

76. Metallionen und Resistenzbildung bei Tbc-Kulturen.

Metallionen und biologische Wirkung, 22. Mitteilung¹⁾

von H. Erlenmeyer, S. Fallab, B. Prijs und W. Roth.

(28. I. 54.)

In der Reihe der Hydrazide von heterocyclischen Verbindungen mit aromatischer Struktur sind neben dem Isonicotinsäurehydrazid (INH) noch andere, z. B. das Picolinsäurehydrazid und das Thiazol-2-carbonsäurehydrazid tuberkulostatisch wirksam²⁾.

Die Beobachtung, dass es möglich ist, die Aktivität des INH durch andere Hydrazide wie Thiophen-2-carbonsäure-hydrazid und Benzhydrazid, welch letztere selbst keine ausgesprochene Aktivität zeigen, herabzusetzen^{2,3)} und sodann aber die Aktivität durch Zusatz von Metallionen, z. B. von Cu⁺⁺, wieder herzustellen⁴⁾, machte es erwünscht, auch das Verhalten des Picolinsäurehydrazids und des Thiazol-2-carbonsäurehydrazids unter ähnlichen Bedingungen zu überprüfen.

Solche Untersuchungen waren von besonderem Interesse, da sich gezeigt hat, dass die erwähnte, durch Cu⁺⁺ ausgelöste Aktivität des INH-Thiophencarbonsäurehydrazidsystems auch nach 10 Tagen noch erhalten bleibt, d. h., dass das — für INH ohne Zusatz charakteristische — auf eine Resistenzbildung zurückgeführte Wachstum unter solchen Bedingungen ausbleibt⁵⁾.

Besonders bemerkenswert war die Beobachtung, dass bereits ein Zusatz von Co⁺⁺ allein zu einer INH enthaltenden Kultur genügt, um gleichfalls die Ausbildung dieser Resistenz weitgehendst zu verhindern⁶⁾. Der aus INH und Co⁺⁺ sich bildende Komplex konnte nunmehr isoliert werden.

¹⁾ 21. Mitteilung: S. Fallab, Über das komplexchemische Verhalten von aromatischen Carbonsäurehydraziden. Exper. **10**, Aprilheft (1954), im Druck.

²⁾ G. Carrara, F. M. Chiancone, V. D'Amato, E. Ginoulhiac, C. Martinuzzi, U. M. Teotino & N. Visconti, G. **82**, 652 (1952); H. C. Beyerman & J. S. Bontekoe, R. **72**, 262 (1953).

³⁾ Vgl. auch M. B. King, R. Knox & R. C. Woodroffe, Lancet **264**, 573 (1953).

⁴⁾ W. Roth, G. Carrara & H. Erlenmeyer, Helv. **36**, 1004 (1953); W. Roth & H. Erlenmeyer, Helv. **37**, 95 (1954).

⁵⁾ R. Knox, M. B. King & R. C. Woodroffe, Lancet **263**, 854 (1952), die berichten, dass INH im Dubos-Medium mit der Zeit sich zersetzt, nehmen daher eine Ablesung bereits nach 14 Tagen vor. Die Autoren haben aus solchen Kulturen INH-resistente Stämme isoliert, die auch nach 6 Folgekulturen noch resistent waren. Dieser letztere wesentliche Punkt, s. insbesondere I. c. S. 856, wurde von R. Bönicke & W. Reif, Naturwiss. **40**, 606 (1953), die die Unbeständigkeit von INH in Nährmedien überprüften, nicht genügend berücksichtigt.

⁶⁾ W. Roth & H. Erlenmeyer, Helv. **37**, 95 (1954).

Dass dieses nach 10 Tagen auftretende Wachstum in Gegenwart von INH allein im wesentlichen einem Resistantwerden der Kultur gegenüber INH zuzuschreiben ist, geht aus dem Verhalten von Folgekulturen hervor, die, wie der folgende Versuch zeigt, stets bereits am 10. Tag und bei hohen INH-Dosen ein stärkeres Wachstum zeigen.

Versuch: Eine Tbc-Kultur, Stamm *Vallée*, zeigte im *Kirchner*-Milieu bei der 10-Tage-Ablesung Wachstumshemmung noch bei einer INH-Konzentration von m/1000000.

Aus den bei m/10000 und m/20000 INH nach 3 Wochen gewachsenen Kulturen wurde das Inokulum für neue Kulturen entnommen. Bei solchen Folgekulturen zeigte die Ablesung nach 10 Tagen, dass auch in Gegenwart von m/5000 INH normales Wachstum auftritt.

Versuche zur Ermittlung der tuberkulostatischen Aktivität des Picolinsäurehydrazids bzw. des Thiazol-2-carbonsäurehydrazids und der Beeinflussung dieser Aktivität durch Zusatz von Thiophen-2-carbonsäurehydrazid und von Cu⁺⁺ und einer Kombination dieser beiden Komponenten sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1.
Tbc, Stamm H₃₇R_v, *Kirchner*-Milieu.

	Total hemmende Grenz-konzentration am 10. Tag	am 21. Tag
Picolinsäurehydrazid	m/20000	m/5000
Picolinsäurehydrazid + Thiophen-2-carbonsäure-hydrazid m/5000	m/5000	m/5000
Picolinsäurehydrazid + Cu ⁺⁺ m/20000	m/20000	m/5000
Picolinsäurehydrazid + Thiophen-2-carbonsäure-hydrazid m/5000 + Cu ⁺⁺ m/20000	m/500000	m/500000
Thiazol-2-carbonsäurehydrazid	m/50000	m/20000
Thiazol-2-carbonsäurehydrazid + Thiophen-2-carbon-säurehydrazid m/5000	m/20000	m/20000
Thiazol-2-carbonsäurehydrazid + Cu ⁺⁺ m/20000	m/100000	m/20000
Thiazol-2-carbonsäurehydrazid + Thiophen-2-carbon-säurehydrazid m/5000 + Cu ⁺⁺ m/20000.	m/1000000	m/1000000

Sowohl beim Picolinsäurehydrazid als auch beim Thiazol-2-carbonsäurehydrazid nimmt die Wirkung — ähnlich wie beim INH — nach dem 10. Tage ab; ein Zusatz von Thiophencarbonsäurehydrazid übt auch bei diesen beiden Verbindungen einen antagonistischen Effekt auf die — in der 10-Tage-Ablesung zu ermittelnde — Wirkung aus.

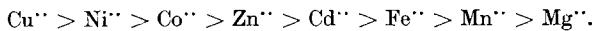
Ein Zusatz von Cu⁺⁺ hebt nun auch hier diesen Antagonismus auf und bewirkt sogar eine deutliche Verstärkung der Wirkung; was auch bei dieser Kombination wieder besonders auffällt, ist das Ausbleiben des nach 10 Tagen sonst auftretenden, durch Resistenzbildung gedeuteten Wachstums.

Diese Ergebnisse und die in früheren Versuchen mit INH erhaltenen Resultate bieten nun vielleicht die Möglichkeit, einen zur Resistenzbildung führenden Mechanismus zu verstehen, indem der Einfluss, den z. B. das Thiophen-2-carbonsäurehydrazid auf die tuberkulo-

lostatische Aktivität des INH zeigt und der in einer Aufhebung bzw. Herabsetzung dieser Aktivität besteht, in seiner Wirkung als eine Art künstliche Resistenz der Tbc-Kulturen gegenüber der Einwirkung von INH aufgefasst werden kann.

Zur Deutung dieser mit INH, Picolinsäurehydrazid und Thiazol-2-carbonsäurehydrazid einerseits, sowie Thiophen-2-carbonsäurehydrazid, Benzhydrazid, Cu⁺⁺ und Co⁺⁺ andererseits zu erzielenden Wechselwirkungen seien folgende Überlegungen angeführt, die, wie dies bei der Interpretation solcher komplizierter Vorgänge nicht anders möglich ist, nur als Arbeitshypothese zu bewerten sind.

Bei verschiedenen, zur komplexen Bindung von Metallionen befähigten Verbindungstypen hat sich in bezug auf eine grössere Reihe von Metallionen gezeigt, dass in betreff der Beständigkeit der gebildeten Metallkomplexe für die verschiedenartigsten Verbindungstypen die gleiche Reihenfolge gilt¹⁾. Diese Reihe ist



Innerhalb der angeführten Ionenreihe wird von allen untersuchten organischen Verbindungen Cu⁺⁺ stets am stärksten komplex gebunden; dementsprechend vermag, wie bereits Pfeiffer²⁾ gezeigt hat, Cu⁺⁺ andere schwächer gebundene Metallionen aus einer komplexen Bindung zu verdrängen. Da nun fast alle Ionen dieser Reihe von biologischer Bedeutung sind – insbesondere haben sich zahlreiche Fermente als metallhaltig erwiesen –, ist damit für die Organismen die Notwendigkeit aufgezeigt, einmal die in den natürlichen Substraten vorhandenen Konzentrationsverhältnisse der Metallionen in das für das biologische Geschehen notwendige Konzentrationsverhältnis umzuformen und sodann die im Organismus schwächer komplex gebundenen Metallionen vor der Verdrängung durch die stärker komplexbildenden Ionen zu schützen. Als giftig in diesem Sinne wäre in dieser Reihe besonders Cu⁺⁺ zu nennen, das aber andererseits auch für gewisse Fermente vom Organismus benötigt wird.

Für die Fermente kann man auf Grund der bisherigen Untersuchungen vermuten, dass – wohl bedingt durch die besondere Bindungsart – die Geschwindigkeit der Austauschreaktion grössere Werte nur während der Reaktion des Fermentes mit Substrat oder substratähnlichen Partikeln annimmt.

Dass nun der Wirkungsmechanismus gewisser bakteriostatisch aktiver Verbindungen in diesem Sinne als eine Reaktion mit substratähnlichen Verbindungen gedeutet werden kann, und dass das Resultat dieser Reaktion in der Ausbildung von insbesondere kupferhaltigen Fermenten zu suchen ist, wurde aus der Beobachtung abgeleitet, dass

¹⁾ D. P. Mellor & L. Maley, Nature **159**, 370 (1947); **161**, 436 (1948); vgl. hierzu die kritische Zusammenfassung von H. Irving & R. J. P. Williams, Soc. **1953**, 3192.

²⁾ P. Pfeiffer, H. Thielert & H. Glaser, J. pr. **152**, 145 (1939).

die bakteriostatische Wirkung gewisser Verbindungen durch Zusatz von Cu⁺⁺ verstärkt und bei anderen in vitro- und in vivo-Versuchen erst durch einen solchen Zusatz ausgelöst wird¹⁾.

Auch die Beobachtung von *S. D. Rubbo, A. Albert & N. I. Gibson*²⁾, wonach die Wirkung von Oxin auf Staphylokokken-Kulturen in einem künstlich ionenarm gemachten Milieu ausbleibt und auf Zusatz von Cu⁺⁺ wieder auftritt, spricht für ein solches Zusammenwirken.

Die Möglichkeit, die Konzentration des Cu⁺⁺ zu regulieren, ist nun dem Organismus durch Eiweißverbindungen³⁾, Aminosäuren oder durch α -Oxysäuren, z. B. Zitronensäure, gegeben. Man muss annehmen, dass durch diese Verbindungen eine weitgehendste Pufferung der Konzentration der schädlichen Metallionen im Organismus möglich ist.

Die Wirkung von bakteriostatischen Verbindungen, deren Aktivität mit dem Vorhandensein von Metallionen verbunden ist, kann als dann in einer Übertragung der Metallionen aus solchen Puffersystemen auf die Fermentsysteme gesucht werden.

Dass eine solche Ablösung oder Übertragung von Cu⁺⁺ durch INH z. B. von einem Kupfer-Aminosäurekomplex erfolgt⁴⁾, insbesondere, wenn ein „Rezeptor“ für das Cu⁺⁺ vorhanden ist, lässt sich aus den folgenden Versuchen ableiten:

1. Eine wässrige Lösung des Alanin-Kupfer-Komplexes, hergestellt mit Kupfersulfat, wird mit INH-Lösung versetzt. Es fällt sofort das schwer lösliche INH-Cu-Salz aus. Als „Rezeptor“ wirkt hier das sehr stabile Gitter des Cu-INH-Komplexsalzes vom Typus RCuHSO_4 .

2. In einer verdünnten wässrigen Lösung des Alanin-Cu-Komplexes lässt sich bei Zugabe von INH die Bildung des INH-Cu-Komplexes durch eine Verstärkung der Bande bei 750 m μ spektrophotometrisch nachweisen.

Das komplexchemische Verhalten der für die vorliegende Diskussion wichtigen Hydrazide wurde neuerdings von *S. Fallab*⁵⁾ eingehend geprüft. Bereits früher⁶⁾ wurde für INH das Vermögen, Cu⁺⁺ zu binden, ermittelt. Auf Grund der neueren Messungen gelten für die Hydrazidreihe die folgenden Werte für k_1^* , d. i. das das Cu-Bindungsvermögen charakterisierende Produkt aus Dissoziationskonstante und Komplexbeständigkeitskonstante.

$\log k_1^*$	Benzhydrazid	Thiophen-2-carbonsäurehydrazid	INH	Thiazol-2-carbonsäurehydrazid
– 4,2		– 3,6	– 3,0	– 0,8

¹⁾ Vgl. *H. Erlenmeyer, J. Büümmer & W. Roth*, Helv. **36**, 941 (1953).

²⁾ Brit. J. exptl. Path. **31**, 425 (1950).

³⁾ *B. A. Köchlín*, Am. Soc. **74**, 2649 (1952).

⁴⁾ Siehe hierzu *A. Albert*, Exper. **9**, 370 (1953).

⁵⁾ L. c.

⁶⁾ *S. Fallab & H. Erlenmeyer*, Helv. **36**, 6 (1953).

Wenn auch in dieser Reihe die biologisch praktisch unwirksamen Hydrazide sich als die schwächeren Komplexbildner erwiesen haben, so ist, wie ein Vergleich der biologischen Aktivität von INH und Thiazol-2-carbonsäurehydrazid zeigt, nicht anzunehmen, dass für die Charakterisierung der biologischen Aktivität nur eine der an dem komplizierten Gleichgewicht beteiligten Konstanten ausreicht¹⁾.

Aber aus der für die Hydrazide ermittelten Fähigkeit, Cu⁺⁺ komplex zu binden, ist abzuleiten, dass, wenn ein Gemisch von INH mit einer grösseren Konzentration eines der biologisch weniger aktiven Hydrazide vorliegt, es zu einer Konkurrenzierung der beiden komplexchemisch ähnlichen Hydrazide sowohl in der Koordinationssphäre des Cu⁺⁺ als auch des Ferment-Metallions kommt.

Die durch Zusatz z. B. von Thiophencarbonsäurehydrazid zu einer INH enthaltenden Kultur bewirkte „künstliche Resistenz“ gegenüber der INH-Wirkung würde auf Grund dieser Überlegungen im wesentlichen auf eine Beanspruchung der Cu⁺⁺-Ionen durch eine zweite komplexchemisch ähnliche Verbindung zurückzuführen sein.

Bei den früher²⁾ mitgeteilten Versuchen wurde in einer Kultur, die m/5000 Thiophencarbonsäurehydrazid neben m/500 000 INH-Lösung enthält, Wachstum beobachtet. Die gleiche Konzentration von INH allein bewirkt totale Hemmung. Aus den oben angegebenen Konstanten für das Cu⁺⁺-Bindungsvermögen errechnet sich, dass die Cu⁺⁺-Komplexe dieser beiden Hydrazide in einem Konzentrationsverhältnis

$$\text{Cu}_{\text{INH}}/\text{Cu}_{\text{Thioph.-H}} = 4 \cdot 10^{-2}$$

vorliegen, d. h. nur 1/25 des komplex gebundenen Cu⁺⁺ befindet sich am INH, so dass bei den natürlichen, nicht sehr grossen Konzentrationen von Cu⁺⁺ die absolute Konzentration an INH-Kupfer-Komplex sehr klein wird.

Es steht nun zu vermuten, dass eine gleichartige Reaktion, d. h. Beanspruchung des Cu⁺⁺ durch einen anderen Komplexbildner, im Organismus auch auf natürlichem Wege, z. B. durch Vermehrung der die Cu⁺⁺- bzw. anderen Metall-Ionen puffernden biochemischen Verbindungen, bewirkt werden kann, womit ein einfacher Mechanismus für die Ausbildung einer Resistenz gegeben wäre. Die Beobachtung, dass einmal ein Zusatz einer grösseren Menge von Cu⁺⁺ die antagonistische Wirkung des Thiophencarbonsäurehydrazids, z. B. auf die INH-Aktivität, aufzuheben vermag, sowie dass zugleich hierbei die Ausbildung der Resistenz unterbleibt³⁾ und dass sogar Co allein einer INH-haltigen

¹⁾ Beim Thiazol-2-carbonsäurehydrazid ist neben der Komplexbildung der Hydrazidgruppe die Möglichkeit der Bildung eines 5-Rings mit dem Ring-Stickstoff zu berücksichtigen.

²⁾ W. Roth, G. Carrara & H. Erlenmeyer, I. c.

³⁾ Erwähnt sei, dass auch das Wachstum einer isolierten resistenten Kultur von einer solchen Kombination gehemmt wird.

Lösung zugefügt die Resistenzbildung einer Tbc-Kultur gegenüber INH verhindert, würde durch eine solche Vorstellung verständlich, da die Pufferung solcher erhöhter Metallionen-Konzentrationen durch den Organismus nicht mehr bewältigt werden könnte, so dass stets genügend Metallionen für die INH-Wirkung vorhanden sind.

Kobalt-Komplex des INH: Eine Lösung von INH in 50-proz. Alkohol wird mit überschüssiger, gesättigter wässriger Kobaltsulfatlösung geschüttelt. Der entstandene feine, kristalline Niederschlag wird abgenutscht und zur Entfernung von Kobaltsulfat mit viel Wasser ausgewaschen. Nach Trocknen am Vakuum erhält man ein feines, rotviolettes Kristallpulver der Formel $C_6H_6ON_3Co, HSO_4, 2H_2O$.

Co wurde titrimetrisch mit Komplexon I bestimmt; $SO_4^{''}$ wurde gravimetrisch ermittelt.

4,229 mg Subst. gaben 3,320 mg CO_2 und 1,420 mg H_2O
1,656 mg Subst. gaben 0,202 $cm^3 N_2$ (21° ; 739 mm)

$C_6H_7O_5N_3SCo, 2H_2O$	Ber. C 21,96	H 3,38	N 12,81	Co 17,96	$SO_4^{''}$ 29,27%
Gef. „ 21,42	„ 3,76	„ 13,77	„ 17,9	„ 29,17%	

Zusammenfassung.

Die tuberkulostatische Aktivität von Picolinsäure-hydrazid und Thiazol-2-carbonsäurehydrazid und ihre Beeinflussbarkeit durch Thio-phén-2-carbonsäurehydrazid und Cu⁺⁺ wird angegeben, und ein zur Resistenzbildung führender Mechanismus wird diskutiert.

Anstalt für anorganische Chemie
und Hygienische Anstalt der Universität Basel.

77. Über den Abbau der Harnsäure zur Oxonsäure (Allantoxansäure).

Vorläufige Mitteilung¹⁾
von Hans Brandenberger.

(I. II. 54.)

Bei der Oxydation der Harnsäure durch Wasserstoffsuperoxyd (oder Luftsauerstoff) in stark alkalischer Lösung entstehen die schön kristallisierenden Salze einer Verbindung $C_4H_3O_4N_3$, die unter den beiden Namen Oxonsäure und Allantoxansäure bekannt ist. Die freie Säure ist sehr unbeständig und zerfällt leicht in CO_2 und Allantoxaidin $C_3H_3O_2N_3$. Die heute allgemein gültigen Anschauungen über die Konstitution dieser zwei Abbauprodukte gehen zurück auf die Arbeiten

¹⁾ Vorgetragen am 6. September 1953 in der Sitzung der Schweiz. Chemischen Gesellschaft (Lugano), vgl. *H. Brandenberger, Chim. 7, 233 (1953)*.