

# Biochemické aspekty cytolytickej aktivity antimikróbne aktívnych amínoxidov

G. TAKÁCSOVÁ — J. ŠUBÍK

*N*-alkyl deriváty nasýtených heterocyklických amínoxidov sú biodegradabilné neiónogénne amfifyly [1, 2], ktoré majú výraznú antimikróbnu aktivitu [3—5]. V štúdií, venovanej spôsobu účinku týchto relatívne netoxických zlúčenín [6] sa zistilo, že za ich antimikróbnu aktivitu je primárne zodpovedná dezorganizácia membránových štruktúr, ku ktorej dochádza po interakcii s amínoxidmi. Táto aktivita značne závisela od dĺžky postranného reťazca hydrofóbneho alkylu a iba mierne ju ovplyvnili iné substituenty polarizovanej *N*-oxid skupiny [3—5]. V tejto práci sa opisuje vplyv homológnej série 4-alkylmorfolín-*N*-oxidov a niektorých iných amínoxidov s rovnakou dĺžkou postranného reťazca, ale rozličnou základnou štruktúrou, na stabilitu cytoplazmatických membrán ľudských erytrocytov.

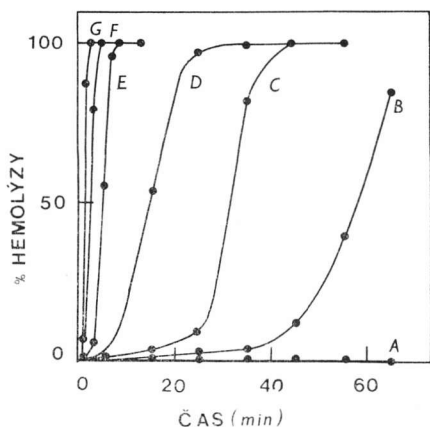
## Materiál a metódy

Premyté červené krvinky sa pripravili riedením čerstvých erytrocytov s 3 objemami schladeného 0,154 M-NaCl a centrifugovaním suspenzie pri 1000 g 10 min pri 0 °C. Získaný sediment sa dvakrát premyl a výsledný sediment červených krviniek sa zriedil na pôvodný objem s 0,154 M-NaCl.

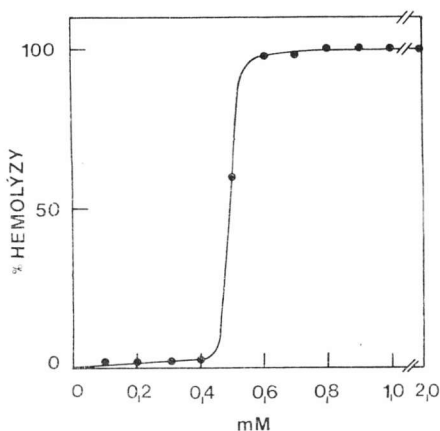
Hemolytická aktivita sa merala v štandardnej inkubačnej zmesi pri 37 °C, ktorá obsahovala 0,154 M-NaCl, 10 mM Tris-HCl, erytrocyty ( $20\text{--}40 \times 10^6$  buniek/ml) a amínoxid (v uvedenej koncentrácii), konečné pH 7,45. V udanom čase alikvotná časť zmesi sa centrifugovala pri 1000 g 2 min a stupeň hemolýzy sa určil stanovením množstva uvoľneného hemoglobínu v supernatante spektrofotometricky pri 573 nm [7]. Koncentrácia hemoglobínu v supernatante po lýze erytrocytov v 10 mM Tris-HCl, pH 7,45 bola 100 % hemolýza. Ukončenie hemolýzy odpovedajúcej úplnej lýze (bez turbidity) v štandardnej inkubačnej zmesi pri danej teplote sa zistilo voľným okom v skúmavkách rovnakej veľkosti použitím definovaného čierneho-bieleho pozadia pre pozorovanie [8].

## Výsledky a diskusia

Obrázok 1 znázorňuje vplyv 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu na stabilitu membrán ľudských erytrocytov. Zistilo sa, že pri nižších koncentráciách amínoksidu rýchla hemolýza nasleduje až po určitom čase inkubácie. Výraznejšia hemolýza sa začína prejavovať v prítomnosti 0,6 mM amínoksidu (obr. 2), čo približne zodpovedá minimálnej koncentrácii 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu inhibujúcej rast rozličných mikrobiálnych buniek.



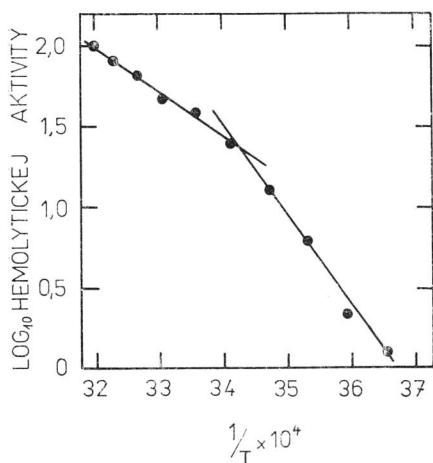
Obr. 1. Vplyv inkubačného času a koncentrácie 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu na hemolýzu ľudských erytrocytov. Koncentrácia amínoksidu: A — 0—0,4 mM; B — 0,5 mM; C — 0,6 mM; D — 0,7 mM; E — 0,8 mM; F — 0,9 mM; G — 1,0 mM.



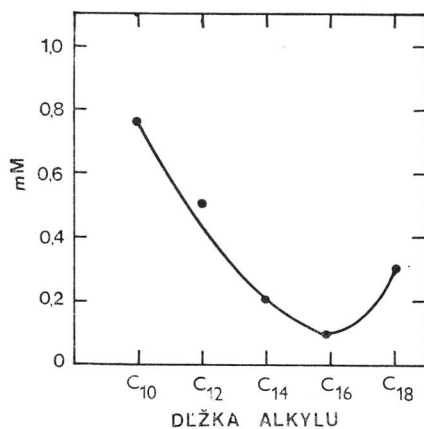
Obr. 2. Rozsah hemolýzy ľudských erytrocytov ako funkcia koncentrácie 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu. Percento uvoľneného hemoglobínu sa stanovilo po 1-hod. inkubácii v prítomnosti amínoksidu.

Teplota významne ovplyvnila hemolytickú aktivitu 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu. Na to, aby 1 mM amínoksid vyvolal úplnú lýzu červených krviniek pri 0 °C, bol potrebný 60-krát dlhší čas ako na úplnú lýzu pri 37 °C. Získané údaje z hemolytickej aktivity 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu analyzované Arrheniovou kinetikou dávajú krivku s fázovým prechodom pri 18 °C (obr. 3). Pretože lipidy membrán ľudských erytrocytov podliehajú fázovému prechodu pri 18—20 °C [9], možno usúdiť, že zmeny vo fyzikálnom stave lipidickej fázy membrán erytrocytov po interakcii s amínoksidmi môžu byť veľmi úzko späté s mechanizmom amínoksidmi indukovanej hemolýzy.

Štúdiom vzájomného vzťahu hemolytickej aktivity a chemickej štruktúry amínoksidov sa zistilo, že cytolytická aktivita hemológnej série 4-alkylmorfolín-*N*-oxidov závisí od dĺžky hydrofóbného alkylu (obr. 4). V skúmanej sérii amínoksidov bol najaktívnejší 4-hexadecylmorfolín-*N*-oxid. Amínoksidy s postarannými alkylmi obsahujúcimi 2—8 atómov uhlíka boli iba veľmi slabě hemolytické. Mierne sa zvýšila hemolytická koncentrácia 4-oktadecylmorfolín-*N*-oxidu, čo môže byť výsledkom nižšej rozpustnosti vo vode v porovnaní s amínoksidmi s kratšími alkylóvými reťazcami. V sérii amínoksidov, ktoré majú



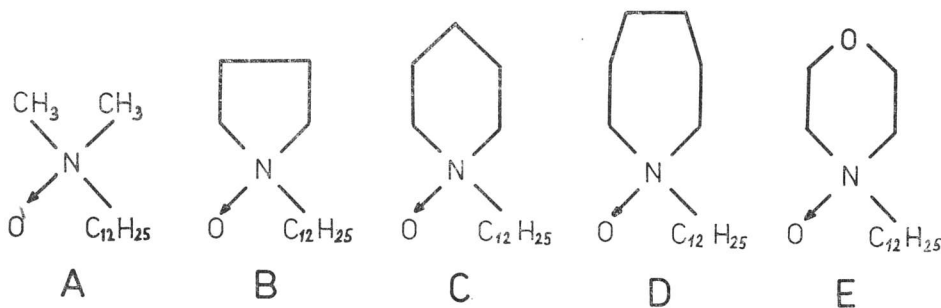
Obr. 3. Arrheniova krivka hemolytickej aktivity 1 mM 4-dodecylmorfolín-*N*-oxidu. Hemolytická aktivita pri udanej teplote je vyjadrená ako recipročná hodnota času (min) potrebného na úplnú hemolýzu násobená faktorom 100.



Obr. 4. Závislosť hemolytickej koncentrácie 4-alkylmorfolín-*N*-oxidov vyvolávajúcej úplnú hemolýzu erytrocytov na dĺžke retazca hydrofóbného alkylu. Hemolýza sa stanovila pri teplote 37 °C počas 30-minútovej interakcie.

rovnaké postranné alkylové retazce ( $C_{12}$ ), ale sa líšia štruktúrou heterocyklov (obr. 5), bolo takéto poradie v smere znižujúcej sa hemolytickej aktivity: 1-dodecylperhydroazepín-*N*-oxid, 1-dodecylpiperidín-*N*-oxid, 1-dodecylpyrolidín-*N*-oxid, 4-dodecylmorfolín-*N*-oxid a *N,N*-dimetyldodecylamín-*N*-oxid. V tomto prípade však relatívne rozdiely v hemolytických koncentráciách amínoxidov neprekročili faktor 3. Takto všeobecné vzájomné vzťahy medzi hemolytickou aktivitou a chemickou štruktúrou amínoxidov sú veľmi podobné vzájomným vzťahom, ktoré sa pozorovali v prípade antimikróbnej aktivity [4, 5] alebo akútnej toxicity u cicavcov [6].

Tieto výsledky demonštrujú hemolytickú aktivitu niektorých heterocyklických *N*-alkylamínoxidov. Hemolytická aktivita, ako aj nedávno popísaná antimikróbna aktivita [4] závisia od teploty, relatívnej koncentrácie a chemickej



Obr. 5. Štruktúra amínoxidov: A — *N,N*-dimetyldodecylamín-*N*-oxid; B — 1-dodecylpyrolidín-*N*-oxid; C — 1-dodecylpiperidín-*N*-oxid; D — 1-dodecylperhydroazepín-*N*-oxid; E — 4-dodecylmorfolín-*N*-oxid

структуры аминоксидов. Je zřejmé, že v obidvoch případech miestom účinku týchto zlúčenín sú biologické membrány, ktoré po interakcii s аминоксидми podliehajú zmenám v molekulárnej organizácii, osmotických a permeabilitných vlastnostiach.

## Súhrn

Zistilo sa, že antimikróbne aktívne alkylderiváty heterocyklických амин-oxidov majú výraznú hemolytickú aktivitu. Rýchlosť a rozsah hemolýzy študovanej 4-alkylморфолін-*N*-oxidmi obsahujúcimi rozlične dlhý uhlíkový reťazec sa zvýšili s koncentráciou аминоксиду, teplotou a dĺžkou homologného alkylu.

Maximum hemolytickej aktivity sa pozorovalo pri аминоксидoch s postranným alkylovým reťazcom obsahujúcim 16 atómov uhlíka. Pri rovnakom alkyle ( $C_{12}$ ) hemolytická aktivita klesala v poradí heterocyklov: perhydroазепин, пиперидин a морфолін. Výsledky podporujú názor, podľa ktorého аминоксидми indukovaná дезорганизация мембранovej štruktúry je príčinou ich antimikróbnej a cytolytickej aktivity.

## Literatúra

1. CULVENOR, C. C. J.: Pure appl. Chem., 3, 1953, s. 83.
2. LINDNER, K.: Tenside, 1, 1964, s. 112.
3. ŠUBÍK, J. — LEŠKOVÁ, Z. — TAKÁČSOVÁ, G. — DUDÍKOVÁ, E.: Výskum biochemického účinku antimikróbných látok. Záverečná správa P11-529-264/02-1, Bratislava, VÚP 1977.
4. ŠUBÍK, J. — TAKÁČSOVÁ, G. — PŠENÁK, M. — DEVÍNSKY, F.: Antimicrob. Agents Chemother., 12, 1977, s. 139.
5. ŠUBÍK, J. — TAKÁČSOVÁ, G.: Bull. VÚP, XVII, 1978, č. 4, s. 1.
6. VRBOVSKÝ, L.: Excerpt. med., Int. Congr., Ser. No. 311, XV, 1973, s. 331.
7. BYINGTON, K. H. — YEH, R. Y. — FORKE, L. R.: Toxicol. appl. Pharmacol., 27, 1974, s. 230.
8. PETHICA, B. A. — SCHULMAN, J. H.: Biochem. J., 53, 1953, s. 177.
9. ZIMMER, G. — SCHIRMER, H.: Biochim. biophys. Acta, 345, 1974, s. 314.
10. HELENIUS, A. — SIMONS, K.: Biochim. biophys. Acta, 415, 1975, s. 29.

## Биохимические аспекты цитолитической активности антимикробно активных аминоксидов

### Выводы

Было определено, что антимикробные активные алкилпроизводные гетероциклических аминоксидов проявляют выразительную гемолитическую активность. Скорость и интервал гемолизы исследованы с 4-алкилморфолин-*N*-окиселями, заключающими углеродный цепь разной длины повышались с концентрацией аминоксидов, температурой и длиной гомологического алкила. Максимум гемолитической активности наблюдалось в случае аминоксидов с побочной алкильной цепью заключающей 16 атомов углерода. В случае одинакового алкила ( $C_{12}$ ) гемолитическая активность понималась в последовательности гетероциклов: пергидроазепин, пиперидин, пиридин, морфолин. На основе результатов мы пришли к заключению, что аминоксидми инициированная дезорганизация мембранной структуры является причиной антимикробной и цитолитической активности.

# Biochemical aspects of cytolytic activity of antimicrobially active amine oxides

## Summary

Antimicrobially active derivatives of heterocyclic *N*-alkyl amine oxides were found to be hemolytic. The rate and the extent of hemolysis, studied by 4-alkylmorpholine-*N*-oxides containing alkyl chain of different length, was increasing with amine oxide concentration, temperature and with the length of homologous alkyl. The maximum of hemolytic activity was observed with alkyl chain containing 16 carbon atoms. At the same alkyl (C<sub>12</sub>) the hemolytic activity was decreasing in order of heterocycles: perhydroazepine, piperidine, pyrrolidine and morpholine. The results are in agreement with the conception according to which the antimicrobial and cytolytic activity of amine oxides is based on a change in the organization and function of cell membranes.