

## 76. Metallionen und Resistenzbildung bei Tbc-Kulturen.

Metallionen und biologische Wirkung, 22. Mitteilung<sup>1)</sup>

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 wirksam<sup>2)</sup>.

Die Beobachtung, dass es möglich ist, die Aktivität des INH durch andere Hydrazide wie Thiophen-2-carbonsäurehydrazid und Benzhydrazid, welch letztere selbst keine ausgesprochene Aktivität zeigen, herabzusetzen<sup>2) 3)</sup> und sodann aber die Aktivität durch Zusatz von Metallionen, z. B. von  $\text{Cu}^{++}$ , wieder herzustellen<sup>4)</sup>, 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  $\text{Cu}^{++}$  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 ausbleibt<sup>5)</sup>.

Besonders bemerkenswert war die Beobachtung, dass bereits ein Zusatz von  $\text{Co}^{++}$  allein zu einer INH enthaltenden Kultur genügt, um gleichfalls die Ausbildung dieser Resistenz weitgehendst zu verhindern<sup>6)</sup>. Der aus INH und  $\text{Co}^{++}$  sich bildende Komplex konnte nunmehr isoliert werden.

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

<sup>2)</sup> 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).

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

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

<sup>5)</sup> 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 l. c. S. 856, wurde von R. Bönicke & W. Reif, Naturwiss. **40**, 606 (1953), die die Unbeständigkeit von INH in Nährmedien überprüften, nicht genügend berücksichtigt.

<sup>6)</sup> W. Roth & H. Erlenmeyer, Helv. **37**, 95 (1954).

Dass dieses nach 10 Tagen auftretende Wachstum in Gegenwart von INH allein im wesentlichen einem Resistenzwerden 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/1 000 000.

Aus den bei m/10 000 und m/20 000 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/5 000 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  $\text{Cu}^{++}$  und einer Kombination dieser beiden Komponenten sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1.

Tbc, Stamm  $\text{H}_{37}\text{R}_v$ , *Kirchner*-Milieu.

|   | Total hemmende Grenz-<br>konzentration |             |
|---|--|-------------|
|   | am 10. Tag                             | am 21. Tag  |
| Picolinsäurehydrazid . . . . .  | m/20 000                               | m/5 000     |
| Picolinsäurehydrazid + Thiophen-2-carbonsäure-<br>hydrazid m/5 000 . . . . .                                      | m/5 000                                | m/5 000     |
| Picolinsäurehydrazid + $\text{Cu}^{++}$ m/20 000 . . . . .  | m/20 000                               | m/5 000     |
| Picolinsäurehydrazid + Thiophen-2-carbonsäure-<br>hydrazid m/5 000 + $\text{Cu}^{++}$ m/20 000 . . . . .          | m/500 000                              | m/500 000   |
| Thiazol-2-carbonsäurehydrazid . . . . .   | m/50 000                               | m/20 000    |
| Thiazol-2-carbonsäurehydrazid + Thiophen-2-carbon-<br>säurehydrazid m/5 000 . . . . .                             | m/20 000                               | m/20 000    |
| Thiazol-2-carbonsäurehydrazid + $\text{Cu}^{++}$ m/20 000 . . .   | m/100 000                              | m/20 000    |
| Thiazol-2-carbonsäurehydrazid + Thiophen-2-carbon-<br>säurehydrazid m/5 000 + $\text{Cu}^{++}$ m/20 000 . . . . . | m/1 000 000                            | m/1 000 000 |

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 antagonischen Effekt auf die – in der 10-Tage-Ablesung zu ermittelnde – Wirkung aus.

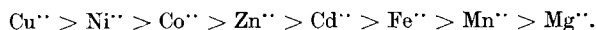
Ein Zusatz von  $\text{Cu}^{++}$  hebt nun auch hier diesen Antagonismus auf und bewirkt sogar eine deutliche Verstärkung der Wirkung; was auch bei dieser Kombination wieder besonders auffällt, ist das Ausbleiben des nach 10 Tagen sonst auftretenden, durch Resistenzbildung gedeuteten Wachstums.

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 tuberku-

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,  $\text{Cu}^{++}$  und  $\text{Co}^{++}$  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 gilt<sup>1)</sup>. Diese Reihe ist



Innerhalb der angeführten Ionenreihe wird von allen untersuchten organischen Verbindungen  $\text{Cu}^{++}$  stets am stärksten komplex gebunden; dementsprechend vermag, wie bereits Pfeiffer<sup>2)</sup> gezeigt hat,  $\text{Cu}^{++}$  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  $\text{Cu}^{++}$  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

<sup>1)</sup> 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.

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

die bakteriostatische Wirkung gewisser Verbindungen durch Zusatz von  $\text{Cu}^{++}$  verstärkt und bei anderen in vitro- und in vivo-Versuchen erst durch einen solchen Zusatz ausgelöst wird<sup>1)</sup>).

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

Die Möglichkeit, die Konzentration des  $\text{Cu}^{++}$  zu regulieren, ist nun dem Organismus durch Eiweissverbindungen<sup>3)</sup>, Aminosäuren oder durch  $\alpha$ -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 alsdann in einer Übertragung der Metallionen aus solchen Puffersystemen auf die Fermentsysteme gesucht werden.

Dass eine solche Ablösung oder Übertragung von  $\text{Cu}^{++}$  durch INH z. B. von einem Kupfer-Aminosäurekomplex erfolgt<sup>4)</sup>, insbesondere, wenn ein „Rezeptor“ für das  $\text{Cu}^{++}$  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  $\text{RCuHSO}_4$ .

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  $750\text{ m}\mu$  spektrophotometrisch nachweisen.

Das komplexchemische Verhalten der für die vorliegende Diskussion wichtigen Hydrazide wurde neuerdings von *S. Fallab*<sup>5)</sup> eingehend geprüft. Bereits früher<sup>6)</sup> wurde für INH das Vermögen,  $\text{Cu}^{++}$  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.

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

<sup>1)</sup> Vgl. *H. Erlenmeyer, J. Büumler & W. Roth, Helv. 36, 941 (1953)*.

<sup>2)</sup> *Brit. J. exptl. Path. 31, 425 (1950)*.

<sup>3)</sup> *B. A. Köchlin, Am. Soc. 74, 2649 (1952)*.

<sup>4)</sup> Siehe hierzu *A. Albert, Exper. 9, 370 (1953)*.

<sup>5)</sup> *L. c.*

<sup>6)</sup> *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 ausreicht<sup>1)</sup>.

Aber aus der für die Hydrazide ermittelten Fähigkeit,  $\text{Cu}^{++}$  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  $\text{Cu}^{++}$  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  $\text{Cu}^{++}$ -Ionen durch eine zweite komplexchemisch ähnliche Verbindung zurückzuführen sein.

Bei den früher<sup>2)</sup> 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  $\text{Cu}^{++}$ -Bindungsvermögen errechnet sich, dass die  $\text{Cu}^{++}$ -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  $\text{Cu}^{++}$  befindet sich am INH, so dass bei den natürlichen, nicht sehr grossen Konzentrationen von  $\text{Cu}^{++}$  die absolute Konzentration an INH-Kupfer-Komplex sehr klein wird.

Es steht nun zu vermuten, dass eine gleichartige Reaktion, d. h. Beanspruchung des  $\text{Cu}^{++}$  durch einen anderen Komplexbildner, im Organismus auch auf natürlichem Wege, z. B. durch Vermehrung der die  $\text{Cu}^{++}$  – 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  $\text{Cu}^{++}$  die antagonistische Wirkung des Thiophencarbonsäurehydrazids, z. B. auf die INH-Aktivität, aufzuheben vermag, sowie dass zugleich hierbei die Ausbildung der Resistenz unterbleibt<sup>3)</sup> und dass sogar Co allein einer INH-haltigen

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

<sup>2)</sup> W. Roth, G. Carrara & H. Erlenmeyer, l. c.

<sup>3)</sup> 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, rotvioletttes 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 <sup>3</sup> $N_2$ (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-phen-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 Mitteilung<sup>1)</sup>

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

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