

BARBARA OWCZARCZYK, JERZY MAZURCZAK

Badania nad zastosowaniem nowego antymetabolitu kwasu foliowego w profilaktyce zakażeń bakteryjnych.

Cz. I. Obserwacje nad efektem bakteriostatycznym kompleksu 2,4-dwuamino-6-hydroksy-pirymidynolu z 2-metylo-1,4-naftochinonem

Z Instytutu Zoologii i Profilaktyki w Produkcji Zwierzęcej Wydziału Zootechnicznego SGGW-AR w Warszawie

Praktyczne zastosowanie antymetabolitów kwasu foliowego (AKF) sprowadza się do wykorzystywania ich jako związków potęgujących efekt bakteriostatyczny lub bakteriobójczy sulfonamidów. Znalazły one również zastosowanie jako leki w schorzeniach pasożytniczych i pierwotniaczych. Bada się wykorzystanie AKF jako cytostatyków.

Istotne znaczenie mają badania zmierzające w kierunku poszukiwania AKF o określonej selektywności, która polega na wybiórczym inaktywowaniu reduktaz kwasu foliowego (FA) w biogenezie tego kwasu, specyficznej tylko dla komórek bakteryjnych lub tylko dla komórek zwierzęcych. W przeciwnym razie efekt terapeutyczny AKF nie ma praktycznego znaczenia, gdyż stają się one szkodliwe dla obu rodzajów komórek.

Poszukiwania nowych AKF, mogących znaleźć praktyczne zastosowanie w terapii zwierząt i ludzi, opierają się na założeniu, że związki o ogólnym wzorze przedstawionym na ryc. 1 posiadają właściwości AKF (10, 11, 14). Zastosowanie ich w lecznictwie uwarunkowane jest jednak chemiczną strukturą podstawników w pozycji C-5 i C-6 pierścienia. Mimo licznych badań nad działaniem AKF, kompleks

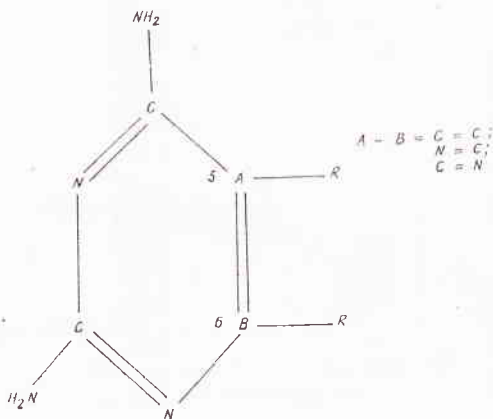
będący przedmiotem badań własnych nie był dotychczas syntetyzowany i opisywany w aspekcie jego aktywności jako AKF. Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że w większości badań nad aktywnością struktur pierścienia pirymidynowego z różnymi podstawnikami w pozycji C-5 i C-6, dobierano je w sposób empiryczny i najczęściej były to struktury same nie wykazujące aktywności biologicznej. Opisywany kompleks charakteryzuje się tym, że pierścień pirymidynolu kompleksowano ze znanym związkiem biologicznie czynnym (witamina K₃). Zakładano również, że kompleks ten może być antymetabolitem kwasu foliowego o odmiennych właściwościach niż dotychczas znane tego typu związki, jak na przykład trimetoprim (TMP), którego mechanizm działania w stosunku do reduktaz kwasu foliowego został już wyjaśniony.

Z przeglądu piśmiennictwa wynika także, że większość badań nad wpływem podstawionych 2,4-dwuaminopirymidyn na wzrost testowych drobnoustrojów prowadzono na podłożach bogatych w organiczne związki, witaminy i niektóre koenzymy. W takich warunkach wielokrotnie rejestrowano efekt bakteriobójczy badanych AKF (12, 13). W badaniach własnych użyto podłoży minimalnych, zawierających tylko sole mineralne i glukozę jako jedyne źródło węgla dla wzrostu modelowego szczepu *E. coli* używanego w badaniach. Ten aspekt metodyczny postępowania różni nasze badania od dotychczas opisywanych i równocześnie ułatwia interpretację otrzymanych wyników.

Materiał i metody

Badany związek o charakterze kompleksu (2,4-dwuamino-6-hydroksypirymidyny z 2-metylo-1,4-naftochinonem, określony dalej skrótem HPN) uzyskano z dość wiadczącej syntezy*). Do badań stosowano związek przekrystalizowany o 99% czystości, scharakteryzowany stosowanymi do tych celów rutynowo metodami fizyko-chemicznymi.

*) Autorzy składają podziękowanie Grodziskim Zakładom Farmaceutycznym „POLFA” za wykonanie syntezy oraz przeprowadzenie badań analitycznych.



Ryc. 1. Pierścień 2,4-dwuaminopirymidyny z zaznaczonymi pozycjami C-5 i C-6

Modelowym obiektem badań był szczep *E. coli* 743 (O20:K), patogenny dla bydła**). Do hodowli szczepu używano następujących podłoży: podłoże minimalne (M-9), przygotowywane wg K. Larka i wsp. (16), które w kolejnych doświadczeniach uzupełniano hydrolizatem kazeiny w ilości 0,1%, oznaczane w tekście symbolem M-9-K i podłoże M-9 uzupełniane hydrolizatem kazeiny z dodatkiem zasad purynowych o symbolu M-9-KP.

Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C z wstrząsaniem w warunkach tlenowych. Inoculum wynosiło 10^5 – 10^6 komórek w 1 ml podłoża. Ilość tę otrzymywano poprzez rozcieńczenie 18-godzinnej hodowli na podłożu M-9. Wzrost hodowli obserwowano w ciągu 7 godzin od momentu zaszczenia podłoża. Liczbę żywych komórek w 1 ml podłoża obliczano metodą rozcieńczeń poprzez wysiewanie na podłoże stałe w płytkach Petriego, zawierających 3% bulion mięsny z 2% agarem. Wysiew na podłoża stałe wykonywano po 7 godzinach.

W opisywanych badaniach przeprowadzono kolejno trzy doświadczenia, które dotyczyły:

a) określenia właściwości bakteriostatycznych i bakteriobójczych HPN w stosunku do modelowego szczepu na podłożu M-9 (I doświadczenie),

b) badania te powtórzono na podłożach M-9-K i M-9-KP (II doświadczenie),

c) przeprowadzono oznaczenia interakcji FA i HPN w porównaniu do interakcji TMP i FA (III doświadczenie).

Celem tak zaplanowanych doświadczeń było porównanie efektu bakteriobójczego lub bakteriostatycznego badanego związku do analogicznych efektów uzyskiwanych po stosowaniu TMP.

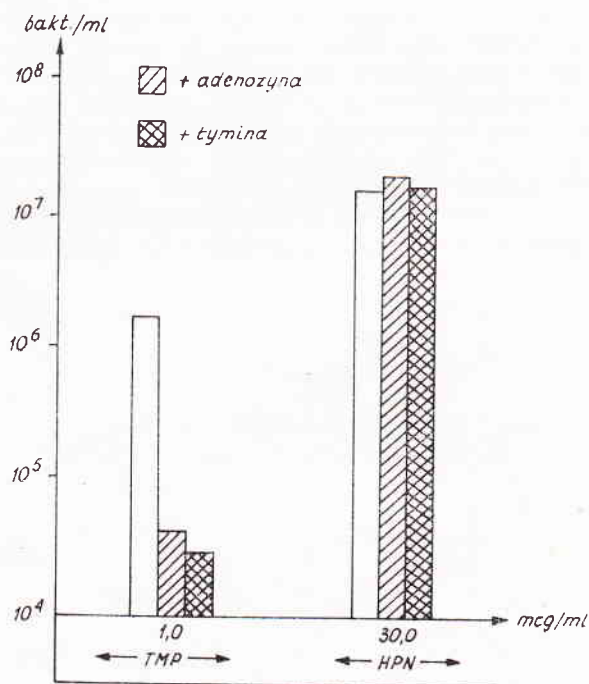
Wyniki badań

W prowadzonych badaniach punktem odniesienia był TMP. Otrzymane wyniki po stosowaniu HPN porównywano zawsze do znanego w swym działaniu AKF jakim jest TMP. Wyniki pierwszego doświadczenia wykazały, że na podłożu M-9 zarówno jeden jak i drugi związek nie wykazują działania bakteriobójczego nawet wówczas, gdy stężenie ich wynosi 200 mcg/ml. Efekt bakteriostatyczny na podłożu M-9 był różny dla obu badanych związków. TMP efekt ten wykazywał już przy stężeniu 1,0 mcg/ml, natomiast HPN przy stężeniu 30 mcg/ml nie wykazywał takiego działania. Ponieważ następnym badanym stężeniem było 200 mcg/ml, przy którym uzyskiwano już efekt bakteriostatyczny, nie określano dokładnie stężenia granicznego, przy którym pojawia się efekt bakteriostatyczny dla HPN, gdyż informacja ta w toku prowadzonych badań nie miała większego znaczenia. Stwierdzono jednak, że zachodzą istotne różnice w działaniu obu związków w warunkach minimalnego podłoża M-9 na wzrost *E. coli*.

W kolejnym II doświadczeniu wykorzystano doniesienia, z których wiadomo, że wzbogacenie podłoża hydrolizatem kazeinowym zmienia efekt bakteriostatyczny TMP na efekt bakteriobójczy (1, 17). W tym przypadku interesujące były obserwacje nad zachowaniem się HPN w środowisku wzbogaconym.

Wyniki drugiego doświadczenia nie potwierdziły danych piśmiennictwa, gdyż nie uzyskano zmiany efektu TMP w okresie logarytmicznej fazy wzrostu testowanego szczepu *E. coli*. Efekt bakteriostatyczny TMP obserwowano począwszy od stężenia 1,0 mcg/ml. Potwierdzono również wyniki poprzedniego doświadczenia: dla HPN efekt bakteriostatyczny uzyskuje się dopiero przy stężeniu 200 mcg/ml. A zatem niezależnie od podłoża stwierdza się różny poziom MIC dla badanych związków. Nie zależy on także od składu stosowanego podłoża.

Z badań nad TMP i innymi tego typu związkami wiadomo, że efekt bakteriobójczy jest wynikiem zniesienia aktywności jednej z reduktaz FA (3, 4, 6), a tym samym zablokowania jednego z etapów biogenezy DNA, związanego z biosyntezą tymidyny. Z tych względów jest zrozumiałe, że efekt bakteriobójczy TMP może mieć miejsce tylko w takim podłożu, w którym znajduje się pełny zestaw aminokwasów oraz zasady purynowe lub odpowiednie nukleozydy z wyjątkiem tyminy i tymidyny. We własnych doświadczeniach zastosowano dodatek adenozyiny i inozyiny, ponieważ w myśl przedstawionych poglądów, należy oczekiwać wyraźnej zmiany aktywności TMP, to znaczy wystąpienia efektu bakteriobójczego w logarytmicznej fazie wzrostu testowego szczepu. Efekt taki dla TMP potwierdzają cytowane badania innych autorów, natomiast HPN w warunkach podłoża wzbogaconego zasadami purynowymi (M-9-KP) wykazywał nadal działanie bakteriostatyczne, nie wpływając w sposób istotny na wzrost 7-godzinnej hodowli badanego szczepu.



Ryc. 2. Efekt bakteriostatyczny i bakteriobójczy badanych związków w zależności od stosowanych dodatków do podłoża M-9-KP

***) Szczep uzyskano z kolekcji Drobnoustrojów Zakładu Mikrobiologii IW Puławy.

Wynik ten rejestrowany w wielokrotnych powtórzeniach wykazał, że badany związek zachowuje się w stosunku do testowego *E. coli* odmiennie od TMP. Wyniki doświadczenia przedstawia ryc. 2.

Odmienne zachowanie się HPN w porównaniu do TMP na podłożu M-9-KP sugerowało, że badany związek może mieć cechy AKF o odmiennym mechanizmie działania niż opisywane do tej pory antymetabolity. Dla potwierdzenia tej sugestii w trzecim doświadczeniu porównywano wzrost modelowego szczepu *E. coli* na kazeinowym podłożu M-9 w warunkach, kiedy badane związki dodawano do podłoża wraz z FA w stężeniu 0,05 mcg/ml podłoża. Wyniki tego doświadczenia przedstawia ryc. 3.

Jak z przedstawionego schematu wynika i w tym doświadczeniu obserwuje się odmienną reakcję obu badanych związków. TMP w stężeniu 1 i 10 mcg/ml wykazuje działanie bakteriostatyczne w obecności FA, natomiast HPN w stężeniach 30 i 200 mcg/ml nie wpływa w istotny sposób na wzrost drobnoustrojów.

Omówienie wyników

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń należy stwierdzić, że badany przez nas związek można określić mianem antymetabolitu kwasu foliowego. Do takiego twierdzenia upoważniają przeprowadzone doświadczenia.

Pierwsze doświadczenie miało na celu sprawdzenie działania HPN w porównaniu do TMP w analogicznych warunkach. Oba związki na podłożu minimalnym M-9 zachowywały się podobnie powodując bakteriostazę, z tym, że MIC dla obu związków różni się dwustukrotnie. AKF typu TMP wykazują działanie bakteriostatyczne i efekt ten został wielokrotnie potwierdzony w piśmiennictwie (1, 17). Mechanizm działania TMP między innymi polega na obniżaniu komórkowej puli koenzymów kwasu czterohydrofoliowego, niezbędnych do syntezy tymidyny, puryn, niektórych aminokwasów i formylacji met-t-RNA (5, 9, 11, 15).

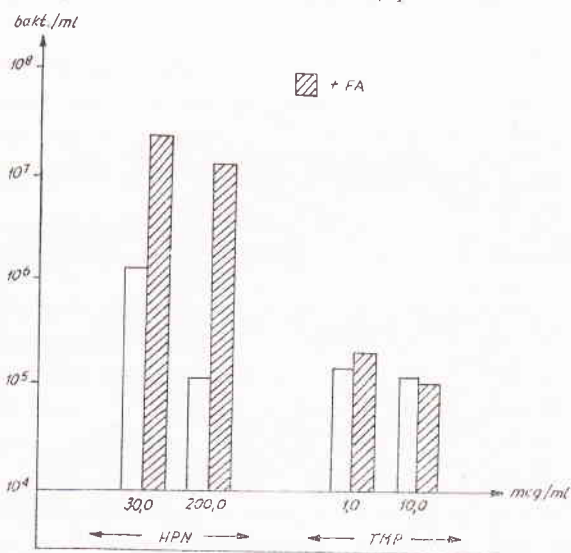
W obecności aminokwasów reakcje katalizowane przez hydroksymetylazę serynową i syntetazę metioniny nie są konieczne do uzupełnienia puli aminokwasowej w syntezie białka komórkowego. W środowisku pozbawionym aminokwasów, jak miało to miejsce w naszych badaniach na podłożu M-9, zablokowanie reakcji katalizowanych przez oba enzymy powoduje brak glicyny, metioniny i seryny, co w konsekwencji prowadzi do zatrzymania biosyntezy białka komórkowego. W tej sytuacji komórki nie dzielą się, a procesy przemianowe są utrzymywane na minimalnym poziomie. Prawdopodobnie gwałtowne zahamowanie syntezy własnych białek komórki chroni ją przed śmiercią w tych niekorzystnych warunkach, umożliwiając jednak utrzymanie się przy życiu

poprzez podtrzymywanie podstawowych procesów życiowych (4).

Stwierdzono także, że uzupełnianie podłoża zestawem aminokwasowym (kazeina) nie wpływa na zmianę aktywności badanych związków w stosunku do testowego szczepu *E. coli*.

Utrzymywanie się efektu bakteriostatycznego dla TMP w warunkach wzbogaconego podłoża można uznać za zgodne z poglądami tych autorów, którzy stwierdzają, że większość inhibitorów reduktazy kwasu dwuhydrofoliowego nie wykazuje działania bezpośredniego, wyrażającego się działaniem bakteriobójczym, natomiast w różnym stopniu zmniejsza przeżywalność drobnoustrojów (2, 9). Należy podkreślić, że efekt działania TMP uzależniony jest od indywidualizmu biochemicznego szczepu bakteriynego (13). W świetle własnych obserwacji można wnioskować, że stosowany szczep *E. coli* jest oporny na bezpośrednie działanie zarówno TMP jak i HPN, bowiem w środowisku niedoboru aminokwasów jak i w warunkach kiedy dodano do podłoża potrzebny zestaw aminokwasów, szczep używany do tych badań nie był podatny na działanie obu związków. Oporność badanego szczepu była większa w stosunku do HPN.

W kolejnym doświadczeniu wykazano, że dodatkowe uzupełnienie podłoża nukleozydami purynowymi powoduje silne działanie bakteriobójcze TMP w stosunku do szczepu testowego i wówczas MIC wynosi 0,1 mcg/ml podłoża. Ten wynik doświadczenia potwierdza wcześniejsze doniesienie (1) mówiące, że dodawanie puryn powoduje odnowienie biosyntezy białka komórkowego pierwotnie hamowanej przez TMP. Jednocześnie w wyniku zahamowania reakcji katalizowanej przez syntetazę tymidylanową następuje śmierć komórki. Można więc powiedzieć, że puryny wykazują synergistyczne działanie z TMP. Opisanego wyżej efektu nie wykazano dla HPN. Na tej podstawie moż-



Ryc. 3. Wpływ FA na wzrost testowego szczepu w obecności HPN lub TMP na podłożu M-9-K

na sądzić, że mechanizm działania HPN jako AKF jest odmienny od opisywanych dotychczas mechanizmów działania dla takich związków jak TMP. Dodatkowym potwierdzeniem przedstawionej tezy są wyniki uzyskane w III doświadczeniu, w którym wykazano, że zahamowanie wzrostu modelowego szczepu pod wpływem TMP nie jest odwracane przez FA, natomiast zjawisko to zachodzi w stosunku do HPN. Ten wynik potwierdza dane z piśmiennictwa o wielokierunkowym działaniu TMP.

Działanie to polega na inhibowaniu reakcji enzymatycznych w różnych punktach biogenezy FA (2, 11, 13, 15). Franklin (7, 8) wykazał, że zahamowanie wzrostu *E. coli* wywołane działaniem 0,02 mcg/ml aminopteryny nie było odwracalne w następstwie równoczesnego dodawania do podłoża FA w stężeniu 0,4 mcg/ml. Dodawanie do podłoża tymidyny w mniejszym stężeniu (0,01 mcg/ml) było wystarczające, aby przywrócić prawidłowy wzrost badanych komórek bakteryjnych. Jak z tego wynika zahamowanie wzrostu drobnoustrojów przez TMP może być znoszone po dodaniu FA do podłoża, jednakże proces ten nie jest wynikiem bezpośredniej reakcji, lecz zachodzi pod wpływem produktów powstających w wyniku działania koenzymów kwasu czterohydrofaliowego (2, 15).

W świetle przedstawionych wyników badań oraz danych z piśmiennictwa można twierdzić, że badany związek HPN wykazuje cechy AKF o odmiennym mechanizmie działania niż dotychczas podaje literatura w odniesieniu do znanych już analogów kwasu faliowego, jakimi są struktury 2,4-dwuaminopirymidyn.

Faktem jest, że HPN wykazuje swe działanie bakteriostatyczne dopiero wówczas, gdy stężenia są duże, tym niemniej uzyskiwany efekt powstaje w innym mechanizmie niż analogiczny efekt wywoływany przez TMP w stosunku do tego samego modelowego szczepu *E. coli*.

Piśmiennictwo

1. Angehrn P., *Then R.*: *Arzneim.-Forsch. (Drug. Res.)* 23, 447, 1973.
2. Blakeley R. L.: *Biochemistry of folic acid and related pteridines*, North-Holland, 1969.
3. Cohen S. S., *Barnet H. D.*: *J. Bacteriol.*, 71, 588, 1956.
4. Cohen S. S.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 186, 292, 1971.
5. Dale B. A., *Greenberg G. R.*: *J. Bacteriol.*, 110, 905, 1972.
6. Dunlap R. B., *Harding M. D.*: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 196, 153, 1971.
7. Franklin A. L., *Stokstad E. L. R., Belt M., Jukes T.H.*: *J. Biol. Chem.*, 169, 427, 1947.
8. Franklin A. L., *Belt M., Stokstad E. L. R., Jukes T. H.*: *J. Biol. Chem.*, 177, 621, 1949.
9. Harvey R. J.: *J. Bacteriol.* 114, 309, 1973.
10. Hitchings G. H., *Falco E. A., Elion G. B., Singer S.*: *Arch. Biochem. Biophys.*, 40, 479, 1952.
11. Hitchings G. H., *Burchall J. J.*: *Adv. in Enzymology*, 27, 417, 1965.
12. Hitchings G. H., *Burchall J. J., Ferone R.*: *Sym. Soc. Gen. Microbiol.* 294, 1966.
13. Hitchings G. H., *Burchall J. J., Ferone J.*: *Proc. 3th Intern. Pharm. Meeting, Sao Paulo*, 5, 3, 1966.
14. Hitchings G. H.: *Trans N. Y. Acad. Sci.* 23, 700, 1960/61.
15. Jukes T. H., *Broquist H. P.*: *Sulfonamides and folic acid antagonists*. In „Metabolic Inhibitors”, 1, 481, Academic Press, New York, 1963.
16. Lark K. G., *Repko T., Hoffman E. J.*: *Biochim. Biophys. Acta*, 76, 9, 1963.
17. *Then R. Angehrn P.*: *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*, 23, 451, 1973.

Adres autora: Barbara Owczarczyk, ul. Akermańska 1/15, Warszawa.

Овчарчик Б., Мазурчак Е. — Исследование по применению нового антиметаболита фолиевой кислоты в профилактике бактериальных инфекций. Ч. I. Наблюдения за бактериостатическим эффектом комплекса 2,4-диамино-6-гидроксипиримидина с 2-метил-1,4-нафтохиноном.

Исследования касались биологической активности комплексного соединения 2,4-диамино-6-гидроксипиримидина с 2-метил-1,4-нафтохиноном (HPN), полученным из экспериментального синтеза. Исследовали рост тестового штамма *E. coli* в присутствии HPN на минимальных культурах, пополняемых в очередных опытах казеином, пуриновыми нуклеозидами или фолиевой кислотой. На основании проведенных опытов следует утверждать, что исследуемое соединение можно определить как антиметаболит фолиевой кислоты. Исследования подтверждают, что в культуре М-9 или М-9, обогащенной казеиновым гидролизатом, HPN ведет себя похоже как триметоприм (TMP), давая МИС в концентрации 200 раз выше чем TMP. Механизм действия HPN отличается, вероятно, от этого доказанного для TMP. о чем свидетельствует различное поведение HPN и TMP на культуре М-9, пополненной пуриновыми нуклеозидами или фолиевой кислотой.

Owczarczyk B., Mazurczak J. — Examinations of the use of a new antimetabolite of folic acid in the prophylaxis of bacterial infections. I. Observations on the bacteriostatic effect of 2,4-methyl-diamine-6-hydroxypirimidine connected with 2-methyl-1,4-naphtachinone.

The examinations concerned the biological activity of the complex, i.e. 2,4-diamine-6-hydroxypirimidine and 2-methyl-1,4-naphtachinone (HPN) received by experimental synthesis. The development of *E. coli* strain at the presence of HPN on the minimal media supplemented with caseine, purine nucleosides of folic acid was tested. On the basis of the experiments it was found that the compound examined behaved like an antimetabolite of folic acid. This was confirmed by examinations in which HPN introduced to the medium M-9 or M-9 supplemented with casein hydrolysate did like trimetoprim (TMP); however MIC was stated at the concentration 200 times higher than that of TMP. The mechanism of the HPN action was different from TMP because its behaviour in the medium M-9 with purine nucleosides was also distinct.

NAYAR P. S. G., WARD G. E., SAUNDERS J. R., MC WILLIAMS P.: *Metody diagnostyczne stosowane przy doświadczalnym zakażeniu bydła Hemophilus somnus. (Diagnostic procedures in experimentally Hemophilus somnus infection in cattle)*. *Can. vet. J.* 18, 159—163, 1977 (6).

U cieląt zakażonych dożylnie oraz drogą aerogenną 9×10^7 — 18×10^7 komórek *Hemophilus somnus* rozwijała się posocznica o nadoстрым lub ostrym przebiegu. Natężenie objawów i przebieg choroby zależały od wielkości dawki zakaźnej oraz wieku cieląt. Najcięższe objawy chorobowe występowały u cieląt młodych zakażonych dożylnie najwyższą dawką zarazka. U padłych sztuk, zmiany zakrzepowo-zatorowe występowały w mózgu, płucach i mięśniach. Na czoko objawów klinicznych wysuwała się depresja, ospałość, wodnisty wyciek z oczu i nozdrzy, gorączka, drżenie mięśni, osłabienie ruchów żwacza. Z krwi 6 z 7 zakażonych zwierząt po 24 godz. po zakażeniu wyosobniono w czystej hodowli *H. somnus*. Z płynu mózgowo-rdzeniowego zarazek wyosobniono po 30, ze stawów po 48 godzinach po zakażeniu. U zakażonych zwierząt aktywność fosfokinazy kreatyniny w płynie mózgowo-rdzeniowym wzrastała około 10 krotnie.

G.