Antimikrobieller Effekt des HIV-Therapeutikums Diethyldithiocarbamat (Imuthiol®)

E. C. Reisinger^{1,2}, F. Allerberger¹, A. Tiran², M. P. Dierich¹

Einleitung

Die klinische Wirksamkeit von Diethyldithiocarbamat (DTC, Imuthiol®, Institute Merieux, Frankreich) zur Therapie der HIV-1-Infektion wurde in mehreren klinischen Studien belegt (1, 2, 3). DTC ist eine niedrigmolekulare Schwefelverbindung mit chelatbildenden Eigenschaften. Durch die Komplexbildung metallischer Zentralatome werden diverse Enzyme gehemmt. Der Wirkmechanismus, der zur verzögerten Progression der HIV-Infektion führt, ist noch Gegenstand der Diskussion.

DTC vermindert die HIV-1-Expression in peripheren Blut-Lymphozyten. Die mögliche Hemmung der reversen Transkriptase (4) sowie des TAT-Gen-Produktes des HIV-1-Virus (2) könnte dafür eine Erklärung darstellen. DTC wirkt immunmodulatorisch im Sinne des vermehrten Ausreifens von T-Zellen aus Null-Zellen (5).

Interleukin 2 (IL 2) und IL 2-Rezeptoren werden unter DTC in ihrer Konzentration verändert (1), eine verminderte Fluidisierung von Lymphozytenmembranen wurde unter DTC-Therapie beobachtet (6). Eine antimikrobielle Wirkung von DTC konnte in vitro auf Methicillin-resistente Staphylokokken (7) und im Mäusemodell bei systemischer Candida-Infektion gezeigt werden (8). Kürzlich beschrieben wir in vitro die fungistatische Wirksamkeit von DTC auf *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Mucor mucedo* und *Aspergillus fumigatus* (9). In vivo wurde nach bauchchirurgischen Eingriffen beim Menschen unter DTC eine verminderte postoperative Infektionshäufigkeit beobachtet (10).

In den erwähnten klinischen Studien bei HIV-Infektion war ein vermindertes Auftreten von opportunistischen Infekten zu beobachten. Das Spektrum der gegen DTC empfindlichen Krankheitserreger bedarf weiterer Abklärung.

Material und Methoden

Bakterien

Staphylococcus aureus (American Type Culture Collection ATCC Nr. 25923), klinische Isolate von *Staphylococcus aureus* (10 Stämme), von *Staphylococcus epidermidis* (10 Stämme), von *Salmonella spp.* (6 Stämme), und von *Escherichia coli* (10 Stämme), sowie je ein Stamm von *Mycobacterium tuberculosis varietas hominis*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii* und *Mycobacterium simiae* wurden zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) verwendet. Die Mykobakterien wurden freundlicherweise vom Forschungsinstitut Borstel, BRD, zur Verfügung gestellt.

Agarverdünnungstest

Müller Hinton-Agar und Löwenstein Jensen-Agar (für Mykobakterien) wurden nach Vorschrift des Herstellers (Api Merieux) zubereitet; während des Abkühlens wurde DTC (bei 48° C im Wasserbad) entsprechend einer Zweier-Verdünnungsreihe von 256-0,25 µg/ml zugegeben und der Agar in Petrischalen gegossen. Eine Bakteriensuspension in 0,9% Kochsalzlösung mit einem Mc Farland-Trübungswert von 0,5 wurde in Müller Hinton-Medium 1 : 10 verdünnt (Keimzahl ca. 1×10^7). Davon wurden 2 µl als Inokulum auf die Agar-Platten aufgetragen. Die MHK wurde definiert als jene Konzentration, bei welcher das Bakterienwachstum nach 16stündiger Inkubation bei 37° C (bei Mykobakterien drei und sechs Wochen bei 35° C) im Vergleich zur Kontrollplatte ohne DTC gehemmt wurde, wobei maximal eine Einzelkolonie toleriert wurde (11).

Mäusestamm

Swiss Mice mit einem Gewicht zwischen 18 und 20 g wurden freundlicherweise von Prof. Semenitz, Innsbruck, zur Verfügung gestellt.

Toxoplasmen-Inokulation

Zur Erhaltung des *Toxoplasma gondii*-Stammes wurde toxoplasmenhaltiger Aszites alle drei Tage intraperitoneal in Mäuse überimpft. Zur Herstellung des Inokulums wurde die Konzentration von *Toxoplasma gondii* im Aszites mit Dunkelfeldmikroskopie in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und entsprechend einer dekadischen Verdünnungsreihe in steriler isotoner Kochsalzlösung verdünnt, sodaß die Gesamtmenge im Inokulum 10^4 , 10^3 und 10^2 Toxoplasmen betrug. DTC wurde in NaCl gelöst und der Toxoplasmenlösung in einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugesetzt (50 mg/kg KG). Die Gesamtmenge des intraperitoneal injizierten Inokulums betrug 1 ml.

Als Positivkontrolle wurde Toxoplasmenlösung ohne DTC, als Negativkontrolle wurde DTC-Lösung ohne Toxoplasmen verabreicht. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Chi Quadrat-Test, wobei ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant bewertet wurde.

Ergebnisse

In unseren Versuchen wirkt DTC bakteriostatisch (MHK) auf *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* in Konzentrationen von 1-32 µg/ml und auf *Escherichia coli* und *Salmonella spp.* in Konzentrationen von 8-128 µg/ml (Tab. 1). Auf das Wachstum von *Mycobacterium tuberculosis varietas hominis*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii* und *Mycobacterium simiae* zeigt DTC in den getesteten Konzentrationen keinen hemmenden Einfluß (Tab. 1).

Bei einer Konzentration von 50 mg/kg KG DTC überlebten fünf von fünf Mäusen, wenn sie mit einer Gesamtmenge von 10^2 Erregern intraperitoneal infiziert wurden (Tab. 2). Bei einem Inokulum von 10^3 Toxoplasmen überlebte eine von fünf behandelten Mäusen, bei 10^4 keine. Die mit 10^2 und mehr *Toxoplasma gondii* in Abwesenheit von DTC infizierten Mäuse starben innerhalb von fünf Tagen nach Infektion. Die in Abwesenheit von DTC überlebenden Mäuse wurden 21 Tage lang nachbeobachtet, bei einigen von ihnen wurde am 4. - 7. Tag nach Infektion vermehrter Haarausfall beobachtet, welcher danach nicht mehr nachweisbar war.

TABELLE 1
Mittlere Hemmkonzentration (MHK) in µg/ml

Bakterien (Anzahl klinischer Isolate)	Median (Grenzwerte)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2
<i>Staphylococcus aureus</i> (10)	8 (2 - 32)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (10)	4 (1 - 16)
<i>Salmonella</i> spp. (6)	32 (8 - 64)
<i>Escherichia coli</i> (10)	32 (8 - 128)
<i>Mycobacterium Tuberculosis</i> (1)	> 256
<i>Mycobacterium intracellulare</i> (1)	> 256
<i>Mycobacterium kansasii</i> (1)	> 256
<i>Mycobacterium simiae</i> (1)	> 256

TABELLE 2
Verhinderung des letalen Effektes von *Toxoplasma gondii*
bei Mäusen des Stammes Swiss mice.

	Anzahl der für die Infektion verwendeten <i>Toxoplasma gondii</i> Organismen			
	10 ⁴	10 ³	10 ²	0
DTC 50 mg/kg KG	5/5*	4/5	0/5	0/5
Kontrolle ohne DTC	5/5	5/5	5/5	—
p Wert	n. s.	n. s.	< 0,02	--

* = gestorbene Mäuse/Gesamtzahl an infizierten Mäusen · n. s. = nicht signifikant

Diskussion

DTC ist antimikrobiell gegen verschiedene Krankheitserreger wirksam. Die antibakterielle Wirksamkeit auf grampositive und gramnegative Bakterien tritt bei Konzentrationen von DTC (MHK) auf, welche beim Menschen in vivo nach intravenöser Applikation erreicht werden (eigene unveröffentlichte Daten). Dabei scheint der antibakterielle Effekt auf grampositive Keime stärker ausgeprägt zu sein als auf gramnegative. Eine Beeinflussung des Wachstums von Mykobakterien durch DTC konnten wir nicht beobachten.

Die Wirksamkeit gegen *Toxoplasma gondii* im Mäusemodell ist bei einem Inokulum von 10² und einer DTC-Dosis von 50 mg/kg KG gegeben (p < 0,02; Chi-Quadrat-Test). Bei höherem Toxoplasmeninokulum zeigt sich ein Vorteil unter DTC gegenüber NaCl, dieser konnte bei der geringen Anzahl an infizierten Mäusen jedoch nicht als signifikant beschrieben werden. Diese Dosierung von DTC übersteigt die bisher bei HIV-Infektion empfohlene therapeutische Dosierung beim Menschen; DTC wird jedoch in Dosen von 75 mg/kg Körpergewicht beim Menschen als Chemoprotektor bei Therapie mit Cis-Platin ohne schwere Nebenwirkungen vertragen (12). Unsere Ergebnisse zeigen, daß bei der Therapie der HIV-Infektion neben den bisher diskutierten Wirkungsmechanismen von DTC, nämlich dem direkt antiretroviralen und dem immunmodulierenden Effekt, eine direkte antimikrobielle Aktivität gegen unterschiedliche Krankheitserreger von Bedeutung sein könnte. Die Aufklärung des molekularen antimikrobiellen Wirkungsmechanismus ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen.

Zusammenfassung

Verminderte Expression des HIV-1 in peripheren Blutlymphozyten durch Diethyldithiocarbamat (DTC) sowie immunmodulierende Eigenschaften der Substanz werden als mögliche Erklärung der Verzögerung der Progression der HIV-Infektion durch DTC in Betracht gezogen.

Wir zeigen, daß DTC antimikrobiell gegen verschiedene Krankheitserreger wirksam ist. Die antibakterielle Wirksamkeit erscheint bei grampositiven Bakterien stärker ausgeprägt als bei gramnegativen und tritt bei Konzentrationen von DTC (MHK) auf, welche beim Menschen in vivo nach intravenöser Applikation erreicht werden können. Das Wachstum von Mykobakterien scheint durch DTC nicht beeinflusst zu werden. DTC verhindert bei einer Dosierung von 50 mg/kg KG und einem Inokulum von 10^2 Erregern die *Toxoplasma gondii* Infektion bei Mäusen.

Schlüsselwörter

Diethyldithiocarbamat, DTC, AIDS, HIV-Therapie, antibiotischer Effekt, *Toxoplasma gondii*.

Summary

Antimicrobial activity of the anti-HIV-compound diethyldithiocarbamate (Imuthiol®)

Reduced expression of HIV-1 in peripheral blood lymphocytes by diethyldithiocarbamate (DTC) and the immunomodulating effect have been discussed as the possible modes of action of DTC in reducing the progression of HIV-1-infection. We demonstrate DTC to have antimicrobial effectiveness against different pathogens. The antibiotic effect is more legible against grampositive than gramnegative bacteria; effective concentrations of DTC (MIC) are obtained after intravenous DTC application. DTC does not seem to influence the growth of mycobacteria. DTC prevents the fatality of mice with an inoculum of 10^2 *Toxoplasma gondii* in a concentration of 50 mg/kg BW.

Key words

Diethyldithiocarbamate, DTC, AIDS, HIV-therapy, antibiotic effect, *Toxoplasma gondii*.

Danksagung

Wir danken Frau E. Jandrisics und Frau H. Antowitzner für die verlässliche technische Assistenz.

Literatur

1. REISINGER, E. C., KERN, P., DIETRICH et al. (1990):
Inhibition of HIV progression by dithiocarb.
Lancet 335, 679-682.
2. LANG, J. M., TOURAINE, J. L., TREPO, C. et al. (1988):
Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of dithiocarb sodium ("Imuthiol") in human immunodeficiency virus infection.
Lancet 8613, 702-706.
3. HERSH, E. M., ABRAMS, D., BARTLETT, J. et al.:
Study of diethyldithiocarbamate in patients with AIDS and AIDS-related complex.
J. A. M. A. zur Publikation eingereicht.

4. POMPIDOU A., ZAGURY, D., GALLO R. C. et al. (1985):
In vitro-inhibition of LAV/HTLV III infected lymphocytes by ditiocarb and inosine pranobex.
Lancet ii, 1066.
5. RENOUX, G., RENOUX, M. (1977):
Thymus-like activities of sulphur derivatives on T-cell differentiation.
J. Exp. Med. 145, 466-71.
6. LEHR, H. A., ZIMMER, P., REISINGER, E. C. et al. (1989):
Decreased plasma membrane fluidity of peripheral blood lymphocytes after diethylthiocarbamate (DTC) therapy in HIV-infected patients.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 37, 521-523.
7. TAYLOR, E. H., WALKER, E. M. jun., BARTELT, M. et al. (1987):
In vitro antimicrobial activity of diethylthiocarbamate and dimethylthiocarbamate against methicillin-resistant *Staphylococcus*.
Ann. Clin. Lab. Sci. 17/3, 171-177.
8. WALKER, E. M., CANNON, D. J., REIFSTECK, M. E. et al. (1987):
Effects of diethylthiocarbamate and structural analogs in mice with systemic candidal infections.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 56/2, 253-263.
9. ALLERBERGER, R., REISINGER, E. C., SÖLDNER, B., DIETRICH, M. P. (1989):
Antifungal activity of diethylthiocarbamate.
Mycoses 32 (10), 527-530.
10. CHAMPAULT, G., BIRON, G., BOUTELIER, P., DEFAYOLLE, P. (1983):
L'immunostimulation en chirurgie viscerale. Essai therapeutique controle par Diethyl-dithio-carbamate de sodium.
Med. Chir. Dig. 12/7, 537-543.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS):
Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Villanova, Pennsylvania.
Order code M7-T; Vol. 3, No. 2.
12. QUAZI, R., CHANG, A. Y. C., BORCH, R. F. et al. (1988):
Phase 1 clinical and pharmacokinetic study of diethylthiocarbamate as a chemoprotector from toxic effects of cisplatin.
J. Natl. Cancer Inst. 80, 1486-1488.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. Emil C. Reisinger
Klinische Mikrobiologie
Medizinische Universitätsklinik Graz

Auenbrugger Platz 15
A-8036 Graz · Austria

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1990

Band/Volume: [12](#)

Autor(en)/Author(s): Reisinger E. C., Allerberger Franz, Tiran A., Dierich M. P.

Artikel/Article: [Antimikrobieller Effekt des HIV-Therapeutikums Diethyldithiocarbamat \(Imuthiol®\). 285-290](#)