

Ewa Augustynowicz-Kopeć, Anna Zabost, Monika Kozińska, Sylwia Brzezińska, Zofia Zwolska

Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. med. Zofia Zwolska

Wykrywanie mutacji w genie NAT II jako metoda określania typu acetylacji izoniazydu (INH) u ludzi

Detection of mutation in NAT II gene as a method of determination of isoniazid (INH) acetylation type in human population

Praca finansowana z Grantu Ministerstwa Nauki i Informatyki nr 2 P05B 136 27

Abstract

Introduction: Isoniazid (INH) is a drug widely used in the treatment of tuberculosis. INH is metabolized to acetylisoniazid by N-acetyltransferase (NAT) in the liver. The rate of INH acetylation is genetically determined. NAT isozymes are encoded at 2 loci; one encodes NAT1, formerly known as the monomorphic form of the enzyme, while the other encodes the polymorphic NAT2, which is responsible for individual differences in the ability to acetylate certain compounds. The objective of the present study was to apply the genotyping of the fast and slow acetylators for personalized therapeutic dose.

Material and methods: Plasma concentrations of INH were determined with biological method in the authors modification. This method warrants high accuracy and secured repeatable results. Genomic DNA was isolated from the blood samples. DNA extracted by Blood DNA Kit and amplified by PCR by Spurr [1] with two primers. PCR product was cut separately with 4 different restriction enzymes: Dde1, Kpn1, Tag1, and BamH1.

Results: Four different NAT 2 alleles were detected in the study population. The presence of any 2 mutant alleles defines the slow-acetylator genotype, whereas rapid acetylators have 1 or 2 wild-type NAT2*4 alleles.

Conclusion: On the basis of our results we suggest the using of NAT 2 genotyping for discrimination of the fast and slow acetylators in monitoring of tuberculosis therapy.

Key words: N-acetyltransferase, isoniazid, polymorphism NAT II, treatment of tuberculosis

Pneumonol. Alergol. Pol. 2007; 75: 134–139

Streszczenie

Wstęp: Isoniazid (INH) jest lekiem powszechnie stosowanym w leczeniu gruźlicy, metabolizowanym w wątrobie do acetylo-izoniazidu przez enzym N-acetylotransferazę (NAT). Szybkość acetylacji leku jest cechą zdeterminowaną genetycznie. Enzym jest kodowany przez dwa geny: NAT1 i NAT2, który jest odpowiedzialny za występowanie różnic w szybkości acetylacji różnych związków. W przedstawionej pracy badano zastosowanie metody genotypowania w określaniu typu acetylacji (szybki, wolny acetylator).

Materiał i metody: Stężenie izoniazydu w surowicy określano metodą biologiczną, gwarantującą wysoką dokładność i powtarzalność wyników. Genomowe DNA izolowano przy użyciu kitu firmy Qiagen, a następnie poddawano reakcji amplifikacji według Spurr [1]. Produkty PCR trawiono oddzielnie 4 enzymami restrykcyjnymi: Dde1, Kpn1, Tag1 i BamH1.

Wyniki: W badanej grupie zidentyfikowano występowanie 4 alleli genu NAT2. Obecność dwóch zmutowanych alleli identyfikowała wolny typ acetylacji, natomiast szybki acetylatorzy mieli 1 lub 2 allele dzikie (NAT2*4).

Wnioski: Zastosowanie metody genotypowania w określaniu mutacji w NAT2 u człowieka umożliwia szybkie określenie typu acetylacji w monitorowaniu biodostępności izoniazydu.

Słowa kluczowe: N-acetylotransferaza, izoniazid, polimorfizm NAT II, leczenie gruźlicy

Pneumonol. Alergol. Pol. 2007; 75: 134–139

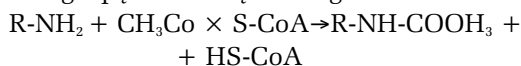
Adres do korespondencji: Ewa Augustynowicz-Kopeć, Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, ul. Płocka 26, 01–138 Warszawa, e-mail: e.kopec@igichp.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 7.02.2007 r.
Copyright © 2007 Via Medica
ISSN 0867–7077

Wstęp

Izoniazyd (INH) jest jednym z dwóch najważniejszych leków przeciwgruźliczych. Charakteryzuje się silnym działaniem przeciwprątkowym, dobrą biodostępnością i zdolnością wnikania do komórek żernych. Izoniazyd jest metabolizowany polimorficznie przez enzym N-acetylotransferazę typu II. W zależności od szybkości acetylacji INH w populacji ludzkiej wyróżnia się dwie fenotypowo odmienne grupy. Są to szybcy (Sz.A.) i wolni (W.A.) acetylatorzy, którzy po jednakowej dawce INH osiągają różne stężenia leku w surowicy i charakteryzują się różną kinetyką wchłaniania oraz wydalania [2].

N-acetylotransferazę (NAT) zidentyfikowano początkowo jako enzym biorący udział w metabolizowaniu ksenobiotyków. Obecnie wiadomo, że odgrywa on istotną rolę w biotransformacji wielu leków z grupami arylaminowymi i hydrazydowymi, jak również związków kancerogennych. NAT katalizuje przeniesienie grupy acetylowej z acetyloCoA na grupę aminową według schematu:



Indywidualne różnice w aktywności enzymu odkryto ponad 40 lat temu podczas badań nad szybkością eliminacji izoniazydu z organizmu człowieka.

U człowieka aktywność acetylotransferaz jest kontrolowana przez dwa geny: NAT I i NAT II, które znajdują się na 8. chromosomie i w 87% są homologiczne. Stwierdzono również istnienie pseudogenu NATP, który zawiera wiele ramek odczytu i kodonów stop [3].

Do niedawna uważano, że N-acetylotransferaza I koduje białko, którego aktywność w komórkach wielu narządów nie wykazuje zróżnicowania międzyosobniczego. Zidentyfikowano istnienie 26 alleli genu NAT I, jednak tylko w kilku przypadkach udało się zbadać ich wpływ na fenotyp acetylacji.

Aktywność enzymu kodowanego przez NAT II wykazuje polimorfizm, który jest wynikiem mutacji punktowych. Rezultatem jest białko o zmienionej sekwencji aminokwasów co wpływa na aktywność enzymu. Mutacje mogą też dotyczyć sekwencji regulacyjnej, powodując zmiany w ekspresji genu i ilości syntetyzowanego białka.

W pierwszych badaniach molekularnych stwierdzono, że trzy mutacje determinują polimorfizm enzymu NAT II [4]. Obecnie zidentyfikowano 13 substytucji nukleotydowych, z których 9 wpływa na zmianę sekwencji aminokwasów i tym samym na aktywność N-acetylotransferazy II. Allele NAT II zawierające mutacje w pozycjach G191A, T341C, A434C, G590A i G857A wiążą się z wolnym typem acetylacji, natomiast brak muta-

Tabela 1. Polimorfizm genu N-acetylotransferazy II

Table 1. Polymorphism N-acetyltransferase II gene

Genotyp <i>Genotype</i>	Typ acetylacji <i>Type of acetylation</i>
NAT2*4/NAT2*4	Szybki <i>Fast</i>
NAT2*4/NAT2*5	Szybki <i>Fast</i>
NAT2*4/NAT2*6	Szybki <i>Fast</i>
NAT2*4/NAT2*7	Szybki <i>Fast</i>
NAT2*5/NAT2*5	Wolny <i>Slow</i>
NAT2*5/NAT2*6	Wolny <i>Slow</i>
NAT2*5/NAT2*7	Wolny <i>Slow</i>
NAT2*6/NAT2*6	Wolny <i>Slow</i>
NAT2*6/NAT2*7	Wolny <i>Slow</i>
NAT2*7/NAT2*7	Wolny <i>Slow</i>

cji w tych pozycjach determinuje szybki typ acetylacji [3].

Do identyfikacji genotypu acetylacji w omawianej pracy wzięto pod uwagę dziki allel NAT2*4 oraz 3 zmutowane allele: NAT2*5, NAT2*6 i NAT2*7.

Genotypy NAT II określane na podstawie alleli (brak lub występowanie mutacji) i odpowiadające im fenotypy acetylacji przedstawiono w tabeli 1.

Celem pracy było:

1. Zastosowanie metody biologii molekularnej do oznaczania mutacji determinujących polimorfizm aktywności enzymu N-acetylotransferazy II.
2. Porównanie zidentyfikowanych typów acetylacji metodą genetyczną i metodą biologiczną (wskaźniki biodostępności INH).

Na przeprowadzenie badań otrzymano zgodę Komisji Etycznej IGiChP nr KE-2/2004.

Materiał i metody

Materiałem do badań były próbki krwi pobrane od 10 zdrowych ochotników. Krew do oznaczenia

stężenia INH pobierano w czasie 0, 1, 2, 3 i 6 godzin od podania leku, do określenia polimorfizmu NAT II — jednorazowo w ilości 5 ml.

Metodyka oznaczania polimorfizmu

N-acetylotransferazy metodą genetyczną

Od zdrowych ochotników DNA izolowano z krwi obwodowej przy użyciu kitu Blood DNA Kit firmy Qiagen. Wyizolowane DNA poddano reakcji PCR ze specyficznymi starterami: NAT1: 5'-GCTGGGTCTGGAGCTCCTC-3'; NAT2:5'-TTGGGTATACATACACAAGGG-3'. Uzyskane produkty amplifikacji poddano działaniu restryktaz: BamH1, Dde1, Kpn1 i Tag1 [5]. Enzymy Kpn1 i Dde1 identyfikowały allel NAT2*5, Tag1 — allel NAT2*6, a BamH1 — allel NAT2*7. Uzyskane produkty trawienia rozdzielano 8-procentowym żelem poliakrylamidowym. Otrzymane prążki wizualizowano bromkiem etydy i poddano analizie w programie LabWorks 4.5.

Określanie typu acetylacji metodą biologiczną

Stężenie czynnego izoniazydu w surowicy określano metodą dyfuzji pionowej Schiedla w modyfikacji własnej.

Do oznaczeń użyto szczepu *Mycobacterium aurum* REB. Ze szczepu wyjściowego przygotowywano mianowaną zawiesinę, którą posiewano na powierzchnię pożywki. Do probówek wprowadzano po 1 ml badanej surowicy. Po 5 dniach inkubacji w temperaturze 37°C mierzono w milimetrach strefy zahamowania wzrostu i wyliczano stężenie INH na podstawie sporządzonej prostej wzorcowej.

Zastosowano dwa kryteria rozróżnienia szybkiego i wolnego typu acetylacji: indeks inaktywacji I_3 (wartość graniczna — 0,65) i stężenie resztkowe INH w surowicy po 6 godzinach C_6 (wartość graniczna — 0,8 $\mu\text{g/ml}$) [6].

Wyniki

W badanej grupie 10 zdrowych ochotników częstość występowania genotypów NAT II określono metodą molekularną (tab. 2).

U czterech osób z allelem warunkującym proces szybkiej acetylacji zidentyfikowano genotyp NAT2*4/NAT2*5. Natomiast w grupie 6 wolnych acetylatorów fenotyp wolnej acetylacji warunkowały następujące genotypy: NAT2*5/NAT2*6 u 4 osób, NAT2*6/NAT2*7 u 1 osoby i NAT2*7/NAT2*7 również u 1 osoby. Uzyskane wyniki poddano analizie łącznie z danymi określającymi typ acetylacji oznaczony metodą biologiczną. Na rycinach 1–3 przedstawiono wykresy stężeń izoniazydu ozna-

Tabela 2. Polimorfizm genu N-acetylotransferazy II w badanej grupie

Table 2. Polymorphism N-acetyltransferase II gene in the study group

	Genotypy <i>Genotypes</i> n	Ochotnicy <i>Donors</i> n
Heterozygotyczni szybcy acetylatorzy <i>Heterozygotic fast acetylators</i>	NAT2*4/NAT2*5	4
Homozygotyczni i heterozygotyczni wolni acetylatorzy <i>Homozygotic and heterozygotic slow acetylators</i>	NAT2*5/NAT2*6 NAT2*6/NAT2*7 NAT2*7/NAT2*7	4 1 1

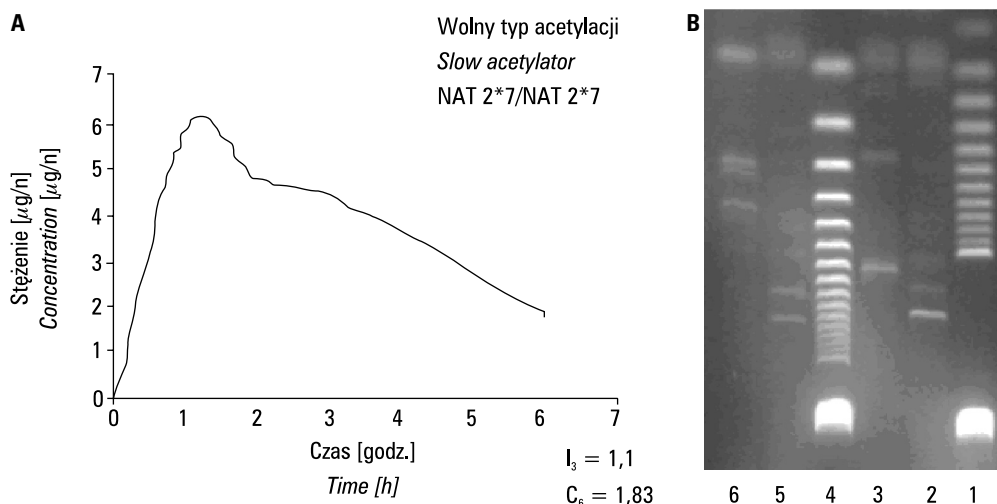
czonych metodą biologiczną oraz zdjęcia przedstawiające analizę restrykcyjną produktów PCR uzyskane dla wolnego i szybkiego acetylatora oraz typu heterozygoty.

Na rycinie 1a przedstawiono przebieg stężeń INH w $\mu\text{g/ml}$ w surowicy jednego z ochotników oznaczony metodą biologiczną w przedziale czasowym 0–6 godzin. Wyliczone ze stężeń wskaźniki biodostępności wynosiły $I_3 = 1,1$; $C_6 = 1,83$, wskazując na wolny typ acetylacji INH. Metodą genetyczną zidentyfikowano mutację w pozycji 857 w obydwu allelach, wykryto homozygotę NAT2*7/NAT2*7, co również wskazuje na wolny typ acetylacji (ryc. 1b).

Natomiast na rycinie 2a przedstawiono stężenia INH w $\mu\text{g/ml}$ w surowicy jednego z ochotników oznaczone metodą biologiczną w przedziale czasowym 0–6 godzin. Wskaźniki biodostępności wyliczone ze stężeń wynosiły $I_3 = 0,35$; $C_6 = 0$, co wskazuje na szybki typ acetylacji INH. Metodą PCR zidentyfikowano mutację w pozycji 481 identyfikującą allel NAT2*5. Nie stwierdzono innych mutacji, co wskazuje na szybki typ acetylacji (ryc. 2b).

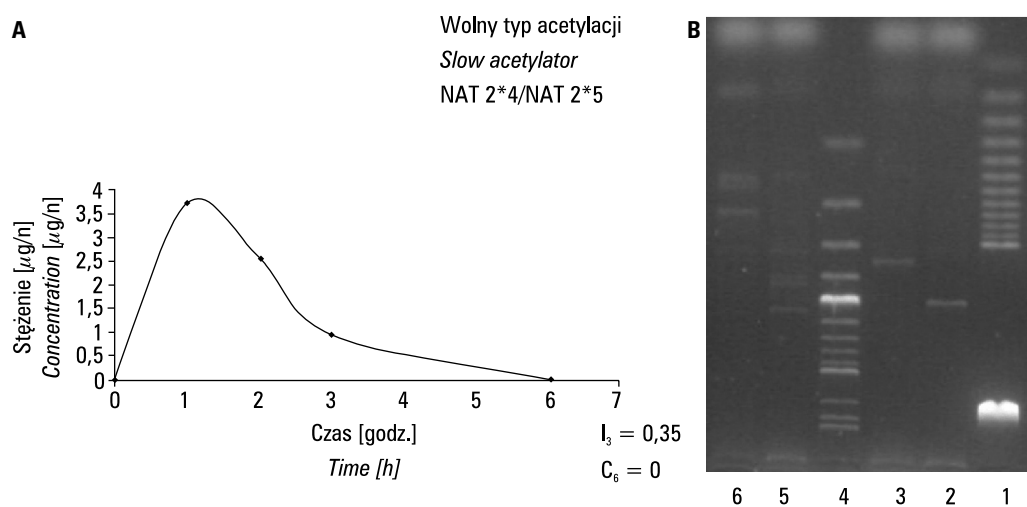
Stosując biologiczną metodę oznaczania typu acetylacji, wśród zdrowych ochotników znalazły się osoby, u których nie udało się precyzyjnie określić aktywności N-acetylotransferazy. Wynikało to z wartości granicznych wskaźników biodostępności leku I_3 i C_6 . Grupa ta jest nazywana „grupą heterozygotyczną”. Zastosowanie metody genetycznej wykrywającej mutacje w genie N-acetylotransferazy II umożliwiło dokładne określenie typu acetylacji w tej grupie (ryc. 3).

Na rycinie 3a zilustrowano stężenia INH w $\mu\text{g/ml}$ w surowicy jednego z ochotników oznaczone metodą biologiczną w przedziale czasowym 0–6 godzin. Wyliczone ze stężeń wskaźniki biodo-



Rycina 1. Typ wolnej acetytacji INH zidentyfikowany metodą biologiczną i genetyczną: **A.** Stężenie izoniazydu w surowicy zdrowego ochotnika w czasie 6 godzin; **B.** Analiza restrykcyjna produktu PCR (ścieżka 1 — wzorzec 25 pz, ścieżka 2 — BamH1, ścieżka 3 — Dde1, ścieżka 4 — wzorzec 50 pz, ścieżka 5 — Kpn1, ścieżka 6 — Tag1)

Figure 1. Identification of INH acetylation type by biological and genetical method for a slow acetylator: **A.** Concentration of INH in plasma of healthy donor in 6 hours; **B.** Restriction analyze of PCR product (lane 1 — molecular size marker 25 pz, lane 2 — BamH1, lane 3 — Dde1, lane 4 — molecular size marker 50 pz, lane 5 — Kpn1, lane 6 — Tag1)



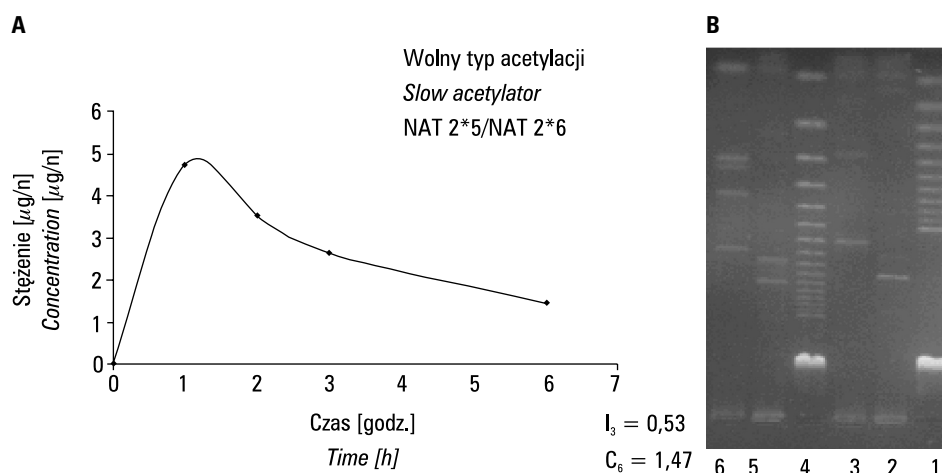
Rycina 2. Typ szybkiej acetytacji INH zidentyfikowany metodą biologiczną i genetyczną: **A.** stężenie izoniazydu w surowicy zdrowego ochotnika w czasie 6 godzin; **B.** analiza restrykcyjna produktu PCR (ścieżka 1 — wzorzec 25 pz, ścieżka 2 — BamH1, ścieżka 3 — Dde1, ścieżka 4 — wzorzec 50 pz, ścieżka 5 — Kpn1, ścieżka 6 — Tag1)

Figure 2. Identification of INH acetylation type by biological and genetical method for a fast acetylator: **A.** concentration of INH in plasma of healthy donor in 6 hours; **B.** restriction analyze of PCR product (lane 1 — molecular size marker 25 pz, lane 2 — BamH1, lane 3 — Dde1, lane 4 — molecular size marker 50 pz, lane 5 — Kpn1, lane 6 — Tag1)

stępnosci wynosiły $I_3 = 0,53$; $C_6 = 1,47$, co uniemożliwiło określenie typu acetytacji INH. Metodą PCR wykryto mutacje w pozycjach 590, 481 i 803 identyfikujące allel NAT2*5 i NAT2*6. Taki układ alleli wskazuje na wolny typ acetytacji (ryc. 3b).

Omówienie

Aktywność polimorficznego enzymu N-acetylotransferazy II wpływa na metabolizm podstawowego leku przeciwprątkowego, szybkość jego eli-



Rycina 3. Typ acetytacji INH zidentyfikowany metodą biologiczną i genetyczną u heterozygoty (NAT2*5/NAT2*6): **A.** Stężenie izoniazydu w surowicy zdrowego ochotnika w czasie 6 godzin; **B.** Analiza restrykcyjna produktu PCR (ścieżka 1 — wzorzec 25 pz, ścieżka 2 — BamH1, ścieżka 3 — Dde1, ścieżka 4 — wzorzec 50 pz, ścieżka 5 — Kpn1, ścieżka 6 — Tag1)

Figure 3. Identification of INH acetylation type by biological and genetical method for a heterozygote (NAT2*5/NAT2*6): **A.** Concentration of INH in plasma of healthy donor in 6 hours; **B.** Restriction analyze of PCR product (lane 1 — molecular size marker 25 pz, lane 2 — BamH1, lane 3 — Dde1, lane 4 — molecular size marker 50 pz, lane 5 — Kpn1, lane 6 — Tag1)

minacji z organizmu i — co za tym idzie — możliwość wywołania efektów toksycznych. W związku z tym przynależność do określonego typu acetytacji jest potencjalnym czynnikiem ryzyka wystąpienia uszkodzeń wątroby indukowanych przez izoniazyd [7].

Czynność acetylacyjna wątroby nie jest zależna od płci i nie zmienia się wraz z wiekiem [8]. Należy wobec tego przyjąć, że typ acetytacji jest cechą osobniczą i nie znane są, jak dotąd, czynniki wpływające na jego zmianę. Żaden z produktów biotransformacji INH — acetyloizoniazyd i kwas izonikotynowy — nie wykazuje biologicznej aktywności. Biologiczny okres półtrwania INH wynosi 1–3 godziny i również zależy od typu acetytacji.

Część INH ulega wydaleniu w postaci biologicznie czynnej, natomiast reszta — w formie nieczynnych, zacetylowanych metabolitów. Większość INH (75–95%) wydala się w formie zmetabolizowanej wraz z moczem w ciągu 24 godzin [9]. W zależności od typu acetytacji, w formie niezmiennionej wydala się od 3 do 30% INH [10]. Wzajemny stosunek tych frakcji zależy również od osobniczych zdolności acetytacji. Isoniazyd niewydalony przez nerki ulega częściowemu wydaleniu z kałem i częściowemu rozkładowi do bliżej nieznanym jeszcze metabolitów.

Do rozróżniania typów acetytacji stosuje się różne kryteria, które wiążą się z zastosowaną metodą badania (chemiczną lub biologiczną), wykry-

waniem INH lub jego metabolitów oraz materiałem biologicznym, w którym prowadzi się oznaczenia.

Zastosowanie metod biologii molekularnej umożliwia dokładne określenie typu acetytacji. Aktywność N-acetylotransferazy II warunkują kombinacje 29 różnych alleli, zawierających od jednej do czterech zmian w sekwencji nukleotydowej. Dominujący allel NAT2*4 warunkuje pełną aktywność enzymu i fenotyp szybkiej acetytacji (brak mutacji w analizowanych pozycjach w genie NAT II), pozostałe allele są odpowiedzialne za fenotyp wolnej acetytacji [11].

Częstość występowania poszczególnych alleli różni się w poszczególnych grupach etnicznych i geograficznych. W populacji kaukaskiej, w której wolni acetylatorzy stanowią około 50%, najczęściej występują allele NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7. Ludzie fenotypowo określani jako szybki acetylatorzy mają jeden lub dwa allele kodujące enzym o wysokiej aktywności, natomiast wolni acetylatorzy mają dwa allele kodujące białko o obniżonej aktywności [12].

Różnice w dynamice metabolizowania INH u wolnych i szybkich acetylatorów determinują stężenie leku i jego metabolitów. U szybkich acetylatorów biodostępność leku mierzona C_{max} i AUC_{0-24h} jest dużo mniejsza niż u wolnych acetylatorów, a przeciwprątkowe stężenie INH utrzymuje się krótko. U wolnych acetylatorów znacznie częściej występują objawy niepożądane związane z kumulacją i toksycznym działaniem leku i jego metabolitów.

W związku z tym, powinni być oni poddani obserwacji, aby złagodzić działania niepożądane lub ich uniknąć [13, 14].

Oznaczenie stężenia INH w surowicy chorych leczonych na gruźlicę ma duże znaczenie w monitorowaniu leczenia gruźlicy i kontrolowaniu przyjmowania leków przez chorych.

Wnioski

1. Zidentyfikowanie mutacji w genie NAT II umożliwiło określenie typu acetylacji INH i było zgodne z typem wyznaczonym na podstawie kryteriów stosowanych w określaniu biodostępności leku.
2. Zastosowanie metody genotypowania umożliwia jednoznaczne określenie typu acetylacji u osób z heterozygotycznym typem acetylacji określonym metodą biologiczną, czego nie umożliwia metoda biologiczna.

Piśmiennictwo

1. Spurr N.K., Gough A.C., Chinegwundoh F.I. Polymorphism in long-metabolizing enzymes as modifiers of cancer risk. *Clin. Chem.* 1995; 41: 1864–1869.
2. Augustynowicz-Kopeć E., Zwolska Z., Niemirowska-Mikulska H. Biodostępność izoniazydu u zdrowych ochotników — szybkich i wolnych acetylatorów INH. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2002; 70: 167–179.
3. Hein D.W., Doll M.A., Fretland A.J. i wsp. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 I NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2000; 9: 29–42.
4. Deguchi T., Mashimo M., Suzuki T. Correlation between acetylator phenotypes and genotypes of polymorphic arylamine N-acetyltransferase in liver. *J. Biol. Chem.* 1990; 265 (22): 12 757–12 760.
5. Pawlik A., Mokrzycka M., Dąbrowska-Żamojcin E. i wsp. Porównanie polimorfizmu N-acetylacji (NAT2) u dzieci i u osób po 65. roku życia. *Prob. Tera. Monitor.* 2002; 13: 126–130.
6. Augustynowicz-Kopeć E., Zwolska Z. Typ acetylacji izoniazydu (INH) u chorych na gruźlicę leczonych w IGIChP w Warszawie w latach 1990–1997. Analiza wskaźników biologicznej dostępności i acetylacji INH u szybkich i wolnych acetylatorów. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2002; 70: 180–192.
7. Czech E., Hartleb M. Alkoholowa i niealkoholowa stymulacja wątrobowego cytochromu P4502E1; konsekwencje biochemiczne, farmakologiczne i patofizjologiczne. *Gastroenterol. Pol.* 2005; 12: 419–429.
8. Evans D.A.P. Genetic variations in acetylation of isoniazid and other drugs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1968; 151: 723–733.
9. Holdiness M.R. Clinical pharmacokinetics of the antituberculosis drugs. *Clin. Pharmacokinetics* 1984; 9: 511–544.
10. Orzechowska-Juzwenko K., Milejski P. Genetycznie uwarunkowane zaburzenia kinetyki leków i ich kliniczne znaczenie. *Pol. Tyg. Lek.* 1984; 39: 1687–1690.
11. Butcher N.J., Boukouvala S., Sim E. i wsp. Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferase. *Pharmacogenomics J.* 2002; 2: 30–42.
12. Kinzing-Schippers M., Tomalik-Scharte D., Jetter A. i wsp. Should we use N-acetyltransferase type 2 genotyping to personalize isoniazid doses? *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49: 1733–1738.
13. Zwolska Z., Niemirowska-Mikulska H., Augustynowicz-Kopeć E. i wsp. Wyniki badania u zdrowych ochotników biodostępności ryfampicyny i izoniazydu z polskiej kapsułki dwulejkowej do leczenia gruźlicy Rifamazid. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1998; 66: 198–206.
14. Zwolska Z., Niemirowska-Mikulska H., Augustynowicz-Kopeć E. Wpływ pożywienia na biologiczną dostępność izoniazydu (INH) u zdrowych ochotników. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1998; 66: 412–421.