

Ewa Augustynowicz-Kopeć, Zofia Zwolska, Hanna Niemirowska-Mikulska

Z Zakładu Mikrobiologii IGiChP w Warszawie,

Kierownik: Prof. dr. hab. biol. Z. Zwolska

Z Przychodni Przyklinicznej IGiChP,

Kierownik: dr. med. H. Niemirowska-Mikulska

BIODOSTĘPNOŚĆ IZONIAZYDU U ZDROWYCH OCHOTNIKÓW – SZYBKICH I WOLNYCH ACETYLATORÓW INH

BIOAVAILABILITY OF ISONIAZID IN HEALTHY VOLUNTEERS
FAST AND SLOW INH ACETYLATORS

Summary: The major pathway for INH metabolism is acetylation of acetyloisoniazid by a noninducible hepatic enzyme N-acetyltransferase. Examples of drugs acetylated by this enzymatic system are: isoniazid, sulphadimidine, hydralazine, dapson and sulphapiridine. The rate of acetylation is constant in any individual but varies in different patients. People are characterized as rapid or slow acetylators with slow acetylation inherited as an autosomal recessive type. Heterozygotes have intermediate acetylation rate. Methods for determining acetylator phenotype have been proposed by many authors, but the many of them need instrumentation such as photometers, centrifuges, chromatographs etc. For estimating of INH acetylator phenotype we have developed a sensitive and rapid biological method with *Mycobacterium aurum* REB as a standard strain. The linearity, precision and accuracy of the method have been evaluated. The minimum detectable concentration of INH was determined to be 0,5 mcg/ml. The test should be completed within 5 days. The described method for determination of INH in human plasma is sensitive and reproducible and allowed to provide pharmacokinetic studies in fast (8 healthy volunteers) and slow (12 healthy volunteers) acetylators. The results have shown that all compared parameters are significantly different in both groups of acetylators.

Key words: rapid and slow acetylators of isoniazid, INH bioavailability in healthy volunteers, method of INH determination, precision and accuracy of the method.

PNEUMONOL. ALERGOL. POL., 2002, 70, 3-4, 167-179

Wstęp Hydrazyd kwasu izonikotynowego (izoniazyd, INH) został po raz pierwszy zsyntetyzowany w 1912 r w Pradze jako część pracy doktorskiej dwóch czeskich biochemików Meyera i Malleya (cyt. z 22). Do leczenia gruźlicy został zastosowany dopiero po ponad 30 latach, po obserwacjach dokonanych przez Chorine o przeciwprątkowym działaniu podobnego chemicznie związku – amidu kwasu nikotynowego.

Silne działanie przeciwprątkowe, dobra biologiczna dostępność, umiarkowane działania niepożądane, doskonałe przenikanie do komórek żernych oraz mały koszt leku sprawiają, że INH należy do głównych leków przeciwprątkowych.

INH jest lekiem eliminowanym z ustroju głównie w postaci zmetabolizowanej. Czynnikiem decydującym o szybkości tego procesu jest aktywność enzymu N – acetylotransferazy wątrobowej wykrytej w 1956 r przez Jenne (12). Enzym ten występuje głównie w cytoplazmie komórek mięsaszowych wątroby. Proces acetylacji zachodzi prawdopodobnie również w płucach, nerkach, jelicie cienkim i śledzionie (10). Szybkość acetylacji jest cechą zdeterminowaną

genetycznie i dziedziczny się zgodnie z prawami Mendla. Aktywność acetylotransferaz w komórkach ludzkich jest kontrolowana przez dwa geny, które zostały oznaczone jako NAT 1 i NAT 2 (14). Aktywność enzymu kodowanego przez gen NAT 1 nie wykazuje zróżnicowania międzyosobniczego, kodowana przez gen NAT 2 wykazuje polimorfizm (30). Występowanie polimorfizmu w aktywności enzymu NAT 2 jest przyczyną zróżnicowania populacji ludzkiej na dwie odmienne fenotypowo grupy: wolnych acetylatorów (WA) i szybkich acetylatorów (SA).

U szybkich acetylatorów aktywność N-acetylotransferazy może być nawet 2-krotnie większa, niż u acetylatorów wolnych (10).

Fenotyp wolnej acetylacji odpowiada homozygotycznemu genotypowi dwóch recesywnych genów-ss. Fenotyp szybkiej acetylacji składa się z dwóch genotypów, z których jeden jest heterozygotyczny-Fs, a drugi homozygotyczny-dominujący-FF (5, 25, 31).

Ponieważ allele warunkujące aktywność N-acetylotransferazy znajdują się w chromosomach autosomalnych fenotyp acetylacji nie zależy od płci (17). Ponadto fenotyp acetylacji nie zależy od wchłaniania INH w przewodzie pokarmowym, stopnia wiązania z białkami, ani od klirensu nerkowego. Czynność acetylacynna wątroby nie zmienia się wraz z wiekiem (4). Należy wobec tego przyjąć, że typ acetylacji jest cechą osobniczą i nie znane są jak dotąd czynniki wpływające na jego zmianę. W surowicy SA stwierdza się niższe stężenia INH i szybszą jego eliminację z organizmu niż u WA. Zjawisko to może być niekorzystne przy leczeniu gruźlicy. Z kolei utrzymywanie się wysokich stężeń INH we krwi przez wiele godzin, tak jak to ma miejsce u WA jest także niekorzystne, ponieważ częściej kojarzy się z objawami niepożądanymi.

Zaden z produktów biotransformacji INH, acetyloizoniazyd i kwas izonikotynowy, nie wykazuje biologicznej aktywności. Biologiczny okres półtrwania INH wynosi od 1 do 3 godzin i również zależy od stopnia acetylacji.

Część leku ulega wydaleniowi w postaci biologicznie czynnej natomiast reszta w formie nieczynnych, zacetylowanych metabolitów. Większość INH (75 do 95 %) jest wydalana w formie zmetabolizowanej z moczem w ciągu 24 godzin (9). W zależności od typu acetylacji, w formie niezmienionej wydalana się od 3 do 30 % INH (20).

Wzajemny stosunek tych frakcji zależy również od osobniczych zdolności acetylacji. INH nie wydany przez nerki ulega częściowemu wydaleniowi z kałem i częściowemu rozkładowi do bliżej nie znanych jeszcze metabolitów.

W Polsce, badając częstość występowania poszczególnych typów acetylacji stwierdzono powiązanie aktywności N-acetylotransferazy ze skłonnościami do niektórych chorób (2, 19, 20, 21, 26, 27).

W literaturze opisano wiele metod określania typu acetylacji izoniazylu metodami chemicznymi (25) i biologicznymi (21). Jedne z nich umożliwiają tylko odróżnienie 2 typów acetylacji, przy użyciu innych można ponadto precyzyjnie określić stężenia leku w surowicy i obliczać parametry farmakokinetyczne INH.

Określenie typu acetylacji metodami biologicznymi (polecany dla wielu antybiotyków w przepisach Farmakopeii) napotyka na wiele trudności związanych z wybiórczym działaniem INH na prątki gruźlicy oraz trudnościami hodowlanymi *Mycobacterium*. Opisane w literaturze metody należą do unikal-

nych i posiadają szereg modyfikacji. Pozwalają one jednak na określenie stężenia INH tylko w surowicy. Inne płyny ustrojowe zawierają tak mało aktywnego przeciwpłatkowo INH, że jego wykrycie metodami biologicznymi nie jest możliwe.

Pierwsza metoda biologiczna została opisana przez Mandel'a i wsp. (15) i polegała na obserwacji zaniku kwasooporności prątków pod wpływem izoniazydu. Była ona swoista tylko dla *M.tuberculosis* i dla próbki surowicy pobranej od konkretnego chorego leczonego INH (16). Inna metoda zwana metodą Schmiedla (24, 32) polega na wykorzystaniu zaobserwowanej przez Tinne'a i Hendersona właściwości dyfuzji pionowej leku z surowicy do stałej pożywki z posianym na niej wzorcowym szczepem prątków gruźlicy wrażliwym na INH. Pobranie i zbadanie wielu próbek krwi umożliwia prześledzenie kinetyki wchłaniania i wydalania INH z organizmu człowieka. Ponieważ jednak w oryginalnej metodzie stosuje się szczep prątków *Myc.H₃₇Rv*, czas oczekiwania na wynik wynosi 14 dni. Tak długi czas jest niekorzystny nie tylko dla chorego, u którego wykonuje się oznaczenie, ale również dla wyniku samego badania, szczególnie z powodu możliwej inaktywacji INH w próbce surowicy. Dlatego podjęto pracę nad przyspieszeniem metody poprzez zastosowanie innego szczepu testowego umożliwiającego szybsze wykonanie badania.

Celem pracy było:

1. opracowanie szybkiej metody biologicznej badania stężeń INH, ustalenie czułości i powtarzalności metody
2. zbadanie i ustalenie czy istnieją różnice w parametrach farmakokinetycznych dostępności biologicznej INH u szybkich i wolnych acetylatorów INH – zdrowych ochotników po podaniu jednorazowo, doustnie izoniazydu w dawce 300 mg.

Material i metody

1. Metoda badania stężeń INH

Opis szczepu. Do oznaczeń użyto szczep wzorcowy *Mycobacterium aurum* REB z kolekcji Instytutu Pasteura w Paryżu. Przed wykonaniem oznaczeń szczep preinkubowano przez 48 h na płynnej pożywce Dubosa. Po czterech dniach inkubacji ze szczepu przygotowano wyjściową, mianowaną zawiesinę *Mycobacterium aurum* i posiewano na pożywkę L-J. Po wyjęciu, próbki ustawiano pionowo w statywach i wprowadzano do nich po 1 ml surowicy badanej dla oznaczenia stężenia INH. Dla każdej próbki surowicy wykonywano 3 równoległe oznaczenia. Po 5 dniach inkubacji w temperaturze 37°C mierzono strefy zahamowania wzrostu szczepu standardowego. Wyznaczono MIC dla leków przeciwpłatkowych, ustalono warunki preinkubacji i hodowli oraz odpowiednie *inoculum* prątków.

Przygotowanie prostej wzorcowej. Prosta wzorcową przygotowano w sposób analogiczny jak oznaczenia INH w badanej surowicy. Naważki czystej substancji INH rozpuszczano w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej. Następnie przygotowywano znane stężenia leku w surowicy cielecej. Do probówek Schmiedla z pożywką Lowensteina – Jensena, na którą wcześniej posiano szczep *Mycobacterium aurum* REB, wprowadzano 1 ml znanego, przygotowanego stężenia leku. Prosta wzorcową wykreślano ze stref zahamowania wzrostu przy następujących stężeniach INH: 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 4,0;5,0.

Po pięciu dniach inkubacji mierzono w mm pionowe strefy zahamowania wzrostu szczepu wzorcowego od powierzchni wprowadzonej surowicy z lekiem.

Otrzymane średnie wartości stref zahamowania wzrostu nanoszono na oś rzędnych umieszczoną na papierze półlogarytmicznym, a logarytmy stężeń na osi odciętych. Zależność opisano wzorem matematycznym.

Prosta standardowa, którą wyliczono z otrzymanych wartości opisywała funkcja wykładnicza:

$Y = e$ do potęgi $(x - a)$ podzielonej przez b , gdzie: Y – stężenie leku, x – strefa zahamowania wzrostu; a i b – stałe empiryczne charakterystyczne dla danej serii badań.

2. Kryteria odróżniania typów acetylacji.

Zastosowano 3 kryteria do odróżniania typów acetylacji:

A. Kryterium wg Armstronga (1), które opiera się na zasadzie resztkowego stężenia INH w surowicy w 6 godzin od podania leku – C_6 .

Za wartość graniczną między typem szybkiej i wolnej acetylacji przyjęto $C_6 = 0,8$ mcg/ml.

B. Kryterium wykorzystujące wartość biologicznego okresu półtrwania INH w surowicy. Za wartość rozdzielającą populację acetylatorów szybkich od wolnych przyjęto $t_{0,5}$ INH wynoszący 120 minut (3, 8, 31).

C. Kryterium opracowanego przez Vivien i wsp. (31) polegającego na wyliczeniu indeksu inaktywacji I_3 . Indeks ten obliczono ze wzoru:

$$I_3 = \frac{C_3 + 0,6}{D}$$

gdzie C_3 – stężenie INH w 3 godziny od podania leku; 0,6 – stały współczynnik; D – dawka INH w mg/kg c.c. Wartość indeksu inaktywacji, która dzieliła populację na szybkich i wolnych acetylatorów ustalono na 0,65.

3. Badania biodostępności INH u zdrowych ochotników

Dane o ochotnikach i sposobie pobierania krwi.

Na prowadzenie badań otrzymano zgodę Komisji Etycznej przy Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc. Ochotnicy składali przed doświadczeniem zobowiązanie o przestrzeganiu zasad obowiązujących w eksperymencie. Byli oni przed rozpoczęciem doświadczeń poddawani badaniom fizykalnym oraz innym jak: rtg płuc, EKG, morfologia krwi, OB, badania biochemiczne krwi oraz badanie moczu. W trakcie trwania badań ochotnicy przebywali pod stałym nadzorem personelu medycznego, pozostawali w jednym pomieszczeniu i przyjmowali jednakowe posiłki oraz napoje. INH podawano na czczo 30 min przed śniadaniem. Pobierano 7 ml krwi z żyły łokciowej do probówek typu Vacutainer, która pozostawała w temperaturze pokojowej do czasu wytworzenia skrzepu. Następnie surowice oddzielano po wirowaniu i zamrażano w temperaturze -20 °C do czasu wykonania analizy.

Krew pobierano w godzinie 0 (przed podaniem leku), a następnie po podaniu 300 mg INH w: 0,5 h/1 h /1,5 h/2 h/2,5 h/3 h/4 h/5 h/6 h/7 h/8 h/10 h/ 12 h.

Wśród 20 ochotników było 9 kobiet i 11 mężczyzn w wieku od 39 do 68 lat, o masie ciała od 59 do 90 kg.

4. Metody analizy farmakokinetycznej i statystycznej

Parametry farmakokinetyczne wyliczono w oparciu o otwarty model jednokompartmenny według programu Pharm/PCS na podstawie uzyskanych doświadczalnie stężeń INH (28).

C_{max} (maksymalne stężenie w mcg/ml) i t_{max} (czas, po którym osiągane jest stężenie maksymalne w godzinach) były wartościami doświadczalnymi, odczytanymi z krzywej stężeń. AUC (AUC_{0-1} oraz AUC_{0-6}) całkowite pole pod krzywą zmian stężenia w czasie w mcg/ml/ h) wyliczono w programie komputerowym jako sumę trójkątów i trapezów.

K_e (stałą szybkość eliminacji 1/h) i K_a (współczynnik absorpcji 1/h) wyliczono w programie komputerowym, natomiast $t_{0,5}$ (biologiczny okres półtrwania w h) otrzymano dzieląc 0,693 przez K_e .

Wyliczono również średnią C_{max} i średnią $z t_{max}$. W obliczeniach uwzględniono: średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, wartości maksymalne i minimalne dla każdego parametru.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników (wartości średnie i SD) przeprowadzono za pomocą programu komputerowego według testu t-Studenta dla par połączonych, analizą wariancji ANOVA stosując przedziały ufności 0,05 i 0,01 (29).

Wyniki

I. Powtarzalność i precyzja, metody

Przeprowadzone badania wykazały, że szczep prątków stosowany do oznaczeń stężeń INH wykazuje oporność na RMP, EMB i penicylinę i wrażliwość na INH i na SM

Na podstawie 24 równoległych oznaczeń ustalono zależność pomiędzy stężeniem INH, a średnią wysokością strefy zahamowania wzrostu szczepu *Mycobacterium aurum*. Najniższe stężenie INH możliwe do oznaczenia w tej metodzie wynosiło 0,25 mcg/ml. Rozrzut wartości składających się na jedną średnią obrazuje odchylenie standardowe (Tab I).

Tabela I. Strefy zahamowania wzrostu *Mycobacterium aurum* (oznaczenia do prostej wzorcowej) i odzyskane stężenia INH.

Table I. Mean value of zone inhibition of *Mycobacterium aurum* calculated for standard curve and found concentration of INH.

Stężenie INH / INH concentration (mcg/ml)	Wysokość zahamowania strefy wzrostu w mm Height of zone inhibition in mm $\bar{x} \pm SD$	Odzyskane stężenie leku Found concentration (mcg/ml)		
		\bar{x}	SD	%
0,25	3,2±0,53	0,27	0,01	108
0,5	7,5±1,56	0,48	0,01	98
1,0	12,0±1,41	0,96	0,03	97
2,0	16,3±2,46	1,92	0,06	95
2,5	17,3±2,20	2,37	0,09	93
4,0	21,0±2,42	3,86	0,09	97
5,0	22,9±1,98	4,92	0,06	98

Odzyskane (otrzymane ze znanego, dodanego do surowicy) stężenie leku wyliczone dla siedmiu stężeń INH (0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 4,0 i 5,0) wynosiło od 93,2 % do 108,0 %, przy odchyleniu standardowym SD < 0,09 dla n = 24 (Tab. II).

Oznaczenia do prostej wzorcowej były wykonywane w 4 seriach. W każdej serii przeprowadzono 6 powtórzeń dla danego stężenia leku. Rozrzut wyników w serii był mniejszy niż 12,3 %, a rozrzut wyników między seriami wahał się w granicach od 1,22 % do 3,8 %. Dokładność metody była wyliczona ze stosunku średniego stężenia obliczonego oraz stężenia wzorcowego i wynosiła od 88 % do 112 %. (Tab III). Przeprowadzone badania wskazują, że metoda jest precyzyjna, a niskie SD, że wyniki są powtarzalne.

Tabela II. Dokładność i precyzja ustalania stężeń INH w surowicy.
 Table II. Accuracy and precision of INH determination in human serum.

Stężenie wzorcowe Standard concentration (mcg/ml)	Stężenie obliczone średnie \pm SD Concentration found mcg/ml mean \pm SD	Rozrzut wyników / Dispersion of results		Dokładność metody w % Accuracy (mean found /added in %)
		w serii/in a seria	między seriami/ between series	
0,25	1. 0,25 \pm 0,00	0,00		100
	2. 0,28 \pm 0,01	3,57	3,7	112
	3. 0,28 \pm 0,01	3,57		112
	4. 0,28 \pm 0,01	3,57		112
0,5	1. 0,50 \pm 0,00	0,00		100
	2. 0,52 \pm 0,01	1,92	2,1	104
	3. 0,44 \pm 0,04	9,09		88
	4. 0,52 \pm 0,01	1,92		104
1,0	1. 0,92 \pm 0,06	6,52		92
	2. 1,03 \pm 0,02	1,94	3,1	103
	3. 0,92 \pm 0,06	6,52		92
	4. 1,03 \pm 0,02	1,94		103
2,0	1. 1,94 \pm 0,06	3,14		97
	2. 2,01 \pm 0,01	0,50	3,1	100
	3. 1,92 \pm 0,06	3,12		96
	4. 2,08 \pm 0,06	2,88		104
2,5	1. 2,55 \pm 0,04	1,19		102
	2. 2,54 \pm 0,03	1,18	3,8	101
	3. 2,34 \pm 0,11	4,70		93
	4. 2,52 \pm 0,01	0,40		100
4,0	1. 3,40 \pm 0,42	12,35		85
	2. 4,11 \pm 0,08	1,95	2,3	102
	3. 3,86 \pm 0,09	2,33		96
	4. 4,11 \pm 0,08	1,95		102
5,0	1. 4,44 \pm 0,39	8,78		88
	2. 5,16 \pm 0,11	2,13	1,2	103
	3. 4,95 \pm 0,03	0,61		99
	4. 5,16 \pm 0,11	2,13		103

II. Różnice w biologicznej dostępności INH u szybkich i wolnych acetylatorów.

Otrzymane wartości stężeń INH i zastosowane kryteria podziału pozwoliły na wyróżnienie: 8 szybkich i 12 wolnych acetylatorów. W grupie SA było 5 kobiet i 3 mężczyzn, w grupie WA 4 kobiety i 8 mężczyzn.

1. Typ szybkiej acetytacji.

Analiza stężeń INH w grupie szybkich acetylatorów w czasie od 0 do 12 godzin po podaniu leku wykazała, że lek jest wchłaniany do krwioobiegu bardzo szybko i po 0,5 h u połowy ochotników osiąga najwyższe stężenie.

Maksymalne, średnie stężenie leku w surowicy wszystkich badanych wystąpiło w 1 h po podaniu i wynosiło 3,3 mcg/ml w zakresie stężeń od 2,5 do 3,7 mcg/ml. Lek wydalął się z organizmu SA bardzo szybko: w 4 h po podaniu INH tylko we krwi jednego ochotnika (L.P 4) stwierdzono bakteriobójcze stężenie leku. W surowicach innych badanych, w tym czasie stężenia leku były zaledwie resztkowe lub niewykrywalne. Po 5 h u żadnego z badanych nie wykryto leku w surowicy (tab III).

Tabela III. Stężenia INH w surowicy 8 zdrowych ochotników po jednorazowej dawce 300 mg leku. Szybki typ acetytacji.

Table III. Concentration of INH in 8 healthy volunteers plasma after a single 300 mg dose. Fast acetylators.

L.P.	Stężeni INH [mcg/ml] w czasie (godziny) Concentration of INH time units (hours)								
	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	5-12
1	0	2,0	3,5	3,1	2,4	2,0	1,4	0,3	0
2	0	4,2	3,7	3,1	2,5	1,9	0,9	0,0	0
3	0	2,1	3,3	3,3	2,5	1,6	0,8	0,3	0
4	0	3,5	3,3	3,0	2,5	1,9	1,8	1,2	0
5	0	3,7	2,9	3,0	1,4	0,7	0,3	0,0	0
6	0	2,4	3,5	2,7	2,7	1,3	1,1	0,8	0
7	0	2,4	3,5	3,1	2,4	2,2	1,6	0,7	0
8	0	3,2	2,5	2,2	1,9	0,5	0,0	0,0	0
Zakres									
Range	0	4,2-2,0	3,7-2,5	3,3-2,2	2,7-1,4	2,2-0,5	1,8-0,0	1,2-0,0	0
Średnia / mean	0	3,0	3,3	3,0	2,3	1,5	1,0	0,4	0
SD	0	0,8	0,4	0,3	0,5	0,6	0,6	0,4	0

Po podaniu ochotnikom zbliżonej dawki leku przeliczonej na kg masy ciała, C max wynosiło średnio 3,6 mcg/ml (3,2-4,2) i występowało w t_{max} pomiędzy 0,5-1 h (średnio 0,8). Eliminacja leku z krwioobiegu była szybka, średni t_{0,5} wynosił 1 h (w zakresie 2,0-0,6) AUC₀₋₁ wahało się w zakresie od 6,8 do 7,8 z wartością średnia 7,2±0,4. (Tab. IV)

Tabela IV. Wskaźniki farmakokinetyczne INH w grupie 8 szybkich i 12 wolnych acetylatorów po podaniu doustnie 300mg leku.

Table IV. Pharmacokinetic parameters of INH in 8 fast and 12 slow acetylators.

Lp. / No	AUC mcg/ml/h	Dawka dose (mg/ /kg c.c.)	Wskaźniki farmakokinetyczne i biodostępności INH Pharmacokinetic and bioavailability of INH parameters					
			I_3	$t_{0,5}$	K_e	K_a	C_{max}	t_{max}
\bar{x}	6,6	4,2	0,4	1,0	0,8	1,0	3,6	0,8
SD	1,3	0,5	0,2	0,5	0,3	0,2	0,3	0,3
SA ZAKRES								
Range	8,2-4,3	4,9-3,3	0,6-0,2	2,0-0,6	1,2-0,4	1,3-0,7	4,2-3,2	1-0,5
\bar{x}	21,8	4,3	0,9	3,0	0,3	0,5	4,3	0,9
SD	2,6	0,4	0,1	1,0	0,1	0,3	0,2	0,3
WA ZAKRES								
range	24,9-18,2	5,1-3,8	0,9-0,8	5,4-1,5	0,5-0,2	1,3-0,3	4,6-4,0	1,5-0,5

AUC = całkowite pole pod krzywą zmian stężenia / area under concentration curve, I_3 = indeks acetytacji / index of acetylation, $t_{0,5}$ = okres półtrwania / elimination half-life, K_e = stała szybkości eliminacji / apparent terminal constant, K_a = współczynnik absorpcji / absorption of the drug, C_{max} = maksymalne stężenie surowicy / maximum plasma concentration, t_{max} = czas osiągnięcia maksymalnego stężenia / time to peak

SA – szybki typ acetytacji / fast acetylators

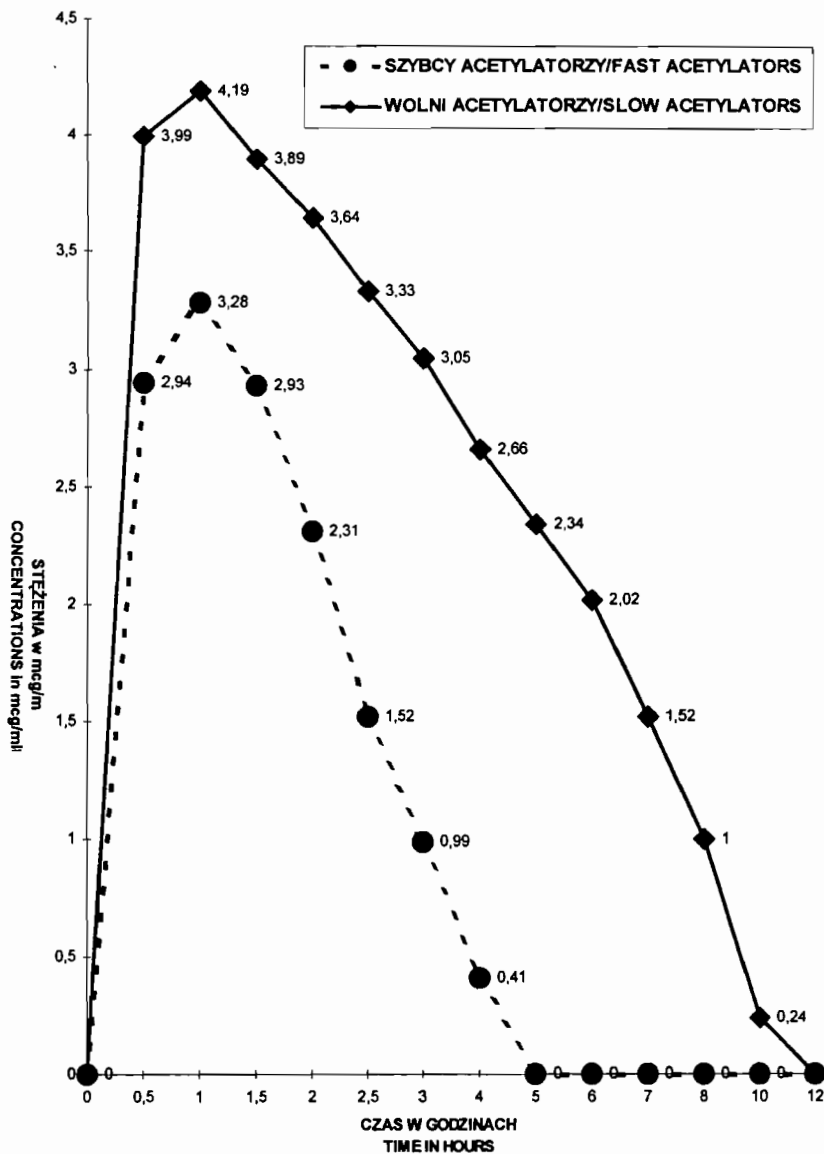
WA – wolny typ acetytacji / slow acetylators

2. Typ wolnej acetytacji.

U wolnych acetylatorów maksymalne stężenie leku we krwi występowało w podobnym czasie jak u SA ale było od niego znacznie wyższe i średnio wynosiło 4,3 mcg/ml (w zakresie 4,6-4,0). AUC całkowite było u WA 3,3 razy większe niż u SA. W surowicy WA jeszcze po 8 h po podaniu leku stwierdzano bakteriobójcze stężenia INH, które zmniejszały się dopiero po 10 h do wartości resztkowych (Tab V).

Czas eliminacji leku odzwierciedla wielkość $t_{0,5}$, która była 3 razy dłuższa u WA w porównaniu z SA. (tab IV)

Wszystkie wskaźniki szybkości acetytacji, biologicznej dostępności i czasu eliminacji leku po podaniu porównywalnych dawek INH u szybkich i wolnych acetylatorów wykazują statystyczną znamienność w obu badanych grupach (Tab. VI i Ryc 1).



Rycina 1 Średnie stężenia INH w surowicy szybkich i wolnych acetylatorów.
 Figure 1 Mean plasma concentrations of INH in fast and slow acetylators.

Biodostępność izoniazydu u zdrowych

Tabela V Stężenia INH (w mcg/ml) surowicy 12 zdrowych ochotników po jednorazowej dawce 300 mg leku. Wolny typ acetylacji.

Table V Concentration of INH (in mcg/ml) in twelve health volunteers plasma after a single 300 mg dose. Slow acetylators.

L.P.	Stężenie INH w mcg/ml w godzinach od podania leku Concentration of INH in mcg/ml at the time intervals												
	0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	5	6	7	8	10	12
1	4,1	4,4	3,8	3,5	3,2	3,2	2,5	2,0	1,9	1,4	0,7	0	0
2	3,7	4,2	3,9	3,7	3,5	3,2	2,5	2,5	2,1	1,6	1,2	0,2	0
3	3,4	4,1	3,4	3,4	3,3	2,7	2,5	1,9	1,9	1,1	0,4	0	0
4	3,9	4,0	3,5	3,5	3,5	3,3	3,0	2,7	2,5	1,7	1,4	0,6	0
5	4,4	3,9	3,8	3,7	3,6	3,4	3,4	3,0	1,8	1,6	1,5	0,7	0
6	4,1	3,7	3,7	3,7	3,2	2,7	2,7	2,0	2	1,4	0,4	0	0
7	4,1	4,5	4,1	3,7	3,5	3,3	2,8	2,6	2,7	1,8	1,3	0,3	0
8	4,1	4,6	4,6	3,7	2,8	3,0	2,5	2,5	2,4	2,3	1,4	0,3	0
9	4,6	4,2	4,1	3,7	3,7	3,0	2,5	2,5	2,0	1,6	1,3	0,4	0
10	3,6	3,8	4,2	3,9	3,7	3,3	2,9	2,5	2,0	1,6	1,2	0,4	0
11	3,3	4,5	3,7	3,6	3,0	3,0	2,4	1,8	1,7	1,3	0,7	0	0
12	4,6	4,4	3,8	3,7	3,0	2,6	2,3	2,0	1,2	1,0	0,4	0	0
Zakres Range	4,6-3,3	4,6-3,7	4,6-3,4	3,9-3,4	3,7-2,8	3,4-2,6	3,4-2,3	3,0-1,8	2,7-1,2	2,3-1,0	1,5-0,4	0,7-0	0
Średnia mean	4,0	4,2	3,9	3,6	3,3	3,1	2,7	2,3	2,0	1,5	1	0,2	0
SD	0,4	0,3	0,3	0,1	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3	0

Tabela VI. Porównanie wskaźników biodostępności INH w surowicy szybkich i wolnych acetylatorów po podaniu jednorazowo, doustnie 300 mg leku

Table VI. Comparison of some pharmacokinetic parameters in volunteers plasma slow and fast acetylators after a single 300 mg oral dose of INH.

Parametry Parameters	Typ acetylacji				p
	Szybki / fast		Wolny / slow		
	x	SD	x	SD	
Dawka dose	4,19	0,49	4,29	0,36	NS
I_3	0,37	0,14	0,85	0,06	< 0,01
$t_{0,5}$	1,02	0,46	2,99	0,94	< 0,05
C_6	0	0	2,02	0,38	< 0,01
C_{max}	3,28	0,39	4,18	0,29	< 0,05
AUC_{0-t}	6,59	1,33	21,82	2,57	< 0,01

I_3 = indeks acetylacji / index of acetylation, $t_{0,5}$ = czas półtrwania / elimination half-life, C_6 = stężenie INH po 6 godzinach od podania leku / concentration of INH in 6 h after drug ingesting, C_{max} = maksymalne stężenie surowicy / maximum plasma concentration, AUC_{0-t} = całkowite pole pod krzywą zmian stężenia / area under concentration curve,

Dyskusja

Oznaczenie INH w surowicy ludzi ma duże znaczenie zarówno do celów naukowych jak i w laboratorium klinicznym do monitorowania leczenia gruźlicy oraz kontrolowania przyjmowania leków przez chorych. Dzięki temu można nie tylko scharakteryzować typ acetylacji, do jakiego należy dany osobnik, ale również śledzić precyzyjnie zmiany w przebiegu stężeń leku, rzędu ułamka mikrograma.

Do rozróżniania typów acetylacji stosuje się różne kryteria, które są związane z zastosowaną metodą badania (chemiczna lub biologiczna), wykrywaniem INH lub jego metabolitów oraz materiałem biologicznym, w którym prowadzi się oznaczenia (surowica lub mocz). W metodach biologicznych używa się wyłącznie surowicę i stosuje różne kryteria takie jak: indeks acetylacji (2, 31), wielkość stężenia INH w odpowiednio wybranym przedziale czasu od podania dawki testującej lub obliczenie szybkości eliminacji leku z krążenia $t_{0,5}$ (8, 11, 31). Wartości graniczne zależą od wielkości dawki testującej oraz drogi podania INH (doustna, domięśniowa lub dożylna). Np. wg Mandela i wsp. (15) wartość graniczną stanowi stężenie 0,3 mcg INH/ml wykrywane w 6 h od podania 4 mg INH/kg m.c.; wg innych 0,4 mcg INH/ml (7); 0,9 mcg INH/ml w 4,5 h po podaniu domięśniowo dawki 3 mg/kg; 1,6 – 2,0 mcg INH/ml w 3 h po podaniu 200 lub 400 mg INH per os (13); $t_{0,5}$ od 0,8 do 1,8 h dla szybkich acetylatorów i 2,3 do 4,1 h dla wolnych po podaniu 10 mg/kg leku dożylnie; 0,8 mcg INH/ml w 6 h od podania per os 4 mg/kg leku (11); 0,58 mcg INH/ml w 4,5 h po podaniu 3 mg/kg leku domięśniowo (6), wskaźnik acetylacji 0,45 u standardowo leczonych na gruźlicę (2).

W badaniach własnych zastosowano 3 kryteria: indeks acetylacji I_3 (wartość graniczna 0,65), biologiczny okres półtrwania $t_{0,5}$ (wartość graniczna 120 min) i stężenie resztkowe w 6 h (wartość graniczna 0,8 mcg/ml).

Zastosowanie każdego z wymienionych trzech wskaźników acetylacji w grupie zdrowych ochotników umożliwiło w 100% zidentyfikowanie szybkich i wolnych acetylatorów.

Przyjęta wartość graniczna $t_{0,5}$ 120 min. jako pojedynczy wskaźnik odróżniła grupę szybkich acetylatorów od wolnych w 86 %.

Wyniki własne są znacznie lepsze niż otrzymane przez autorów francuskich (18), którzy określając fenotyp acetylacji u chorych przy użyciu tych samych 3 wskaźników otrzymali prawidłową ocenę w około 50 % badanych. Czaplńska-Jóźwiak i wsp. (2) stosowali u 98 chorych tylko jeden wskaźnik acetylacji I_3 z wartością graniczną 0,65 i stwierdzili, że wartość ta jest za wysoka dla badanych chorych i do podziału wolnych i szybkich acetylatorów zaproponowali wartość graniczną I_3 – 0,45.

Trzeba również, wspomnieć, że wśród zdrowych ochotników znalazły się osoby u których nie udało się precyzyjnie określić typu acetylacji. Ta grupa w badaniach nazywana bywa "grupą heterozygotyczną" lub "typem pośrednim". Bywa ona oddzielana przez wielu autorów od szybkich i wolnych acetylatorów i jest związana z heterozygotycznym genotypem determinującym aktywność N-acetylotransferazy. Posługując się nie tylko wartością indeksu acetylacji, ale również przebiegiem stężeń INH w czasie można pominąć grupę pośrednią i zakwalifikować badanego do określonego typu acetylacji. Według Skrętkiewicz (25) istnienie grupy pośredniej stwarza możliwości manipulowania wynikami, to znaczy przesuwania tej grupy w kierunku wygodnym dla badacza

w celu uzyskania znamienności statystycznej. Wielu autorów zajmujących się polimorfizmem acetylacji pomija grupę pośrednią, wyłączając ją ze swoich rozważań. Dotyczy to szczególnie autorów prac stosujących metody chemiczne, które nie pozwalają śledzić przebiegu stężeń w surowicy w czasie od podanej dawki leku. W ocenie własnego materiału wyeliminowano z rozważań grupę pośrednią, co stworzyło możliwość jednoznacznej oceny wyników.

Badając biologiczną dostępność INH u wolnych i szybkich acetylatorów – zdrowych ochotników po podaniu porównywalnej dawki leku w przeliczeniu na kg masy ciała stwierdzono statystycznie znamienne różnice we wszystkich zastosowanych wskaźnikach.

U szybkich acetylatorów biodostępność leku (wyrażona wartością C_{max} i AUC) jest dużo niższa niż u wolnych acetylatorów. Oznacza to, że u szybkich acetylatorów przeciwprątkowe stężenia INH obserwuje się w surowicy bardzo krótko, u niektórych osób zaledwie do 2,5 – 3 h od podania leku. Mając na uwadze, że lek podaje się raz dziennie, należy wystrzegać się sytuacji, w której może dojść do niekontrolowanego obniżenia stężeń terapeutycznych oraz wskaźników dostępności biologicznej leku jak to ma miejsce np. w przypadku zażywania leku po śniadaniu. (32)

Zdrowi ochotnicy reprezentujący wolny typ acetylacji osiągają wyższe stężenia leku w surowicy, wykrywalne nawet po 10 h od podania dawki. A zatem chorzy z wolnym typem acetylacji w trakcie leczenia przeciwprątkowego powinni być również poddani szczególnej obserwacji dla uniknięcia ubocznych objawów leku, długo pozostającego w krwioobiegu.

Wnioski

1. Opracowana, biologiczna metoda określania stężeń INH charakteryzuje się powtarzalnością, dokładnością, krótkim czasem badania i nie wymaga specjalistycznej aparatury. Z tego względu może być rekomendowana do stosowania w laboratoriach mikrobiologii prątką III rzędu
2. Metoda umożliwia monitorowanie leczenia gruźlicy oraz kontrolowanie przyjmowania INH przez chorych.
3. Trzy badane wskaźniki acetylacji z wartościami granicznymi: indeks acetylacji $I_3 = 0,65$, $t_{0,5} = 120$ min i stężenie resztkowe $C_6 = 0,8$ mcg/ml są przydatne w określaniu typu acetylacji INH u ludzi.
4. Po podaniu jednakowej dawki INH 300 mg stwierdzono w surowicy szybkich i wolnych acetylatorów- zdrowych ochotników statystycznie zamienne różnice w wysokościach osiąganych stężeń leku, wskaźnikach farmakokinetycznych oraz wskaźnikach biodostępności leku.

Piśmiennictwo

1. Armstrong A.R., Peart H.E. : A comparison between the behaviour of Eskimos and non – Eskimos to the administration of isoniazid.. Am. Rev. Respir. Dis. 1960, 81, 588.
2. Czaplińska-Jóźwik E., Szymański A., Dutkiewicz J. : Wskaźnik inaktywacji INH oznaczony metodą biologiczną i jego zastosowanie w monitorowaniu leczenia przeciwprątkowe-
3. go. Pneumol. Alergol. Pol. 1986, 54, 535-540.
3. Eidus L., Hodgkin M.M. : A new isoniazid preparation designed for moderately fast and „fast” metabolizers of the drug. Arzheim. Forsch 1975, 25, 1077.
4. Evans D.A.P. : Genetic variations in acetylation of isoniazid and other drugs. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1968, 151, 723.

5. Evans P., White T. : Human acetylation polymorphism. *J. Lab. Clin. Med.* 1964, 63, 3, 394.
6. Gangadharam P.R.I., Bhatia A.L., Radhakrishna S., Selkon J.B. : Rate of inactivation of isoniazid in South Indian patients with pulmonary tuberculosis. Microbiological assay of isoniazid in serum following a standard intramuscular dose. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 1961, 25, 765.
7. Gow J.G., Evans D.A.P. : A study of the influence of the isoniazid inactivator phenotype on reversion in genito-urinary tuberculosis. *Tubercle, Lond.* 1964, 45, 136.
8. Grosset J., Canetti G. : La methode de diffusion verticale. Sa valeur dans le dosage de l'Isoniazid libre du serum. : *Rev. Tuberc.* 1958, 22, 1077.
9. Holdiness M.R. : Clinical pharmacokinetics of the antituberculosis drugs. *Clin. Pharmacokinetics* 1984, 9, 511.
10. Jędryczko A., Gmiński J. : Kliniczne konsekwencje polimorfizmu. *Pol. Tyg. Lek.* 1984, 37, 1249.
11. Jenne J., Mc Donald F., Mendoza E. : A study of the renal clearances, metabolic inactivation rates and serum fall-off interaction of isoniazid and paraaminosalicylic acid in man. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1961, 84, 371.
12. Jenne J.W. : Studies of human patterns of isoniazid metabolism using an intravenous fall – off technique with a chemical method. *Am. Rev. Res. Dis.* 1960, 81, 1.
13. Kotosowska J., Libiszowska-Staniul M. : Poziomy wolnego, biologicznie czynnego INH w zależności od wielkości dawki i kojarzenia z PAS-em u szybkich, średnich i wolnych inaktywatorów. *Gruźlica* 1963, 31, 115.
14. Lutz W., Barański B., Krajewska B. : Polimorfizm N-acetylacji, a zróżnicowanie podatności narządowej na kancerogenne działanie amin aromatycznych homo- oraz heterocyklicznych. *Med. Pr.* 1994, 4, 344.
15. Mandel W., Cohn M.L., Russell W.F., Middlebrook G. : Effect of para-aminosalicylic acid on serum isoniazid levels in man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1956, 91, 409.
16. Middlebrook G. : Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazide and the incidence of variants resistant to the drug in vitro. *Am. Rev. Tuberc.* 1952, 65, 765.
17. Mitchell R.S., Bell J.C. : Clinical implications of isoniazid blood levels in pulmonary tuberculosis. *New Engl. J. Med.* 1957, 257, 22, 1066.
18. Modai J., Coulaud J.P., Vivien J.M.i wsp. : Influence de la rifampicine sur le métabolisme de l'isoniazide. *Nouv. Presse Med.* 1978, 7, 1263.
19. Olszewska Z., Orłowska-Westwood B., Orszulak D.i wsp. : Fenotyp acetylacji w tuszczycy. *Przeg. Derm.* 1980, 67, 19.
20. Orzechowska-Juzwenko K., Milejski P. : Genetycznie uwarunkowane zaburzenia kinetyki leków i ich kliniczne znaczenie. *Pol. Tyg. Lek.* 1984, 39, 1688.
21. Pawłowska I., Rakowska I. : Oznaczanie fenotypu inaktywacji INH u chorych na gruźlicę płuc metoda pośrednią na modelu sulfametazyny. *Pneumol. Alergol. Pol.* 1978, 46, 605 – 612.
22. Riley L.W. : Isoniazid chemistry, metabolism and mechanism of action. w Room. W.N. Garay S.M. (eds) *Tuberculosis*, Little Brown Boston 1996, 763.
23. Russell D.W. : Simple method for determining isoniazid acetylator phenotype. *Brit. Med. J.* 1970, 3, 324.
24. Schmiedel A. : Weitere Untersuchungen über das Wesen und die klinische Bedeutung der hochgradigen Isoniazidinaktivierung im Körper. *Beit. Klin. Tuberk.* 1960, 122, 232.
25. Skrętkiewicz J. : Przegląd najczęściej stosowanych metod oznaczania fenotypu acetylacji i różnicowania osób wolno i szybko acetylujących. *Farmacja Pol.* 1990, 47, 7.
26. Skrętkiewicz J., Mazurowa A., Orszulak D. : Fenotyp acetylacji w grupie ludzi pochodzących z regionu łódzkiego. *Pol. Tyg. Lek.* 1981, 36, 89.
27. Skrętkiewicz J., Sękulska M., Podlaszczuk M., Polakowski P. : Fenotyp acetylacji u osób uzależnionych od alkoholu w okresie abstinencji. *Probl. Terapii Monitor.* 1995, 6, 173.
28. Tallarida R.J., Murray R.B. : *Manual of pharmacologic calculation with computer programs.* Springer-Verlag, New York, 1987, 29, 93.
29. Tallarida R.J., Murray R.B. : *Manual of pharmacologic calculation with computer programs.* Springer-Verlag, New York, 1987, 40, 134.
30. Vatsis K.P., Martell K.J., Weber W.W. : Diverse point mutations in the human gene for polymorphic N-acetyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 6333.
31. Vivien J.N., Thibier R., Lepeule A. : La pharmacocinetique de l'isoniazide dans la race blanche. *Rev. Fr. Mal. Respir.* 1973, 1, 5-6, 753.
32. Zwolska Z., Niemirowska-Mikulska H., Augustynowicz-Kopeć E. : Wpływ żywienia na biologiczną dostępność izoniazydu (INH) u zdrowych ochotników. *Pneumol. Alergol. Pol.* 1998, 66, 412,421.

Wpłynęła: 10.10.2001 r.