

Н. А. АПОЯН, Ж. Б. САЯДЯН

ВЛИЯНИЕ ИЗОНИКОТИНОИЛ ГИДРАЗОНА 5-БЕНЗИЛ
 2-АЦЕТИЛ ФУРАНА И ФТИВАЗИДА НА
 ДЕГИДРОГЕНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ МИКОБАКТЕРИЙ

Шефнер [1], изучая механизм действия изониазида на туберкулезную палочку, установил, что суббактериостатические концентрации изониазида повышают дегидрогеназную активность туберкулезной палочки. По его данным последнее специфично для изониазида и его производных. Боники [2] еще ранее сообщил об избирательном бактериостатическом действии фуран-2 карбоксильного гидразида на бычий штамм туберкулезной палочки и подавлении его дегидрогеназной активности.

Исследования в области производных фурана в Институте тонкой органической химии АН АрмССР А. Л. Мнджояном и его сотр. [3] выявили, что из синтезированных ими ряда гидразонов фурана одним из наиболее активных является изоникотиноил гидразон 5-бензил 2-ацетил фуран. В этом соединении уже имеется сочетание двух активных групп— пиридина и фурана. Исходя из вышензложенного, нам представлялось интересным проверить влияние изоникотиноил гидразон 5-бензил 2-ацетил фурана на активность дегидрогеназы микробов. По-видимому, изучение влияния вышеуказанного препарата на активность микобактерий поможет нам выявить активную группу, за счет которой происходит специфическое антимикробное воздействие. Наряду с ним точно также изучалось и влияние фтивазида (изоникотиноил 3-метокси 4-оксибензил гидразида).

В опыт были взяты 2 штамма: вакцинный штамм ВСГ и сапрофитная палочка—микобактерий В₅. Оба штамма обладают дегидрогеназной активностью. Вакцинный штамм ВСГ выращивался на картофельно-глицериновой среде, а сапрофит микобактерий В₅ на яичной среде Любенау. Из них по стандарту вакцины ВСГ готовилась взвесь микробов, трехкратно отмытая от питательной среды, густотой в 5—10 миллиардов. Взвесь микробов смешивалась в равном объеме с различными концентрациями изучаемых препаратов.

Изучаемые препараты с трудом растворялись в воде, поэтому мы вначале их растворяли в спирте, затем уже в дистиллированной воде, в концентрации 1 : 5000, 1 : 10000; 1 : 20000; 1 : 40000. В пробирки с соответствующими концентрациями препарата вводилась взвесь микробов различной густоты и выдерживалась в термостате при 37°C. Определение дегидрогеназной активности микробов проводилось через каждые 3—24—48—72 часовой экспозиции смеси при 37° следующим образом.

2% агар, изготовленный на буферном растворе K_2HPO_4 ($pH=7,0$) и содержащий 1% глюкозы, растапливался, охлаждался до 45° и разливался по пробиркам со смесью микробы+препарат, т. е. с культурой, выдержанной в термостате с различными концентрациями изучаемых препаратов. Содержимое пробирки хорошо смешивалось, охлаждалось и только после затвердения агара пробирки помещали в термостат при 37° . Через каждые 5—10 мин. в течение часа, а в дальнейшем через каждый час в течение 4 час. наблюдалось за обесцвечиванием. Если среда не обесцвечивалась за этот срок, наблюдения продолжались еще 24 часа. Реакция обесцвечивания метиленовой сини говорит о дегидрогеназной активности микробов, т. е. о стимулировании окислительно-восстановительной реакции микробных клеток.

Для сравнения воздействия препаратов на дегидрогеназную активность нами был поставлен ряд контрольных опытов. K_1 —из опытной среды исключались изучаемые препараты. K_2 —из опытной среды исключались препараты, но вводилась смесь микроб+спирт в разведении 1:9, какое имелось при введении растворов препаратов. K_3 —из опытной среды исключались препараты, но вводилась смесь микроб+спирт в разведении 1:100. K_4 —из опытной среды исключались препарат и глюкоза. K_5 —из опытной среды исключалась микробная взвесь. Дегидрогеназная активность микробов отмечалась крестами. Обесцвечивание раньше всего наступает в нижней части пробирки. В верхней части агара, вследствие диффузии кислорода воздуха, остается синяя зона (2—3 мм), образующая контраст с обесцвеченной областью внизу. Полное обесцвечивание агара в пробирке, не считая верхней синей зоны в 2—3 мм, отмечалось + + +, две трети среды + +, если же имелось обесцвечивание половины среды + +. Обесцвечивание нижней части среды отмечалось +.

В обычных условиях добавление 12-дневной культуры ВСГ в агаровую среду с метиленовой синью вызывало быстрое ее обесцвечивание за 5—7 мин. Предварительное выдерживание такой взвеси при $37^\circ C$ снижало ее дегидрогеназную активность, обесцвечивание среды наступало через 30 минут. Как видно из табл. 1, введение в микробную взвесь изучаемых препаратов, ее выдерживание, т. е. препарат+микроб 3 часа при $37^\circ C$ не отражалось на активности фермента. Однако более длительная экспозиция препарат+микроб при $37^\circ C$ выявляла определенное действие препарата на ферментативную активность штамма ВСГ, зависящее от концентрации препарата. Из табл. 2, в которой приведены данные влияния препаратов на дегидрогеназу штамма ВСГ, видно, что суббактериостатические концентрации изоникотиноил гидразол 5-бензил, 2-ацетил фурана и фтивазида почти в одинаковой степени повышают дегидрогеназную активность микроба по сравнению с контрольными пробирками.

Эта реакция более четко проявлялась после 48—72-часовой экспозиции препарат+микроб. Так, при 24-х часовой экспозиции дегидрогеназная активность микобактерий выявлялась после двух час., а при

12-дневная 10-миллиардная взвесь культуры BCG

Время обесцвечивания	Разведение препарата								Контроль				
	Изоникотиноил гидразона 5-бензол 2-ацетил фурана				Фтивазида				K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅
	1/5000	1/10000	1/20000	1/40000	1/5000	1/10000	1/20000	1/40000					

Выдерживание смеси препарат + микроб 24 часа при 37°C

1 час	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2 часа	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3 часа	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4 часа	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24 часа	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—

Выдерживание смеси препарат + микроб 48 часов при 37°C

1 час	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2 часа	—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—
3 часа	—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—
4 часа	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24 часа	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—

Выдерживание смеси препарат + микроб 72 часа при 37°C

1 час	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2 часа	—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—
3 часа	—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—
4 часа	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24 часа	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—

12-дневная 10-миллиардная взвесь культуры BCG

Время обесцвечивания	Разведение препарата								Контроль				
	Изоникотиноил гидразона 5-бензол 2-ацетил фурана				Фтивазида				К ₁	К ₂	К ₃	К ₄	К ₅
	1/5000	1/10000	1/20000	1/40000	1/5000	1/10000	1/20000	1/40000					

Выдерживание смеси препарат + микроб 24 часа при 37°C

1 час	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2 часа	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3 часа	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4 часа	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24 часа	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—

Выдерживание смеси препарат + микроб 48 часов при 37°C

1 час	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2 часа	—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—
3 часа	—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—
4 часа	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24 часа	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—

Выдерживание смеси препарат + микроб 72 часа при 37°C

1 час	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2 часа	—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—
3 часа	—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—
4 часа	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24 часа	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—

Таблица 3

12-дневная 5 миллиардная взвесь культуры BCG

Время обесцвечивания	Разведение препарата								Контроль				
	Изоникотиноил гидразона. 5-бензил 2-ацетил фурана				Фтивазида				К ₁	К ₂	К ₃	К ₄	К ₅
	1/5000	1/10000	1/20000	1/40000	1/5000	1/10000	1/20000	1/40000					

Выдерживание смеси препарат + микроб 24 часа при 37°

1 час	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 часа	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 часа	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 часа	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
24 часа	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-

Выдерживание смеси препарат + микроб 48 часов при 37°С

1 час	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 часа	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 часа	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
4 часа	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
24 часа	++	++	++	++	-	+	++	++	++	++	++	+	-

Выдерживание смеси препарат + микроб 72 часа при 37°

1 час	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 часа	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 часа	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 часа	-	-	++	++	-	-	+	+	-	-	-	-	-
24 часа	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++	+	-

48—72-часовой экспозиции после трех час. В контрольных пробирках обесцвечивание наступало только к 22—24 час.

При уменьшении количества микробов в смеси препарат + микроб снижалась дегидрогеназная активность штамма ВСГ (табл. 3).

Известно, что у старых культур снижена ферментативная активность.

Нами были проведены опыты определения дегидрогеназной активности у 17—24-дневных культур ВСГ. Оказалось, что изучаемые препараты не действуют на дегидрогеназную активность старых культур (табл. 4). Исходя из вышеизложенного, можно прийти к выводу, что бактериостатические концентрации (1/5000, 1/40000) изучаемых препаратов стимулируют дегидрогеназную активность штамма ВСГ, что свидетельствует об изменении окислительно-восстановительной реакции. Опыты с сапрофитом микобактерий B_5 были поставлены точно так же, как и с вакцинной культурой ВСГ. Культура микобактерии B_5 , выращенная в течение 4-х дней, ферментативно высокоактивна независимо от длительного выдерживания ее с препаратом. Уменьшение количества микобактерий от 10 млрд до 5 млрд микробов, а также длительность выращивания культуры на питательной среде снижало их ферментативную активность независимо от присутствия препарата. Следовательно, вышеуказанные препараты в испытанных концентрациях не оказывали воздействия на активность фермента микобактерии B_5 .

Нарушение дегидрогеназной активности культуры ВСГ под действием бактериостатических доз изучаемых препаратов, по-видимому, указывает на определенную связь этого изменения с механизмом действия препарата.

В ы в о д ы

1. Изоникотиноил гидразон 5-бензил 2-ацетил фуран и фтивазид, подобно изониазиду и его производным, в бактериостатических концентрациях 1/5000—1/40000 стимулирует дегидрогеназную активность молодых культур ВСГ.

2. Вышеуказанные препараты в концентрациях 1/5000—1/40000 не действуют на дегидрогеназную активность сапрофита микобактерии B_5 .

Институт тонкой органической химии
АН АрмССР

Поступило 27.IV 1965 г.

Ն. Հ. ԱՓՈՅԱՆ, Ժ. Բ. ՍԱՅԱԴՅԱՆ

5-ԲԵՆՉԻԼ-2-ԱՑԵՏԻԼՖՈՐԱՆԻ ԻՉՈՆԻԿՈՏԻՆՈՒԼ ՀԻԴՐԱԶՈՆԻ ԵՎ ՖՏԻՎԱԶԻՆԻ
ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԻԿՈԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԴԵՀԻԴՐՈԳԵՆԱԶԱՅԻՆ
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել է 5-բենզիլ-2-ացետիլֆուրանի իզոնիկոտինոիլ հիդրազոնի և ֆտիվազինի ազդեցությունները BCG վակցինային շտամի և B₅ սապրոֆիտ միկոբակտերիայի դեհիդրոգենազային ակտիվությունների վրա:

Փորձերը կատարվել են այդ միացությունների 1/5000—1/40000 նոսրացրած լուծույթների հետ ջերմության 37°C-ի պայմաններում, 3—24—48 և 72 ժամվա ընթացքում:

Ստացված այս խառնուրդները այնուհետև ավելացվել են 1 գլյուկոզա և 0,02 մեթիլենային կապույտ պարունակող 2% ազարային միջավայրին և այն թողնվել է 72 ժամ 37°C-ում:

Փորձի տվյալները ցույց են տվել, որ նշված մեծությունների 1/5000 և 1/40000 բակտերիոստատիկ լուծույթները ուժեղացնում են BCG շտամի դեհիդրոգենազային ակտիվությունը, համեմատելով այն միայն միկոբակտերիաներ պարունակող խառնուրդից ստացված տվյալների հետ:

Միաժամանակ պարզվել է, որ այդ նույն միացությունները B₅ միկոբակտերիայի դեհիդրոգենազային ակտիվության վրա ոչ մի ազդեցություն չի թողնում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Werner B. Schaffner. J. of Bacteriology, 79, 2, 236, 1960.
2. Bonice цит. из J. of Bacteriology, 79, 2, 236, 1960.
3. Мнджоян А. Л., Африкян В. Г., Дохикян А. А., Журули Л. Д. Изв. АН АрмССР (хим. науки), т. XV, 313, 1960.