

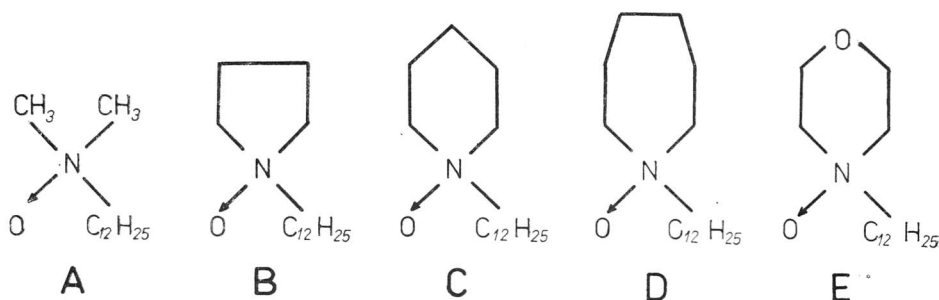
Vplyv heterocyklických N-alkylamínoxidov na rast a metabolizmus mikrobiálnych buniek

J. ŠUBÍK — G. TAKÁCSOVÁ

Amín oxidy predstavujú veľkú skupinu chemických zlúčenín odvodených od terciálnych amínov obsahujúcich silne polarizovanú $N \rightarrow O$ väzbu [1—3]. Mnohé amín oxidy vyskytujú sa v prírode alebo chemicky syntetizované, sú známe ako antimetabolity, chemoterapeutiká, psychotropné a kancerostatické látky. Niektoré amín oxidy sú mutagénne a kancerogénne [1—6].

N-alkylderiváty nasýtených heterocyklických amín oxidov predstavujú biodegradibilné neionogénne amfifyly, ktoré sa dobre rozpúšťajú vo vodných i nevodných rozpúšťadlách [7]. Na rozdiel od štruktúrne podobných amínov a kvartérnych amóniových solí sú odpovedajúce amín oxidy menej toxické [8, 9]. Málo pozornosti sa však dosiaľ venovalo ich antimikróbnej aktivite a mechanizmu účinku.

V tejto práci sme sa venovali štúdiu antimikróbnej aktivity, spôsobu biochemického účinku, ako aj vzájomným vzťahom štruktúry a aktivity nasýtených heterocyklických N-alkylamín oxidov (obr. 1).



Obr. 1. Štruktúra amín oxidov. A — N, N-dimetyldodecylamín-N-oxid, B — 1-dodecylpyrrolidín-N-oxid, C — 1-dodecylpiperidín-N-oxid, D — 1-dodecylperhydroazepín-N-oxid, E — dodecylmorfolín-N-oxid.

Materiál a metódy

1. Použité mikroorganizmy

V práci sa použili tieto kmene baktérií:

Bacillus cereus NCIB 8122, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* a *Salmonella typhimurium* TA 100.

Z vláknitých húb sa použili tieto kmene: *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Penicillium italicum*, *P. cyclopium*, *P. brevicompactum*, *Mucor mucedo*, *M. racemosus*, *Botrytis cinerea*, *Neurospora crossa*, *Rhizopus oryzae*, *R. nigricans* a *Paecilomyces varioti*.

Z kvasiniek sme použili diploidný laboratórny kmeň *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN DT XII.

2. Kultivačné podmienky

Bunky baktérií *B. cereus* rástli v tekutom baktopeptónovom médiu pri 30 °C z tepelne aktivovaného (65 °C/15 min) spórového inokula (začiatočná koncentrácia 10⁸ spór/ml). Jeden liter média obsahoval: 1 g baktopeptónu, 1 g glukózy, 0,1 g Tween 80, 0,5 g KH₂PO₄, 17,4 mg K₂SO₄, 12,3 mg MgSO₄ · 7 H₂O, 0,22 mg MnSO₄ · 7 H₂O, 3 mg FeSO₄, 1,44 mg ZnSO₄ · 7 H₂O, konečné pH 7,2.

Klíčenie spór a rast baktérií sme sledovali Langeho kolorimetrom pri 700 nm, ako aj priamym počítaním spór pod mikroskopom po strate svetlolomnosti.

Kvasinky rástli pri 30 °C v semisyntetickom médiu, obsahujúcom v 1 litri: 20 g glukózy, 5 g peptónu, 5 g kvasnicového extraktu, 100 g adenínu a zmes minerálnych solí: 1 g KH₂PO₄, 0,5 g MgSO₄ · 7 H₂O, 0,5 g KCl, 1,2 g (NH₄)₂SO₄, 2 g NaNO₃ a 10 mg FeSO₄ · 7 H₂O.

Rast sa sledoval počítaním buniek v Bürkerovej komôrke pod mikroskopom.

3. Tvorba spór vláknitých húb

Pre tvorbu spór sme Petriho misky obsahujúce Sabouraudov agar inokulovali malým kúskom mycélia alebo spórami zo zásob kultúry. Po 7 dňoch rastu pri 30 °C sme do Petriho misky pridali dostatočné množstvo sterilnej vody, potrebnej na ponorenie mycélia, povrch mycélia sme premiešali sklenenou tyčinkou a suspenziu prečistili cez vatú. Za sterilných podmienok sme spóry premyli destilovanou vodou, stanovila sa ich koncentrácia počítaním v Bürkerovej komôrke pod mikroskopom a použili sa na inokuláciu.

4. Určenie priemeru inhibičných zón

Stekutenú agarovú semisyntetickú alebo minimálnu pôdu sme inokulovali vegetatívnymi bunkami baktérií na konečnú koncentráciu 10⁶ buniek/Petriho misku. Po stuhnutí pôdy sme na jej povrch pridali inhibítor a priemer zóny inhibície sme merali po 24, resp. 72 hodinách rastu pri 37 °C.

Minimálne médium obsahovalo v 1 litri 20 g glukózy, 50 mg histidínu, zmes anorganických solí ako v semisyntetickom médiu a zmes vitamínov vytvorenú z 10 mg inozitolu, 1 mg tiamín-HCl, 600 μ g pyridoxínu-HCl, 600 μ g kyseliny nikotínovej, 600 μ g kyseliny *p*-aminobenzoovej, 600 μ g pantotenánu vápenatého, 10 μ g biotínu a 200 μ g riboflavínu.

5. Germinačný test

Germinačný test sme robili pri 30 °C v 100 ml Erlenmayerových bankách obsahujúcich 10 ml semisyntetického média s 2 % glukózou, spóry plesní (10⁶/ml) a inhibitor v udanej koncentrácii. Klíčivosť spór sme sledovali mikroskopicky.

6. Určenie životaschopnosti buniek

Bunky baktérií, kvasiniek a spór plesní po interakcii s inhibítorom v čase uvedenom vo výsledkoch sme premyli a vysiali na pevné semisyntetické médium s 2 % glukózou. Po inkubácii pri 30 °C sme v porovnaní s kontrolou stanovili počet vyrastených baktérií, kvasiniek a vyklíčených konídií. Rast a klíčivosť sme sledovali 3 až 12 dní.

7. Určenie respiračnej rýchlosti celých buniek

Spotreba kyslíka premytých buniek sa stanovila polarograficky vibračnou zlatou elektródou v reakčnej zmesi obsahujúcej v 2 ml: 50 mM glutarát draselný, 10 mM KH₂PO₄, 100 mM KCl, 0,25 % glukózu, 0,48 % etanol, bunky kvasiniek (1—4 mg sušiny) a inhibitor, konečné pH 4,3.

8. Príprava protoplastov a izolácia mitochondrií kvasiniek

Bunky (1 g sušiny) sme suspendovali v 20 ml 0,5 M merkptoetanolu, do ktorého sme pridali 0,1 M Tris-HCl pH 9,3 a inkubovali 5 min pri 30 °C. Suspenziu sme centrifugovali 5 min pri 1500 g, bunky premyli 10 ml 1,5 M sorbitolu a 1 mM EDTA v 10 mM citrátovo-fosfátovom tlmiacom roztoku pH 5,8 a napokon suspendovali v tom istom médiu na konečný objem 10 ml. Ďalej sme pridali 300 mg lyofilizovaného enzýmového výťažku zo žalúdkov slimákov, suspendovaného v minimálnom objeme inkubačného média a suspenziu sme inkubovali pri 30 °C za občasného miešania. Tvorbu protoplastov sme sledovali diferenciálnym počítaním vzoriek riedených vodou, resp. 1,5 M sorbitolom. Po vytvorení protoplastov sme suspenziu centrifugovali (10 min pri 1000 g) a protoplasty trikrát premyli 1,2 M sorbitolom v 2 mM EDTA pH 7,0 obsahujúcom ešte 0,1 % sérumalbumínu a centrifugovali vždy pri 1600 g 10 min.

Pre izoláciu mitochondrií sme protoplasty (z 1 g sušiny) buniek kvasiniek suspendovali v minimálnom objeme 1,2 M sorbitolu v 2 mM EDTA a zmiešali s 10 ml 0,6 M sorbitolu v 1 mM EDTA pH 7,0. Suspenziu sme homogenizovali 8 s v oceľovom homogenizátore a potom centrifugovali pri 1500 g 10 min. Mitochondrie zo supernatantu sme izolovali centrifugáciou pri 8000 g 10 minút a suspendovali v 4 ml homogenizačného média. Suspenziu sme centrifugovali 5 min pri 1200 g, aby sa odstránili kontaminujúce nerozbité protoplasty alebo

zvyšky bunkových stien. Mitochondrie sme sedimentovali zo supernatantu centrifugáciou pri 18 000 g 12 min. Povrch sedimentu sme jemne premyli malým množstvom 0,8 M manitolu pH 7,0, do ktorého sa mitochondrie nakoniec resuspendovali.

9. Detekcia lýzy protoplastov

Lýzu protoplastov kvasiniek, indukovanú amínoxidmi sme merali sledovaním poklesu optickej hustoty suspenzie protoplastov v médiu obsahujúcom 1,35 M sorbitolu, 1 mM EDTA a $10\text{--}40 \cdot 10^6$ protoplastov/ml. Konečné pH 7,0, teplota 25 °C.

10. Stanovenie rýchlosti kvasenia

Anaeróbnou glykolýzou kvasinkových buniek v dusíkovej atmosfére sme stanovili konvenčnou manometrickou technikou pri 30 °C v 80 mM citrátovo-fosfátovom tlmivom roztoku pH 4,3, obsahujúcom 50 mM glukózu, bunky kvasiniek (0,7 mg sušiny) a inhibítor, ako je udané.

11. Stanovenie respiračnej rýchlosti izolovaných mitochondrií

Spotrebu kyslíka sme merali polarograficky pri 30 °C v reakčnom médiu, ktorého 2 ml obsahovali 0,6 M manitolu, 20 mM KCl, 1,5 mM EDTA, 10 mM Tris-maleátu, 10 mM fosforečnanu draselného, 0,25 mM ADP, mitochondrie (1—3 mg bielkovín), substrát a inhibítor, ako je udané. Konečné pH 6,4.

12. Detekcia uvoľneného draslíka

Bunky kvasiniek (8,5 mg sušiny) vyrastených do stacionárnej fázy sme premyli trikrát deionizovanou vodou a predinkubovali 15 min v 10 ml 20 mM glukózy. Po 10, resp. 20 min od pridania 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu sme vzorky centrifugovali a supernatant analyzovali na obsah K^+ . Bunky sme premyli demineralizovanou vodou, suspendovali v demineralizovanej vode a varili vo vode 20 min. Po centrifugácii sme zmerali K^+ v bunkovom extrakte. K^+ sme určili plameňovým fotometrom používajúc KCl ako štandard.

13. Detekcia uvoľneného materiálu absorbujúceho ultrafialové lúče

Premyté bunky kvasiniek ($2 \cdot 10^6$ buniek/ml) sme inkubovali pri 30 °C v prítomnosti rozličných koncentrácií amínoxidov. V určenom čase sme 2 ml suspenzie odcentrifugovali 10 min pri 1600 g a množstvo materiálu absorbujúceho v ultrafialovej oblasti v supernatante sme stanovili spektrofotometricky pri 280 nm.

14. Stanovenie enzýmových aktivít

Aktivitu glykolytických enzýmov sme určili spektrofotometricky pri 366 nm [11].

Aktivitu ATPázy sme merali 6 min pri 30 °C v 1 ml reakčnej zmesi obsahujúcej 10 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 4 mM ATP, 0,1 mg mitochondriálnych bielkovín a inhibítor, ako je udané. Konečné pH 9,5.

15. Stanovenie bielkovín

Mitochondriálne bielkoviny sme stanovili biuretom [12] po predchádzajúcom vyzrážaní bielkovín 0,5 N HClO₄, čím sme odstránili sacharidy interferujúce s analýzou.

16. Stanovenie anorganického fosfátu

Anorganický fosfát sme stanovili metódou podľa Sumnera [13].

17. Chemikálie

Amín oxididy (čistota 98,0—99,8 %) pripravili z odpovedajúcich terciálnych amínov oxidáciou s vodným roztokom peroxidu vodíka F. Devínsky a I. Lacko (Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského, Bratislava).

Oligomycín a N, N, N', N'-tetrametyl-*p*-fenyléndiamín (TMPD) boli výrobky firmy Serva (Heidelberg, NSR), glykolytické enzýmy firmy Boehringer (Mannheim, NSR) a ostatné chemikálie firmy Lachema (Brno).

Výsledky

1. Antibakteriálna a antifungálna aktivita 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu

Na štúdium spôsobu účinku nasýtených heterocyklických alkylamínoxidov za reprezentatívnu zlúčeninu sme vybrali 4-dodecylmorfolín-*N*-oxid. Vplyv tohto amínoxidu na rast a metabolizmus mikroorganizmov kontaminujúcich potravinárske suroviny a výrobky [14] sme študovali pomocou prokaryotických, ako aj eukaryotických typov buniek.

Tabuľka 1 demonštruje schopnosť 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu inhibovať rast buniek rozličných druhov baktérií (grampozitívnych, gramnegatívnych, sporulujúcich, nesporulujúcich) na povrchu agarových médií. Ukázalo sa, že antibakteriálna účinnosť amínoxidu na minimálnom médiu je relatívne vyššia ako na semisyntetickom médiu. To pravdepodobne súvisí s adsorpciou inhibítora na komponenty kvasnicového extraktu alebo peptónu v semisyntetickom médiu. Z testovaných baktérií boli na inhibičný účinok 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu najcitlivejšie grampozitívne bunky *Streptococcus faecalis*.

Vplyv 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu na klíčenie, postgerminálny vývoj a prežitie sme sledovali iba v prípade spór *Bacillus cereus*. Zistili sme, že pri vzrastajúcich koncentráciách amínoxidu (0,5, 1,0 a 2,0 mM) sa rýchlosť klíčenia spór v tekutom glukózovom médiu znižovala, pričom sa celkové percento nevyklíčených spór zvyšovalo. Vegetatívne bunky dvojhodinovú interakciu 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidom (2 mM) neprežili. Na druhej strane životaschopnosť nevyklíčených spór *B. cereus* sa po 5-hodinovom účinku amínoxidu nezmenila.

Tabuľka 1. Inhibícia rastu baktérií 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidom (300 µg) po 72-hod. rastu pri 37 °C

| Mikroorganizmus | Minimálne médium | Semisyntetické médium |
|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| | (Priemer zóny inhibície /mm/) | |
| <i>Bacillus cereus</i> | 16 | 17 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 18 | 9 |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | 37 | 29 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | 18 | 10 |
| <i>Escherichia coli</i> | N. T. | 15 |
| <i>Proteus vulgaris</i> | 18 | 10 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | 12 | N. T. |

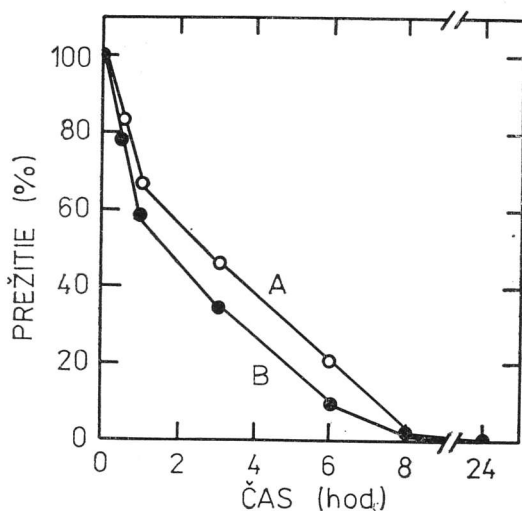
N. T. — netestované

Podobne tak rast bakteriálnych buniek, ako aj rast vláknitých húb bol inhibovaný účinkom 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu. Amínoxid (300 µg) pridaný na povrch pevného Sabouraudovho média v Petriho miskách obsahujúcich spóry inhiboval rast viacerých testovaných plesní. Vo všetkých prípadoch sa inhibícia rastu prejavila hladkou a priehľadnou agarovou zónou priemeru 7—17 mm. Najcitlivejšie na inhibičný účinok 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu boli *Botrytis cinerea* a *Paecilomyces varioti* (tab. 2).

Tabuľka 2. Inhibícia rastu vláknitých húb 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidom (300 µg) po dvoch týždňoch rastu pri 30 °C

| Mikroorganizmus | Priemer zóny inhibície (mm) |
|------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> | 7 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | 12 |
| <i>Penicillium italicum</i> | 8 |
| <i>Penicillium roqueforti</i> | 11 |
| <i>Penicillium cyclopium</i> | 8 |
| <i>Penicillium brevi-compactum</i> | 12 |
| <i>Mucor mucedo</i> | 13 |
| <i>Mucor racemosus</i> | 11 |
| <i>Botrytis cinerea</i> | 17 |
| <i>Neurospora crossa</i> | 8 |
| <i>Paecilomyces varioti</i> | 16 |
| <i>Rhizopus oryzae</i> | 10 |
| <i>Rhizopus nigricans</i> | 7 |

Vplyv 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu na klíčenie a prežitie spór plesní sme testovali s *Aspergillus niger* a *Penicillium italicum*. V tekutom semisyntetickom médiu, do ktorého sme pridali 1 mM 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu, konídie týchto plesní neboli schopné vyklíčiť a ich životnosť klesala s časom interakcie (obr. 2). Za podmienok zabráňujúcich rastu (spóry suspendované vo vode)



Obr. 2. Strata životaschopnosti konídií plesní po interakcii s 1 mM 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidom. A — *Aspergillus niger*, B — *Penicillium italicum*.

bolo prežitie zasiahnutých spór trochu vyššie, ale po 24-hodinovej interakcii vplyv amínoksidu bol opäť fungicídny (1 % prežitia).

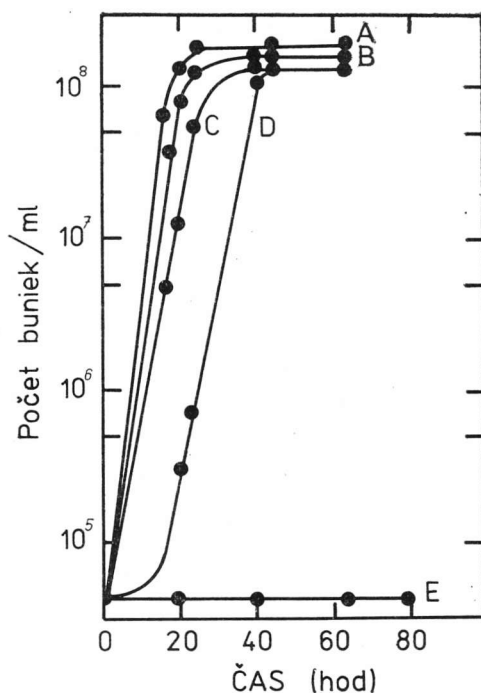
2. Biologické membrány ako miesto účinku amínoksidov

Rast kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* v tekutom glukózovom médiu bol úplne inhibovaný 0,5 mM 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidom. Amínoksid v nižších koncentráciách (0,5—0,3 mM) spôsoboval lag v rastovej krivke a mierne znížoval rastové výťažky v stacionárnej fáze (obr. 3). Za týchto podmienok sme nepozorovali zvýšenie tvorby respiračne-deficitných mutantov testovaných zalievacou technikou s trifenyltetrazóliumchloridom [15].

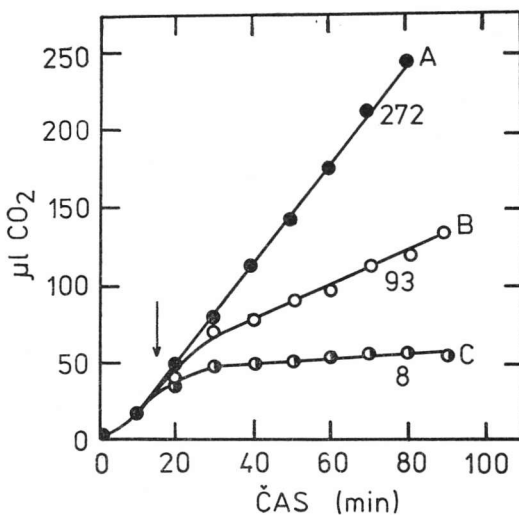
Štúdiom vplyvu amínoksidu na energetické mechanizmy celých buniek kvasiniek sme zistili, že 4-dodecylmorfolín-*N*-oxid je schopný úplne inhibovať anaeróbnú glykolýzu (obr. 4). Avšak na druhej strane reakčné rýchlosti niektorých glykolytických enzýmov testovaných *in vitro* (aldoláza, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza, fosfoglycerátkináza, triózfosfát izomeráza, glyceroldehydrogenáza a laktátdehydrogenáza) neboli významne ovplyvnené 1 mM 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidom.

Aj oxidácia glukózy kvasinkovými bunkami (obr. 5) bola inhibovaná 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidom. Za prítomnosti 1 mM amínoksidu sme nepozorovali spotrebu kyslíka bunkami bez ohľadu na to, či substrátom bola glukóza alebo etanol. V súlade s týmito zisteniami izolované kvasinkové mitochondrie za prítomnosti amínoksidu neboli schopné oxidovať citrát, jantaran, TMPD + + askorbát a ich ATPázová aktivita (tab. 3) bola inhibovaná v podobnom rozsahu ako s oligomycínom, ktorý je známym inhibítorom membránne viazanej mitochondriálnej ATPázy [16].

Interakcia kvasinkových buniek počas 5 minút s 0,5 mM 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidom spôsobila stratu ich životaschopnosti (prežitie 0 %). Za podobných



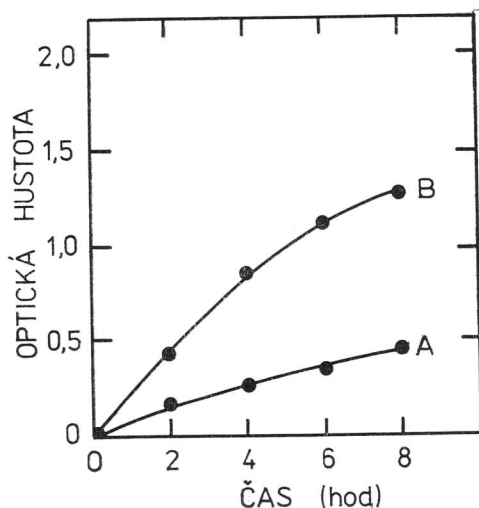
Obr. 3. Vplyv 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu na rast kvasiniek *S. cerevisiae* v tekutom semisyntetickom médiu s 0,5 % glukózou. A — bez inhibítora, B — 0,05 mM amínoxid, C — 0,2 mM amínoxid, D — 0,3 mM amínoxid, E — 0,5 mM amínoxid.



Obr. 4. Vplyv dodecylmorfolín-*N*-oxidu na fermentáciu buniek kvasiniek. V čase označenom šípkou bol pridaný amínoxid z bočného ramena. Čísla pri krivkách udávajú hodnoty $Q_{N_2}^{CO_2}$. A — bez inhibítora, B — 0,5 mM amínoxid, C — 1,0 mM amínoxid.

Tabuľka 4. Uvoľňovanie intracelulárneho draslíka z buniek kvasiniek v prítomnosti 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu

| Inhibitor | Obsah K ⁺ v bunkách ($\mu\text{g K}^+/\text{mg sušiny}$) | | |
|---------------|---|--------|--------|
| | 0 min | 10 min | 20 min |
| — | 25,2 | 25,0 | 24,5 |
| 1 mM amínoxid | 25,2 | 1,8 | 1,1 |
| 2 mM amínoxid | 25,2 | 1,1 | 1,1 |

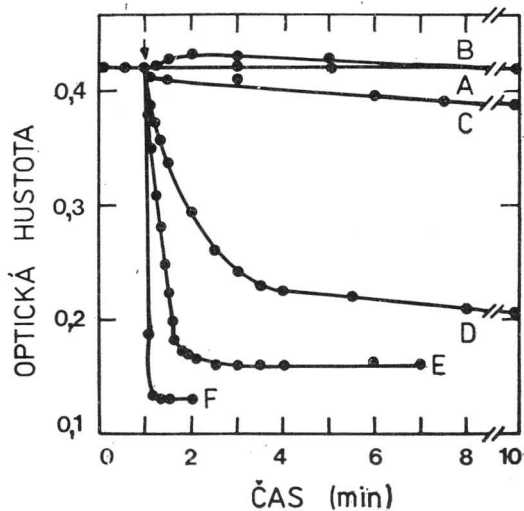


Obr. 6. Uvoľnenie UV-absorbujúceho materiálu z buniek kvasiniek vplyvom 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu. A — 0,5 mM amínoxid, B — 2,0 mM amínoxid.

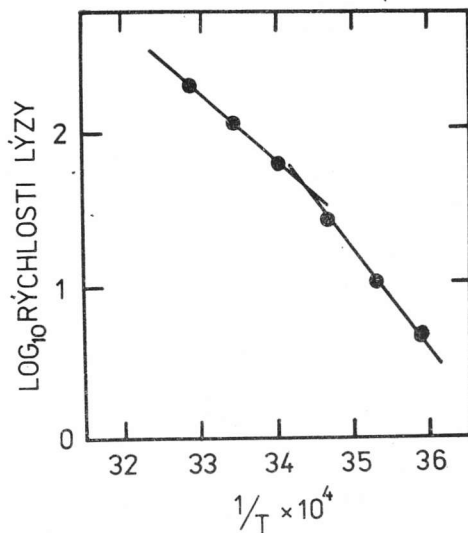
Rozrušenie štruktúry membrán amínoxidmi sa výraznejšie prejavilo s protoplastmi kvasiniek. Vplyv rozličných koncentrácií 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu na stabilitu protoplastov kvasiniek uvádza obr. 7. Zistili sme, že rýchlosť a rozsah lýzy protoplastov sú funkciou relatívnej koncentrácie amínoxidu. Väčšie zmeny v rozsahu lýzy protoplastov sme pozorovali nad 0,5 mM koncentráciou amínoxidu, čo je dobrá zhoda s letálnymi koncentraciami 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu, zistenými pre vegetatívne bunky baktérií a kvasiniek. Rýchlosť lýzy protoplastov spôsobenej amínoxidmi závisela od teploty. Cytolytická aktivita 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu (0,5 mM) pri 5 °C bola 55-krát nižšia ako pri 30 °C. Údaje cytolytickej aktivity 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu, podrobené kinetickej analýze (Arrheniusove krivky) ukazujú zlom v lineárnej závislosti cytolytickej aktivity od teploty pri 16–20 °C (obr. 8), čo môže byť vo vzťahu k tepelne indukovaným fázovým zmenám membránových lipidov [18].

Indukované zmeny v štruktúre biologických membrán vyvolané 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidom sa zdajú byť takto primárne zodpovedné za antimikróbnu aktivitu tohto amínoxidu. Ako sa ukázalo, tieto zmeny doprevádza zmena

permeability cytoplazmatickej membrány, inhibícia energetického metabolizmu, lýza a usmrtenie buniek.



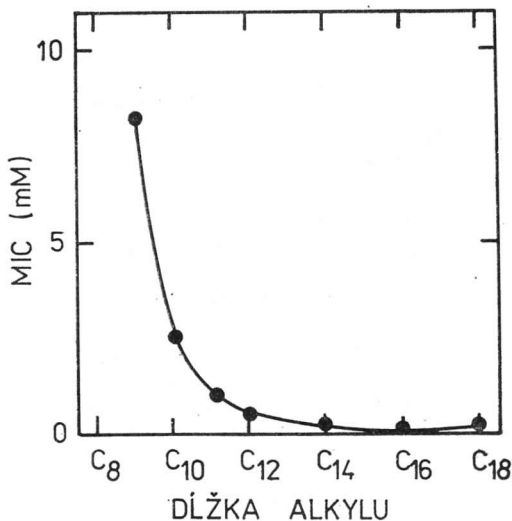
Obr. 7. Lýza osmoticky stabilizovaných protoplastov indukovaná rozličnými koncentráciami 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu. Amínoxid bol pridaný v čase označenom šípkou. A — kontrola, B — 0,1 mM amínoxid, C — 0,3 mM amínoxid, D — 0,5 mM amínoxid, E — 0,7 mM amínoxid, F — 1,0 mM amínoxid.



Obr. 8. Arrheniova krivka cytolytickej aktivity 0,5 mM 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu. Rýchlosť lýzy protoplastov sa vyjadřila ako $\Delta OD/min \times 10^3$.

3. Vzájomný vzťah medzi chemickou štruktúrou amínoxidov a ich antimikróbnou a cytolytickou aktivitou

Na doplnenie štúdií o spôsobe účinku, ako aj na zistenie nevyhnutných a rozhodujúcich funkčných skupín, ovplyvňujúcich aktivitu amínoxidov, študovali sme vzájomný vzťah medzi štruktúrou a biologickou aktivitou amínoxidov, a to v sérii 4-alkylmorfolín-*N*-oxidov, v ktorých alkylová skupina obsahovala rozličný počet atómov uhlíka, ako aj so skupinou štruktúrne odlišných amínoxidov, obsahujúcich ten istý alkylový reťazec (obr. 1).



Obr. 9. Závislosť antimikrobiálnej aktivity 4-alkylmorfolín-*N*-oxidu od dĺžky reťazca hydrofóbnej alkylovej skupiny. MIC — minimálna koncentrácia amínoxidu inhibujúca rast buniek kvasiniek v semisyntetickom médiu.

Obrázok 9 ukazuje, že antimikróbná aktivita vyjadrená ako minimálna koncentrácia amínoxidu, zabraňujúca rastu kvasiniek v tekutom semisyntetickom médiu, zvyšuje sa s rastúcim alkylom, dosahujúc maximum pre 4-hexadecylmorfolín-*N*-oxid. Vplyv 4-oktadecylmorfolín-*N*-oxidu bol o niečo nižší pravdepodobne v dôsledku jeho zníženej rozpustnosti vo vode. 4-alkylmorfolín-*N*-oxidy obsahujúce alkylový reťazec kratší než C_{12} boli menej účinné, s minimálnymi inhibičnými koncentraciami väčšími než 10 mM pre heptyl a viac ako 40 mM pre hexyl a butyl. Kvalitatívne podobné výsledky sme získali aj pre homológnu sériu 1-alkylpiperidín-*N*-oxidov.

Vplyv 4-alkylmorfolín-*N*-oxidov pri inhibícii rastu buniek odpovedal ich cytolytickým aktivitám, ktoré sa merali s protoplastmi kvasiniek. Opäť význačne nižšie cytolytické aktivity sme zistili pre amínoxidy obsahujúce skupinu alkylu kratšiu ako C_{12} . Maximum aktivity sme stanovili pre 4-hexadecylmorfolín-*N*-oxid (tab. 5).

Obmena štruktúry heterocyklického kruhu testovaných amínoxidov už nemala taký prenikavý vplyv na zmenu ich aktivity. Na základe štúdia vplyvu

Tabuľka 5. Závislosť cytolytickej aktivity 4-alkylmorfolín-*N*-oxidu od dĺžky reťazca hydrofóbnej alkylovej skupiny

| Amínoxid | Minimálna koncentrácia indukujúca totálnu lýzu protoplastov kvasiniek (mM) |
|--------------------------------------|---|
| 4-decylmorfolín- <i>N</i> -oxid | 10,0 |
| 4-dodecylmorfolín- <i>N</i> -oxid | 0,5 |
| 4-tetradecylmorfolín- <i>N</i> -oxid | 0,15 |
| 4-hexadecylmorfolín- <i>N</i> -oxid | 0,07 |

rozličných koncentrácií amínoxidov na rast buniek kvasiniek a lýzu ich protoplastov bolo možné zostaviť toto poradie amínoxidov podľa ich rastúcich aktivít: *N,N*-dimetyldodecylamín-*N*-oxid, 4-dodecylmorfolín-*N*-oxid, 1-dodecylpyrolidín-*N*-oxid, 1-dodecylpiperidín-*N*-oxid a 1-dodecylperhydroazepín-*N*-oxid (tab. 6).

Tieto výsledky naznačujú, že biologická aktivita testovaných amínoxidov výrazne závisí od dĺžky reťazca hydrofóbneho alkylu, pričom ju iba mierne ovplyvňujú ostatné substituenty polarizovanej $N \rightarrow O$ skupiny.

Tabuľka 6. Biologická aktivita rozličných dodecylamínoxidov

| Amínoxid | Minimálne koncentrácie | |
|--|--|---|
| | inhibujúce rast buniek kvasiniek (mM) | indukujúce totálnu lýzu protoplastov (mM) |
| 1-dodecylperhydroazepín- <i>N</i> -oxid | 0,2 | 0,1 |
| 1-dodecylpiperidín- <i>N</i> -oxid | 0,4 | 0,2 |
| 1-dodecylpyrolidín- <i>N</i> -oxid | 0,4 | 0,3 |
| 4-dodecylmorfolín- <i>N</i> -oxid | 0,4 | 0,5 |
| <i>N,N</i> -dimetyldodecylamín- <i>N</i> -oxid | 0,6 | 0,4 |

Diskusia

Výsledky práce demonštrujú mnohé efekty niektorých nasýtených heterocyklických alkylamínoxidov na rast a metabolizmus baktérií, vlákнитých húb a kvasiniek. Vyplýva z nich, že antimikróbná aktivita týchto amínoxidov súvisí s ich interakciou s biologickými membránami. Ako výsledok tejto interakcie, ktorá môže byť limitovaná bunkovou stenou mikrobiálnych spór, ako aj niektorých vegetatívnych buniek, mení sa štruktúra a permeabilita bunkových membrán a inhibujú sa procesy závislé od membrány, čo nakoniec vedie k úhynu buniek.

Tieto závery silne podporujú i výsledky, demonštrujúce amínoxidmi indukované uvoľňovanie K^+ z buniek kvasiniek, ako aj lýza osmoticky stabilizovaných protoplastov kvasiniek. Strata intracelulárneho K^+ môže viesť k inhi-

bícii glykolýzy a pravdepodobne aj iných procesov v bunke, ktoré závisia od energie, čo pozorovali Gale a spol. [19] s niektorými látkami, ovplyvňujúcimi štruktúru membrán. Poškodenie membránových funkcií aminoxidmi sa jasne demonštrovalo aj s izolovanými mitochondriami kvasiniek. Je dobre známe, že štruktúra a funkcia mitochondrií veľmi tesne navzájom súvisia. Nezaráža preto, že po interakcii 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu s izolovanými mitochondriami kvasiniek, boli tieto organely neschopné oxidovať viaceré substráty poskytujúce elektróny rozličným segmentom respiračného reťazca a aktivita ich ATPázy bola silne inhibovaná.

Pokusy korelovať chemickú štruktúru aminoxidov s ich biologickými aktivitami ukázali, že prítomnosť vhodne dlhého reťazca hydrofóbného alkylu na polarizovanej N→O skupine je nevyhnutná pre antimikróbnu a cytolytickú aktivitu týchto zlúčenín. Aminoxidy obsahujúce tieto dve chemické skupiny, sú povrchovo aktívne a vykazujú v kyslých roztokoch kationoidnú aktivitu [2, 5]. Tieto vlastnosti uľahčujú absorpciu a penetráciu amfifilných molekúl aminoxidov do membrán, indukujú potom zmeny v ich molekulárnej organizácii, čo vedie k zmene permeability a osmotickej rovnováhy, zapríčínujúc tak smrť buniek. Zmeny fyzikálnych vlastností membrán môžu závisieť od fázových premien membránových lipidov [20], čo by mohlo vyplývať aj z pozorovanej závislosti aminoxidmi indukovanej lýzy kvasinkových protoplastov od teploty. Hoci sa vplyv 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu *in vitro* na aktivitu niektorých glykolytických enzýmov nepozoroval, nemožno vylúčiť možnosť denaturujúceho a solubilizujúceho účinku aminoxidov na niektoré membránové bielkoviny.

Súhrn

Študovala sa antimikróbná aktivita a spôsob účinku heterocyklických N-alkylaminoxidov. Zistilo sa, že 4-dodecylmorfolín-*N*-oxid inhiboval diferenciáciu ako aj rast rozličných druhov baktérií, vlákňitých húb a kvasinky *S. cerevisiae*. Účinok 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu na vegetatívne bunky baktérií a húb bol letálny. Bunky kvasiniek *S. cerevisiae* po interakcii s 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidom stratili intracelulárny K⁺ a neboli schopné skvasovať ani oxidovať glukózu. Izolované mitochondrie v prítomnosti 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu neoxidovali jantaran, citrát, TMPD + askorbát a ich ATPázová aktivita bola silne inhibovaná. Protoplasty kvasiniek v osmoticky stabilizovaných médiách za prítomnosti rast inhibujúcich koncentrácií 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu lyzovali. Rýchlosť lýzy protoplastov závisela od teploty a koncentrácie pridaného 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu.

Výraznú antimikróbnu aktivitu vykazovali aj deriváty aminoxidov štruktúrou podobné 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu. V homologúnej sérii 4-alkylmorfolín-*N*-oxidov, obsahujúcich alkylový postranný reťazec o rozličnej dĺžke, antimikróbná a cytolytická aktivita vzrastala s rastúcou dĺžkou alkylu. Kým zmena dĺžky alkylu výrazne vplývala na biologickú aktivitu študovaných aminoxidov, zmena štruktúry heterocyklického kruhu sa už tak výrazne neprejavovala. V sérii aminoxidov obsahujúcich rovnaký alkyl (C₁₂), antimikróbná a cytolytická aktivita mierne vzrastali v poradí: 4-dodecylmorfolín-

-*N*-oxid, 1-dodecylpyrimidín-*N*-oxid, 1-dodecylpiperidín-*N*-oxid, 1-dodecylperhydroazepín-*N*-oxid.

Získané výsledky indikujú, že dezorganizácia membránových štruktúr mikroorganizmov po ich interakcii s amínoxidmi je primárne zodpovedná za ich antimikróbnú aktivitu.

Literatúra

1. CULVENOR, C. C. J.: Rev. pure and appl. Chem., 3, 1953, s. 83.
2. LINTON, E. P.: J. Amer. Chem. Soc., 62, 1940, s. 1945.
3. TAKÁČOVÁ, G. — ŠUBÍK, J.: Bull. výsk. Úst. potr. (v tlači).
4. BICKEL, M. H.: Pharmacol. Rev., 21, 1969, s. 325.
5. LINDNER, K.: Tenside, 1, 1964, s. 112.
6. OCHIAI, E.: Aromatic Amine Oxides. Amsterdam, Elsevier 1967, 456 s.
7. SWISHER, R. D.: J. Amer. Oil Chemists' Soc., 40, 1963, s. 648.
8. DECHEZLEPRETTE, S. — PORTER, R. — CHEYMOL, J.: Med. Pharmacol. exp., 16, 1967, s. 529.
9. VRBOVSKÝ, L.: Excerpt. med., XV, Int. Congr. Ser. 311, 1973, 331 s.
10. KLEINZELLER, A. — MÁLEK, I. — VRBA, R.: Manometrické metody a jejich použití v biologii a biochemii. Praha, Stát. zdrav. nakl. 1954.
11. BERGMAYER, H. V.: Methods of Enzymatic Analysis. New York — London, Academic Press 1965.
12. JACOBS, E. E. — JACOB, M. — SANADI, D. R. — BRADLEY, L. B.: J. Biol. Chem., 223, 1956, s. 147.
13. SUMNER, J. B.: Science, 100, 1944, s. 413.
14. HAMPL, B.: Potravinářská mikrobiologie. Praha, SNTL — Bratislava, Alfa 1968.
15. OGUR, M. — St. JOHN, R. — NAGAI, S.: Science, 125, 1957, s. 928.
16. ŠUBÍK, J. — KUŽELA, Š. — KOLAROV, J. — KOVÁČ, L. — LACHOWICZ, T. M.: Biochim. biophys. Acta, 205, 1970, s. 513.
17. LIRAS, P. — LAMPEN, J. O.: Biochim. biophys. Acta, 372, 1974, s. 141.
18. RAISON, J. K.: V: Avery J. (ed.), Membrane Structure and Mechanism of Biological Energy Transduction. London — New York, Plenum Press 1974, 559 s.
19. GALE, E. F. — CUNDLIFE, E. — REYNOLDS P. E. — RICHMOND, M. H. — WARING, M. J.: The Molecular Basis of Antibiotic Action. London, Wiley and Sons, 1972.
20. HELENIUS, A. — SIMONS, K.: Biochim. biophys. Acta, 415, 1975, s. 29.

Шубик, Ю. — Такачева, Г.

Воздействие гетероциклических окислов *n*-алкиламинов на рост и обмен веществ микробиальных клеток

Выводы

Изучалась антимикробная активность и влияние гетероциклических окислов *n*-алкиламинов. Установлено, что *n*-додecilморфолин-*N*-окисел ингибировал дифференциацию и рост различных видов бактерий, фиброзных грибов и дрожжей *S. cerevisiae*. Действие 4-додecilморфолин-*N*-окисела на вегетативные клетки бактерий и грибов было летальное. Клетки дрожжей *S. cerevisiae* после взаимодействия с 4-додecilморфолин-*N*-окиселом потеряли внутриклеточный K^+ и не были способны ни сбраживать ни окислять глюкозу. Изолированные митохондрии в присутствии 4-додecilморфолин-*N*-окисела не окисляли сукцинат, цитрат, TMPD+ аскорбат и их

активность АТР была сильно ингибирована. Протопласты дрожжей в осмотически стабилизированных средах в присутствии концентраций 4-додецилморфолин-оксида, ингибирующих рост, лизировали. Скорость лизы протопластов зависела от температуры и концентрации добавленного Н-додецилморфолин-Н-оксида.

Значительную антимикробную активность обнаруживали также производные окислов аминов структурно похожих на 4-додецилморфолин-Н-окисел. В гомологической серии 4-алкилморфолин-Н-окиселов, содержащих алкиловую боковую цепь различной длины, антимикробная и цитолитическая активность возрастала с возрастающей длиной алкила. Пока изменение длины алкила значительно влияло на биологическую активность изучаемых окислов аминов, изменение структуры гетероциклического кольца уже так выразительно не проявлялось. В серии окислов аминов, содержащих одинаковый алкил (C_{12}) антимикробная и цитолитическая активность слегка возрастала в последовательности: 4-додецилморфолин-Н-окисел, 1-додецилпирролидин-Н-окисел, 1-додецилпиперидин-Н-окисел, 1-додецилпергидроазепин-Н-окисел.

Полученные результаты показывают, что дезорганизация мембранных структур микроорганизмов после взаимодействия с окислами аминов первично ответственна за их антимикробную активность.

Šubík, J. — Takácsová, G.

Effect of heterocyclic N-alkyl amine oxides on the growth and metabolism of microbial cells

Summary

The antimicrobial activity and mode of action of heterocyclic N-alkyl amine oxides has been studied. It was found that 4-dodecylmorpholine-N-oxide inhibited the differentiation and growth of different species of bacteria, filamentous fungi and of the yeast *S. cerevisiae*.

For vegetative cells, the effect of 4-dodecylmorpholine-N-oxide was lethal. Cells of *S. cerevisiae*, after interaction with 4-dodecylmorpholine-N-oxide, released intracellular K^+ and were unable to oxidize or ferment glucose. The isolated mitochondria in the presence of 4-dodecylmorpholine-N-oxide were not able to oxidize succinate, citrate, TMPD plus ascorbate and their ATPase activity was strongly inhibited. 4-Dodecylmorpholine-N-oxide at growth inhibiting concentrations induced rapid lysis of osmotically stabilized yeast protoplasts, with the rate of lysis a function of temperature and of amine oxide concentration.

Derivatives of amine oxides structurally similar to 4-dodecylmorpholine-N-oxide also exhibited significant antimicrobial activity. Antimicrobial and cytolytic activity in homologous series of 4-alkylmorpholine-N-oxides was increasing with the chain length of the side alkyl. While the biological activity of studied amine oxides was significantly dependent on the length of the alkyl, the change in the structure of heterocycle only moderately influenced it. In series of amine oxides containing the same alkyl (C_{12}) antimicrobial and cytolytic activity was slightly increasing in the order: 4-dodecylmorpholine-N-oxide, 1-dodecylpyrrolidine-N-oxide, 1-dodecylpiperidine-N-oxide, 1-dodecylperhydroazepine-N-oxide.

The results indicate that disorganization of the membrane structure after interaction of microorganisms with the tested amine oxides was primarily responsible for their antimicrobial activity.