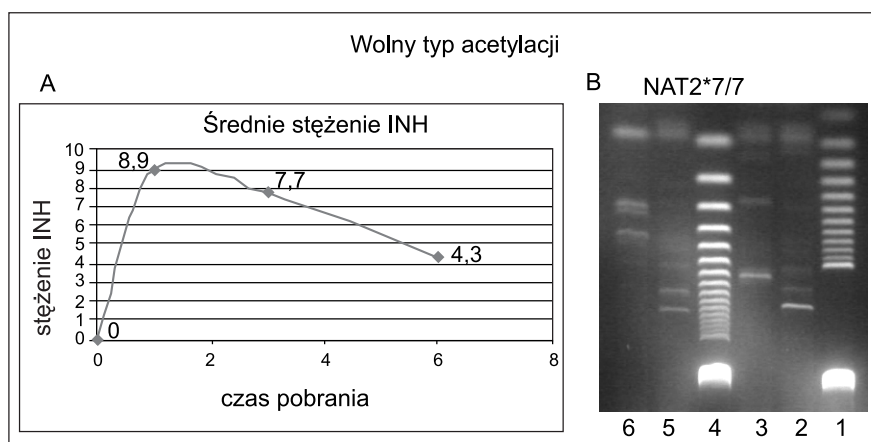
DYSKUSJA

Schorzenia, niedożywienie, rodzaj diety, ekspresja genów, aktywność enzymów oraz przewlekłe stosowanie leków należą do czynników mających wpływ na farmakokinetykę leków (10). Następstwem zaburzeń w metabolizowaniu leków mogą być znaczące różnice osobnicze wartości stężeń w surowicy, mimo podania jednakowej dawki leku. Powoduje to, że u niektórych chorych ta sama dawka leku jest niewystarczająca do osiągnięcia stężenia terapeutycznego, natomiast u innych powoduje występowanie niebezpiecznych objawów niepożądanych. W przewlekłych chorobach wątroby, jak również przy zatruciach alkoholem, dochodzi do osłabienia czynności detoksykacyjnych wątroby i tym samym do wydłużenia czasu metabolizowania leku (11, 12).

Izoniazyd jest jednym z leków, który przyczynia się do występowania działań niepożądanych.



Ryc. 2. Porównanie oznaczania typu acetytacji metodą chromatograficzną i genetyczną u chorego z szybkim typem acetytacji. A – średnie stężenia izoniazydu w $\mu\text{g/ml}$ w surowicy chorego w przedziale czasowym od 0 do 6 godzin od podania leku. B – Ścieżka 1 – wzorzec 50pz, ścieżka 2 – produkty trawienia enzymem BamH1, ścieżka 3 – produkty trawienia enzymem Dde1, ścieżka 4 – produkty trawienia enzymem Kpn1, ścieżka 5 – produkty trawienia enzymem Tag1, ścieżka 6 – wzorzec 25pz.



Ryc. 3. Porównanie oznaczania typu acetytacji metodą chromatograficzną i genetyczną dla chorego z wolnym typem acetytacji. A – średnie stężenia izoniazydu w $\mu\text{g/ml}$ w surowicy chorego w przedziale czasowym od 0 do 6 godzin od podania leku. B – Ścieżka 1 – wzorzec 25pz, ścieżka 2 – produkty trawienia enzymem BamH1, ścieżka 3 – produkty trawienia enzymem Dde1, ścieżka 4 – wzorzec 50pz, ścieżka 5 – produkty trawienia enzymem Kpn1, ścieżka 6 – produkty trawienia enzymem Tag1.

Jedną z przyczyn tego zjawiska jest biotransformacja przy udziale N-acetylotransferazy do hepatotoksycznych produktów. Różnice w dynamice metabolizowania INH u wolnych i szybkich acetylatorów determinują stężenie leku i jego metabolitów. Długotrwałe przyjmowanie leków przeciwprątkowych może powodować ostre lub chroniczne zapalenie wątroby (13). Najcięższe postaci ostrego zapalenia wątroby w czasie przyjmowania izoniazydu wiążą się z nadmiarem hydrazyny, która powstaje przy udziale amidazy.

U szybkich acetylatorów wyniki leczenia izoniazydem są mniej zadowalające, rzadziej występują remisje, częściej nawroty choroby i oporność na lek. Biodostępność leku mierzona C_{max} i $AUC_{0-24\text{h}}$ jest dużo mniejsza niż u wolnych acetylatorów, a przeciwpątkowe stężenie INH utrzymuje się krótko. U wolnych acetylatorów znacznie częściej występują objawy niepożądane związane z kumulacją i toksycznym działaniem leku. A zatem powinni być oni poddani obserwacji, aby uniknąć wystąpienia niepożądanych objawów ubocznych (14).

Zastosowanie metod biologii molekularnej umożliwia dokładne określenie typu acetytacji. Ekspresja N-acetylotransferazy 2 jest uwarunkowana kombinacjami 53 różnych alleli występujących z różną częstością. Dominujący allel NAT2*4 warunkuje pełną aktywność enzymu i fenotyp szybkiej acetytacji, pozostałe allele odpowiedzialne są za fenotyp wolnej acetytacji (15). W populacji kaukaskiej najczęściej występujące allele to NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7, w tej populacji wolni acetylatorzy stanowią około 50%. Różnorodność alleli genu NAT2 skutkuje międzyosobniczymi różnicami w farmakologicznej i toksykologicznej odpowiedzi na leki (16).

Dużą rolę w wyznaczaniu typu acetytacji odgrywa korelacja pomiędzy genotypowaniem i fenotypowaniem. Znajomość tej korelacji ma szczególne znaczenie, kiedy ze względu na stan kliniczny chorego można zastosować tylko metodę genetyczną.

W badaniach prowadzonych przez Parkina wykazano, że częstość występowania genotypu warunkującego wolny typ acetytacji wynosi 32%, pośredniego 45%, szybkiego 23%. W wykonanej analizie uzyskano 100% zgodność pomiędzy oznaczonym fenotypem acetytacji a genotypem NAT2 (17). Badania przeprowadzone przez Smitha i wsp. na grupie szwedzkich ochotników, wśród których stwierdzono metodą fenotypową 21 (30%) szybkich acetylatorów i 49 (70%) wolnych, wykazały 100% zgodność pomiędzy genotypowaniem a określaniem typu acetytacji metodą fenotypową (18). W badaniach Kita i wsp. analizowano relację pomiędzy genotypem NAT2 i fenotypem acetytacji INH u 12 zdrowych ochotników i 7 chorych na gruźlicę. Uzyskano 95% zgodność pomiędzy określonym genotypem i fenotypem (19). Cascorbi i wsp. stwierdzili, że w 93,3% przypadków, na podstawie określonego genotypu prawidłowo udało się określić fenotyp acetytacji (20).

W przeprowadzonych przez nas badaniach zgodność określania genotypu z fenotypem wynosiła 100%.

Badania dotyczące korelacji między genotypem a fenotypem wskazują, że wyniki uzyskane metodą genotypowania są wiarygodne, a zgodność genotypu z fenotypem wynosi według różnych autorów od 93 do 100%. Powodem rozbieżności pomiędzy typem acetytacji określonym na podstawie analizy mutacji w genie NAT2 i typem acetytacji metodą fenotypową są najprawdopodobniej rzadko wykrywane lub niezidentyfikowane do chwili obecnej allele NAT2 (20, 21, 22).

Wydaje się, że obecnie, gdy gruźlica pozostaje nadal poważnym zagrożeniem świata, a ponadto pojawił się problem częstego występowania szczepów wielolekoopornych, w analizie tej sytuacji nie należy zaniedbywać fenomenu acetytacji determinującego często niedostateczne stężenia INH w krwioobiegu chorych i niepożądane efekty uboczne.

WNIOSKI

1. W badanej grupie 64 osób stwierdzono niewielką przewagę wolnego typu acetytacji INH – 53% nad

szybkim – 47%.

2. Wykrycie mutacji w genie NAT2 pozwala na szybkie określenie typu acetytacji INH.

PIŚMIENNICTWO

- Zabost A: Polimorfizm w genie N-acetylotransferazy 2 jako metoda wyznaczania typu acetytacji u ludzi. Praca doktorska IGIChP Warszawa 2010.
- Evans DA, White TA: Human acetylation polymorphism. *J Lab & Clin Med* 1964; 63: 394-403
- Jenne JW: Studies of human patterns of isoniazid metabolism using an intravenous fall-off technique with a chemical method. *Am Rev Respir Dis* 1960; 81: 1-8.
- Hein DW: Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2; role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res* 2002; 506-507: 65-77.
- Grant DM, Lottspeich F, Meyer UA: Evidence for two closely related isozymes of arylamine N-acetyltransferase in human liver. *FEBS Lett* 1989; 244: 203-207.
- Deguchi T, Mashimo M, Suzuki T: Correlation between acetylator phenotypes and genotypes of polymorphic arylamine N-acetyltransferase in human liver. *J Biol Chem* 1990; 265: 12575-12760.
- Boukouvala S, Fakis G: Arylamine N-acetyltransferases: what we learn from genes and genomes. *Drug Metab Rev* 2005; 37: 511-564.
- Cascorbi I, Brockmüller J, Mrozikiewicz PM et al.: Arylamine N-acetyltransferase activity in man. *Drug Metab Rev* 1999; 31: 489-502.
- Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z: Typ acetytacji izoniazydu (INH) u chorych na gruźlicę leczonych w IGIChP w Warszawie w latach 1990-1997. Analiza wskaźników biologicznej dostępności i acetytacji INH u szybkich i wolnych acetylatorów. *Pneum i Alerg Polska* 2002; 70, 3-4, 180-192.
- Zent C, Smith P: Study of the effect of concomitant food on the bioavailability of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide. *Tuber Lung Dis* 1995; 76: 109-113.
- Skreńkiewicz J, Sękułska M, Podlaszczuk M, Polakowski P: Fenotyp acetytacji u osób uzależnionych od alkoholu w okresie abstynencji. *Probl Ter Monit* 1995; 6: 173-176.
- Chlebowska I, Beszłej JA, Grzesiak M et al.: Research of acetylation phenotype in dependent on alcohol people. *Adv Clin Exp Med* 2006; 15: 47-52.
- Huang YS, Chern HD, Su WJ et al.: Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 2002; 35: 883-889.
- Zwolska Z, Niemirowska-Mikulska H, Augustynowicz-Kopeć E: Wyniki badania u zdrowych ochotników biodostępności ryfampicyny i izoniazydu z polskiej kapsułki dwulekowej do leczenia gruźlicy Rifamazid. *Pneum Alerg Pol* 1998; 66: 198-206.
- Kinzing-Schippers M, Tomalik-Scharte D, Jetter A et al.: Should we use N-acetyltransferase type 2 genotyping to personalize isoniazid doses? *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1733-1738.
- Sim E, Payton M, Noble M, Minchin R: An update of genetic, structural and functional studies of arylamine N-acetyltransferase in eukaryotes and prokaryotes. *Hum Mol Genet* 2000; 9, 2435-2441.
- Parkin DP, Vandenplas S, Botha JH et al.: Trimodality of isoniazid elimination: phenotype and genotype in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 117-1722.
- Smith CA, Wadelius M, Gough AC et al.: A simplified assay for the arylamine N-acetyltransferase 2 polymorphism validated by phenotyping with isoniazid. *J Med Genet* 1997; 34: 758-760.
- Kita W, Tanigawara Y, Chikazawa S et al.: N-acetyltransferase 2 genotype correlated with isoniazid acetylation in Japanese tuberculous patients. *Biol Pharm Bull* 2001; 24: 544-549.
- Cascorbi J, Drakoulis N, Brockmüller J et al.: Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 581-592.
- Lin HJ, Han CY, Lin BK, Hardy S: Slow acetylator mutations in the human polymorphic N-acetyltransferase gene in 786 Asian, Blacks, Hispanics, and Whites: application to metabolic epidemiology. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 827-834.
- Okumura K, Kita T, Chikazawa S et al.: Genotyping of N-acetylation polymorphism and correlation with procainamide metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 61: 509-51.

otrzymano/received: 18.08.2011

zaakceptowano/accepted: 14.09.2011

Adres/address:

*Anna Zabost

Zakład Mikrobiologii, IGIChP

ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa

tel.: (22) 431-21-61, tel./fax: (22) 431-21-82

e-mail: a.zabost@igichp.edu.pl