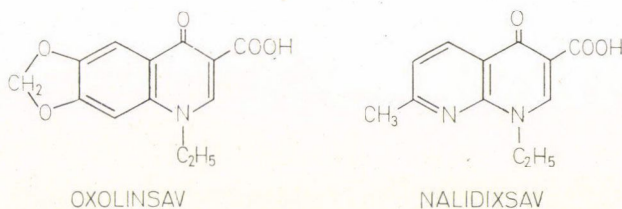


AZ OXOLINSAV HUMAN BIOTRANSFORMATIOJÁRÓL

PERÉNYI TIBOR és GRABER HEDVIG az orvostudományok kandidátusa

Közlésre érkezett: 1973. XI. 5.

Az oxolinsav, a nalidixsavhoz hasonló struktúrájú, (1. ábra) de antibakteriálisan aktívabb kinolinszármazék. Mikrobiológiai vizsgálatok bizonyítják, (Ringel és mtsai 1967, Turner és mtsai 1967, Graber és mtsai 1973) hogy korong módszerrel mérve több az oxolinsavra érzékeny törzs; ugyanazon törzseken pedig az oxolinsav MIC⁺, ill MBC⁺⁺ értékei alacsonyabbak, mint



1. ábra. Oxolinsav és nalidixsav szerkezeti képlete.

a nalidixsavéi. A szer így alacsonyabb dosisban adagolható és várhatóan a húgyúti fertőzések kezelésében hatásos eszközünk lesz. Erre utalnak a klinikai vizsgálatok is. (Atlas és mtsai 1969, D'Alessio és mtsai 1967, Madsen és Rhodes 1971, Scheidt és Schach 1970, Truant és Katsampes 1970.)

Mikrobiológiai és klinikai vizsgálatainkon kívül az oxolinsav human biotransformációjáról is tájékozódni kívántunk.

Módszer és anyag

Kémiai módszerekkel határoztuk meg 12 kezelés alatt álló betegen az oxolinsav, ill. metabolitjainak kvalitatív és quantitív ürítését, UV abszorbcióspektrummal, ill. kromatografiával.

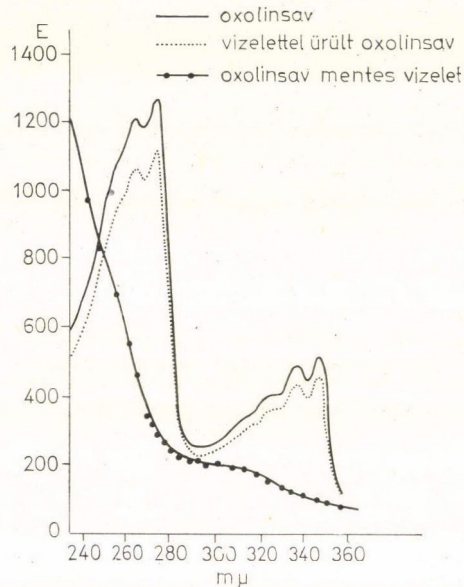
Szabad oxolinsav meghatározása: a vizeletet 2–3 pH-ig savanyítottuk, és diizopropiléteres extrakcióval tisztítottuk. A vizes fázist ezután kloroformmal kiráztuk; a szabad oxolinsav teljesen átvihető az organikus fázisba, míg a glukuronidok a vizes fázisban maradnak. Ezek után a szabad oxolinsavat

* MIC: minimalis inhibitor concentratio

** MBC: minimalis bactericid concentratio

0,1 N NaOH-val vontuk ki az organikus fázisból és 340 nm-es hullámhosszon mértük az abszorbtíot.

Di Carlo és *mtsai* (1968) szerint az oxolinsav abszorbtio spektruma kétesúcsú maximumot ad a 260 nm-es hullámhosszon. Magunk, a görbe további lefutásának megfigyelésével 325, ill. 340-es hullámhosszon másik, alacsonyabb, de szelektívebb kettős csúcsot észleltünk. Méréseinket azért végeztük ebben a régióban, mert itt más, ugyanakkor alkalmazott gyógyszer zavaró hatása kiküszöbölhető volt. (2. ábra)



2. ábra. Kristályos, továbbá vizeletből fázisecserével tisztított oxolinsav abszorptios spektruma.

A teljes oxolinsav mennyiségét ugyanezzel a módszerrel határoztuk meg, de a vizeletfrakciót előzőleg betaglucuronidaseval inkubáltuk.

A mennyiségek kiszámítása kalibrációs görbével történt. Minden esetben ellenőriztük a NaOH-s fázist teljes spektrumát, hogy más zavaró anyagok jelenlétét biztosan kizárjuk.

Az össz *glukuronsav* meghatározása *Bitter* és *Muir* (1962) szerint történt.

Papírkromatográfiás vizsgálataink felszálló technikával, *Schleicher-Schüll* 2034/b papíron készültek, kétféle szolvenssel.

A: n-propanol : etilacetat : víz (6 : 1 : 3)

B: n-propanol : butilacetat : etilacetat : víz (6 : 2 : 1 : 3)

A foltokat UV lámpa alatt hívtuk elő.

Vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálataink nem aktivált Kieselgel G rétegen kétféle szolvenssel történtek.

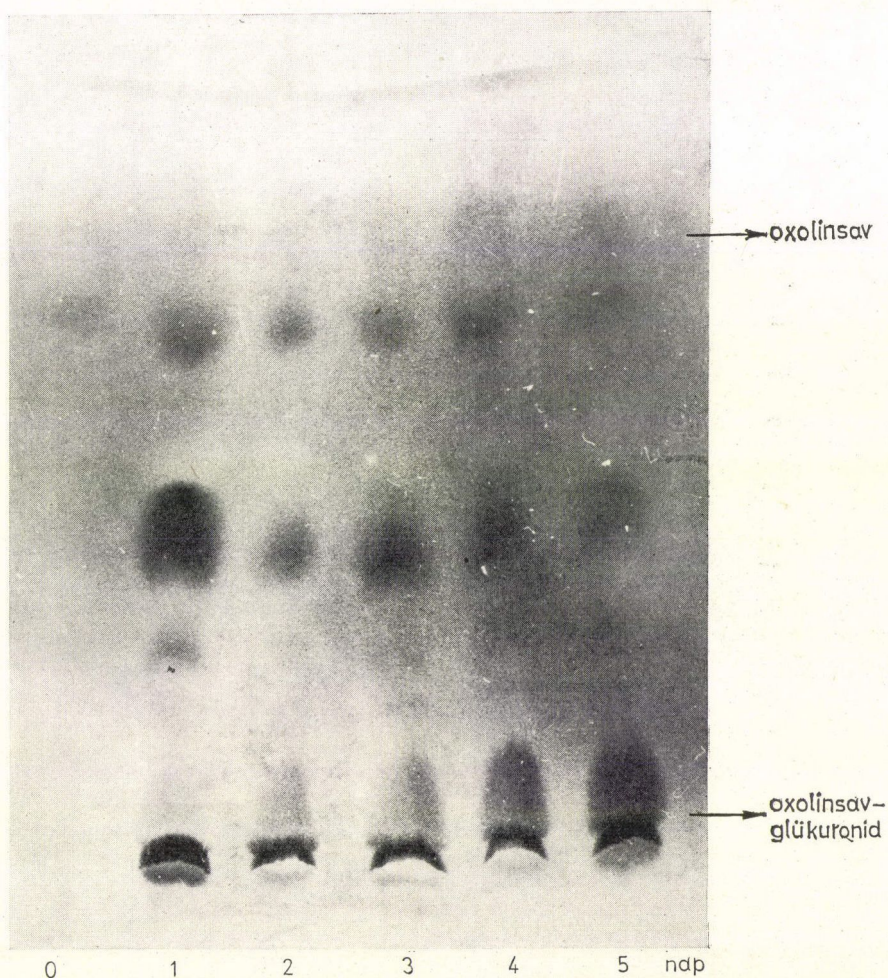
A: polár rendszer: etanol : víz (7 : 3)

B: apolár rendszer: nitrometán : jégecet (3 : 1)

A *biogrammokat* ugyanezen vékonyrétegekből állítottuk elő. Test orgánizmusként az OKI 30022 számú *E coli* törzset használtuk. A 18 órás kultúrából készített standard suspensio 1,0 ml-ét oldottuk be 100 ml folyékony agarba, és indikátorként 100 mcg/ml trifeniltetrazolimkloridot (TTC) kevertünk hozzá. A vékonyréteg lemezekre 5–7 mm vastagságú agarlemezt öntöttünk, majd az egész rendszert 24 órára 37 fokon inkubáltuk. A kioltási zónák a vörösesbarna alapon világosak maradtak.

Eredmények

3. és 4. ábránk papírkromatogrammok, amelyeket a kezelés alatt álló beteg naponta gyűjtött vizeletéből készítettünk, A. ill. B. szolvenssel. Mind-

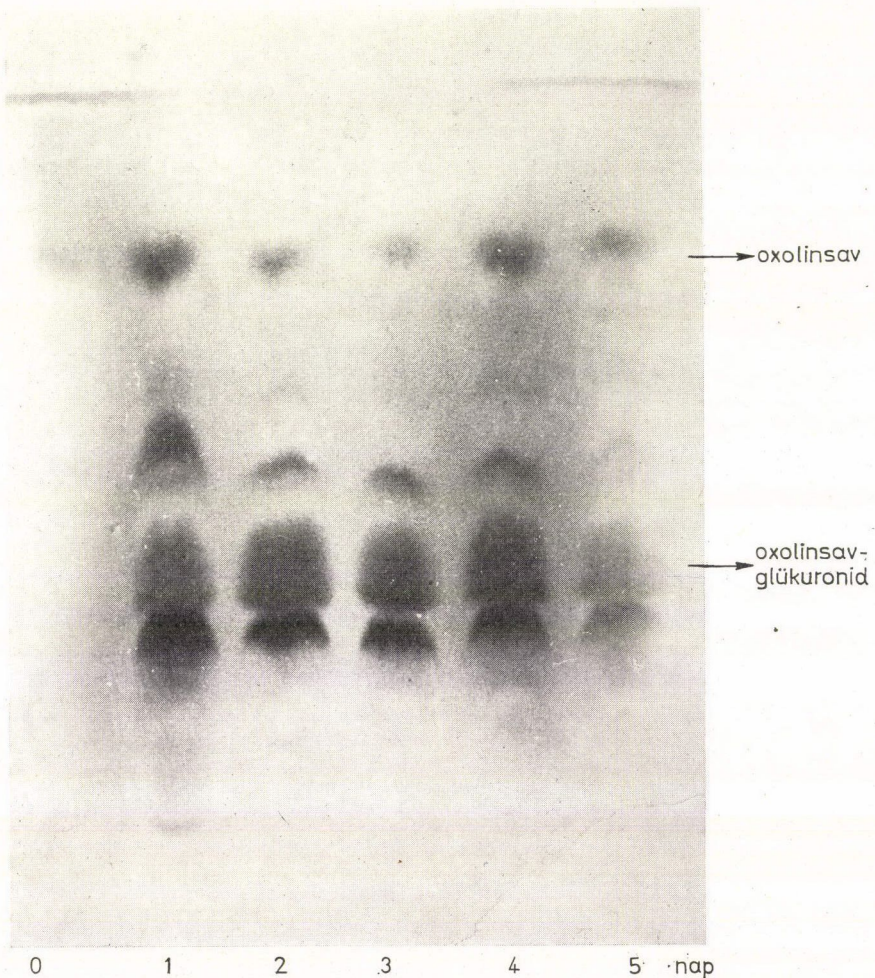


3. ábra. Oxolinsav kezelés alatt álló beteg naponta gyűjtött vizeletének papírkromatográfiája. Az egyes oszlopok az egyes napi frakciók kromatogramjai, B szolvenssel.

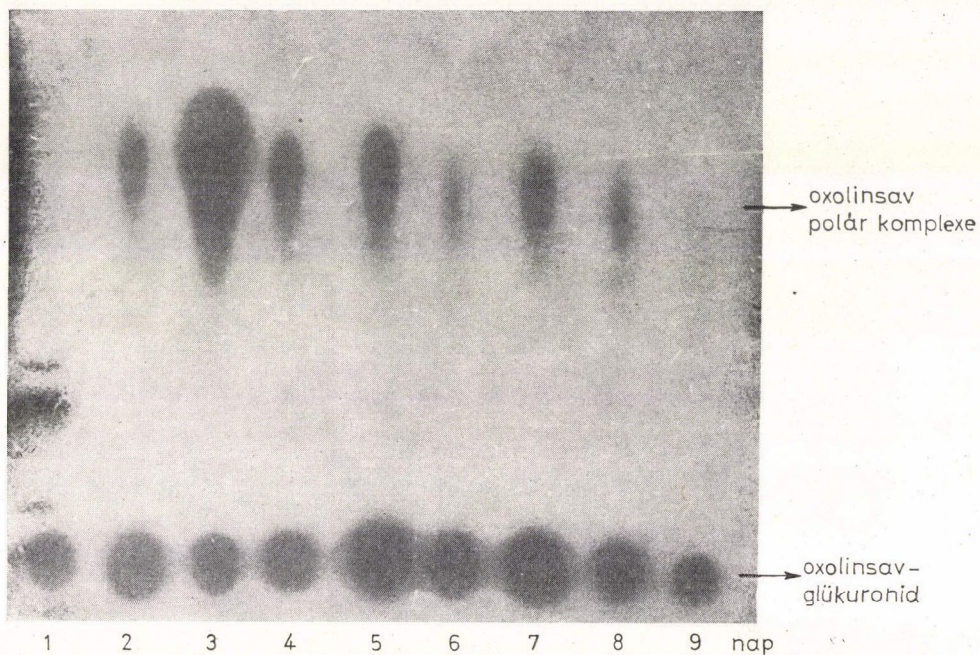
kettőn, de a 3. ábrán jobban kivehetően, három új folt látható a szabad oxolinsav, és glukuronidjának jól kivehető foltjai mellett. (Rf. 0,9, ill. Rf 0,35.)

Az új foltok 0,6, 0,3 és 0,25 Rf értékűek. Ezeknek a foltoknak az UV abszorbcióspektruma teljesen különböző az oxolinsavétól. Pontosabb identifikálásuk még folyamatban van. A 0,3-as Rf értékű folt glukuronidase kezelés után eltűnik, tehát mindezek szerint glukuronid.

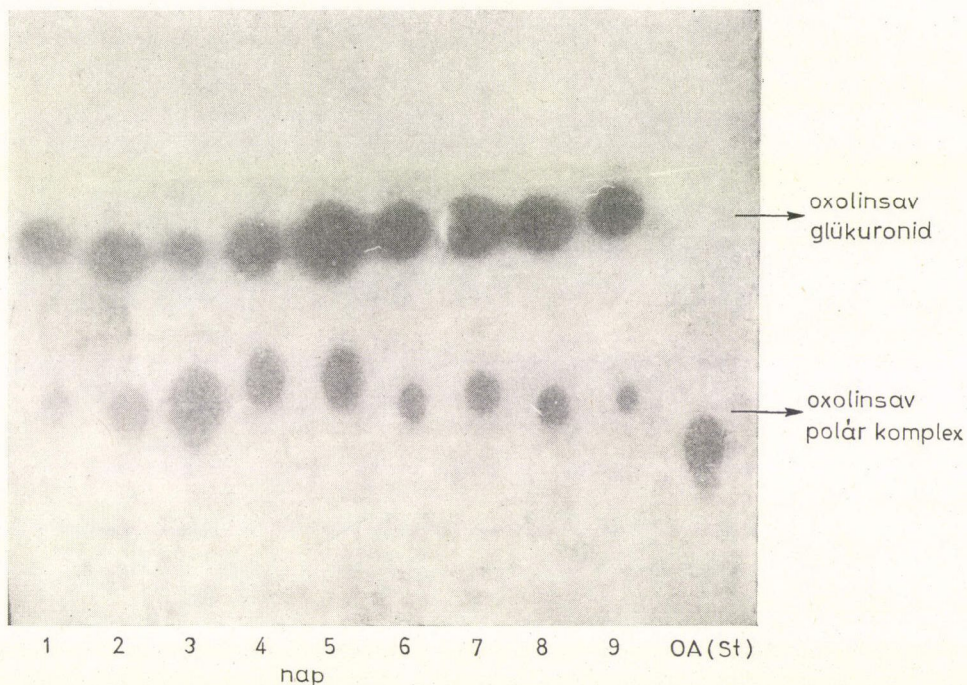
5. ábránk ugyanezen viszonyokról készült biogrammot mutat. A biogramokkal az egyes metabolitok biológiai aktivitásáról kívántunk meggyőződni. Az apolaros rendszerben a glukuronidok a start vonalról nem mozdulnak el, az oxolinsav (polár komplex formájában, mint *Di Carlo* kimutatta, (1968)) Rf értéke 0,7. Polár rendszerben (6. ábra) vizsgálva a glukuronidok mozgása



4. ábra. Oxolinsav kezelés alatt álló beteg naponta gyűjtött vizeletének papírkromatográfiája. Az egyes oszlopok az egyes napi frakciók kromatogramjai, A szolvenssel.



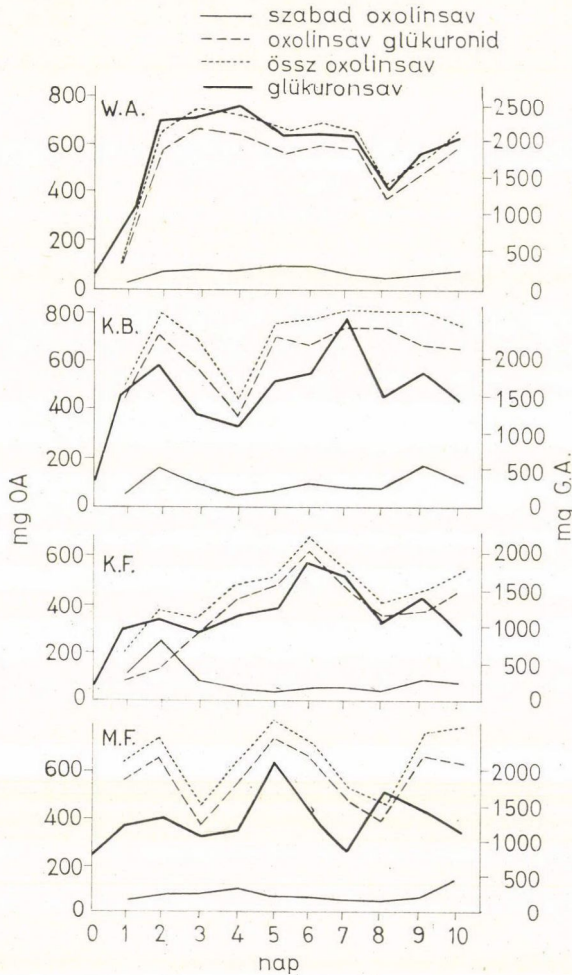
5. ábra. Oxolinsav kezelés alatt álló beteg naponta gyűjtött vizeletének biogrammja. Az egyes oszlopok az egyes napi frakciók kromatogramjai. B szolvens.



6. ábra. Oxolinsav kezelés alatt álló beteg naponta gyűjtött vizeletének biogrammja. Az egyes oszlopok az egyes napi frakciók kromatogramjai. A szolvens.

gyorsabb (Rf 0,7), mint az oxolinsav polár komplexéé (Rf 0,5). Mint ismeretes, a glukuronidok antimikrobásan nem aktívak, azonban az oxolinsav a 24 órás inkubálás alatt felszabadul a konjugált kötésből és a rendszerben világosan látható gátlási zónát ad.

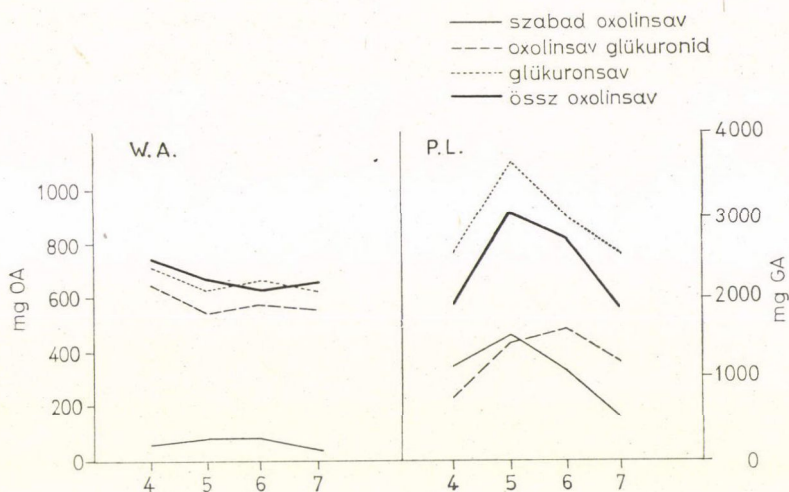
7. ábránk az oxolinsav, ill. metabolitjainak kvantitatív ürítési viszonyait ábrázolja grafikusan, négy jó máj-, ill. vesefunkciójú betegben. A szabad oxolinsav ürítése mindössze a bevitt adag 5–10%-át teszi ki, azonban ez az érték 20–80 mcg/ml között változik, ami a legtöbb bakterium MIC, ill. MBC értékét lényegesen meghaladja. A gyógyszer nagyobb része, 30–40%, glukuroniddé alakult és így jelenik meg a vizeletben. Mértük a betegek glukuronsav ürítését is és azt találtuk, hogy az oxolinsav szedése a glukuronsav ürítés összmenyiségét fokozta.



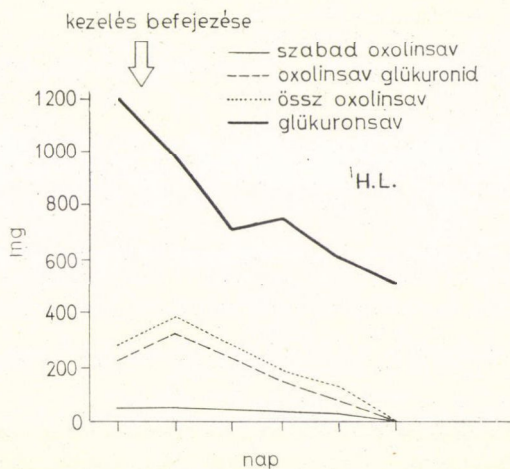
7. ábra. Négy normál máj- és vesefunkciójú beteg által ürített oxolinsav, ill. metabolitjai a kezelés folyamán.

8. ábránk az ürítés változását mutatja kóros májfunkciójú, hepatitis chronicában szenvedő betegben. Mind az oxolinsav szabad formája, mind pedig a glukuronsav ürítés mértéke emelkedett: viszont a glukuronidoké lényegesen csökkent a normál értékekhez képest.

A 9. ábra veseelégtelenségben szenvedő beteg ürítését mutatja be: mint látható, az oxolinsav szintje alacsony, de az ürítés elhúzódó, míg normál körülmények között a kezelés abbahagyása után 24–48 órával már nem látunk oxolinsavat a vizeletben, addig veseelégtelenségben az ürítés csak 5 nap múlva fejeződik be.



8. ábra. Kóros májfunkciójú beteg (P. L.) oxolinsav ürítése normál viszonyokkal (W. A.) összehasonlítva.



9. ábra. Veseelégtelenségben észlelt oxolinsav ürítés.

Megbeszélés

Az oxolinsav serum- és vizeletszintjét mikrobiológiai módszerrel Ringel és mtsai (1967), human metabolizmusát pedig kettősen jelzett izotop vegyületekkel, egyszeri adagot alkalmazva egészséges önkénteseknek, Di Carlo és mtsai vizsgálták (1968). Az ő megállapításuk, hogy az oxolinsav részben szabad formában, nagyobbrészt azonban glukuronidként ürül. Saját vizsgálataink eredménye ezzel teljesen egyezik. Módszerük lehetővé tette, hogy a széket vizsgálatával a teljes bevitt gyógyszeradaggal el tudjanak számolni. Ezen kívül megállapították azt is, hogy az oxolinsav a vizeletben polár komplex formában van jelen, ez teszi lehetővé az egyébként rosszul oldódó anyag oldatban maradását. További eredményük, hogy igen kis mennyiségben más, biológiailag inaktív metabolitokat is kimutattak, amelyek, a kémiai elemzés szerint, a metiléndioxi-csoport felbomlásából keletkeztek, azonban a vegyület kinolinváza változatlan maradt.

Saját vizsgálatainkban talált, biológiailag aktív komponens kizárólag a szabad oxolinsav volt, amelyet — a polár és apolár rendszerekben való viselkedése alapján, magunk is polár komplexnek tartunk. A biogrammon észlelt másik aktív termék, mint említettük, in vivo nem aktív; az inkubálás folyamán a kötésből felszabaduló oxolinsav adja az aktivitást.

Az ismeretlen eredetű foltok elemzésekor először megkíséreltük összeegyeztetni őket a Di Carlo (1968) által kimutatott, a metiléndioxi-csoport felbomlásából keletkezett, ún. katechol formákkal. Ezt azonban az UV spektrum határozottan cáfolta. Folyamatban levő tömegspektrográfós analízisünk is más szerkezetű anyag mellett szól. Nyitva marad tehát a kérdés, hogy vajon lehetséges-e a nagyon stabil oxolinsav teljes átalakulása a szervezetben, vagy pedig másik vegyületnek, az oxolinsav által indukált ürítéséről van szó.

Minden egyes betegünkben az oxolinsav szedésével párhuzamosan a glukoronsav ürítésének növekedését észleltük. Úgy látszik, hogy az oxolinsav (a nalidixsavhoz hasonlóan; McChesney és mtsai 1964) a glukuronsavképzést indukálja. Ezért, mivel a glukuronsav a gyógyszermetabolizmus egyik kulcsvegyülete, a gyógyszerinterakciók lehetőségével számolnunk kell (Miettinen és Leskinen 1970, Conney 1967).

Májlaesios betegekünk ürítésének vizsgálata azt mutatja, hogy bár az oxolinsav jelen van, továbbá az erősen indukált glukuronsavképzés révén nagy mennyiség áll rendelkezésre, a glukuronidképzés igen kismértékű. Feltehető, hogy ezt az uridindifoszoglukuronidtranszferaze enzim valamilyen defektusa magyarázza.

Mivel ilyen módon májbeteg egyén vizeletében a szabad oxolinsav nagyobb százalékban ürül a normálisnál, valószínű, hogy ilyen esetekben kisebb adagokkal elérhető a terápiás szint.

Veseelégtelenségben szenvedő betegben, más gyógyszerekhez hasonlóan,

az oxolinsav ürítése is elhúzódik; ezekben az esetekben tehát a nagyobb intervallumokban való adagolás látszik kívánatosnak.

Mivel a szer human metabolizmusát pathológiás körülmények között még nem vizsgálták, ezen eredményeink további megerősítésre szorulnak.

Összefoglalás

1. Kémiai módszerekkel vizsgáltuk az oxolinsav és metabolitjainak ürítését húgyúti infekciókban, egyébként egészséges, továbbá máj-, ill. vese-laesióban szenvedő betegeken.

2. A szabad oxolinsav a bevitt adag 5–10%-ában ürül. Ez a mennyiség biztosítja a vizeletben szükséges terápiás koncentrációt.

3. A szer glukuronidján kívül három további, szerkezetében az oxolinsavtól eltérő vegyület ürítését mutattuk ki, amelyek pontosabb azonosítása még folyamatban van.

4. Az oxolinsav szedésével párhuzamosan a glukuronsav ürítés megnő; ez a gyógyszerinterakciók lehetőségét veti fel.

5. Kóros májfunkció esetén a glukuronidképzés csökkenését és a szabad oxolinsav ürítésének fokozódását észleltük; veseelégtelenségben pedig az ürítés elhúzódását.

IRODALOM

- Atlas, E., Clark, H., Silverblatt, F., Turch, M.*: Ann. Intern. Med. **70**, 713 (1969).
- D'Alessio, D. J., Olexy, V. M. és Jackson, O. G.*: Oxolinic Acid treatment of urinary tract infections. Antimicrob. Agents and Chemother. p. 490. (1967).
- Bitter, T. és Muir, H. M.*: Anal. Biochem. **4**, 330 (1962).
- Di Carlo, F. J., Crew, M. C., Melgar, M. D., Roemer, S., Ringel, S. M., Haynes, J. L. és Wilson, M.*: Arch. Int. Pharmacodyn. **174**, 413 (1968).
- Di Carlo, F. J., Crew, M. C. és Greenough, R. C.*: Arch. Biochem. Biophys. **127**, 503 (1968).
- McChesney, E. W., Froelich, E. J., Leshner, G. Y., Crain, A. V. R. és Rosi, D.*: Toxicol. appl. pharmacol. **6**, 292 (1964).
- Conney, A. H.*: Pharmacol. Rev. **19**, 317 (1967).
- Graber, H., Arr, M.*: Mikrobiológiai és klinikai vizsgálatok oxolinsavval. Közlés alatt.
- Madsen, P. O. és Rhodes, P. R.*: J. Urol. **105**, 870 (1971).
- Miettinen, T. A. és Leskinen, E.*: Glucuronic acid pathway. in: Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis. vol. I. p. 157. (Ed: W. H. Fishman.) Academic Press. New York. (1970).
- Ringel, S. M., Turner, F. J., Lindo, F. L., Roemer, S. és Direnga, B. A.*: Oxolinic acid, a new synthetic chemotherapeutic agent. II. Bactericidal rate and resistance development. Antimicrob. Agents and Chemother. p. 480. 1967).
- Ringel, S. M., Turner, F. J., Roemer, S., Daly, J. M., Zlatanoff, R. és Schwartz, B. S.*: Oxolinic acid, a new synthetic chemotherapeutic agent. III. Concentration in serum, urine and renal tissue. Antimicrob. Agents and Chemother. p. 486. (1967).
- Scheidt, J. és Schach, H.*: Dtsch. med. Wschr. **24**, 462 (1970).
- Schmitt, G., Neussel, H. és Pardon, F.*: Int. J. Clin. Pharmacol. ther. a. Toxicol. **7**, 246 (1973).
- Truant, J. P., Katsampes, C.*: Clinical effectiveness of oxolinic acid in urinary tract infections. Progress in Antibacterial and Anticancer Chemotherapy. Univ. Park Press, Baltimore. (1970).
- Turner, J. T., Ringel, S. M., Martin, J. F., Storino, P. J., Daly, J. M., Schwartz, B. S.*: Oxolinic acid, a new synthetic antimicrobial agent. In vivo and in vitro studies. Antimicrob. Agents and Chemother. p. 475. (1967).