

162. Über die Wirkung eines mit radioaktivem ^{35}S indizierten 2-(p-Aminophenyl)-thiazols auf Kulturen von Tuberkelbazillen II

von H. Erlenmeyer, H. Meyer, H. Noll und E. Sorkin.

(11. IV. 49.)

In einer ersten Mitteilung¹⁾ hatten wir über Versuche berichtet, in denen die Einwirkung eines mit radioaktivem Schwefel indizierten 2-(p-Aminophenyl)-thiazols (APT) auf die Oberflächenkultur eines BCG-Stammes in *Lockemann*- und *Sauton*-Nährlösung untersucht worden war. Es hatte sich hierbei gezeigt, dass bei einer APT-Konzentration von 10^{-4} Mol/l in der Nährlösung die isolierten Bakterien²⁾ radioaktiven Schwefel enthalten und zwar — unter der Annahme, dass die ermittelte Aktivität dem APT zugeordnet werden kann — bis zu $0,77 \gamma$ APT pro mg Bakterien Trockengewicht. Gegenüber der Konzentration des APT in der Lösung, d. i. $0,0176 \gamma$ pro mg bedeutet dies eine Anreicherung der Verbindung in den Bakterien.

Bei der Fortsetzung dieser Versuche war es interessant zu erfahren, in welcher Weise die von den Bakterien aufgenommene Menge des APT von der Konzentration des APT in der Nährlösung abhängt. Die Ergebnisse aus solchen Versuchsreihen mit BCG-Oberflächenschwimmkulturen in *Sauton*-Nährlösungen mit 10^{-4} – 10^{-6} Mol APT/l sind in Figur 1 wiedergegeben³⁾.

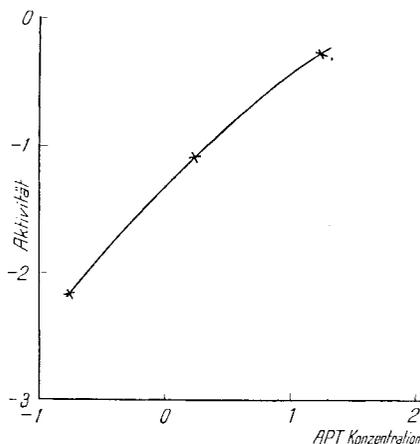


Fig. 1.

Ordinate: Logarithmus der Aktivität in γ APT/mg Bakterien Trockengewicht.
Abszisse: Logarithmus der Konzentration des APT in der Nährlösung mg/l.

¹⁾ H. Noll, E. Sorkin und H. Erlenmeyer, *Helv.* **32**, 609 (1949).

²⁾ Bei einer Inkubationszeit bis zu 34 Tagen.

³⁾ Nach 26 Tagen Inkubationszeit.

Die Genauigkeit der Messungen hängt bei der angewandten Methode der Direktmessung von der Totalaktivität und dem Gewicht der Probe (Trockengewicht der isolierten Bakterien) ab. In den angegebenen Bestimmungen kann der Fehler für die Aktivität der aus 10^{-4} und 10^{-5} Mol APT/l enthaltenden Nährlösungen gewonnenen Bakterien zu $\pm 3\%$ angegeben werden, während bei 10^{-6} Mol APT/l wegen der schwachen Aktivität mit einem Fehler von $\pm 13\%$ zu rechnen ist.

Diese Messungen zeigen, dass die aufgenommene absolute Menge des ^{35}S , ausgedrückt in γ APT/mg Bakterien Trockengewicht, von der Konzentration des APT in der Lösung abhängt. Von Bedeutung ist die Feststellung, dass in allen diesen Versuchen das APT eine das Wachstum total hemmende Wirkung zeigt. Man kann daher aus diesen Bestimmungen entnehmen, dass mit der Aufnahme von $0,005 \gamma$ oder mehr APT/mg Bakterien Trockengewicht unter den gewählten Bedingungen mit Sicherheit eine bakterio-statische Wirkung des APT verbunden ist. Verschiedene Stämme von *Mycobacterium tuberculosis* haben bei Verwendung von Oberflächenkulturen ähnliche Empfindlichkeit (Tab. 1).

Tabelle 1.

	Oberflächenkultur, total hemmende Grenzkonzentration Mol/l
<i>Vallée</i> . . .	$2,5 \cdot 10^{-7}$
BCG	$10^{-6} - 10^{-7}$

Während die bisherigen Versuche in rein synthetischen Nährlösungen durchgeführt worden waren, wird im folgenden noch ein erster Beitrag zu dem eigenartigen Verhalten von Tbc-Kulturen in serumhaltigen Nährlösungen gebracht.

Für die Bewertung der in *in vitro*-Wachstumsversuchen ermittelten tuberkulostatischen Wirkungen von Verbindungen war der Befund von grösster Bedeutung, dass bei einem Zusatz von ca. 10% Serum zu einer Nährlösung die ohne diesen Zusatz vorhandene wachstumshemmende Wirkung von sehr vielen Verbindungen aufgehoben wird. Die Deutung dieser Erscheinung ist nicht einfach zu geben. Es besteht die Möglichkeit, dass beim Übergang von der wässrigen Nährlösung, in der die Gleichgewichte:



die Verteilung der Verbindungen auf Lösung (H_2O) und Bakterien (Tbc) bestimmen, zu der serumhaltigen Lösung, bei der die Verteilung auf Serum und Bakterien von den Gleichgewichten:



abhängt, bei einer starken Bindung der $H_2N \cdot R$ -Verbindung durch das Serum die durch die Bakterien gebundene Menge von $H_2N \cdot R$ entsprechend stark vermindert wird. Der Unterschied in der ermittelten wachstumshemmenden Wirkung würde unter der Annahme eines gleich bleibenden reaktiven Verhaltens der Bakterien in wässriger und serumhaltiger Nährlösung alsdann auf die Verschiedenheit der Bindung der $H_2N \cdot R$ -Verbindungen durch Wasser und Serum zurückzuführen sein.

Im Zusammenhang mit der Diskussion dieser Gleichgewichte sind die folgenden Versuche zu erwähnen, die mit den zu der $H_2N \cdot R$ -Reihe gehörenden Verbindungen: p-Aminobenzoesäure, Sulfathiazol und p-Aminosalicylsäure durchgeführt wurden.

1. Nach den Untersuchungen von *M. Allgöwer*¹⁾ wird Sulfathiazol bedeutend stärker an Serum gebunden als p-Aminobenzoesäure.

2. Bei Tbc-Kulturen wird aber die wachstumshemmende Wirkung der p-Aminobenzoesäure auf Tbc-Kulturen durch Serumzusatz aufgehoben, während die wachstumshemmende Wirkung des Sulfathiazols durch Serumzusatz nur unwesentlich geändert wird²⁾.

3. Andererseits gilt, dass die wachstumshemmende Wirkung der p-Aminosalicylsäure auf Tbc-Kulturen durch Serumzusatz nur unwesentlich geändert wird, und dass aber bemerkenswerterweise, wie *E. Suter*³⁾ gezeigt hat, der in wässrigen Nährlösungen vorhandene antagonistische Effekt der p-Aminobenzoesäure auf die wachstumshemmende Wirkung der p-Aminosalicylsäure bei Serumzusatz nicht mehr vorhanden ist.

Für eine Deutung solcher Versuche ist es nun wichtig zu erfahren, ob die angeführte Annahme gilt, dass die Bakterien in einer synthetischen, wässrigen Nährlösung und in einem serumhaltigen Nährmedium in ihrem reaktiven Verhalten übereinstimmen, d. h. als gleichartig zu betrachten sind. Eine solche Gleichartigkeit würde im Experiment bedeuten, dass die Tbc-Kulturen in beiden Medien auf die Bindung der gleichen Menge der $H_2N \cdot R$ -Verbindung mit der Einstellung des Wachstums reagieren.

Da für die Auswertung der Ergebnisse der in in-vitro-Versuchen ermittelten tuberkulostatischen Wirkungen für Versuche in vivo die Analyse dieser Serumwirkung von grosser Bedeutung ist, haben wir es unternommen, mit Hilfe des radioaktiven APT etwas über die Gleichartigkeit der Bakterien in wässrigen und in serumhaltigen Nährlösungen in Erfahrung zu bringen. Die starke tuberkulostatische Wirkung des 2-(p-Aminophenyl)-thiazols und auch der isomeren Ver-

¹⁾ Helv. physiol. pharmacol. acta **2**, 569 (1944).

²⁾ *E. Suter, H. Erlennmeyer, E. Sorkin und H. Bloch*, Schw. Z. Path. u. Bakt. **11**, 193 (1948); *H. Bloch, H. Erlennmeyer und E. Suter*, Exper. **3**, 199 (1947).

³⁾ Helv. physiol. pharmacol. acta **6**, 773 (1948).

bindungen ist, wie wir bereits in früheren Versuchen¹⁾ ermittelt hatten, in Nährlösungen, die 10% Serum enthalten (*Kirchner-Milieu*), nicht mehr vorhanden.

Tabelle 2.

Verbindung	Oberflächenkultur in <i>Lockemann</i> -Nähr- lösung	<i>Kirchner</i> -Nähr- lösung, 10% Serum enthaltend
	total hemmende Grenzkonz. Mol/l	
2-(p-Aminophenyl)-thiazol.	$2,5 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-3}$
4-(p-Aminophenyl)-thiazol.	$5 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-3}$
5-(p-Aminophenyl)-thiazol.	$1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-3}$

Wir haben nun in Gegenwart von radioaktivem APT Wachstumsversuche sowohl mit *Vallée*- als auch mit BCG-Kulturen in Nährlösungen mit Zusatz von 10% Serum durchgeführt.

Es wurden zuerst Versuche in den Konzentrationsbereichen $5 \cdot 10^{-4}$, $2,5 \cdot 10^{-4}$, $1,25 \cdot 10^{-4}$ und $6,25 \cdot 10^{-5}$ Mol/l angesetzt, um mit Sicherheit ein Wachstum zu erhalten. Es zeigte sich hierbei, dass in allen vier Konzentrationen trotz der Gegenwart von APT²⁾ ein diffuses Tiefenwachstum erfolgt³⁾.

Um die Genauigkeit der Aktivitätsmessungen zu verbessern, die, wie erwähnt, von der Menge der Bakterien abhängt, wurde einerseits das Material aus den vier BCG-Kulturen, und andererseits wurden die Bakterien aus den vier *Vallée*-Kulturen gesammelt. Die Bakterien wurden hierbei zuerst aus den einzelnen Kulturen durch Zentrifugieren von den Nährlösungen abgetrennt, darauf einmal mit 5 cm³ dest. Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Die isolierten Bakterien aus den je vier Nährlösungen wurden nun vereinigt und noch neunmal mit je 5 cm³ Wasser gewaschen. Das bei 80° getrocknete Material wurde für die Ermittlung der Radioaktivität nach der in der ersten Mitteilung⁴⁾ angegebenen Methode der Direktmessung verwendet.

Die Messungen ergaben für die aus den *Vallée*-Kulturen isolierten Bakterien einen Aktivitätswert, der unter der Annahme, dass die ermittelte Radioaktivität dem APT zuzuordnen ist, einem Gehalt von $0,036 \gamma \pm 20\%$ APT/mg Bakterien Trockengewicht entspricht.

Für die BCG-Bakterien ergibt die Aktivitätsmessung einen Wert, der $0,050 \gamma \pm 25\%$ APT/mg Bakterien Trockengewicht entspricht.

In einem zweiten Versuch wurde nur in je einer Nährlösung, die 10% Serum und 10^{-4} Mol APT/l enthielt, eine Kultur von *Vallée* und eine solche von BCG angesetzt. Es erfolgte in beiden Kulturen diffuses Tiefenwachstum. Die wie oben angegeben isolierten und verarbeiteten Bakterien wurden wiederum auf ihre Aktivität geprüft.

Die Messungen ergaben für die aus der *Vallée*-Kultur isolierten Bakterien eine Aktivität, die einem Gehalt von $0,029 \gamma \pm 20\%$ APT/mg Bakterien Trockengewicht entspricht. Für die BCG-Bakterien ergab die Aktivitätsmessung einen Wert, der $0,035 \gamma \pm 20\%$ APT/mg Bakterien Trockengewicht entspricht.

¹⁾ *H. Erlenmeyer, C. Becker, E. Sorkin, H. Bloch* und *E. Suter*, *Helv.* **30**, 2058 (1947).

²⁾ Das Inokulum war bei diesen Versuchen bedeutend kleiner als bei den bisherigen Ansätzen; über die Methodik siehe *E. Suter, H. Erlenmeyer, E. Sorkin* und *H. Bloch*, loc. cit.

³⁾ Versuchsdauer 14 Tage.

⁴⁾ *H. Noll, E. Sorkin* und *H. Erlenmeyer*, loc. cit.

Diesen Versuchen ist zu entnehmen: 1. Der in den Bakterien ermittelte radioaktive ^{35}S zeigt, dass auch in Gegenwart von Serum in der Nährlösung das vorhandene APT mit den Bakterien in Beziehung kommt und, dass die Aufhebung der wachstumshemmenden Wirkung durch das Serum demnach nicht durch eine alleinige Bindung des APT an das Serum bedingt ist. 2. In Wachstumsversuchen mit Oberflächenkulturen in synthetischen Nährlösungen wurde die für eine sichere bakteriostatische Wirkung von den Bakterien aufzunehmende Menge von ^{35}S , unter der Annahme, dass die Aktivität dem APT zukommt, zu 0,005 γ oder mehr APT/mg Bakterien Trockengewicht ermittelt. Die in Gegenwart von Serum von den Bakterien aufgenommene Menge von ^{35}S übersteigt sowohl in den *Vallée*- als auch in den BCG-Kulturen diesen Wert, ohne dass jedoch hiermit eine bakteriostatische Wirkung verbunden war.

Für die Deutung der Serumwirkung ist demnach auch die Möglichkeit einer Nichtgleichartigkeit der Bakterien in wässrigen und in serumhaltigen Nährlösungen zu diskutieren.

Zusammenfassung.

Es wurde die von Tbc-Bakterien in synthetischen Nährlösungen, die ein mit ^{35}S indiziertes p-Aminophenylthiazol enthalten, aufgenommene Menge von radioaktivem Schwefel in Abhängigkeit von der APT-Konzentration in der Nährlösung ermittelt. Die für eine wachstumshemmende Wirkung notwendige Aktivität der isolierten Bakterien wurde festgestellt.

Weiterhin wurde die enthemmende Wirkung des Serums auf die wachstumshemmende Wirkung des APT untersucht. Es wurde gefunden, dass in Gegenwart von Serum die Bakterienkulturen wachsen, trotzdem sie nach der Isolierung einen Aktivitätswert zeigen, der grösser ist als der in den vorangegangenen Versuchen in synthetischer Nährlösung für eine wachstumshemmende Wirkung ermittelte Wert.

Universität Basel,
Anstalt für anorganische Chemie,
Hygienisches Institut,
und
Staatliches Seruminstitut,
Kopenhagen (Dir. *J. Ørskov*).