

KRYSTYNA OBOJSKA

WPŁYW KWASU P-AMINOSALICYLOWEGO I 5-BROMOSALICYLO-
HYDROKSAMOWEGO NA PRZEMIANĘ HYDRAZYDU KWASU
IZONIKOTYNOWEGO U SZCZURA

Z Zakładu Farmakologii Instytutu Leków i Instytutu Gruźlicy w Warszawie
Kierownik: doc. dr J. Venulet

Wydaje się, że mechanizm acetylowania hydrazydu kwasu izonikotynowego* przez ssaki jest podobny do acetylowania przez nie sulfonamidów, lub innych amin pierwszorzędowych. Wykazano, że przy równoczesnym podaniu ludziom INH i PAS-u ilość wolnego INH w moczu zwiększyła się o 75%. (Brettoni 1952). Następnie doniesiono o zjawisku silnego hamowania acetylacji sulfonamidów pod wpływem INH *in vivo* zwłaszcza po podaniu z INH pyrogronianu (Gerattini, 1953).

Na podstawie tych faktów wysnuto wniosek, że zachodzi tu konkurencyjne acetylowanie PAS-u zamiast INH w wyniku czego poziom INH w krwiobiegu królika jest po upływie 4 godz. dwukrotnie większy (Johnson, 1954). Autor ten dyskutuje również korzystny wpływ PAS-u na leczenie przy pomocy INH. Zamiast PAS-u podaje się niekiedy w Polsce preparat T-40, wprowadzony do terapii przez Hornunga i Krakowską (1951).

Dlatego po opracowaniu przez nas metodyki pozwalającej na badanie przemian, a zwłaszcza acetylacji INH u szczura i po ustaleniu dwóch dróg metabolizowania INH u tego zwierzęcia [8] podjęliśmy studia nad przebiegiem acetylacji *in vivo* i wpływem dwóch popularnych leków PAS-u i preparatu T-40 na ten proces.

Celem niniejszej pracy było: 1) wykazanie za pomocą własnej metodyki chromatografii wstępującej ewentualnego wpływu preparatu T-40 i PAS-u na rodzaje metabolitów INH u szczura białego; 2) określenie ewentualnego wpływu obu preparatów na liczbę poszczególnych metabolitów.

* W niniejszej pracy użyto następujące skróty: INH — hydrazid kwasu izonikotynowego, PAS — kwas p-aminosalicylowy, T-40 — kwas 5-bromosalicylohydroksanowy.

Materiał doświadczalny stanowiły szczury białe, samce wagi od 250 do 360 gramów w ogólnej liczbie 25.

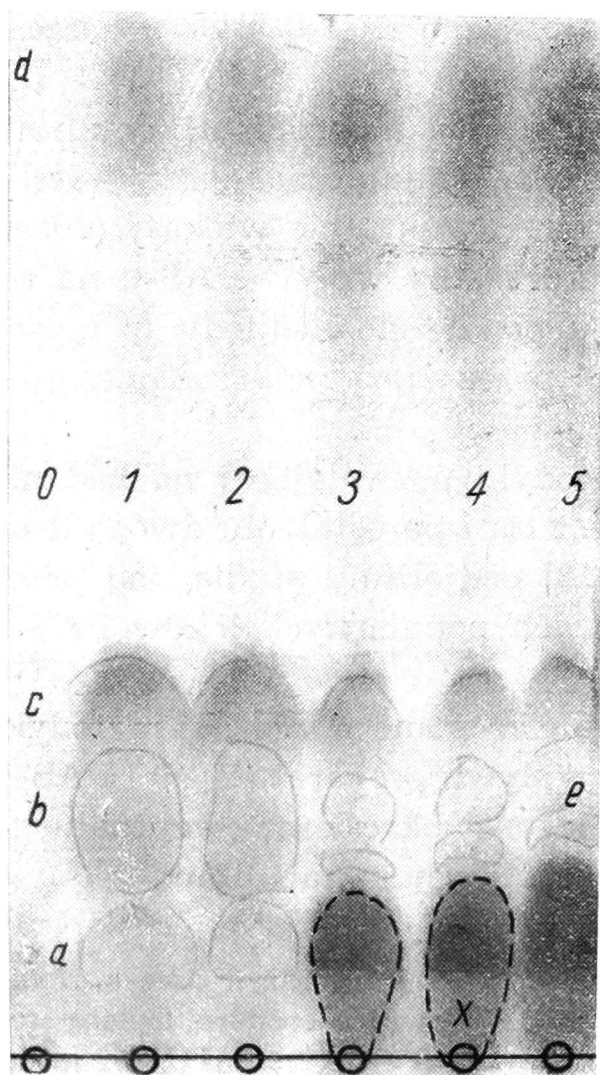
METODYKA

W doświadczeniach użyliśmy preparatów PAS i T-40, których czystość uprzednio skontrolowano chromatograficznie. Szczurom podawaliśmy INH w ilości 50 mg/kg podskórnie, przy jednoczesnym podaniu doustnym 500 mg/kg PAS-u lub preparatu T-40. Zwierzęta nawadniano solą fizjologiczną podawaną w ilościach stanowiących 3% wagi ciała. Mocz zbierano przez 4 godz. od czasu podania leków.

Zebrany mocz zagęszczano i nanoszono na chromatogramy. Chromatogramy rozwijano w układzie n-butanol nasycony 1,5N, 3N, lub stężonym (25%) amoniakiem. Wywoływano bromocyjanem lub azotanem srebrowym w roztworze alkalicznym. Szczegóły metodyczne podano w pracy wcześniejszej [8].

WYNIKI

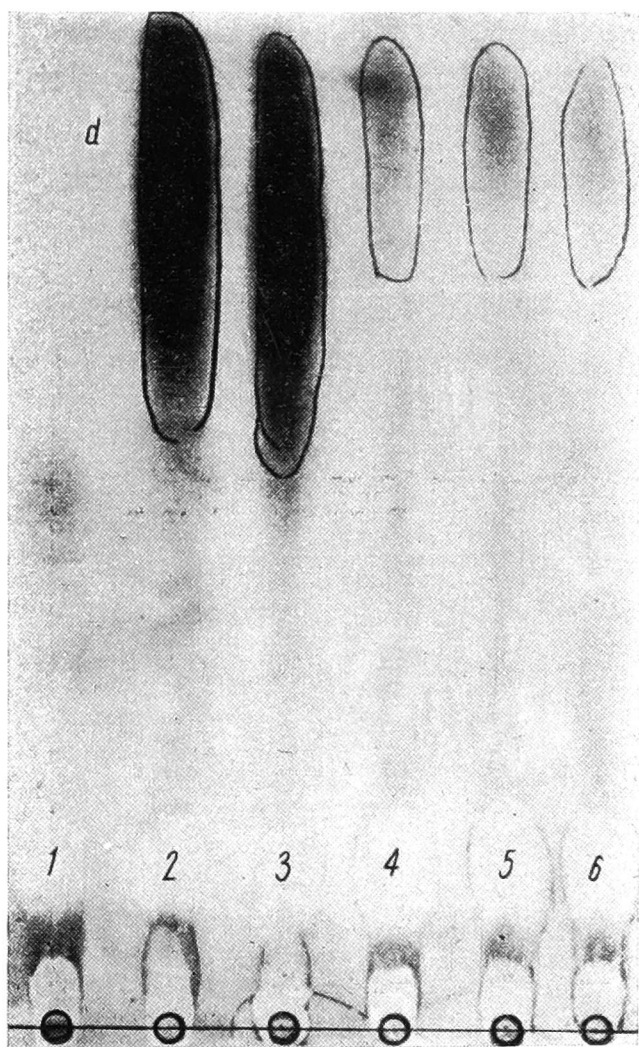
W toku doświadczeń porównywano chromatogramy, na które nanoszono równe ilości zagęszczonego moczu, stwierdzono przy tym, że dodatek PAS-u wpływa na wzajemny stosunek metabolitów INH, przy czym nie pojawiają się nowe metabolity. Ilustruje to ryc. 1 i ryc. 2.



Ryc. 1. Chromatogram wykazujący wpływ PAS-u na wzajemny stosunek metabolitów INH. Chromatogram moczu zwierząt, którym podano INH oraz INH i PAS rozwijamy w układzie n-butanol nasycony stężonym amoniakiem wywołany bromocyjanem i benzydynam. Ilość naniesionego moczu w każdej próbie wynosiła 0,2 ml. Próbki od lewej przedstawiają: 0 — mocz kontrolny od zwierzęcia, któremu podano roztwór soli fizjologicznej (nawodniono); 1 i 2 — mocz zwierząt nawodnionych, którym podano INH; 3, 4, 5 — mocz nawodnionych zwierząt, którym podano oprócz INH, PAS. Oznaczenia literowe na chromatogramie przedstawiają a — izonikotynoiloglicyna; b — kwas izonikotynowy; c — pochodna acetylowa INH; d — INH; e — kwas nikotynowy; x — ciemnobrązowy barwnik moczu zwierząt, które otrzymały PAS.

Chromatogram 1 wykazuje małe ilości INH, znaczniejsze kwasu izonikotynowego i izonikotynoiloglicyny oraz pochodnej acetylowej INH w moczu szczurów, które otrzymały sam INH, w porównaniu z moczem zwierząt, które prócz INH dostały PAS.

Ryc. 2. Chromatogram wykazujący ilość wolnego INH w moczu zwierząt, którym podano sam INH oraz INH łącznie z PAS-em. Chromatogram moczu zwierząt, którym podano INH oraz INH i PAS, rechromatografowany dwukrotnie w układzie n-butanol nasycony stężonym amoniakiem, wywoływany metodą srebrową. Każda próbka zawiera 0,35 ml moczu. Próbki od lewej przedstawiają: 1 — mocz zwierząt, którym nie podawano leku; 2, 3 — mocz zwierząt, które otrzymały INH łącznie z PAS-em; 4, 5, 6 — mocz zwierząt, które otrzymały sam INH. Ilość zredukowanego srebra przez metabolit d (INH) w moczu zwierząt, które otrzymały dodatkowe PAS jest znacznie większa.



Celem uwidocznienia większych ilości wolnego INH w moczu zwierząt, które otrzymały INH i PAS w porównaniu z moczem zwierząt, którym podano sam INH sporządzono chromatogram wywołany metodą srebrową, który ilustruje ryc. 2.

Ponadto stwierdziliśmy w moczu zwierząt, które otrzymały INH oraz PAS pojawienie się niewykrywalnego w innych warunkach kwasu nikotynowego.

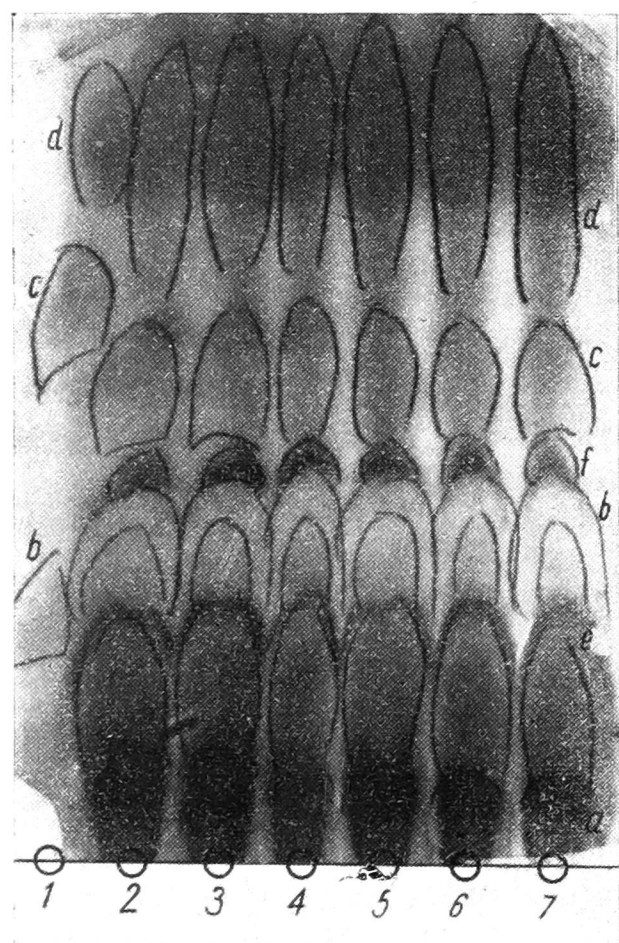
W celu przekonania się czy w moczu zwierząt otrzymujących dodatkowo PAS nie ma innych metabolitów INH występujących tam w ilościach kilkakrotnie mniejszych, chromatografowano zagęszczony mocz zwierząt, którym podano prócz INH PAS. Mocz nanoszono na chromatogram w ilości trzykrotnie większej niż w przypadku przedstawionym na ryc. 1. Wyniki przedstawia ryc. 3.

Prócz zidentyfikowanych metabolitów INH na chromatogramie tym pojawia się nowa pochodna f, która występuje okresowo w moczu szczurów,

otrzymujących sam INH. Pochodnej tej nie udało się nam zidentyfikować.

Uzyskane dotąd wyniki wykazują wyraźną rolę PAS-u w hamowaniu wewnątrzustrojowej acetylacji INH. Podobny wpływ udało się nam uzyskać w przypadku zwierząt, którym zamiast PAS-u podawano łącznie z INH preparat T-40.

Przed uzyskaniem ostatecznych wyników należało przekonać się czy metodyka używana dotąd, odpowiednia będzie dla badań nad preparatem T-40, a mianowicie czy metabolity T-40 w badanym moczu nie dają bar-



Ryc. 3. Chromatogram moczu zwierząt, które otrzymały PAS i INH. Ilość naniesionego moczu jest trzykrotnie większa niż normalnie. Chromatografia moczu zwierząt, którym prócz INH podano PAS. Mocz наносono na bibułę w ilości 0,6 ml na każdą próbkę. Chromatogram rozwijano w układzie n-butanol nasycony stężonym amoniakiem rechromatografując trzykrotnie. Równolegle rozwijano mocz kontrolny z dodatkiem INH (d), acetylo — INH (e), oraz kwasu izonikotynowego (b) kolumna 1. Kolumny 2, 3, 4, 5, 6, 7 — przedstawiają mocz zwierząt otrzymujących PAS i INH, ale nakroplony w większych ilościach niż w poprzednich chromatogramach. Wykryto następujące pochodne INH: a — izonikotynoiloglicynę; b — kwas izonikotynowy; c — pochodną acetylową INH; d — INH; f — niezidentyfikowana pochodna INH; w kolumnach doświadczalnych od 2 do 7 widać wyraźnie ciemny łuk e zidentyfikowany jako kwas nikotynowy.

wnych reakcji z bromocyjanem, aby je ewentualnie odróżnić od metabolitów INH. Okazało się, że metabolity T-40 nie dają połączeń barwnych z bromocyjanem (ryc. 4).

Po ustaleniu metodyki porównywano mocz zwierząt, którym podano preparat T-40 łącznie z INH z moczem zwierząt, którym podano sam INH. Wyniki ilustruje ryc. 5.

Na podstawie ryc. 5 widzimy, że preparat T-40 podany zwierzęciu łącznie z INH powoduje podobnie jak PAS zmniejszenie ilości izonikotynoiloglicyny, kwasu izonikotynowego oraz pochodnej acetylowej. Na podstawie innych chromatogramów widzimy, że ilości samego INH wykrywa-

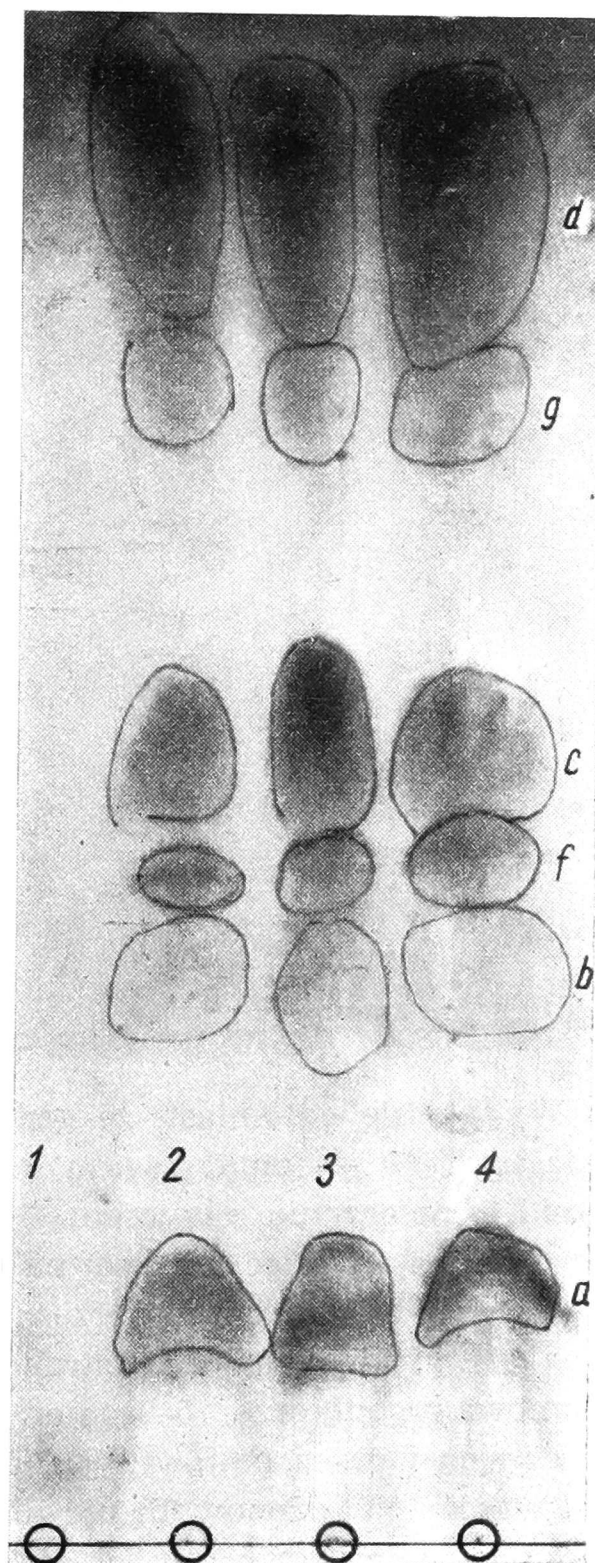
nego w moczu zwierząt otrzymujących dodatkowo T-40 zwiększają się. Dowodzi to antyacetylującego działania preparatu T-40.

To wykazane przez nas antyacetylujące działanie preparatu T-40 jest słabsze od analogicznego działania PAS-u. Powyższy wniosek wynika z po-

równania chromatogramów wywołanych metodą srebrową w modyfikacji pozwalającej na uchwycenie ilości w moczu zwierząt, które otrzymały sam INH. INH łącznie z preparatem T-40, oraz INH łącznie z PAS-em (ryc. 6) oraz (ryc. 7) wywołana również metodą srebrową pozwalającą na uchwycenie tak INH, jak i acetylopochothanej tego związku (porównaj w przypadku T-40 podanego łącznie pracę wcześniejszą 8).

Na ryc. 7 widać wyraźnie, że z INH, mamy o wiele więcej acetylopochothanej niż w przypadku PAS-u, zaś INH znacznie mniej.

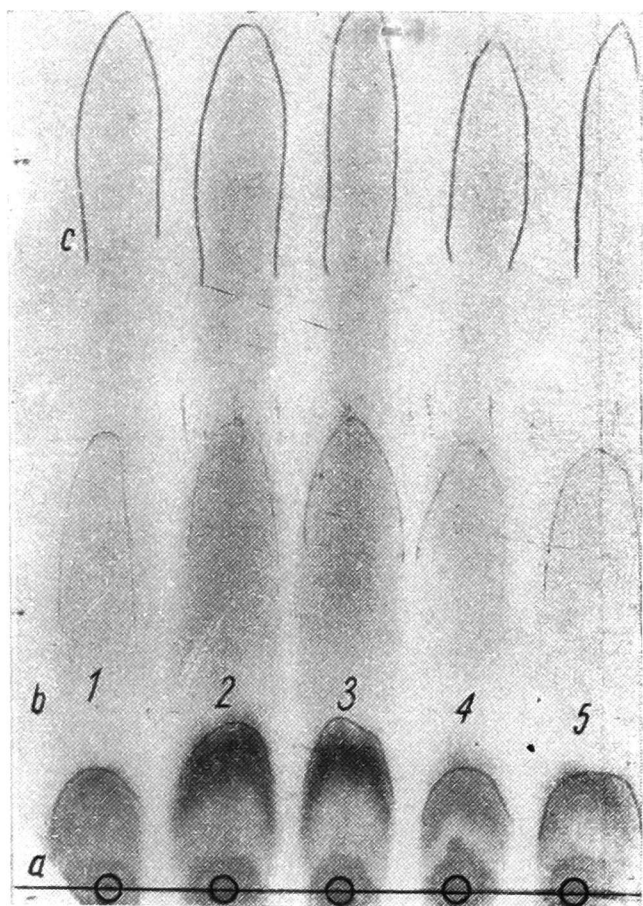
Ryc. 4. Chromatogram kontrolny moczu zwierzęcia, które otrzymało tylko preparat T-40. Chromatogram moczu zwierzęcia, które otrzymało sam preparat T-40, kolumna 1, i moczu zwierząt, które otrzymały sam INH — kolumny 2, 3, 4. Chromatogram rozwijano w układzie n-butanol nasycony 3N amoniakiem i rechromatografowano trzykrotnie. U zwierzęcia kontrolnego nie otrzymywano plam na chromatogramie. Stwierdzono występowanie nowej pochodnej INH oznaczonej tu jako g, o której już donosiliśmy w pracy wcześniejszej.



OMÓWIENIE WYNIKÓW

Z doświadczeń niniejszej pracy wynika, że PAS podobnie, jak preparat T-40 wpływa na wzajemny stosunek metabolitów INH oraz hamuje acetylację INH w organizmie szczura silniej niż preparat T-40.

Należy podkreślić, że oba preparaty podawano w równej ilości wagowej, tj. 500 mg/kg zwierzęcia. Częsteczka PAS-u waży około 51% mniej niż częsteczka T-40, operowano zatem różnymi ilościami molarnymi obu związków. Wiemy, że hamowanie acetylacji przez PAS polega na współzawodnictwie tego związku i INH wobec enzymów acetylujących. Niejasny jest natomiast mechanizm hamowania acetylacji przez preparat T-40, gdyż nie wykryto acetylopochothanej tego związku.

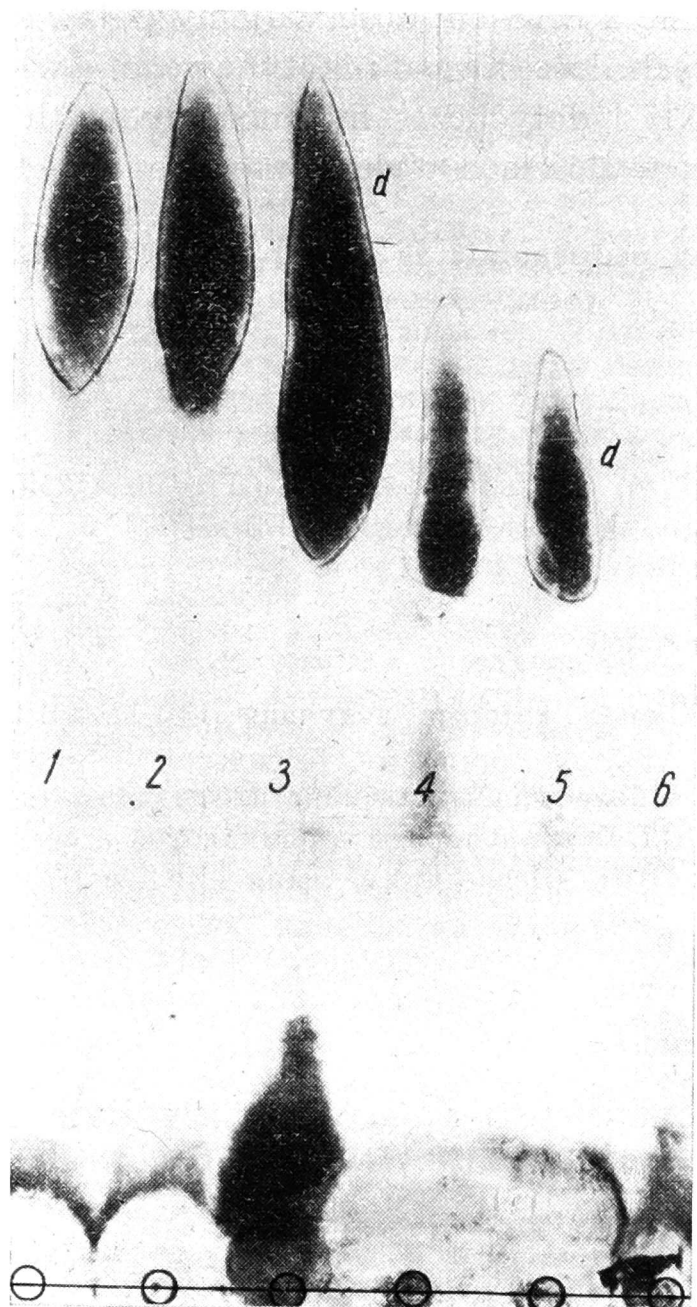


Ryc. 5. Wpływ preparatu T-40 na wzajemny stosunek metabolitów INH. Chromatogram moczu zwierząt, którym podano preparat T-40, oraz preparat T-40 łącznie z INH. Chromatogram rozwijano trzykrotnie w układzie n-butanol nasycony stężonym amoniakiem. Na każdą próbkę nakraplano 0,5 ml słabo zagęszczonego moczu. Próbka 1, 4, 5 — przedstawia metabolity INH zwierząt, którym podano dodatkowo preparat T-40. Próbki 2 i 3 przedstawiają metabolity INH u zwierząt, którym podano wyłącznie tylko ten preparat. Na fotografii nie uwidocznił INH (metabolitu d); oznaczenia literowe przedstawiają: a — izonikotynoiloglicyna; b — kwas izonikotynowy; c — acetylowa pochodna INH.

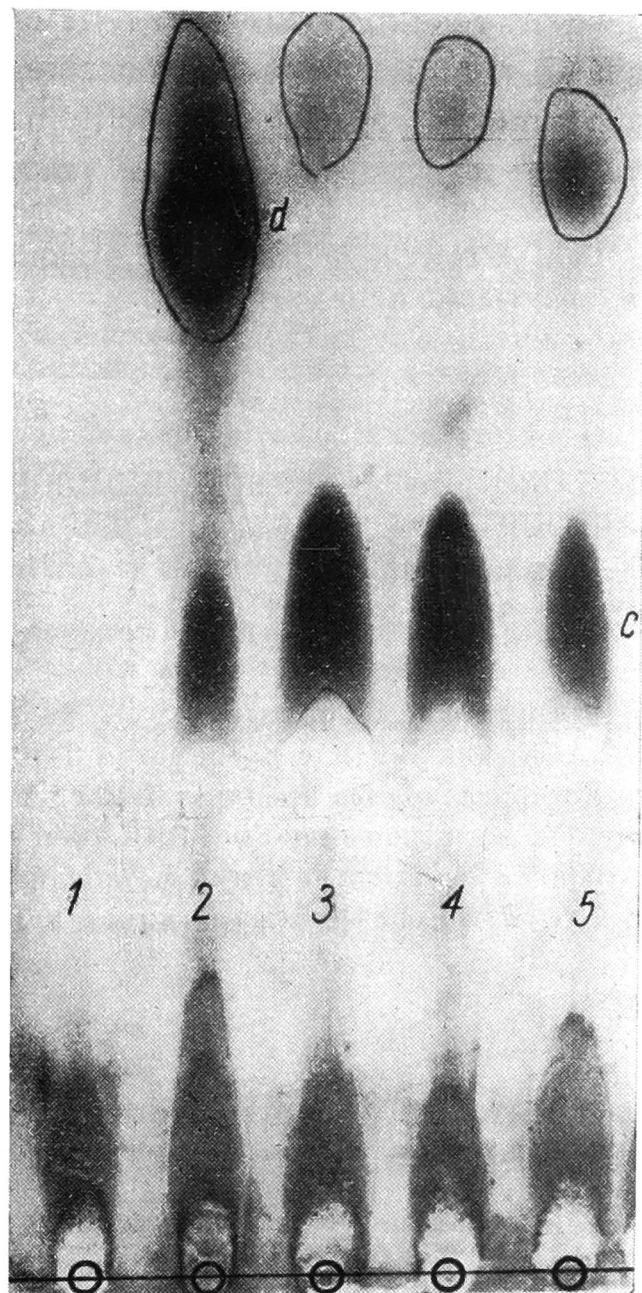
Wydaje się natomiast, że grać tu może rolę metabolit ustrojowy preparatu T-40 — amid kwasu 5-bromosalicylohydroksamowego, oraz ten amid w połączeniu z kwasem glukuronowym. Inne metabolity T-40 [6, 7] wydają się nie mieć wpływu na hamowanie acetylacji INH.

Hamowanie acetylacji przez 5-bromosalicylamid *in vitro* obserwował Johnson i wsp. (1956) na ekstrakcie wątroby gołębia. Proces acetylacji INH hamowany był przez 5-bromosalicylamid prawie w tym samym stopniu (52%) co i przez PAS (49%). Ponieważ ani sam amid ani w połączeniu z kwasem glukuronowym nie ulega acetylacji, w procesie hamowania jej przy łącznym podawaniu T-40 z INH, hamowanie acetylacji INH przez T-40, związane jest być może z wpływem pośrednim lub bezpośrednim powstałego z przemian T-40 amidu, na koenzym A.

Wydaje się, że dla zahamowania acetylacji w równym stopniu przez oba preparaty należy podać o 50% więcej preparatu T-40 niż PAS-u w stosunku wagowym.



Ryc. 6.



Ryc. 7.

Ryc. 6. Antyacetylujące działanie preparatu T-40. Chromatogram zagęszczonego moczu dwukrotnie rozwijano w układzie n-butanol nasycony 1,5N amoniakiem. Próbkę od lewej przedstawiają mocz nakraplany w ilościach 0,1 ml każda, wywołany metodą srebrową. 1 i 2 — mocz szczura, któremu prócz INH podano preparat T-40; 3 — mocz szczura, któremu podano INH łącznie z PAS-em; 4, 5 — mocz szczura, któremu podano sam INH; 6 — mocz kontrolny — zwierzęcia, które nie otrzymało żadnego leku; d — przedstawia ilość wolnego INH w moczu.

Ryc. 7. Antyacetylujące działanie preparatu T-40 wykazane przez uwidocznienie wolnego INH i jego acetylopochovej. Chromatogram moczu niezagęszczonego rozwijano trzykrotnie w układzie n-butanol nasycony 3N amoniakiem. Chromatogram rozwijano metodą srebrową. Na każdą próbkę nanoszono 0,25 ml niezagęszczonego moczu. Próbkę przedstawiają kolejno: 1 — mocz zwierzęcia kontrolnego po 4 godz.; 2 — mocz zwierzęcia, które prócz INH otrzymało PAS, zebrany po 2 godz.; 3 i 4 — mocz zwierzęcia, pobrany po 4 godz., które prócz INH otrzymało preparat T-40; 5 — mocz zwierzęcia, które prócz INH otrzymało PAS, pobrany w cztery godziny od czasu rozpoczęcia doświadczenia. Na chromatogramie uwidoczniono następujące metabolity: d — INH; c — acetylowa pochodna INH.

W przypadku podawania INH łącznie z PAS-em obserwujemy pojawianie się w moczu zwierząt znacznie większych ilości kwasu nikotynowego. Kwas nikotynowy nie jest metabolitem INH i dotychczas nie możemy wytłumaczyć jego pojawiania się w moczu w ilościach wykrywalnych.

Pani *Elżbiecie Baliszewskiej* pragniemy podziękować za pomoc techniczną przy wykonywaniu niniejszej pracy.

K. Obojska

ВЛИЯНИЕ ПАРА-АМИНОСАЛИЦИЛОВОЙ И 5-БРОМСАЛИЦИЛОВОГИДРОКСАМОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОБМЕН ГИДРАЗИДА ИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ У БЕЛЫХ КРЫС

Содержание

Сравнивались хроматограммы белых крыс, которые получали ГИНК, ГИНК с ПАСК, или ГИНК с препаратом Т-40.

Установлено, что препарат Т-40 обладает более слабым антиацетилирующим действием по отношению к ГИНК, чем ПАСК. Оба препарата в одинаковой степени изменяли взаимоотношения метаболитов ГИНК. После применения ГИНК и ПАСК в моче крыс обнаруживали никотинпвую кислоту.

K. Obojska

THE EFFECT OF PARA-AMINOSALICYLIC AND 5-BROMOSALICYLHYDROXAMIC ACIDS ON ISONICOTINIC ACID HYDRAZIDE METABOLISM IN THE RAT

Summary

White rats were given (a) INH, (b) INH + PAS, and (c) INH + T-40, and chromatograms of their urine were compared.

The anti-acetylizing effect of T-40 with regard to INH was inferior to that of PAS. The two preparations modified in a like manner the proportions of INH metabolites. PAS given together with INH caused nicotinic acid to appear in the urine.

PIŚMIENNICTWO

1. *Brettoni B.*: Minerva Med. Torino 1952, 2, 674.
2. *Gerattini S.*: Atti VI Congresso Internat. Microbiol. Roma, Bd. 1953, 1, 584.
3. *Hornung S., Krakowska M.*: Gruźlica, 1952, 20, 469.
4. *Johnson W. J.*: Nature 1954, 174, 744, 4433.
5. *Johnson W. J., Corte G.*: Proc. of the Soc. Experim. Biol. a. Med., 1956, 92, 2, 446.
6. *MC. Isaac W. M., Williams R. T.*: Biochem. J. 1957, 66, 3, 369.
7. *MC. Isaac W. M., Williams R. T.*: Biochem. J. 1956, 62, 3, 23-P.
8. *Obojska K.*: Praca w przygotowaniu do druku.

Otrzymano: 3. 12. 1959.