

S. TUSZYŃSKA, K. MYSZKOWSKA, W. WOŹNIAK, J. TAUTT\*

## WPŁYW CHLORAMFENIKOLU NA PRZEBIEG SYNTEZY TRZEWIOWEJ NIEKTÓRYCH WITAMIN GRUPY B U SZCZURÓW

Z Instytutu Leków w Warszawie

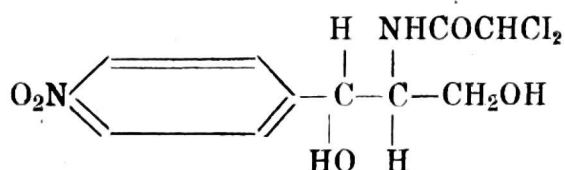
Dyrektor: prof. dr P. Kubikowski

Chloramfenikol, jeden z najszerzej stosowanych w lecznictwie antybiotyków, został po raz pierwszy wyosobniony z hodowli grzybka *Streptomyces Venezuelae* przez Ehrlicha i Joslyna w 1947 r. (33).

W ciągu następnego roku poznano budowę chemiczną chloromycetyny, co pozwoliło na opracowanie syntezy tego związku (Crooks i inni 1949 r.) (17, 18, 33).

W Polsce synteza chemiczna została opracowana w 1951 r. przez Supniewskiego i Wolfa (33).

Jest to D(—)treol-1-p-nitrofenylo-2-dwuchloroacetamido-1,3-propandiol o wzorze:



Badania Hahna (12), dotyczące związku między budową chemiczną chloromycetyny a jej działaniem antybakteryjnym, wykazały, że działanie to zależy od rodzaju podstawnika przy pierścieniu aromatycznym, od podstawnika w grupie amidowej oraz położenia podstawników przy dwóch asymetrycznych węglach. Najbardziej aktywny biologicznie okazał się izomer D(—) treo z podstawnikiem NO<sub>2</sub> w pierścieniu fenolowym i Cl<sub>2</sub> w grupie acetamidu.

W preparatach handlowych chloromycetyna może występować jako forma optycznie czynna albo jako racemat. Ustalono pogląd, że aktywność racematu jest dwa razy mniejsza od preparatu optycznie czynnego. Doniesienia klinik krajowych sugerują jednak równowartościowość działania obu form (9, 10). W naszej pracy posługiwano się preparatem racemicznym produkcji krajowej. Zastosowanie chloromycetyny w lecznictwie jest bardzo szerokie. Stosuje się ją w leczeniu licznych schorzeń zakaźnych, zwłaszcza wywoływanych przez bakterie gramoujemne i riketsje. Obserwuje się jednak często objawy uboczne działania tego antybiotyku: zaburzenia przewodu pokarmowego, niedokrwistość, stany uczuleniowe skóry. Część powyższych objawów związana jest z awitaminozą B. Brisou i inni (2, 5, 22, 26) zjawisko powstawania awitaminozy tłumaczą zachodzącymi pod wpływem podawania antybiotyków zmianami we

\* Przy współpracy technicznej K. Lewandowskiej.

florze bakteryjnej. Antybiotyki bowiem działając bakteriostatycznie na bakterie syntetyzujące witaminy powodują jednocześnie zahamowanie czynności życiowych bakterii wrażliwych na niedobory witamin. Zmianom tym nie podlegają tylko te mikroorganizmy, których zapotrzebowanie na witaminy z grupy B jest niewielkie lub które same je syntetyzują. Zmiany składu flory bakteryjnej mogą w pewnej liczbie przypadków spowodować zaburzenia w ustroju.

Mechanizm działania chloromycetyny nie jest całkowicie wyjaśniony. Prawdopodobnie polega on na hamowaniu metabolizmu tłuszczów i pokrewnych estrów kwasów organicznych, powodując w wyniku zahamowanie czynności życiowych bakterii (18, 26). Stąd przy dłuższym trwającym leczeniu chloromycetyną zachodzi konieczność zapobiegania mogącej wystąpić awitaminozie B. Klinicznie niedobór witamin z grupy B zauważyli w 1949 r. *Long* i *Chandler* (4) w czasie leczenia aureomycyną i chloramfenikolem. Analogiczny wpływ streptomycyny na poziom tiaminy, ryboflawiny i amidu kwasu nikotynowego w moczu i krwi chorych stwierdzili *Summer* i *Sartory* (4). Późniejsze prace nad ubocznym działaniem PAS-u potwierdzały poprzednie wyniki (27). Odmienne rezultaty otrzymali badacze interesujący się przebiegiem tego zjawiska w organizmie zwierzęcym. *Scure* (30) w 1951 r. badał wydzielanie kwasu pantotenowego u szczura przy podawaniu penicyliny, aureomycyny i chloromfenikolu, nie stwierdzając obniżenia poziomu tej witaminy w moczu. *Dotta* (8) doszedł do tych samych wniosków odnośnie witaminy PP i jej metabolitu, stosując rimifon. Inni badacze (13) (*Halery* i *Diamant*) obserwowali nawet wzrost wydzielania witamin przy podawaniu antybiotyków. Oksytetracyklina powodowała wzrost wydzielania witaminy PP i kwasu foliowego, a aureomycyna witaminy PP i biotyny.

Wydaje się, że różne wyniki otrzymane w doświadczeniach na ludziach i zwierzętach są rezultatem różnej przemiany chloromycetyny w tych organizmach. Z ustroju ludzkiego produkty przemiany chloramfenikolu są wydalane z moczem, u zwierząt natomiast głównie z kałem i z żółcią, co daje w następstwie mniejsze stężenia antybiotyku w ich przewodzie pokarmowym (18). Prawdopodobnie stężenia te nie wpływają dostatecznie na zahamowanie syntezy trzewiowej witamin. Zaobserwowane w niektórych badaniach na zwierzętach zjawisko zwiększonego wydzielania witamin przy dużych dawkach antybiotyków można wytłumaczyć jego uaktywniającym działaniem na esterazę komórki bakteryjnej, co powoduje wzrost intensywności jej procesów metabolicznych. Jednak dalsze podawanie antybiotyku hamuje prawie całkowicie aktywność esterazy, dając zahamowanie wzrostu bakterii (26, 31, 32). Celem naszej pracy było potwierdzenie wyników uzyskanych w dotychczas prowadzonych pracach biologicznych oraz ujęcie ich w konkretne dane liczbowe.

W badaniach naszych obserwowaliśmy działanie chloromycetyny na przebieg syntezy trzewiowej witamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, PP i pantotenianu wapnia, oznaczając ich poziom w moczu szczurów.

Stosowane w doświadczeniach dawki chloramfenikolu były analogiczne do dawek stosowanych u ludzi (w przeliczeniu na kg wagi ciała). Staraliśmy się o zachowanie warunków doświadczenia możliwie zbliżonych do warunków klinicznych, w dalszym założeniu bowiem praca nasza miała objąć badania na ludziach.

## PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA

## Część biologiczna

Badania przeprowadzono na szczurach albinosach wagi około 100 g. W okresie trwania doświadczenia zwierzęta były karmione pełnowartościową pod względem kalorycznym dietą o następującym składzie:

Mleko w proszku . . . . .	35%
Kazeina . . . . .	11%
Mąka pszenna . . . . .	43%
Margaryna . . . . .	2%
Tran . . . . .	1%
Cukier . . . . .	7,7%
Sól kuchenna . . . . .	0,2%
Cytrynian żelaza . . . . .	0,12%

Powyższa dieta zawierała w dziennej porcji witaminy w ilości stanowiącej minimum dziennego zapotrzebowania szczura (witamina B<sub>1</sub> — 10 mikrograma, witamina B<sub>2</sub> — 40 mikrograma, witamina PP — 105 mikrograma).

Dzienna porcja diety dla jednego szczura wynosiła od 10—15 g. Przeprowadzono trzy analogiczne doświadczenia. Okres doświadczenia trwał cztery tygodnie i miał przebieg następujący: Po dwunastodniowym okresie podawania diety szczury podzielono na trzy grupy, po 21 szczurów każda. Dwom grupom w ciągu następnych 10 dni podawano chloromycetynę. Grupa kontrolna nie otrzymywała leku. I grupa otrzymywała lek w ilości 10 mg na 100 g wagi szczura, II grupa w ilości 20 mg.

Po upływie 10 dni przerwano podawanie leku zwierzętom, pozostawiając je jeszcze przez tydzień na diecie.

Chloromycetyna używana w doświadczeniach była produkcji krajowej. Podawano ją zwierzętom doustnie jako zawiesinę w oleju arachidowym w jednorazowych dawkach dziennych. Łączna dawka leku przypadająca na 100 g wagi szczura w ciągu 10 dni wynosiła dla grupy I — 100 mg, a dla grupy II — 200 mg. Dla zachowania jednakowych warunków doświadczenia grupa kontrolna dostawała sam olej arachidowy.

W okresie trwania doświadczenia badano 6-krotnie poziom witamin w moczu zwierząt.

Pierwsze oznaczenie określało poziom witamin w moczu po 12 dniach podawanej diety. Następnie badano poziom witamin po 2., 4., 7. i 10. dawce chloromycetyny (oznaczenie 2, 3, 4, 5).

Ostatnie oznaczenie (6) przeprowadzono po tygodniowej przerwie w podawaniu leku.

## Część analityczna

Dobowy mocz od każdej grupy zwierząt po splukaniu klatek metabolicznych 3%-owym kwasem octowym i po dodaniu 5 ml buforu octanowego o pH = 4,5 dopełniono do 200 ml tym samym kwasem (roztwór A). W tak przygotowanym moczu oznaczono witaminę B<sub>1</sub> metodą tiochromową (35), witaminy B<sub>2</sub>, PP i pantotenian wapnia metodami mikrobiologicznymi (15, 35).

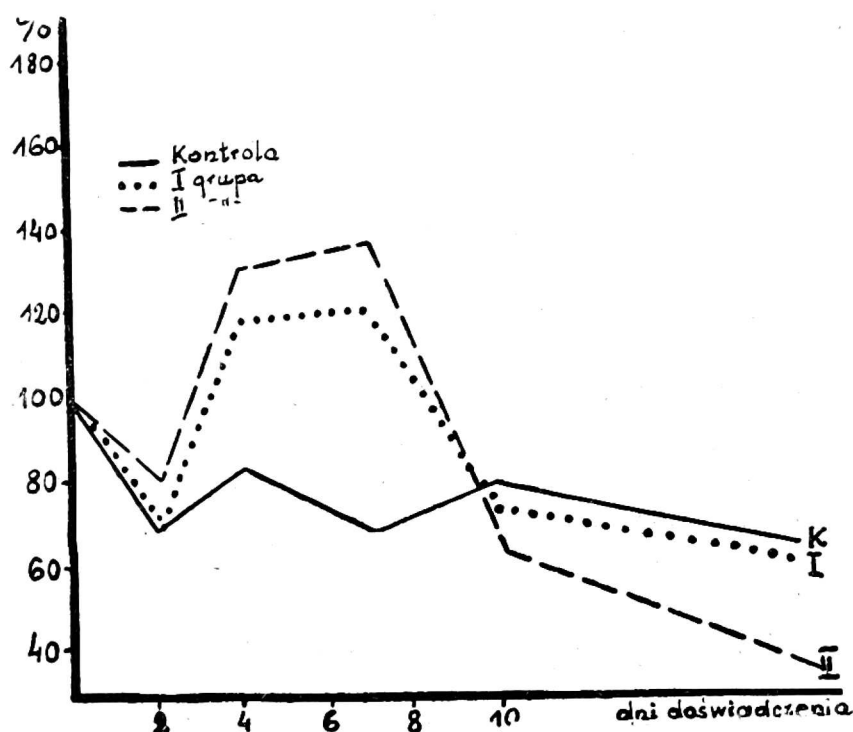
W celu oznaczenia tiaminy próbę moczu zawierającą około 6 mikrograma tiaminy adsorbowano na kolumnie wypełnionej Dekalso F i eluowano ją 25% KCl. Ilość tiaminy w eluacie oznaczano na fluorometrze Colemana.

Aby oznaczyć ryboflawinę i amid kwasu nikotynowego, 20 ml w wyżej podany sposób przygotowanego moczu (zawierającego około 30 mikrograma witaminy B<sub>2</sub> i 60 mikrograma witaminy PP) hydrolizowano w autoklawie z 50 ml 0,1 n kwasu siarkowego przez 15 min. pod ciśnieniem 1 atmosfery. Po oziębieniu hydrolizatu doprowadzano go do pH = 6,8 i rozcieńczano tak, aby końcowe stężenie witaminy B<sub>2</sub> i PP wynosiło 0,1 mikrograma na 1 ml roztworu.

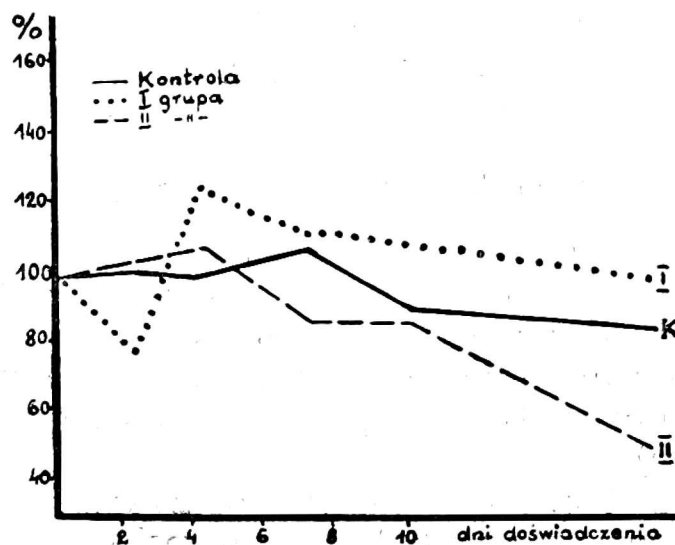
Do oznaczenia pantotenianu wapnia pobierano 4 ml moczu z roztworu A (około 10 mikrograma pantotenianu wapnia) i przygotowywano rozcieńczenie zawierające 0,1 mikrograma tej witaminy w 1 ml. W przygotowanych w ten sposób próbach moczu oznaczano witaminy mikrobiologiczne: pantotenian wapnia wg *Hawka* (15), a witaminę PP i B<sub>2</sub> wg U. S. P. XV (35).

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

W wyniku badania kontrolnego każdej grupy szczurów wziętych do doświadczenia stwierdzono, że ilość tiaminy wydalonej z moczem dobo-



Ryc. 1. Poziom pantotenianu Ca przy podawaniu chloromycetyny

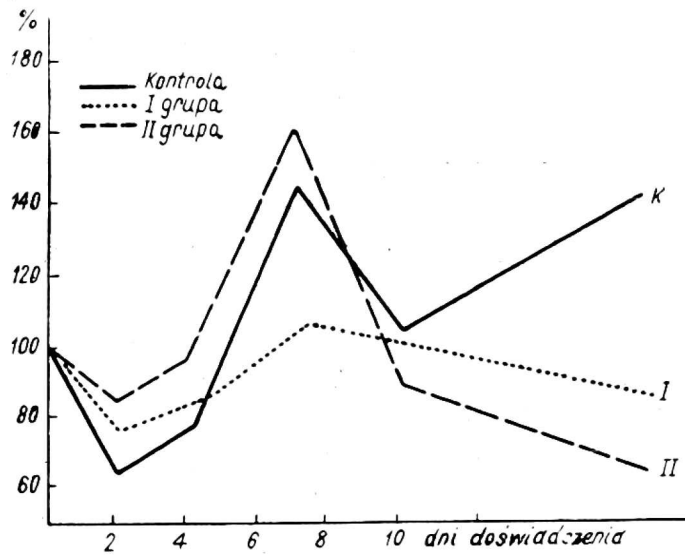


Ryc. 2. Poziom witaminy PP w moczu przy podawaniu chloromycetyny

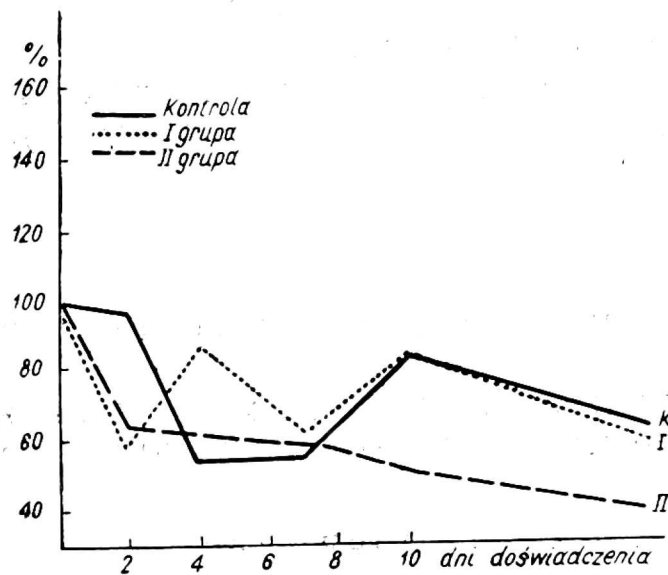


wym wynosiła średnio 0,8  $\mu\text{g}$ , ryboflawiny 23  $\mu\text{g}$ , amidu kwasu nikotynowego 30  $\mu\text{g}$  i pantotenu wapnia 45  $\mu\text{g}$  na jednego szczura. Wartości te przyjęto za 100% dla każdej grupy zwierząt.

Przeprowadzono trzy analogiczne doświadczenia na łącznej liczbie 190 zwierząt uzyskując niezależnie od płci zwierząt podobne wyniki liczbowe, wyrażające poziom witamin w moczu przy podawaniu chloromycetyny. Wyniki te są przedstawione graficznie na załączonych wykresach (ryc. 1, 2, 3, 4).



Ryc. 3. Poziom witaminy B<sub>1</sub> w moczu przy podawaniu chloromycetyny



Ryc. 4. Poziom witaminy B<sub>2</sub> w moczu przy podawaniu chloromycetyny

Analizując przebieg syntezy jelitowej witamin z grupy B przy podawaniu chloromycetyny stwierdzono, że:

1. Antybiotyk ten nie wywiera wpływu na syntezę witamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i amidu kwasu nikotynowego. Występujące wahania w zawartości tych witamin w moczu obserwuje się zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupach otrzymujących chloromycetynę.

2. Zauważa się natomiast pewien wpływ chloromycetyny na syntezę pantotenu wapnia.

Już dawka 40 mg leku powoduje nieznaczny wzrost poziomu tej witaminy w moczu (około 20%).

Następne dawki (do 140 mg leku) dają dalszy wzrost ilości pantotenu wapnia w moczu (o 40%).

Powyżej tej dawki obserwuje się gwałtowny spadek poziomu tej witaminy w moczu (o 40%).

Przerwanie podawania leku powoduje obniżenie zawartości pantotenu wapnia w moczu poniżej wartości uzyskanej w badaniu przed rozpoczęciem doświadczenia.

Powyższe wyniki potwierdzają obserwację innych badaczy odnośnie działania chloromycetyny na przebieg syntezy jelitowej witamin z grupy B u zwierząt.

Nie obserwuje się tu bowiem zmniejszenia syntezy w czasie podawania leku.

Porównanie z innymi wynikami otrzymanymi przez badaczy w pracach klinicznych nasuwa przypuszczenie, że brak wpływu chloramfenikolu na organizm zwierzęcy wynika zarówno z różnego składu flory jelitowej gryzonia i człowieka, jak i z faktu, że podawanie chloromycetyny nie prowadzi do zupełnego zniszczenia mikroflory, a tylko zmienia jej typ (2, 5, 22). Zaobserwowany wzrost poziomu pantotenu wapnia w moczu po podaniu chloromycetyny znajduje potwierdzenie w pracach *Smitha* (31, 32) nad aktywnością esterazy w komórkach *E. coli*. Zjawiska tego nie spostrzeżono jednak w badaniu innych witamin.

Zauważono jedynie trwałe obniżenie poziomu wszystkich badanych witamin (około 50%) w obrębie drugiej grupy w końcowej fazie doświadczenia, co wydaje się wskazywać na pewne zakłócenia równowagi w procesach syntezy trzewiowej przy maksymalnych dawkach antybiotyku powyżej 100 mg na kg wagi.

Wyniki naszej pracy wskazują, że tylko przeprowadzenie badań klinicznych może rozwiązać problem awitaminozy występującej przy leczeniu chloromycetyną.

С. Тушиньска, К. Мышковска, В. Возняк, Я. Таутт

### ВЛИЯНИЕ ХЛОРАМФЕНИКОЛЯ НА ХОД КИШЕЧНОГО СИНТЕЗА НЕКОТОРЫХ ВИТАМИНОВ ИЗ ГРУППЫ В У КРЫС

#### Содержание

Исследовалось влияние хлоромидетина на торможение кишечного синтеза витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, РР, пентотениана кальция у крыс, определяя уровень этих витаминов в моче животных.

Результаты эксперимента показали, что у крыс не наблюдается уменьшения синтеза витаминов из группы В во время применения хлорамфеникола. Замечено лишь, что при даче животным совокупной максимальной дозы от 100—200 мг на 100 г веса животного вызывает некоторое снижение уровня исследованных витаминов. Сверх того отмечено, что введение хлоромидетина вызывает вначале поднятие уровня пантотениана кальция в моче, а затем снижение уровня этого витамина ниже того, который был до начала опыта. Результаты опытов изложены в статье.

S. Tuszyńska, K. Myszkowska, W. Woźniak, J. Tautt

## THE INFLUENCE OF CHLORAMPHENICOL ON THE COURSE OF VISCERAL SYNTHESIS OF SOME VITAMINS FROM GROUP B IN RATS

### Summary

The influence of chloromycetin was investigated on the inhibition of visceral synthesis of Vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, PP, calcium pantothenate in rats, and the level of the said vitamins was estimated in the urine of animals.

It was found that in a rat no lowering of synthesis of vitamins from group B can be observed during chloramphenicol administration. The only thing noted was that giving the animals a summated optimal dose from 100—200 mg/100 g of body weight of the animal causes some lowering of the level of the examined vitamins. Besides that it was noted that chloromycetin administration causes at the beginning increase in the level of calcium pantothenate in urine and then decrease of this vitamin below the level prior to the experiment.

The results of the experiments are discussed.

### PIŚMIENNICTWO

1. Balakrishman S., Rajagopalan R.: *Curr. Sci.*, 1954, 23, 15. — 2. Bedryńska-Dobek M., Kurowska-Taylorowa A.: *Ped. Pol.*, 1955, 4, 331. — 3. Bicknell F., Prescott T.: *The Vitamins in Medicine*. London 1947. — 4. Bober S.: *Działanie uboczne antybiotyków*. Warszawa 1956. — 5. Brisou J.: *Presse Méd.*, 1953, 36, 748. — 6. Catton R.: *Ann. l'Inst. Pasteur*, 1956, 90, 4, 494, 1956, 90, 6, 10. — 7. Dosnow A., Petsch G.: *Arz. Forsch.*, 1955, 5, 305. — 8. Dotta F., Campana C.: *Acta Vitam.*, Milano 1953, 7, 189. — 9. Gębala A., Pazdor F.: *Biul. C. Z. A.*, 1956, 8, 221. — 10. Gębala A., Pazdor F.: *Biul. C. Z. A.*, 1957, 3, 82.
11. Guggenheim K., Halery S.: *J. of Nutr.*, 1953, 50, 2, 245. — 12. Hahn F.: *Antib. and Chem.*, 1956, 6, 9, 531. — 13. Halery S., Diamant E.: *Brit. J. Nutr.* 1955, 9, 1, 57. — 14. Harris R., Thiman K.: *Vitamins and Hormones*, New York 1949. — 15. Hawk B.: *Practical Physiological Chemistry*. Philadelphia 1947. — 16. Johansson K.: *Proc. Soc. Exper. biol. Med.*, 1956, 93, 331. — 17. Korzybski Z., Kuryłowicz W.: *Antybiotyki*, Warszawa 1955. — 18. Kuryłowicz W.: *Antybiotyki w lecznictwie*, Warszawa 1956. — 19. Mammino N., Pipitone V.: *Biol. Ist. Sier. Milan.*, 1955, 34, 374. — 20. Mammino N., Pipitone V.: *J. Uutr.*, 1955, 57, 61.
21. Mameesh M., Shendel H.: *Brit. J. Nutr.*, 1956, 10, 1. — 22. Marschall H. C., Palmer W.: *J. Ann. Med. Ass.*, 1950, 144, 1, 900. — 23. Mitchell H. K., Isbell E. R.: *Univ. Tex. Publ.*, 1942, 1. — 24. Monstradier G.: *Ann. l'Inst. Pasteur*, 1956, 90, 4, 494, 1956, 90, 6; 10. — 25. Morrison R.: *Nature*, 1956, 178, 1467. — 26. Niedźwiecka-Trzaskowska I.: *Chloromycetyna*, Warszawa 1951. — 27. Putignano T., Ramuni M.: *Acta Vitam. Milano* 1953, 7, 217. — 28. Putignano T., Ramuni M.: *Acta Vitam.*, 1953, 7, 5, 194. — 29. Rosen F.: *Proc. Soc. Exp. biol. Med.*, 1955, 88, 1, 241. — 30. Scuro L.: *Acta Vitam. Milano* 1953, 7, 143.
31. Smith G., Worrel C.: *Arch. Biochem.*, 1949, 23, 3, 341, 1949, 24, 1, 216. — 32. Smith G., Worrel C.: *J. Bact.*, 1949, 58, 6, 803. — 33. Supniewski J.: *Chloromycetyna*, *Pol. Tyg. Lek.*, 1950, 43, 1535. — 34. Tiinnenhoff F., Schwabe H.: *Arztl. Forsch.*, 1955, 5, 277. — 35. U. S. P. XV, 1955. — 36. Ulbrycht T.: *Nature*, 1956, 178, 913. — 37. Valentine F.: *Lancet*, 1956, i, 589.