

Navorsings- en oorsigartikels

In vitro antimikrobiële aktiwiteit en *in vivo*-toksisiteit van die afbraakprodukte van trimetoprim

J.J. Bergh*, J.C. Breytenbach en S. van Dyk

Departement Farmaseutiese Chemie, Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys, Potchefstroom 2520

Ontvang 15 Januarie 1991; aanvaar 28 Mei 1991

UITTREKSEL

Die *in vitro* antimikrobiële aktiwiteit en *in vivo*-toksisiteit van vyf pirimidien, almal afbraakprodukte van trimetoprim, is bepaal. Hierdie produkte, wat na hidrolise of oksidasie van die geneesmiddel ontstaan, is meestal biologies onaktief. Met die uitsondering van die ketoon, wat slegs teenoor een van die mikro-organismes in die toets aktief is, beskik nie een van die verbindings oor antibakteriële aktiwiteit nie, terwyl geeneen akute toksisiteit of fototoksisiteit vertoon nie.

ABSTRACT

In vitro antimicrobial activity and *in vivo* toxicity of trimethoprim degradation products

The *in vitro* antimicrobial activity and *in vivo* toxicity of five pyrimidines, degradation products of trimethoprim, was determined. These compounds, formed on hydrolysis or oxidation of the drug, are mostly biologically inactive. With the exception of the ketone, which is active against only one of the micro organisms used in the test, all other compounds are devoid of antimicrobial activity and none possesses acute toxicity or phototoxicity.

AGTERGROND

Geneesmiddelstabiliteit is van groot farmaseutiese belang. Saam met oplosbaarheidseienskappe bepaal dit grootliks die tipe en aard van die doseervorm waarin geneesmiddels geformuleer kan word en stel sodoende spesifieke eise aan die vervaardiger. Hierdeur, en deur die invloed op die rakleef tyd van die produk, beïnvloed chemiese stabiliteit die koste van medisyne. 'n Geneesmiddel is slegs terapeuties bruikbaar indien die stabiliteit die formulering, hantering en bewaring daarvan toelaat. Ontbindingsprodukte wat in die formulering kan ontstaan, beïnvloed die veiligheid en effektiwiteit van medisyne. Verder vereis die registrerende owerheid inligting oor die stabiliteit van geneesmiddels en oor die moontlike effekte van afbraakprodukte.

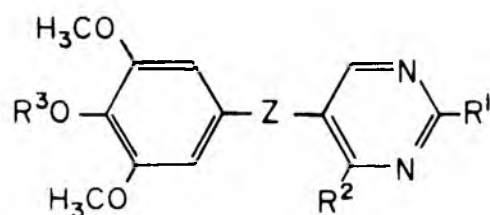
Trimetoprim (1) [2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoksibensiel)-pirimidien] word wyd teen verskeie bakteriële infeksies gebruik en word dikwels óf alleen óf in kombinasie, meestal met sulfoonamide, voorgeskryf. Ons stel om verskeie redes in die ontbinding van hierdie geneesmiddel belang en het voorheen aangetoon¹ dat hoewel trimetoprim (1) redelik stabiel is, dit deur termiese, suur- en/of fotochemies gekataliseerde hidrolise of oksidasie oorsprong aan ten minste vyf ontbindingsprodukte [(2) – (6)] gee. Die oksidasieprodukt (2) vorm binne 'n paar dae in oplossings of in suspensies wat aan sonlig blootgestel is, terwyl twee ander ontbindingsprodukte [(4) en (5)] in verskeie kommersiële farmaseutiese suspensies waargeneem¹ is. Die kinetika van die afbraakreaksie is voorheen gerapporteer.²

In hierdie artikel beskryf ons die *in vitro* antimikrobiële aktiwiteit en *in vivo*-toksisiteit van die afbraakprodukte. Die *in vitro* antimikrobiële aktiwiteit teenoor sewe spesies

*Outeur aan wie korrespondensie gerig kan word.

TABEL 1

Strukture van trimetoprim (1) en sy afbraakprodukte



	R ¹	R ²	R ³	Z
1	NH ₂	NH ₂	CH ₃	-CH ₂ -
2	NH ₂	NH ₂	CH ₃	O -C-
3	OH	OH	CH ₃	-CH ₂ -
4	OH	NH ₂	CH ₃	-CH ₂ -
5	NH ₂	OH	CH ₃	-CH ₂ -
6	NH ₂	OH	H	-CH ₂ -

Grampositiewe bakterieë, drie spesies Gramnegatiewe bakterieë, twee skimmels en 'n gis is bepaal deur van die direkte agarplaattegniek³ gebruik te maak. Die *in vivo*-toksisiteit is bepaal deur 'n hippokratiese evalueringstoets⁴ na orale

dosering van 1 000 mg/kg van die toetsverbindings aan Sprague-Dawleyrotte. Makroskopiese en histologiese *post mortem*-ondersoeke van alle organe is gebruik in die evaluering van akute toksisiteit.

MATERIALE EN METODEDES

Die verbindings (1) tot (6) is verkry soos voorheen beskryf.¹ Kommersiële suspensies waarna verwys word, was tussen 4 en 7 jaar oud.

Antimikrobiële aktiwiteit

Die organismes soos in tabel 2 uiteengesit, is in die direkte agarplaattegniek³ gebruik. Difco-voedingsagar is gebruik as groeimedium vir bakterieë en Oxoid-moutekstrakagar vir fungi. Geïnkubeerde plate is vir 24 uur by 37°C geïnkubeer. Die teenwoordigheid van 'n groei-inhibisiesone rondom die toetsverbindings is 'n aanduiding van antibakteriële aktiwiteit.

TABEL 2

Antimikrobiële aktiwiteit van verbindings (1) – (6)

MIKROËRGANISME	AKTIWITEIT (grootte van inhibisiesone in mm)					
	1	2	3	4	5	6
GRAM +						
<i>Staphylococcus aureus</i>	5&5vg	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus salivarius</i>	ng	ng	ng	0	ng	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1 vg	0	0	ng	0	ng
<i>Bacillus licheniformis</i>	1 vg	0	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	2 vg	0	0	0	0	0
<i>Micrococcus roseus</i>	ng	ng	ng	0	ng	0
<i>Micrococcus luteus</i>	13	0	0	ng	0	ng
GRAM -						
<i>Enterobacter cloacae</i>	± vg	2	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	4	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella sp.</i>	5 vg	0	0	0	0	0
SKIMMELS						
<i>Penicillium sp.</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus sp.</i>	0	0	0	0	0	0
GIS						
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	0

Sleutel:

vg: vertraagde groei

ng: organisme nie vir die spesifieke verbinding gebruik nie

± : inhibisiesone onduidelik of kleiner as 0,5 mm

Akute toksisiteit

Suspensies van verbindings (1), (2), (3) en (5) in 0,25% waterige agar is oraal in 'n enkele dosis van 1 000 mg/kg aan groepe van ses nievastende manlike Sprague-Dawleyrotte met massas tussen 100 en 150 g toegedien. Water en voedsel is twee uur na dosering weerhou. Die diere is in 'n gekontroleerde omgewing oor 'n periode van sewe dae waargeneem en tekens van toksisiteit is geëvalueer en aangeteken van 0 (teken afwesig of normaal) tot ++++ (teken abnormaal) volgens die stelsel van Malone en Robichaud.⁴ Aan die einde van die observasieperiode is die proefdiere gedood deur 'n oordosis natriumpentobarbitoon en onderwerp aan 'n makroskopiese en histologiese *post mortem*-ondersoek van alle organe. 'n Groep van ses rotte

wat aan dieselfde protokol maar sonder die toetsverbinding blootgestel was, is as kontrole gebruik. Verbindings (4) en (6) is vanweë 'n gebrek aan materiaal nie getoets nie.

TABEL 3

Tekens waargeneem na orale toediening van (2)(1 000 mg/kg)

TEKEN	AANTAL	DUUR	MAKSIMUMTELLING
Verlaagde motoriek	6	1-6	+++
Enoftalmos	4	2-6	+
Prose	6	4-6	++++
Pilomotoriese ereksie	5	1-6	++
Miose	6	1-48	0,1 mm
Lakrimasie	3	2-6	+++
Hiperemie	4	1-4	+
Mikturisie	5	0,5-24	++

Sleutel:

Teken: abnormale tekens waargeneem

Aantal: aantal diere uit 'n groep van 6 wat die tekens vertoon

Duur: tydsduur (uur) waartydens tekens waargeneem is

Maksimum telling: maksimum telling op 'n skaal 0 tot ++++ (kyk Malone en Robichaud, ref 4).

Fototoksisiteit

Fototoksisiteit is 'n ongewenste velreaksie wat voorkom by gelyktydige of agtereenvolgende blootstelling van die vel aan sekere molekules (fotosensitiseerders) en lig.⁵

Candida albicans is as die toetsorganisme vir die bepaling van fototoksisiteit⁶ van verbindings (1) tot (6) gebruik. Toetsplate is onder UV-lig (366 nm) en duplikaatplate (as kontroles) in die donker geïnkubeer. Die teenwoordigheid van 'n groter groei-inhibisiesone by die toetsplate as by die kontroles is 'n aanduiding van fototoksisiteit.

RESULTATE EN BESPREKING

Antimikrobiële aktiwiteit

Trimetoprim (1) vertoon die verwagte aktiwiteit teen al die Grampositiewe en Gramnegatiewe bakterieë in die toets (tabel 2). Verbindings (3), (4), (5) en (6), waarin een of beide aminogroepe met hidroksifunksies vervang is, toon geen aktiwiteit teenoor enige van die toetsorganismes nie. Hierdie resultate is in ooreenstemming met vorige bevindings⁷ dat die 2,4-diaminostitueerte essensieel vir antibakteriële aktiwiteit is. Dit is ook aangetoon⁸ dat die waterstofbinding tussen die 4-aminogroep van trimetoprim (1) en die ruggraatkarbonielgroep van Val-115 in *E. coli* dihidrofilatreduktase (DHFR) 'n belangrike element verantwoordelik vir hierdie geneesmiddel se meer potente inhibisie van bakteriële DHFR as van hoender-DHFR is. Verder is aangetoon⁹ dat verskille in die selektiwiteit van bensielgesubstitueerde verbindings vir bakteriële DHFR grootliks afhanklik is van die aard van die 4'-substituent, synde laag vir polêre 4'-hidroksiverbindings, maar hoog vir 4'-amino-analoë. Verbinding (2) daarteenoor besit die 2,4-diaminogroep, maar is slegs teen *Enterobacter cloacae* aktief. Hierdie afname in aktiwiteit soos vergelyk met dié van trimetoprim (1) is waarskynlik die gevolg van geometriese en strukturele verskille tussen (1) en (2). Dit kan wees dat die kritiese waterstofbinding tussen die

4-aminogroep van (2) en die karbonielgroep in die aktiewe posisie van bakteriële DHFR vanweë die geometrie van (2) nie moontlik is nie. Verbinding (2) bind wel aan *Streptococcus faecium*-DHFR.¹⁰

Die effektiwiteit van trimetoprim enersyds en sy veiligheid vir die mens andersyds, berus op dié middel se hoë affiniteit vir die bakteriële dihidrofolaatreduktase, terwyl dit eers by veel hoër konsentrasies die reduktase in die menslike lewer inhibeer.¹¹

Toksisiteit

Verbindings (1), (2), (3) en (5) het, teen 'n dosis van 1 000 mg/kg, nie die dood van enige proefdiere veroorsaak nie en sowel makroskopiese as histologiese *post mortem*-ondersoeke het geen letsels getoon wat aan hierdie verbindings toegeskryf kon word nie. Hoewel verbindings (1), (3) en (5) geen tekens van toksisiteit veroorsaak het nie, het (2) 'n aantal nonspesifieke tekens van veranderlike intensiteit, soos in tabel 3 opgesom, veroorsaak. 'n Afname in motoriek, enftalmos, ptose en pilomotoriese ereksie word dikwels by diere in 'n toestand van ongesteldheid waargeneem en kan nie gebruik word om die toksisiteit van (2) te karakteriseer nie. By die kontroles is daar geen abnormale gedrag, tekens of histologiese letsels waargeneem nie.

Fototoksiteit

Geen fototoksiteit is met enige van die verbindings (1) tot (6) waargeneem nie.

LITERATUURVERWYSINGS

- Bergh, J.J., Breytenbach, J.C. & Wessels, P.L. (1989). Degradation of trimetoprim, *J. Pharm. Sci.* 78(4), 348-350.
- Bergh, J.J., Breet, E.L.J. & Breytenbach, J.C. (1990). Kinetika van die ontbinding van trimetoprim, Elfde Kongres van die Akademie vir Farmaseutiese Wetenskappe, Johannesburg.
- Van der Vijver, L.M. & Lötter, A.P. (1971). The constituents in the roots of *Plumbago auriculata* Lam. and *Plumbago zeylanica* L. responsible for antibacterial activity, *Planta Medica*, 20, 8-13.
- Malone, M.J. & Robichaud, R.C. (1962). A hippocratic screen for pure or crude drug materials, *Lloydia*, 25, 32-332.
- Nater, J.P. & De Groot, A.C. (1983). Unwanted effects of cosmetics and drugs used in dermatology, *Excerpta Medica*, Amsterdam.
- Weimarck, G. & Nilsson, E. (1980). Phototoxicity in *Heracleum sphondylium*, *Planta Medica*, 38, 97-111.
- Roth, B., Falco, E.A., Hitchings, G.H. & Bushby, S.R.M. (1962). 5-Benzyl-2,4-diaminopyrimidines as antibacterial agents. 1. Synthesis and antibacterial activity *in vitro*, *J. Med. Chem.*, 5, 1103-1123.
- Mathews, D.A., Bolin, J.T., Burridge, J.M., Filman, D.J., Volz, K.W. & Kraut, J. (1985). Dihydrofolate reductase. The stereochemistry of inhibitor selectivity, *J. Biol. Chem.*, 260, 392-399.
- Roth, B., Raukman, B.S., Ferone, R., Baccanari, D.P., Champness, J.N. & Hyde, R.M. (1987). 2,4-Diamino-5-benzylpyrimidines as antibacterial agents. 7. Analysis of the effect of 3,5 dialkyl substituent size and shape on binding to four different dihydrofolate reductase enzymes, *J. Med. Chem.*, 30, 348-356.
- London, R.E., Groff, J.P., Cocco, L. & Blakley, R.L. (1982). Nuclear magnetic resonance study of interaction of ligands with *Streptococcus faecium* dihydrofolate reductase labelled with [γ -¹³C] tryptophan, *Biochemistry*, 21, 4450-4458.
- Hitchings, G.H. (1970). Trimethoprim: Biochemical basis for sulphonamide potentiation, *Byvoegsel tot die S.A. Mediese Tydskrif*, 15 Augustus 1970, 1-2.