

REFERATE GENERALE

Laboratorul de biofizică a I.M.F. București (cond.: conf. V. Vasilescu)

DATE RECENTE PRIVIND ASPECTE PARTICULARE ALE ACȚIUNII BIOLOGICE A HIDRAZIDEI ACIDULUI IZONICOTINIC

L. Leahu

De la descoperirea de către Fox, în 1952, a capacității bacteriostatice a hidrazidei acidului izonicotinic (HIN), aceasta a devenit una dintre cele mai importante arme din arsenalul terapeutic al tuberculozei. Acțiunea acestei substanțe față de bacilul Koch, precum și relativa ei lipsă de toxicitate au determinat — se pare — introducerea rapidă a HIN în terapeutică, fără un control suficient și complex al acțiunii sale biologice. La scurt timp după introducerea HIN în tratamentul diferitelor forme de tuberculoză, s-au semnalat fenomene toxice, în special nervoase, legate de administrarea masivă și îndelungată pe care o necesită terapia cu acest agent. Printre efectele secundare frecvent întâlnite menționăm nevritele periferice, descrise de A. D. Hunt și colab. (1954).

Cercetările efectuate ulterior au pus în evidență fapte interesante privind mecanismul de acțiune a hidrazidei acidului izonicotinic. Nevritele periferice amintite aveau simptome clinice de deficiență în piridoxină. Investigațiile efectuate de către Biehl și Vilter (1954) au arătat că HIN produce o scădere a conținutului de piridoxină din țesuturi cu excepție de izonicotinofilhidrazină a piridoxalului. Autorii conchid că nevrita prin HIN este — în parte — o manifestare a deficienței în vitamina B₆ (piridoxină). S-au mai semnalat tulburări metabolice studiate în special de autorii sovietici (Smelev, 1960), interesind printre altele cocarboxilaza a cărei scădere — în urma administrării hidrazidei acidului izonicotinic — duce la o creștere a piruvemiei. Menționăm că determinările cromatografice (Obojska, 1960) sau cele analitice cu ajutorul reacției dintre HIN și ionul de vanadiu (Păunescu și Buzescu, 1960; Păunescu, 1961/a) au arătat că în organism HIN nu se metabolizează complet. În afară de derivatul acetilat al HIN, de hidrazină, acid izonicotinic, izonicotinoil-glicină și hidrazonle unor alfa-cetoacizi (piruvic și cetoglutamic), s-a putut pune în evidență și HIN nemodificat.

S-au făcut încercări reușite de a se obține derivați ai hidrazidei acidului izonicotinic care — fără a avea activitatea tuberculostatică diminuată — să fie lipsiți de toxicitate. În acest sens menționăm rezultatele lui Sciukina și colab. (1952), obținute cu izonicotinoilhidrazonle vanilinei și ale lui Budeanu și colab. (1957) cu izonicotinoilhidrazona etilvanilinei. În special acest ultim compus s-a arătat la animal complet lipsit de toxicitate, animalele de experiență (șoareci și cobai) putând suporta perfect doze de 1.200—2.000 mg/kilogram administrate pe cale digestivă. Puținele date existente în literatură, în legătură cu modul de acțiune și cu metabolismul acestor compuși, arată că factorul tuberculostatic activ este tot hidrazida acidului izonicotinic, pusă în libertate prin hidroliza compușilor amintiți (Nasta și Făunescu, 1957; Păunescu, 1961/a).

Ulterior au fost efectuate cercetări privind acțiunea HIN asupra celulelor tumorale și asupra efectului posibil de inducere a tumorilor. Încă din 1952 Simon a arătat pe tumori ascitice Ehrlich acțiunea citostatică a HIN. Rezultatele au fost confirmate pe carcinomul Walker, de către Gross (1956) care, apreciind cantitativ inhibiția creșterii tumorale (37%), afirmă că acțiunea citostatică nu este suficient de puternică pentru a justifica folosirea HIN în acest sens. În legătură cu acțiunea

citostatică a HIN, menționăm experiențele foarte recente ale lui *Gaugadham, Harold și Schaeffer* (1963) care au arătat pe *Mycobacterium tuberculosis* că HIN produce o puternică inhibiție a sintezei ADN și ARN, fără a afecta — cel puțin în primele 12 ore — sinteza proteică și incorporarea fosfatului radioactiv în fracțiunea polifosfatului anorganic acido-solubil.

Din punctul de vedere al acțiunii HIN asupra proceselor tumorale sînt interesante și cercetările lui *Tiboldi și colab.* (1955) care au efectuat investigații privind acțiunea HIN asupra carcinomului *Brown-Pearce*. Autorii maghiari arată că în doză de 10 mg/kgcorp în administrare cotidiană, hidrazida acidului izonicotinic mărește capacitatea de metastazare a tumorii amintite dar că — în același timp — exercită un elect protector față de transplantarea tumorii la animalele pretratate. Mecanismul acestui ultim fenomen este probabil diferit de unul imunologic, deoarece HIN are o acțiune inhibitoare asupra producerii de anticorpi (*Hadnagy și Krepesz*, 1957).

Cercetările propriu-zise privind inducerea de tumori prin hidrazida acidului izonicotinic au fost inițiate în 1957, cînd *Juhász, Baló și Kendrey* au pus în evidență activitatea cancerigenă a HIN. Lucrînd pe șoareci albi cărora li se administra intraperitoneal, din două în două zile, cîte 3 mg HIN (doza totală per animal era de 82 mg), autorii citați au obținut la 7^{1/2} luni de la începerea tratamentului, adenoame papilare pulmonare, leucemii limfoide, mioleide și histiocitare precum și un reticulosarcom hepatic.

Reluînd experiențele autorilor maghiari, *Mori și Yasuno* publică în 1959 primele rezultate privind inducerea tumorilor pulmonare la șoareci, cu hidrazida acidului izonicotinic. *Mori și Yasuno* lucrează pe șoareci din linia dd, cărora li se administrează într-un regim sintetic cîte 1,5—3 mg HIN pe zi/șoarece, adică doză de 10—15 ori mai mare decît doza terapeutică obișnuită. După 134 zile autorii au observat prima tumoare pulmonară (adenom). Toate animalele sacrificate după această dată prezentau adenoame sau creșteri adenomatoase ale plămînilui. Structura tumorilor era similară cu cea descrisă în tumorile primare ale plămînilui sau cu cea a tumorilor induse prin hidrocarburi cancerigene, uretan sau azotiperită. Ulterior *Mori, Yasuno și Matsumoto* (1960) au încercat să stabilească doza minimă de HIN necesară pentru inducerea tumorilor pulmonare. De data aceasta dozele de substanță cu ajutorul cărora s-au putut obține tumori mergeau de la 0,25—0,01% (în dietă), intervalul care trecea pînă la apariția procesului neoplazic fiind de 7 luni. Tumori pulmonare au fost obținute și prin injecții subcutanate cu 0,1 ml dintr-o soluție apoasă de 2% HIN. Injecțiile se făceau timp de 18 săptămîni, din două în două zile. La locul de inoculare nu au apărut tumori. Indicele de cancerizare a animalelor variaza în funcție de cantitatea de HIN din dietă, între 8% (0,01% HIN) și 100% (0,25% HIN), iar în cazul injectării soluției de 2% HIN, indicele era de 53%.

Experiențele lui *Viallier și Casanova* (1960), efectuate pe cîteva sute de șoareci albi din linia Swiss (linie cu un mic procentaj de tumori sponiane), cărora li s-au administrat în injecții intraperitoneale doze de HIN mergînd în total pînă la 12,6 g per animal de experiență, sau li s-a administrat HIN sub formă de aerosoli sau în apa de băut, nu sînt concludente. La animalele decedate în cursul experienței sau sacrificate într-un interval de 5—7 luni de la începerea administrării hidrazidei acidului izonicotinic, s-au putut observa numai o leucoză limfoidă și un limfosarcom. În grupul animalelor netratate (martori) s-au găsit după 7 luni două limfosarcoame. Rezultate negative obține *Loscalzo* (1964) după un an de administrare la șobolan, în apa de băut, a unei cantități de 30 mg/kgcorp HIN pe zi.

Din rezultatele destul de contradictorii ale diferiților autori pare să rezulte că linia, respectiv structura genetică a animalelor pe care se lucrează, are o importanță deosebită și în cercetările privind acțiunea cancerigenă a hidrazidei acidului izonicotinic. Cercetările ulterioare vor arăta dacă în acest caz este vorba de o sensibilitate particulară a unor linii de animale față de HIN (sensibilitate ce s-ar traduce prin apariția de tumori), sau dacă avem într-adevăr de a face cu o acțiune particulară a acestei substanțe în sensul în care ne ocupăm de ea. Subliniem totodată că și în cazul unei sensibilități speciale, un rol important îl au și dozele foarte mari de HIN (de 10—15 ori superioare dozelor terapeutice obișnuite).

Mecanismul posibil de acțiune a HIN în apariția tumorilor experimentale

Mecanismul de acțiune a hidrazidei acidului izonicotinic în producerea tumorilor experimentale este neclar, deoarece însăși acțiunea HIN asupra diferitelor sisteme biochimice în stare normală este încă destul de puțin cunoscută.

Au fost efectuate unele investigații privind interacțiunea HIN cu proteinele celulare. Rezultatele indirecte obținute par să arate că afinitatea HIN pentru aceste componente biologice fundamentale este foarte redusă în comparație cu alte substanțe cancerigene. În acest sens s-a cercetat acțiunea HIN asupra cancerizării hepatice prin p-dimetilaminoazobenzen (DAB), observându-se o marcată acțiune inhibitoare a HIN față de acest tip de substanță cancerigenă. S-a constatat însă că nu este vorba de un fenomen de competiție între HIN și DAB pentru proteina hepatică, ci de inactivarea DAB prin combinarea cu hidrazida acidului izonicotinic (Matsumoto, Mori și Yasuno, 1960).

Una dintre căile prin care hidrazida acidului izonicotinic ar putea interveni în metabolismul celular pentru a-l vicia și a declanșa fenomenele de malignizare, pare să rezulte din interacțiunea HIN cu NAD (nicotinamidadeninucleotidul).

Nicotinamidadeninucleotidul (coenzima I, coehidraza I)* este format dintr-o moleculă de niacinamidă legată de ribozofosfat și de adenzin-5-fosfat. NAD este una dintre coenzimele cu un rol fundamental în procesele metabolice ale celulei normale. Cercetările moderne arată că această coenzimă este implicată în mersul normal al reacțiilor enzimice într-o măsură mai mare decât orice altă coenzimă cunoscută. În special NAD este interesat direct în mersul normal al reacțiilor biochimice ale respirației celulare: or, se știe după lucrările clasice ale lui Warburg, că din punct de vedere biochimic caracteristica principală a celulei tumorale este alterarea ireversibilă a respirației. Printre alte cauze, această alterare poate fi pusă și pe seama unei deficiențe în NAD. De altfel, Jedeikin și Weinhouse (1955), determinând conținutul de NAD din tumori, l-au găsit mult scăzut, iar Branston și Morton (1956) au arătat că sinteza NAD în celulele tumorale este redusă față de celulele normale.

În ceea ce privește interacțiunea HIN cu NAD, Zatman și colab. (1953, 1954) au arătat că hidrazida acidului izonicotinic înlocuiește partea niacinamică din NAD prin acțiunea unei enzime (NAD-aza HIN-insensibilă) și în acest fel inactivează această coenzimă de importanță fundamentală. Inactivarea NAD poate duce la o alterare treptată a respirației celulare și — în ultimă instanță — la evoluția ireversibilă a celulei normale spre celula tumorală. Cercetări mai recente (Păunescu, 1959; Nasta, Păunescu și Georgescu, 1960) par să arate că interacțiunea NAD cu HIN este mai complexă decât pare la prima vedere. Metabolizarea intermediarilor din ciclul Krebs este activată de către NAD. Adăugarea de HIN la sistemele de reacție pe care au lucrat autorii citați, a arătat că metabolizarea acestor intermediari (piruvat, fumarat, malat) este încetinită, indiferent dacă în sistemul de reacție se adaugă sau nu NAD. Aceste rezultate indică aspecte noi ale problemei pe care le vom discuta mai jos.

În apariția tumorilor ar putea juca un rol tulburarea unor etape metabolice, ca rezultat al interacțiunii HIN cu piridoxina.

Piridoxina (vitamina B₆) participă la metabolism sub forma unui derivat fosforilat al piridoxalului, *piridoxal-6-fosfatul*, coenzimă cu un rol fundamental în metabolismul aminoacizilor, în special în reacțiile de transaminare și decarboxilare. Deși cercetările privind metabolismul proteic în tumori nu sînt suficient de concludente, există numeroase indicații după care acest metabolism este serios afectat. Cercetările efectuate asupra transaminazelor, enzime deosebit de impor-

* Conform raportului Comisiei de nomenclatură a enzimelor din cadrul Uniunii Internaționale de Biochimie, raport adoptat în 1961, denumirea DPN (dihidropiridin-nucleotid) a fost schimbată — din considerente structurale — în NAD (nicotinamidadeninucleotid).

tabolismului celular, dereglare care ar duce la malignizarea celulei animale. Reacțiile care se desfășoară în ciclul Krebs au o însemnătate capitală pentru funcționarea normală a celulei, pentru procesele de creștere și multiplicarea normală ale acesteia. O perturbare a reacțiilor ce se desfășoară în ciclul acizilor tricarboksilici, mai ales dacă tulburarea este persistentă, poate forța celula să-și caute a altă cale prin care să obțină energia necesară activității sale. Lezarea lanțului respirator normal conduce la realizarea unei căi diferite de sinteză a fosfatului bogat în energie; sinteza lui nu se mai face pe calea fosforilării oxidative. În cazul celulei tumorale energia este furnizată în mare măsură în cursul proceselor metabolice de glicoliză, în care un loc special — caracteristic celulei tumorale — îl ocupă glicoliza aerobă, cale mai rapidă dar mai neeconomică de producere a energiei necesare unui metabolism celular crescut dar dezorganizat.

S-au efectuat cercetări având drept scop identificarea grupării active din hidrazida acidului izonicotinic, prin care această substanță ar putea interveni pentru a vicia metabolismul celular și a orienta celula spre malignizarea observată experimental. Din acest punct de vedere Mori, Yasuno, și Matsumoto (1960) au studiat o grupă de substanțe din care făceau parte: uretanul (cunoscut drept cancerigen pulmonar), semicarbazida, izonicotinilmetasulfonatul de sodiu (Neoiscotin) și pirazinamida. S-a observat că toate substanțele amintite erau cancerigene pulmonare. Autorii japonezi atribuie această proprietate prezenței comune (și în

HIN) a grupării carbamil $\begin{matrix} \text{O} \\ | \\ (\text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{R}), \end{matrix}$ iar în HIN a derivatului substituit al acestei grupări $\begin{matrix} \text{O} \\ | \\ (\text{H}_2\text{N}-\text{HN}-\text{C}-\text{R}). \end{matrix}$

Cu toate rezervele ce pot exista referitor la interpretarea rezultatelor obținute de diferiți autori în ce privește unele aspecte particulare ale acțiunii biologice a HIN pe care le-am prezentat, credem că datele expuse mai sus sînt instructive nu numai din punct de vedere al rezultatelor obținute în studiul mecanismului de acțiune a acestei substanțe; ele arată că este necesar un studiu aprofundat și multilateral al acțiunii oricărui medicament nou, deoarece prin complexitatea verigilor metabolice asupra cărora acționează, orice substanță chimică are efecte multiple și de multe ori neașteptate.

Sosit la redacție: 29 ianuarie 1965.

Bibliografie

1. BEGUM A., BACHHAVAT B. K.: Ann. Biochem. Exp. Med. (1960), 20, 143;
2. BRANSTON M. V., MORTON R. K.: Biochem. J. (1956), 33, 640;
3. BUDEANU C. H., BUDFANU E., TOMA A.: Rev. Chimie (1957), 2, 185;
4. GAUGADHARAM P. R. J., HAROLD F. M., SCHAEFFER W. B.: Nature (London) (1963), 198, 712;
5. GRAFFI A., BIELKA H.: Probleme de oncologie experimentală, Ed. Acad. R.P.R. București (1962), 276;
6. GREENSTEIN J. P.: The Biochemistry of cancer, Academic Press. N. Y. (1954);
7. GROSS W.: Klin. Wschr. (1956), 34, 495;
8. HADNAGY CS., KREPSZ I.: Z. Immunitätsf. (1958), 114, 493;
9. HUNT A. D., SOCKES J., MACCARRY W. W., STOOD H. H.: Pediatrics (1954), 13, 140;
10. JEDEIKIN L. A., WEINHOUSE S.: J. Biol. Chem. (1955), 213, 271;
11. JUHÁSZ J., BALÓ J., KENDREY G.: Z. Krebsforsch. (1957), 62, 188;
12. LICHSTEIN H. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1955), 88, 519;
13. LOSCALZO B.: Arch. int. Pharmacodyn. (1964), 152, 249;
14. MATSUMOTO K., MORI K., YASUNO A.: Gann. (1960), 51, 91;
15. MORI K., YASUNO A.: Gann (1959), 50, 107;
16. MORI K., YASUNO A., MATSUMOTO K.: Gann (1960), 51, 83;
17. NASTA M., PĂUNESCU E.: Probleme de terapeutică (1957), 8, 51;
- Șt. Cerc. Inf. Microbiol. Microbiol. Parazitol. (1958), 9, 471;
18. NASTA M., GEORGESCU P., PĂUNESCU E.: Cerc. Ftiziologie (1956), 5, 215;
19. NASTA M.,

PAUNESCU E., GEORGESCU P.: Ști. Cerc. Biochimie (1958), 1, 313; Ann. Inst. Pasteur (1960), 99, 504; 20. OBOJSKA K.: Acta Physiol. Polon. (1960), 11, 469; 21. PAUNESCU E.: Ști. Cerc. Biochimie (1959), 2, 299; (1961/a), 4, 117; (1961/b), 543; 22. PAUNESCU E., BUZESCU M.: Fiziologia (1960), 6, 547; 23. POLLACK N. A., TAYLOR A., WILLIAMS R. J.: (1942), cit. de A. Graffi și N. Bielka; 24. SIMON K.: Z. Naturforsch. (1952), 7 b, 531; 25. SCIUKINA N. N., PERȘIN G. N., MAKFEV O. O., SASONOVA E. D., NIKITSKAIA E. N., IANINA A. D., IAKOVLEVA A. I.: Dan SSSR (1952), 84, 981; 26. SMELEV N. A.: Probl. tuberk. (1960), 8, 27; Sov. med. (1960), 5, 43; 27. TIBOLDI T., DÁVID M., KOVÁCS K., MOLNÁR P.: Z. Tuberk. (1955), 106, 257; 28. VIALLIER J., CASANOVA F.: C. R. Soc. Biol. (1960), 154, 985; 29. WACHSTEIN M., KELLNER J. D., ORTIZ J. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1960), 105, 563; 30. ZATMAN N. J., KAPLAN N. O., COLOWICK S. P., CIOTTI M. M.: J. Amer. Chem. Soc. (1953), 75, 3293; J. Biol. Chem. (1954), 209, 453.