

Aus dem Tuberkulose-Forschungsinstitut Borstel, Institut für experimentelle Biologie und Medizin (Direktor: Prof. Dr. Dr. ENNO FREERKSEN)

Zur experimentellen Wertermittlung des Tuberkulostaticums Isoxyl*

Von

ENNO FREERKSEN und MAGDALENA ROSENFELD

Mit 9 Textabbildungen in 20 Einzeldarstellungen

(Eingegangen am 28. Februar 1963)

Wenn wir die zur Zeit gegebene Situation in großen Zügen betrachten, so kann man sagen, daß die „normale“ Tuberkulose, also die durch das *M. tuberculosis* (hum.) hervorgerufene Mykobakteriose (FREERKSEN 1960) beim Menschen heute therapeutisch keine grundsätzlichen Schwierigkeiten mehr enthält. Hochwirksame Stoffe, vor allem Isoniazid und Streptomycin, stehen zur Verfügung, um von 100 Tuberkulosen, die in die Klinik oder in die Behandlung kommen, je nach Status, Ausgangsmaterial und auch in Abhängigkeit von manchen Imponderabilien doch mindestens 80% der Fälle zu einem befriedigenden Therapieergebnis zu bringen. Therapeutische Schwierigkeiten entstehen aber bei drei Gruppen von Kranken:

1. Bei solchen, die nach Anwendung der bei den meisten erfolgreichen, sog. Standard-Therapie (INH + SM + PAS) nicht zur Heilung kommen. Man kann sie grob noch wieder in zwei Untergruppen teilen, nämlich erstens in jene, deren Angehörige dadurch therapierefraktär sind, daß die Behandlung nicht ausreichend durchgeführt worden ist, und zweitens in jene, bei der trotz korrekt durchgeführter Therapie kein Behandlungserfolg eintrat. Die Angehörigen beider Gruppen sind überwiegend dadurch charakterisiert, daß sie dauernd oder zeitweise Bakterien mit Chemoresistenz gegen die verwendeten Tuberkulostatica ausscheiden (*sekundäre Chemoresistenz*).

2. Es gibt chemotherapeutisch behandelte Patienten, die offen geblieben sind und mit ihren chemoresistenten Keimen Gesunde infizieren. Bei letzteren ist demnach die Tuberkulose primär durch eine chemoresistente Bakterien-Population gesetzt worden (*primäre Chemoresistenz*).

3. Erkrankungen kommen durch Aufnahme von virulenten sog. „atypischen“ Mykobakterienstämmen vor. Sie sind therapierefraktär, wenn die Keime primär chemoresistent gegen die gräuchlichen Tuberkulostatica sind.

Die Therapieforschung ist dementsprechend vor allem auf diese drei Hauptgruppen gerichtet und sucht nach neuen mykobakteriostatischen Stoffen:

a) um die Zahl der Therapieversager nach Standard-Therapie zu vermindern (Verbesserung der Standard-Therapie),

b) um eine Therapie nach erfolgloser Vorbehandlung zu entwickeln, und

c) zur Therapie primärresistenter Infektionen, die durch typische oder atypische Mykobakterienstämmen verursacht sind.

* Isoxyl ist 4-4'-Diisoamyloxythiocarbanilid. Es wurde zu Versuchszwecken von der Continental Pharma (Brüssel) zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen der Standard-Therapie ist die PAS der schwächste Partner. Man kann sie in den Dosen, die heute gewöhnlich oral gegeben werden, als tuberkulostatisch nahezu wirkungslos bezeichnen. Im Experiment bremst sie deshalb selbst in hohen Dosen (1000 mg/kg!) einen ablaufenden tuberkulösen Prozeß nur unerheblich (Abb. 1) und verhindert nicht, daß bei einer Dauertherapie über 10 Monate beim Kaninchen alle behandelten Tiere an Tuberkulose unter (und trotz) Therapie sterben. Der Ersatz der PAS durch wirksamere Stoffe, die besser

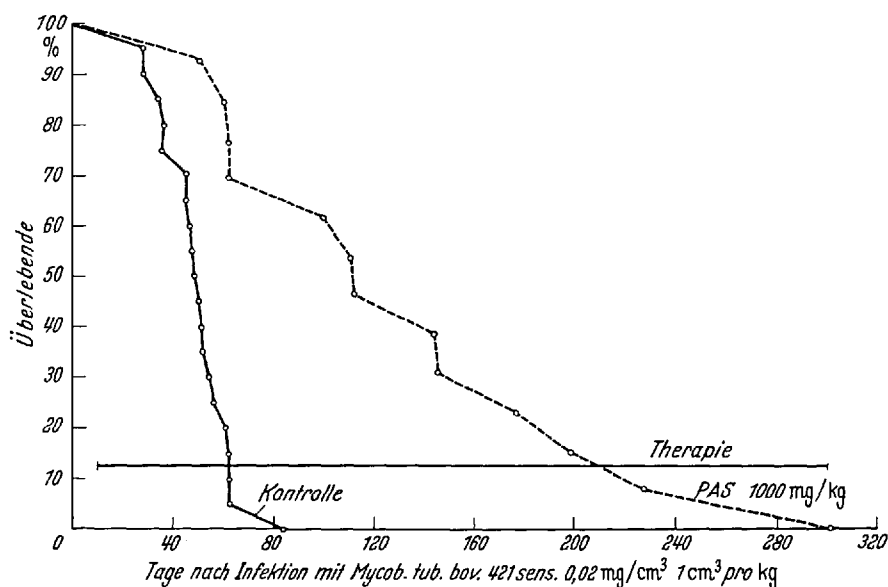
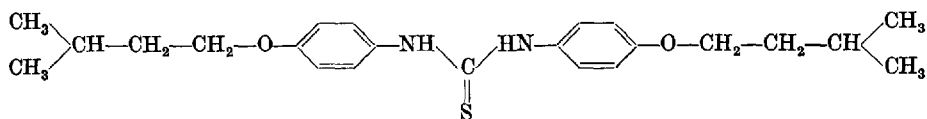


Abb. 1. Überlebensversuch unter Therapie mit 1000 mg/kg PAS. Versuchstier: Kaninchen, O — ein an Tuberkulose gestorbenes Tier

verträglich sind und in geringerer Dosis gegeben werden können, wäre daher dringend erwünscht. Wir haben unter diesem Gesichtspunkt im Laufe der vergangenen Jahre viele Stoffe untersucht. Unter den im Handel befindlichen fiel uns dabei das Thiocarbanilid *Isoxyl*:



auf. Eine erste orientierende Mitteilung dazu findet sich bei FREERKSEN und ROSENFELD, auf die hier verwiesen werden kann. Die Belgische Gesellschaft zur Erforschung und Bekämpfung der Tuberkulose und Lungenkrankheiten hat sich kürzlich auf einem internationalen Symposium ausführlich mit dieser Substanz beschäftigt.

Zunächst war zu prüfen, ob die Substanz im Versuchstier — wozu wir für den Anfang immer die Maus wählen — überhaupt eine Wirkung gegenüber dem tuberkulösen Infekt hat. Dazu wurden in Vorversuchen drei Dosen verwendet, nämlich 20, 50 und 100 mg/kg. Es ergab sich, daß Isoxyl gegen *hochvirulente*

Infektionen, die sämtliche Kontrollen innerhalb von 3 Wochen zum Absterben bringen, eine eindeutige, dosisabhängige tuberkulostatische Wirkung hat.

Nach diesem Ergebnis war zu prüfen, wie sich die Isoxyl-Leistung zu der anderer bekannter Tuberkulostatika verhält. Nach dem Ausfall der Vorversuche war zu vermuten, daß es sich der Größenordnung nach um eine Leistung handeln würde, die zwischen der der PAS und der des Ethioniamid¹ steht. Diese beiden Stoffe wurden daher als Vergleichssubstanzen mitgeprüft (Abb. 2). Danach leisten 100 mg/kg Isoxyl mehr als 500 mg/kg PAS; die Leistung von 50 mg/kg Ethioniamid wurde dagegen in dieser Versuchsanordnung nicht ganz erreicht.

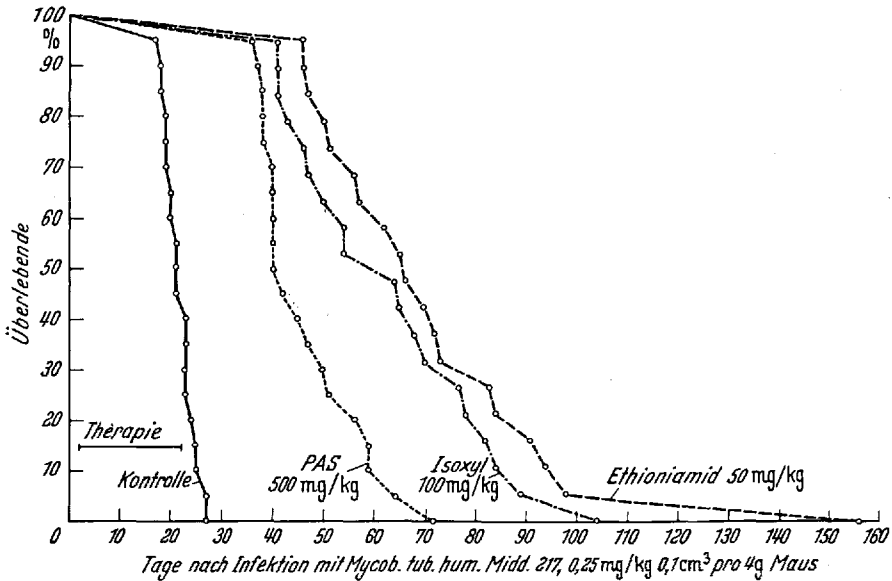
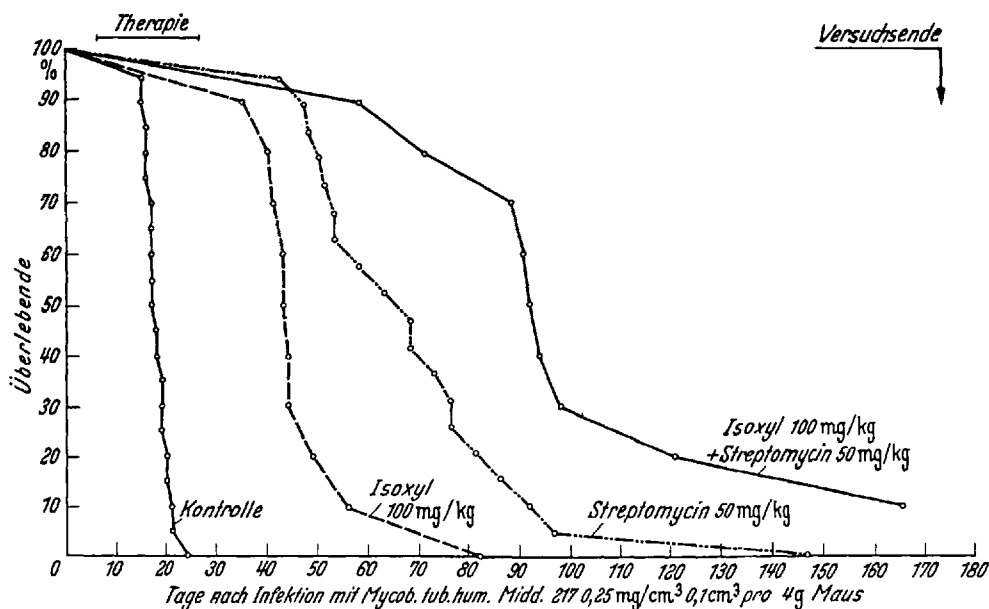
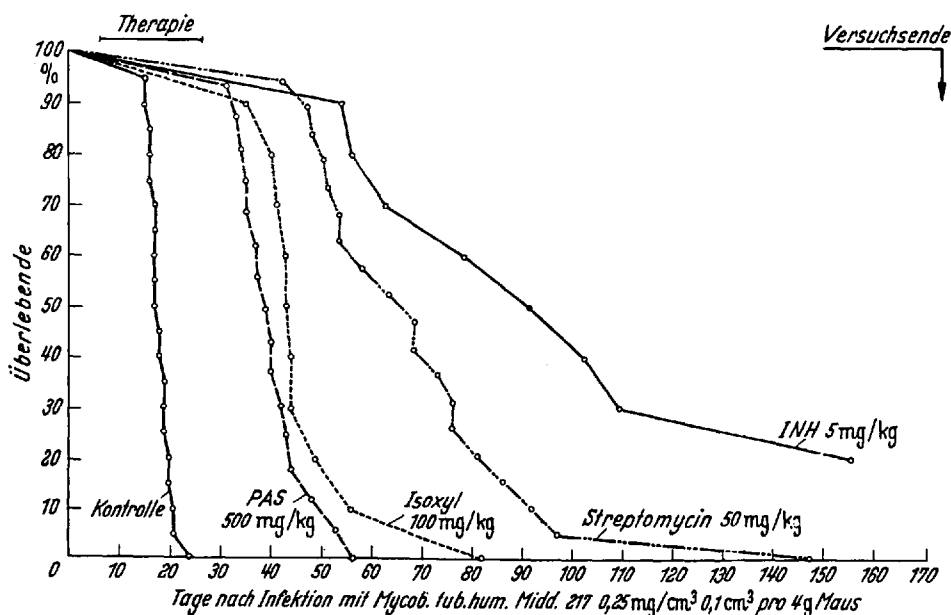


Abb. 2. Vergleichender Therapieversuch mit Ethioniamid, Isoxyl und PAS. Versuchstier: Maus, O = ein an Tuberkulose gestorbene Tier

In einem weiteren Schritt wurde ein Leistungsvergleich zum Streptomycin und Isoniazid gezogen (Abb. 3). Es ergab sich wieder die bessere Leistung von 100 mg/kg Isoxyl gegenüber der von 500 mg/kg PAS. Es zeigte sich weiterhin, daß 50 mg/kg Streptomycin mehr leisteten als 100 mg/kg Isoxyl, und daß diese noch von 5 mg/kg Isoniazid übertroffen würden. Nach dieser Versuchsanordnung gehört das Isoxyl nicht zu den „großen“ Tuberkulostatika, zu denen man auch heute noch nur das Isoniazid und — mit Abstand — Streptomycin rechnen kann. Die sog. „kleinen“ Tuberkulostatika kommen vor allem als Kombinationspartner im Rahmen der Kombinationstherapie in Frage. Das Isoxyl mußte daher in dieser Richtung weitergeprüft werden. Dabei bestätigte sich, was wir bei praktisch allen anderen „kleinen“ tuberkulostatischen Stoffen sehen: Die Überlegenheit des Isoniazids läßt die dagegen vergleichsweise geringe Leistung der kleineren Tuberkulostatika unter experimentellen Bedingungen kaum in Erscheinung treten. Immerhin kann man bei Verwendung kleinerer INH-Dosen einen Kombinationseffekt darstellen, der mindestens dem der PAS entspricht. Wie Abb. 4 zeigt, hat

¹ In Deutschland unter der Bezeichnung Iridocin (Bayer-Leverkusen) im Handel.



aber die Kombination mit Streptomycin (vgl. 100 mg/kg Isoxyl allein, 50 mg/kg Streptomycin allein und Streptomycin + Isoxyl in diesen beiden Dosierungen) einen guten Effekt. Der Ausfall dieses Experimentes legt es nahe, die Kombination dieser beiden Stoffe auch klinisch zu versuchen.

Aus unseren weiteren Versuchen über die Kombinationsleistung des Isoxyl greifen wir noch die mit 20 mg/kg Ethioniamid heraus (Abb. 5). Die Kombinationswirkung ist nicht so groß wie mit Streptomycin, aber unverkennbar. Da das Bestehen einer Kreuzresistenz zwischen Ethioniamid und Isoxyl angenommen wird, ist es vielleicht nicht unwichtig, darauf hinzuweisen, daß man auch solche Stoffe durchaus in der Kombination verwenden kann. Abb. 5 zeigt gleichzeitig die im Vergleich zum Ethioniamid und Isoxyl schwache Wirkung des Thiosemicarbazons (Conteben) unter diesen Versuchsbedingungen. Die Kombination Isoxyl + Ethioniamid hat nach dem Ausfall des Experimentes ebenfalls klinisches

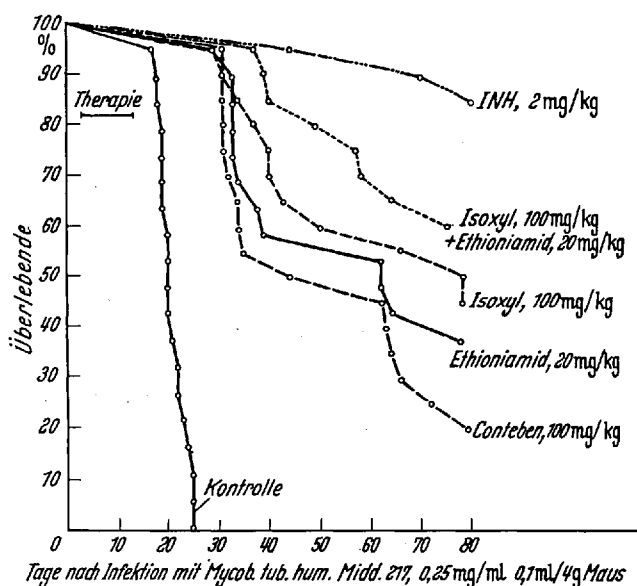


Abb. 5. Kombinationsversuch von Isoxyl mit Ethioniamid. Versuchstier: Maus, O = ein an Tuberkulose gestorbenes Tier

Interesse. Mit ihr könnte die weniger gute Verträglichkeit des Ethioniamids (die im allgemeinen zur Anwendung relativ kleiner Dosen nötig) kompensiert werden.

Ein wichtiger Punkt bei der Wertermittlung neuer Substanzen ist schließlich deren Leistung gegenüber isoniazid- und streptomycinresistenten Mykobakterienstämmen (Abb. 6). Bei hoher totaler Resistenz (50 γ) ist Isoniazid selbst in einer Dosis von 50 mg/kg ohne Wirkung; die damit behandelte Gruppe verhält sich nicht anders als die unbehandelte Kon-

trolle. Dagegen zeigt Isoxyl in Dosierungen von 100 mg/kg und 200 mg/kg eine eindeutige therapeutische Wirkung.

Nachdem durch die Ergebnisse an der Maus Versuche mit größeren Versuchstieren gerechtfertigt waren, wurde die Isoxyl-Leistung mit der der PAS, des Dadibutols¹, des Ethioniamids und des Isoniazids am Kaninchen verglichen (Abb. 7). Bei dieser Versuchsanordnung, die an die Substanzen sehr große Anforderungen stellt, zeigten Ethioniamid und Isoxyl praktisch gleiche Leistungen, wobei allerdings vom Isoxyl 200 mg/kg und vom Ethioniamid nur 50 mg/kg verwendet wurden. Es ist möglich, daß die Leistung des Ethioniamids in dieser Versuchsanordnung größer gewesen wäre, wenn man höhere Dosen gewählt hätte. Da diese beim Menschen aber nicht vertragen wird, schienen Versuchsanordnungen in dieser Richtung nicht sinnvoll.

¹ Wir verwenden die Bezeichnung Dadibutol als Laborbezeichnung für Dextro-2,2'-(Äthylendiimino)-di-1-Butanol. Die Substanz wurde uns freundlicherweise von den Lederle-Laboratories (American Cyanamid Company) zur Verfügung gestellt.

Der Kaninchenversuch erlaubt auf einfache Weise röntgenologische Verlaufskontrollen. Aus der großen Zahl von Aufnahmen werden hier einige vom Tage des Therapieendes wiedergegeben (Abb. 8a—m), nachdem die Therapie 5 Wochen lang geführt worden war. Wenn man diese Röntgenserien vergleicht, so zeigt sich, daß (es handelt sich um eine kleine Auswahl aus der röntgenologischen Gesamtkontrolle) sich die PAS-Gruppe trotz der hohen Dosierung von 300 mg/kg von der unbehandelten Kontrolle praktisch nicht unterscheidet. Ein wenig besser ist die Leistung des Dadibutols. Die Therapieergebnisse mit Isoniazid, Ethioniamid und Isoxyl sind zu diesem Termin praktisch gleich gut. Erst der Gesamtverlauf des Versuches zeigt, daß die beiden letzteren nicht die Leistung von 5 mg/kg Isoniazid erreichen, denn bei der Isoniazid-Gruppe kommt das Rezidiv am spätesten.

Da es sich hier nur um die Mitteilung unserer experimentellen Befunde handelt, ist es notwendig, wenigstens einiges, was die Frage der

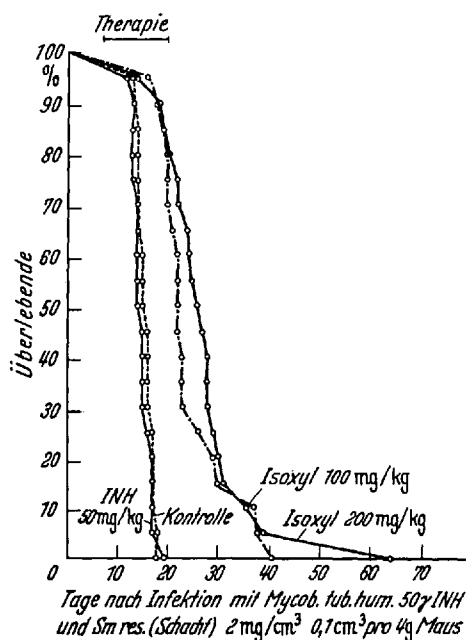


Abb. 6. Isoxyl-Leistung bei Infektion mit einem hochvirulenten, gegen Isoniazid und Streptomycin resistenten Stamm. Versuchstier: Maus, ○ = ein an Tuberkulose gestorbenes Tier

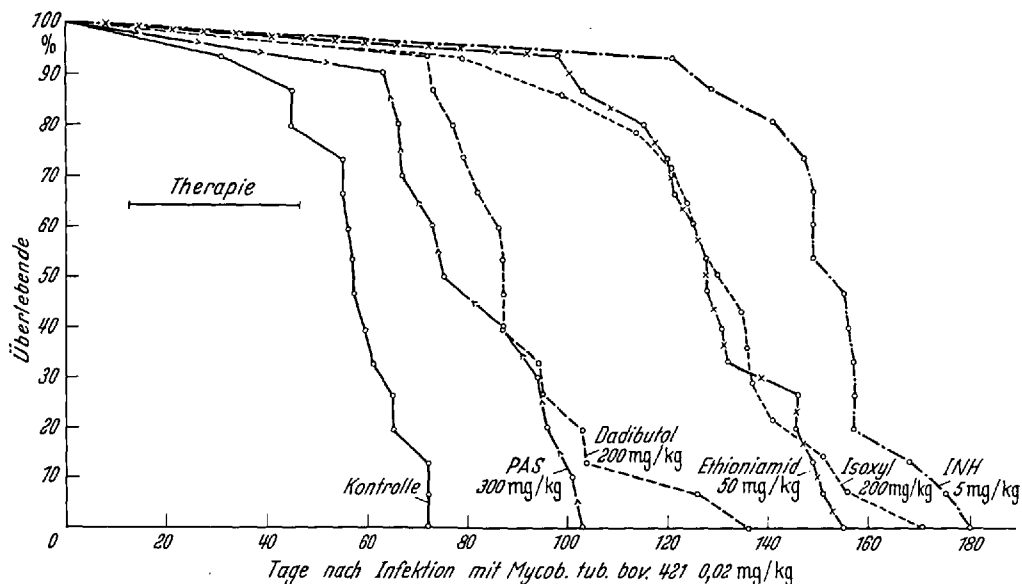


Abb. 7. Vergleichender Therapieversuch am Kaninchen mit Isoxyl, Ethioniamid, Dadibutol und PAS, ○ = ein an Tuberkulose gestorbenes Tier

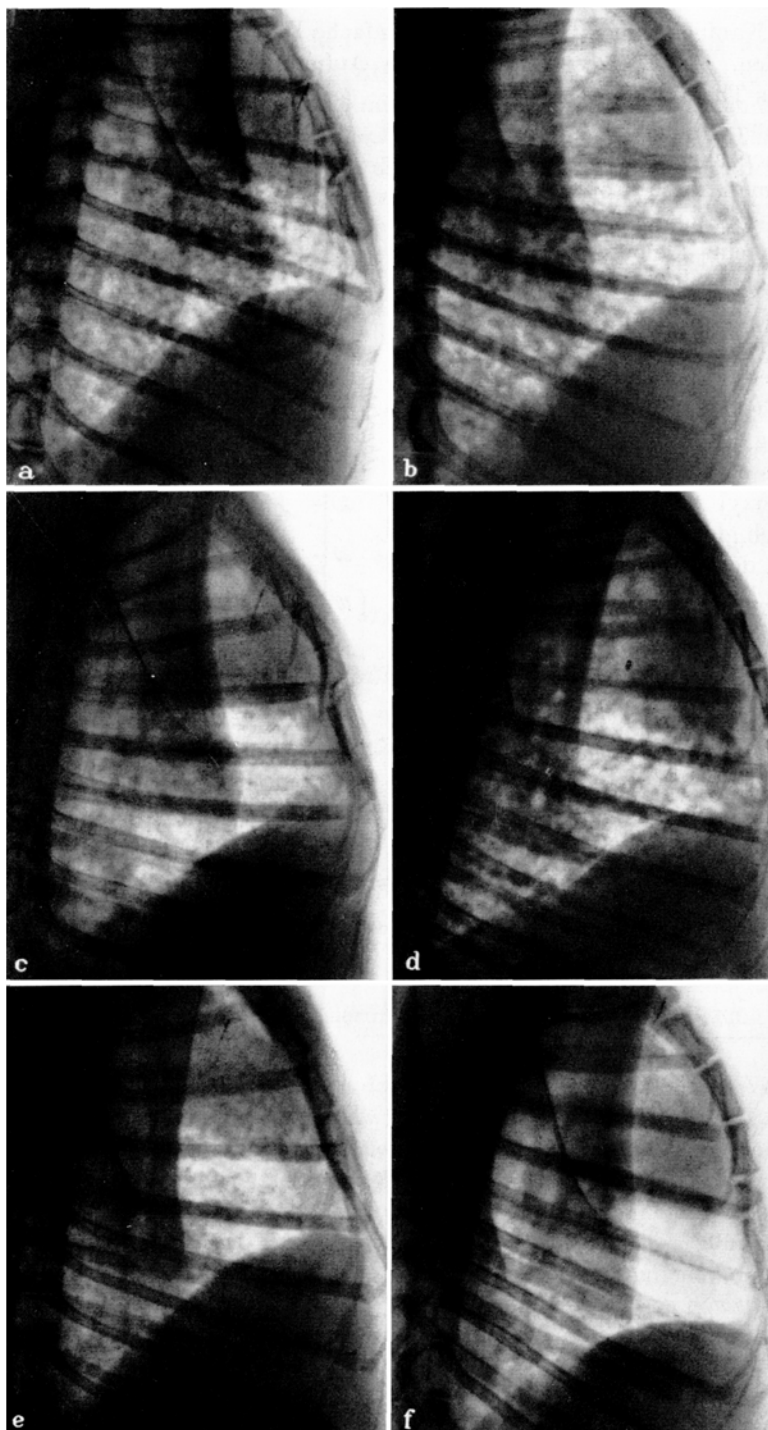


Abb. 8 a—f

Abb. 8 a—m. Röntgenologischer Therapievergleich zum Zeitpunkt des Therapieendes.
Versuchsbedingungen s. Abb. 7. a und b: Kontrolle; c und d: PAS 300 mg/kg; e und f: Dadibutol
200 mg/kg; g und h: Isoxyl 200 mg/kg; i und k: Ethionamid 50 mg/kg; l und m: INH 5 mg/kg

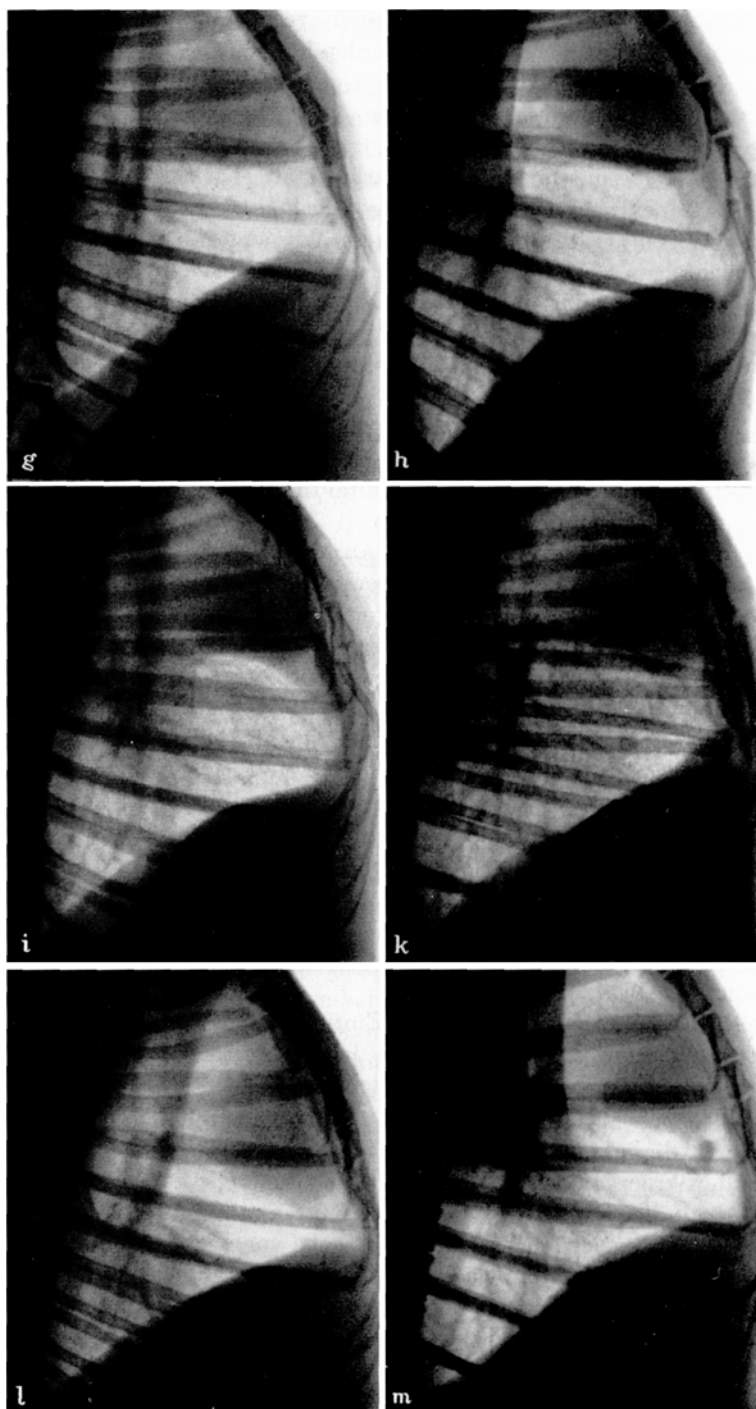


Abb. 8 g—m

Aussagekraft des Tierversuches betrifft, zu erörtern, d. h., ob und wie weit seine Ergebnisse in die Klinik übernommen werden können. Dieses an sich sehr vielschichtige Problem soll später in einer eigenen Darstellung gesondert abgehandelt werden. Wir beschränken uns daher hier darauf, einige wichtige Gesichtspunkte herauszuheben:

1. Bei der Wertermittlung neuer tuberkulostatischer Stoffe ist zunächst nur *ein* Punkt entscheidend, nämlich, was die Substanz therapeutisch leistet. Alles andere ist dagegen zweitrangig und kann deshalb auch im zeitlichen Ablauf der Prüfung nachfolgen. Wir machen daher zwar auch *in vitro*-Prüfungen, führen aber gleichzeitig Screening-Tests bei der Maus durch. Bei allen Stoffen, die Andeutungen einer therapeutisch brauchbaren tuberkulostatischen Wirkung zeigen, werden weitere Versuchstiere einbezogen; vor allem Meerschweinchen und Kaninchen — gelegentlich auch Affen.

2. Die Prüfung geht vor allem auf die Beantwortung von vier Grundfragen aus:

- a) Wird eine ablaufende Tuberkulose-Infektion bei
 - α) sofort beginnender Therapie (Simultantherapie) vor Ausbildung der Erkrankung,
 - β) bei späterem Therapiebeginn nach Ausbildung der Erkrankung gebremst?
- b) Wird eine bereits vorhandene tuberkulöse Erkrankung zur Rückbildung gebracht, d. h., hat die Substanz eine echte *therapeutische* Wirkung?
- c) Wann tritt das Rezidiv nach Absetzen der Therapie auf?
- d) Besteht eine Wirkung gegen chemoresistente, typische oder atypische Infektionen?

e) Wie groß ist die Toxizität und welche Nebenwirkungen treten auf?

3. Diese Fragen müssen vor allem im Überlebensversuch geprüft werden. Alle anderen Versuchsanordnungen können wichtige Zusatzkenntnisse liefern. Bedenklich ist aber die ausschließliche Bewertung des sog. „Befall-Index“;

- a) weil das subjektive Moment zu groß ist,
- b) weil er immer nur für den Zeitpunkt der Feststellung zutrifft (er zeigt Momentbilder, aber nicht Verlaufsbilder),
- c) nur bei einer sehr großen Zahl von Stichproben Fehlschlüsse vermieden werden können,
- d) weil er keinerlei Hinweis auf den Eintritt des Rezidivs gibt.

Die Ermittlung des Befallsindex kann daher nur ergänzend als Hilfsmethode in den Überlebensversuch eingebaut werden.

4. Die tuberkulostatische Therapie wirkt nicht unmittelbar auf die Tuberkulose als Krankheit, die in der Gesamtheit als Folge der Auseinandersetzung zwischen Makro- und Mikroorganismus zustande kommt, sondern ätiologisch, also durch Einwirkung auf die Erreger als Ursache der Erkrankung. Für die Bewertung von Ergebnissen des Tierversuches ist diese Tatsache von entscheidender Bedeutung. Durch die Einbringung von Tuberkuloseerregern kommen Krankheitsformen zustande, die im Ablauf bei jeder makroorganismischen Species verschieden aussehen können und deshalb auch nicht ohne weiteres vergleichbar sind. Auf diese verschiedenen *Formen* von Erkrankungen wirkt man mit tuberkulostatischen Stoffen auch gar nicht ein, sondern nur auf deren *Ursache*. Diese ist aber in allen Fällen die gleiche. Es ist für die antibakterielle Therapie daher auch unerheblich, ob die Tuberkulose als Krankheit bei den Versuchstieren anders aussieht und

anders verläuft als beim Menschen. Wesentlich ist die *eine* Tatsache, nämlich daß sich nach Hemmung der Erreger die Tuberkulose des Versuchstieres eben-
sogut zurückbildet wie die des Menschen. Trotzdem muß man solche Stoffe an
möglichst vielen Versuchstier-Species prüfen — nicht weil die Tuberkulosen bei
ihnen verschieden sind, sondern weil diese

a) mit den angebotenen tuberkulostatischen Stoffen sozusagen verschieden
umgehen (spezielle Pharmakokinetik der verschiedenen Versuchstierarten),

b) weil die Eigenleistung der verschiedenen Species bei der Erregerhemmung
und schließlichen Keimvernichtung unterschiedlich groß ist,

c) weil die Keimzahlen in der pathogenen Population in den Herden der ver-
schieden Versuchstierspecies unterschiedlich groß sind.

5. Was wir aus dem Tierversuch in die Klinik übernehmen dürfen, ist daher
sehr viel; Stoffe, die in einem umfassend durchgeführten Tierversuch eine Wir-
kung zeigen, werden auch beim Menschen einen therapeutischen Effekt haben.
Der Erfolg wird gewöhnlich ein wenig besser sein, weil wir unter experimentellen
Bedingungen beim Versuchstier meistens akut verlaufende Tuberkulosen mit
großen Keimzahlen vor uns haben (z. B. progrediente miliare Tuberkulose), wie
sie heute beim Menschen nur noch selten vorkommen. Auch ein schwächerer tuber-
kulostatischer Anstoß kann beim Menschen daher noch Bedeutung haben. Was
eine Substanz im Tierversuch leistet, kommt daher auch beim Menschen zustande,
wenn für die jeweils zu prüfende Substanz nicht besonders hinderliche pharmako-
kinetische Bedingungen herrschen. Das Umgekehrte, nämlich daß eine Substanz
beim Menschen wirksam ist, nicht aber im Tierversuch, ist bisher praktisch nicht
vorgekommen. Der Tierversuch klärt somit fast alles, was man über die thera-
peutische Leistung wissen muß, bevor eine Substanz in die klinische Prüfung
kommen kann. Bei der letzteren handelt es sich vor allem noch um die Ermittlung
der richtigen Dosierung und im engsten Zusammenhang damit um die sog. „Ver-
träglichkeit“.

6. Im Tierversuch kann man vor allem die Toxizität im Sinne der *gerichteten*
Toxizität prüfen (z. B. Nephrotoxizität, Hepatotoxizität, Neurotoxizität). Die
allgemeine Toxizität (das ist genauer gesagt nicht viel mehr als die, deren Wirkungs-
modus nicht sicher erkennbar oder bekannt ist) und die gewöhnlich als DL 50
ausgedrückt wird, hat grundsätzlich experimentelles Interesse, denn sie führt zur
Ausschaltung giftiger Stoffe. Solche Untersuchungen müssen daher abgeschlossen
sein, bevor eine Substanz in die Klinik kommen darf. Nicht prüfbar im Tier-
versuch ist aber die für die Therapie am Menschen viel wichtigere „Verträglich-
keit“, die nicht identisch ist mit „Toxizität“. Sie entscheidet sogar weitgehend
unabhängig von der tuberkulostatischen Aktivität darüber, ob man eine Substanz
überhaupt geben, welche Dosis verabfolgt und wie lange diese gegeben werden
kann. Diese Verträglichkeit ist leider nur klinisch prüfbar; das Versuchstier
bietet dafür nur wenig brauchbare Hinweise. Insofern beinhaltet die Einführung
jeder neuen Substanz ein Risiko, das nur in solchen Anstalten übernommen
werden sollte, in denen alle Voraussetzungen für eine vollständige Kontrolle des
Wirkungsablaufes und der möglichen Schädigung wirklich gegeben sind. Erst
nachdem die vollständige experimentelle Prüfung abgeschlossen ist, sollte eine
Substanz klinisch geprüft werden. Leider wird dagegen nicht selten in nicht zu
verantwortender Weise verstoßen.

Gegen die Anwendung des Isoxyls in der Klinik bestehen von der tuberkulostatischen Aktivität her gesehen also keinerlei Bedenken. Trotzdem sind diese aufgetaucht, weil Versuche zur Blutspiegelbestimmung nicht zu überzeugenden Ergebnissen geführt haben. Obwohl möglicherweise dazu bald geeignete Wege gefunden werden, bedarf dieses Argument noch einer kurzen grundsätzlichen Betrachtung. Entscheidend für die Bewertung einer Substanz ist ihre therapeutische Leistung. Wenn man diese in Relation zu meßbaren Blutspiegelwerten setzen kann, so liegt darin ein Sicherheitsfaktor, der nicht unterschätzt,

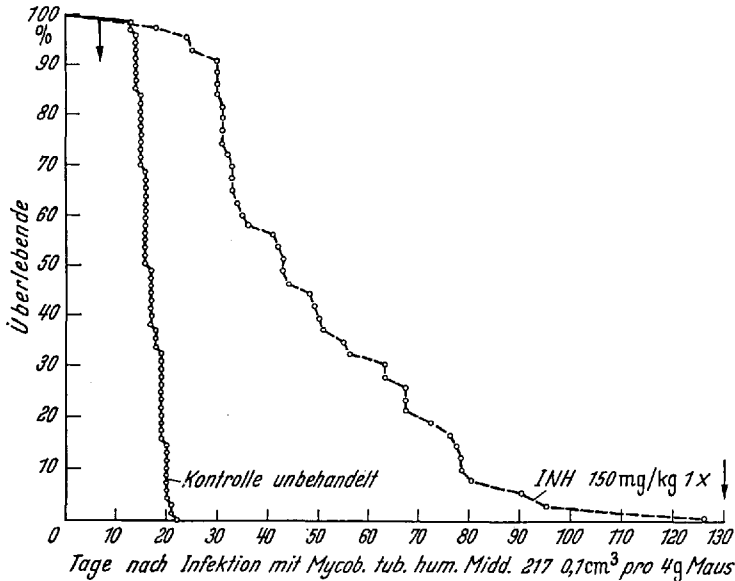


Abb. 9. Therapeutischer Effekt von Isoniazid, 150 mg/kg, 1mal. Versuchstier: Maus, O = ein an Tuberkulose gestorbenes Tier

aber auch nicht überbewertet werden darf. Es gibt nachweisbar antibakteriell wirksame Stoffe, bei denen keine sichere Beziehung zwischen einem kontinuierlich aufrechterhaltenen Blutspiegel und der therapeutischen Leistung besteht. Das ist besonders eindrucksvoll bei dem wichtigsten Tuberkulostaticum, das wir zur Zeit zur Verfügung haben, nämlich beim Isoniazid. Ohne auf diese Frage hier weiter einzugehen, soll hier nur an einem einzigen Beispiel (Abb. 9) gezeigt werden, daß die INH-Leistung nach *einmaliger* Applikation über lange Zeit fortwirkt, ohne daß noch ein Blutspiegel besteht. Diese nachwirkende Leistung des Isoniazids ist dosisabhängig. Obwohl beim Isoxyl mit großer Wahrscheinlichkeit ein ganz anderer Wirkungsmodus als beim INH besteht, muß man sich doch davor hüten, die Nichtnachweisbarkeit eines Blutspiegels mit Wirkungslosigkeit gleichzusetzen.

Unter Berücksichtigung unserer Befunde und der kurz skizzierten Grundsätze ergeben sich *zusammenfassend* folgende Feststellungen:

1. Isoxyl hat in einer Dosierung, die wegen der guten Verträglichkeit dieser Substanz auch im Bereich der klinischen Anwendbarkeit liegt, im Experiment einen guten therapeutischen Effekt, der über dem der PAS liegt und in der Größenordnung dem des Ethioniamids nahekommt.

2. Die Substanz ist wirksam gegen streptomycin- und isoniazidresistente Infektionen.

3. Kombinationseffekte sind am eindrucksvollsten mit Streptomycin, deutlich mit Ethioniamid und Dadibutol, weniger groß, aber vorhanden, mit Isoniazid.

4. Das Isoxyl ist dadurch charakterisiert, daß es in die Gruppe der sog. „kleineren“ Tuberkulostatica gehört. Es kann mit allen gebräuchlichen Tuberkulostatica kombiniert werden. Es ist wenig toxisch, so daß man im Gegensatz zu den meisten Tuberkulostatica zweiter Ordnung den Maximaleffekt durch entsprechende Dosierung auch ausnutzen kann.

5. Isoxyl ist der PAS erheblich überlegen, so daß es dieses Präparat in der Standard-Therapie ersetzen könnte.

Literatur

- FREERKSEN, E.: Die sogenannten „atypischen“ Mycobakterien. Klin. Wschr. 38, 297—309 (1960).
- Symposium der Société Belge d'Etudes Scientifiques sur la Tuberculose et la Pneumologie, 6.—11. 12. 1962 in Brüssel. Soc. Belg. Etud. Sci. Tuberc. 11, 450 (1963).
- , u. M. ROSENFELD: Experimentelle Therapie mit 4,4'-Diisoamyloxythiocarbanilid. Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.) 12, 280—282 (1962).

Prof. Dr. Dr. ENNO FREERKSEN und MAGDALENA ROSENFELD,
Tuberkulose-Forschungsinstitut, 2061 Borstel