

BIOTIN ANTAGONISTA PERHIDROTHIAZIN TÍPUSU
VEGYÜLETEK HATÁSMÓDJÁNAK VIZSGÁLATA

D O K T O R I É R T E K E Z É S

SÁGINÉ, KISS ILDIKÓ
okleveles vegyész

Készült a Gyógyszerkutató Intézet Kemoterápiai Osztályán
1973-76. évben

Budapest, 1980.

A perhidrotiazin típusu vegyületek hatásmódjával kapcsolatos vizsgálatokat a Gyógyszerkutató Intézet Kemoterápiái Osztályán végeztem. Köszönöm az Intézet Igazgatóságának, hogy az anyagok és eszközök rendelkezésemre bocsátásával megteremtették munkám alapvető lehetőségét.

Köszönetet mondok Dr. Koczka István tudományos osztályvezetőnek, aki a munkát kezdeményezte, és birálatával, tanácsaival mindvégig segített.

Köszönettel tartozom Dr. Bánfi Dezső tudományos osztályvezetőnek a szénjelzett izotóp vegyület elkészítéséért, és Dr. Elekes István tudományos csoportvezetőnek a radioaktivitás mérésekért.

Köszönöm Dr. Körösy Jenő tudományos osztályvezetőnek és Dr. Ambrus Gábor tud. osztályvezetőnek a szintetikus munkákban nyújtott segítséget.

Végül köszönetet mondok Andó Lászlónénak a lelkiismeretes technikai segítségért.

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	6
2.	Irodalmi előzmények összefoglalása	8
2.1.	A biotin bioszintézise	8
2.2.	A biotin biokémiai szerepe	9
2.2.1.	Holoenzim /biotin-enzim/ képződése	11
2.2.2.	Karboxilációs, illetve transzkarboxilációs folyamatok mechanizmusa	14
2.2.3.	Biotin-enzimek szerepe a zsírsavak bio- szintézisében	15
2.3.	Biotin antagonista vegyületek	16
2.3.1.	Biotin antagonista vegyületek csoportosi- tása szerkezetük szerint	17
2.3.2.	Biotin antagonista vegyületek csoportosi- tása hatásmódjuk szerint	22
3.	Kísérleti anyagok és módszerek	23
3.1.	Táptalajok készítése	23
3.1.1.	Kirchner táptalaj	23
3.1.2.	Biotin-mentes komplett táptalaj	24
3.1.3.	Cukor-élesztő táptalaj	25
3.1.4.	Szilárd táptalajok	25
3.2.	A kísérletekben felhasznált egyéb anyagok	25
3.3.	Mikroorganizmusok	26
3.3.1.	Törzsek fenntartása	27

3.3.2.	Inokulum készítés	27
3.3.3.	Mikroorganizmusok szaporodásának mérése .	29
3.4.	Kísérleti módszerek és eszközök	29
3.4.1.	Sorozathigitás	29
3.4.2.	Deztiobiotin → biotin átalakulás vizsgálata Saccharomyces cerevisiae törzsszel ..	30
3.4.3.	Biotin meghatározása	31
3.4.3.1.	Baktériumok összes biotin tartalmának mérése	31
3.4.3.2.	Baktériumok szabad biotin tartalmának mérése	32
3.4.4.	Mycobacterium phlei zsírsav szintézisének vizsgálata	32
3.4.4.1.	Zsírsav szintézis jelzése	32
3.4.4.2.	Zsírsavak preparálása	32
3.4.4.3.	Zsírsavak észterezése	33
3.4.4.4.	Zsírsav-észterek szétválasztása vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel	33
3.4.4.5.	Radioaktivitás mérése	34
4.	Kísérleti eredmények és értékelésük	34
4.1.	Perhidrotiazin származékok hatása Mycobacterium tuberculosis H ₃₇ ^R _V törzsre	34
4.2.	NYT 105 hatása Mycobacterium phlei törzsre	36
4.3.	NYT 105 Mycobacterium phleire kifejtett hatásának antagonizálása biotinnal	37

4.4.	NYT 105 hatásának antagonizálása deztiobiotinnal <i>Mycobacterium phlei</i> esetén	39
4.5.	NYT 105 hatásának antagonizálása deztiobiotinnal <i>Saccharomyces cerevisiae</i> törzsön	41
4.6.	NYT 105 hatása <i>Lactobacillus plantarum</i> biotin-hasznosítására	45
4.7.	NYT 105 hatása <i>Mycobacterium phlei</i> biotin tartalmára	54
4.8.	NYT 105 hatása <i>Mycobacterium phlei</i> zsírsav szintézisére	59
5.	Összefoglalás	68
6.	Irodalom	73

1. Bevezetés

A biotin felfedezése¹, kémiai szerkezetének bizonyítása², szintézisének megvalósítása³ az intermedierek biológiai vizsgálatát is lehetővé tette. Hamarosan felismerték, hogy egyes biotin származékok és analógok mikrobiológiai tesztrendszerben nemcsak biotin-szerű hatásuk mértékében különböznek, hanem a biotin eredeti hatását befolyásolhatják /csökkenthetik/⁴. Mivel a biotint általában mikroorganizmusok növekedési faktoraként határozták meg, a biotin analógok a baktériumok szaporodása szempontjából potenciális antagonisták, amelyeket patogén mikroorganizmusok esetén hasznosítani is lehetne.

Az elgondolás gyakorlati megvalósítása akkor kapott újabb lendületet, amikor fermentléből izoláltak egy Mycobacidine-nek nevezett vegyületet, amely *Mycobacterium tuberculosis* emberpatogén törzsek szaporodását is igen alacsony koncentrációban gátolta in vitro⁵. A vegyület szerkezetét a biotinhoz hasonlónak találták⁶, biológiai kísérletekben pedig a biotin hatását in vitro antagonizálta⁷.

A Mycobacidine-ről megállapították, hogy emberi terápiás alkalmazhatóságának számos körülmény gátat

szab. A melegvérűek nem szintetizálnak biotint, a mikobaktériumok igen. A biotin antagonista vegyületek antimikobakteriális hatása magyarázható a biotin bioszintézisének gátlásával, ezt a gátlást azonban a biotin jelenléte megszünteti. A melegvérűek felvett biotinja miatt a *Mycobacidine* in vivo kísérletekben hatástalannak bizonyult⁸.

Hazánkban rendszeres szerves kémiai kutatás indult meg újabb kémiai szerkezetű biotin antagonista vegyületek szintézisére azzal az elgondolással, hogy azok esetleg terápiásan is alkalmazhatók lesznek. Ezért vált szükségessé az előállított vegyületek biológiai vizsgálata.

Az előállított vegyületek in vitro és in vivo mikobaktérium-ellenes hatásának meghatározása folyamán megállapítást nyert, hogy a 26 új vegyület közül több in vitro igen aktív mikobaktériumok szaporodásának gátlásában, in vivo azonban ezek a vegyületek is hatástalanok voltak⁹.

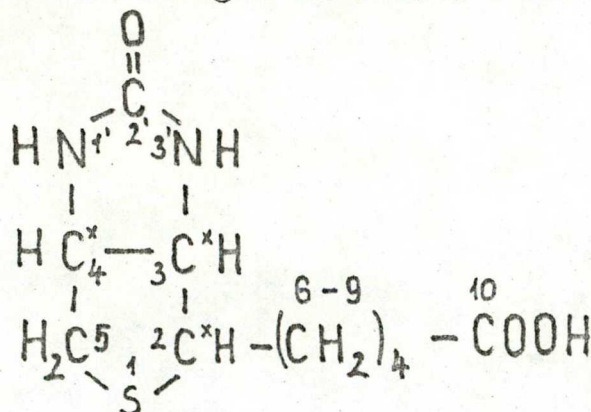
Doktori értekezésemben a fent említett vegyületek közül az in vitro egyik leghatékonyabb vegyület hatásmódját tanulmányoztam. Arra a kérdésre kerestem választ, hogy a Nyitrai és mtsai⁹ által előállított új /3,4,5,6-tetrahidro-4-oxo-2H-1,3-tiazin-2-il/alkánsavak leghatásosabb tagja eltér-e biológiai

hatásában a mások által korábban vizsgált Mycobacidine-től^{7,8,10}, illetve az irodalomból ismert más biotin antagonistá vegyülettől.

2. Irodalmi előzmények összefoglalása

2.1. A biotin bioszintézise

A biotint v. H-vitamint /I/ Kögl¹ izolálta 1936-ban tojássárgájából. Melville és mtsai² 1942-ben állapították meg helyes szerkezeti képletét, melyet Folkers és mtsai³ szintézissel igazoltak 1945-ben.



I. Biotin

Hexahidro-2-oxo-[3aS-/3a α ,4 β ,6a α /]-1H-tieno-
[3,4-d]imidazol-4-pentánsav

A biotint az állati szervezetek és a mikroorganizmusok egy része nem képesek szintetizálni. Ezeknek külső forrásból kell vitaminszükségletüket fe-

dezni. Más mikroorganizmusok azonban képesek a bioszintézisre¹¹, amelynek jelenleg három utja ismert.

A biotin bioszintézise Lezius¹² szerint *Achromobacter* IV S-ben az 1. ábrán látható módon játszódik le. A biotin molekula 1,4,5,1' része ciszteiből, a 2,3,6-10 rész pimelinsavból és a 2'3' rész karbamoilfoszfátból alakul ki.

A másik reakcióutat Pai¹³ *E. coliban* írta le /2. ábra/. Eszerint pimelinsavból és alaninból 7-oxo-8-aminopelargonsavon és 7,8-diaminopelargonsavon keresztül deztibiotin /II/ keletkezik természetes intermedierként a biotin bioszintézisében. Az eredményt *Bacillus megaterriummal*¹⁴, *Brevibacteriummal*, *Bacillus sphaericussal* és *Mycobacterium smegmatissal*¹⁵ végzett kísérletek is alátámasztották.

Harmadik reakcióutat is leírtak már *Agrobacterium* esetén¹⁶, ahol a pimelinsav helyett glutársav a prekursor, a törzs a pimelinsavat nem is tudta hasznosítani. A deztibiotin abban az esetben is természetes intermedier volt.

2.2. A biotin biokémiai szerepe

A biotin az élő szervezetekben lejátszódó karboxilálási ill. transzkarboxilálási folyamatokban

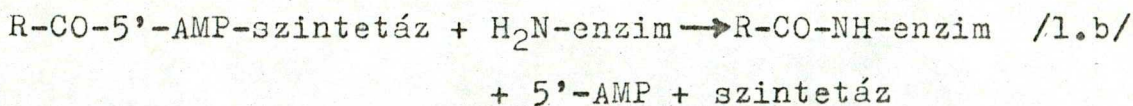
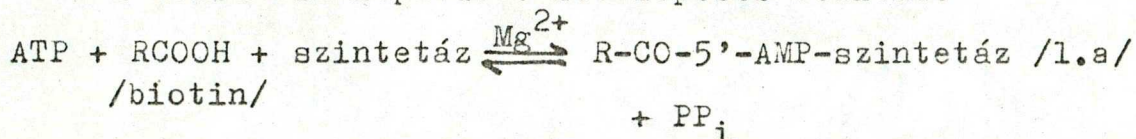


vesz részt oly módon, hogy az e folyamatokat katalizáló enzimek prosztetikus csoportját képezi¹⁷.

2.2.1. Holoenzim /biotin-enzim/ képződése

A karboxiláz ill. transzkarboxiláz enzimek ugy keletkeznek, hogy a biotin karboxil csoportja és az apoenzim egy lizinjének ϵ -amino csoportja között kovalens kötés létesül. A kötés igen stabil, enzimati- kusan nem hidrolizálható, csak tömény kénsav vagy sósav hasítja. Ezt a kötésmódot az összes eddig vizs- gált biotin-enzimre bizonyították¹⁷.

A holoenzim képződése két lépéses reakció:



A biotin-deficiens sejtek is tartalmazzák mind az apoenzimet, mind a szintetázt, amely katalizálja a D/+/-biotin ATP-függő kötődését az apoenzimhez. A reakció terméke az enzimati- kusan aktiv holoenzim.

Ha a reakciót tisztított enzimekkel, sejtmentes közegben végzik, bármely komponens kihagyása a holo- enzim képződés megszűnését vonja maga után. A reak- ció a D/+/-biotinra specifikus, de racém oxibiotin- nal is végbemehet a holoenzim képződés /az oxibiotin

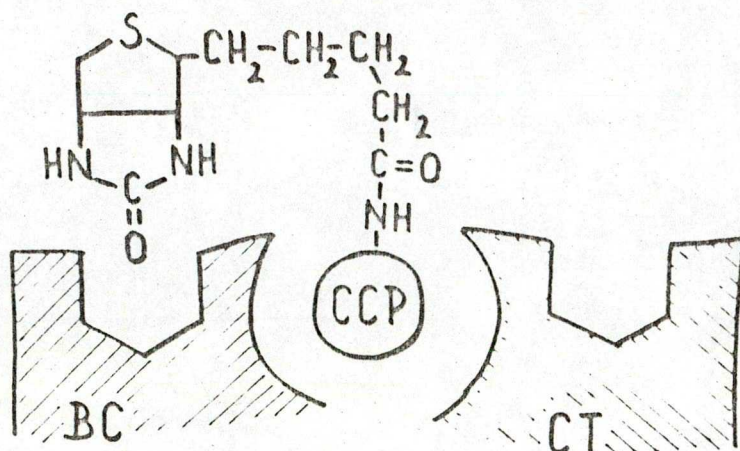
biológiai rendszerekben is képes a biotint helyettesíteni/. A biotinil-adenilát helyettesítheti a biotin + ATP + Mg^{2+} -ot, de a szintetáz elengedhetetlen a reakcióhoz.

A holoenzim térszerkezetének megállapítására is kiterjedt vizsgálatok folynak. Abból a kísérleti adatból, hogy a β -metilkrotonil-CoA karboxiláz képes a viszonylag nagy töménységben jelenlévő szabad biotint karboxibiotinná alakítani, Lynen¹⁷ arra következtetett, hogy a biotin nemcsak karboxil csoportjával kötődik kovalensen az apoenzimhez, hanem másodlagos kötés is kialakul a biotin ureido-gyűrűje és az enzim között. Ebből a kötésből szorítja ki a szabad biotin a prosztetikus csoportot, mikor karboxilálódik.

Lane és mtsai¹⁸ egy másik biotin-enzimet, az acetil-CoA karboxilázt vizsgálták igen részletesen. Megállapították, hogy ez enzimkomplex, amely három alegységből áll /3. ábra/: karboxil-hordozó protein /CCP/, biotin karboxiláz /BC/ és karboxil transzferáz /CT/ alegység. A biotin a CCP-alegység egy lizinjének ϵ -amino csoportjához kapcsolódik kovalens kötéssel, és a másik két alegység között szabadon oscillálva felveszi ill. leadja az "aktiv CO_2 "-ot. A biotin karboxiláz ill. karboxil transzferáz alegység-

3. ábra

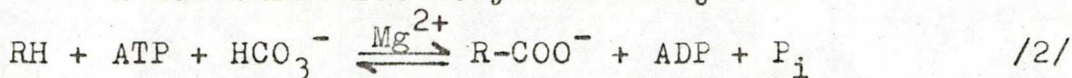
Acetil-CoA karboxiláz enzim szerkezete Lane¹⁸ szerint



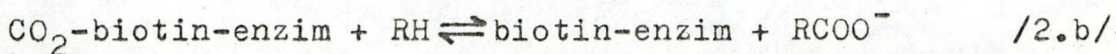
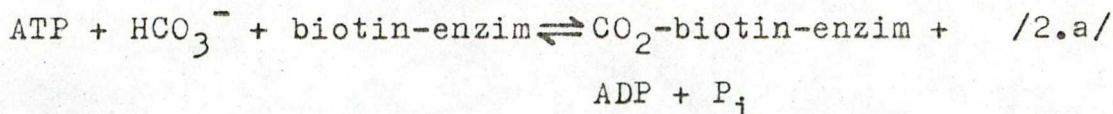
gen levő kötőhely nemcsak a prosztetikus csoportot képes befogadni, hanem szabad biotint is meg tud nem-kovalensen kötni. /Tehát elvileg azonos a Lynen által feltételezett "másodlagos kötőhely"-lyel./ Kimutatták azt is, hogy a biotin karboxiláz a szabad karboxil oldalláncot tartalmazó biotint köti inkább, míg a karboxil transzferáz a biotin-metilészterre, biotinil-acetátra, biotinolra, biocitinre 50-100-szor érzékenyebb modellreakciókban^{19,20}.

2.2.2. Karboxilációs, illetve transzkarboxilációs folyamatok mechanizmusa

A karboxilációs folyamat sémája¹⁷:

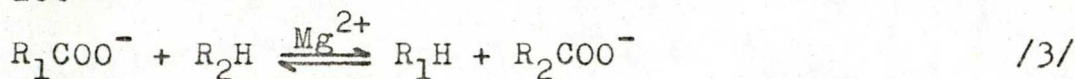


Ez a bruttó egyenlet két lépésre osztható:

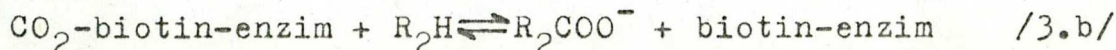
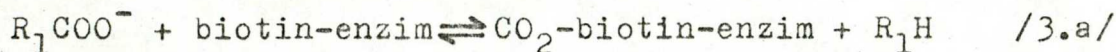


A transzkarboxilálás is hasonló módon játszódik

le:



Ez is két lépéses reakció:



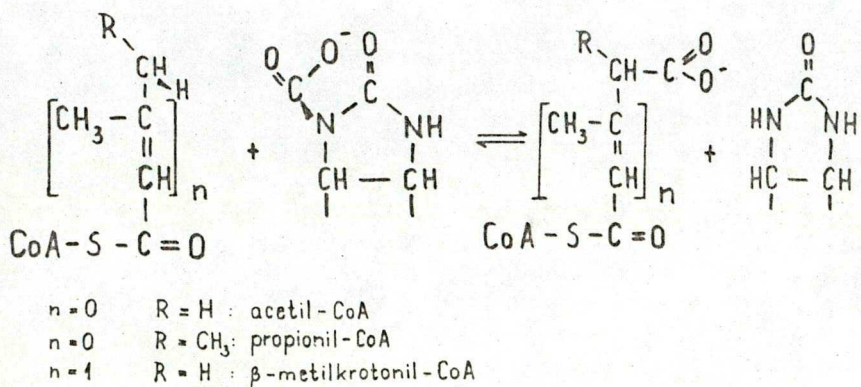
Kimutatták, hogy az "aktiv CO_2 " keletkezésekor a CO_2 a biotin 1'-N-jéhez kötődik, a 3'-N-t a biotin oldalláncának első szénatomja a tiszta cisz szerkezet miatt gátolja a CO_2 megkötésében.

A CO_2 -biotin-enzimben a COO^- reaktivitása az ureido-gyűrű elektronvonzásából származik, amely növeli a karboxil csoport elektrofil karakterét, és így affinitását a nukleofil akceptorokhoz. Az akceptorok metil vagy metilén csoportok, melyek a szomszédos karbonil csoportok révén képesek karbanion képzésre. Az elektrofil transzkarboxiláció a 4. áb-

rán látható egyenlettel írható le. A reakció megfordítható, és a citrát indukálja az enzímfunkció megváltozását²¹.

4. ábra

Elektrofil transzkarboxiláció mechanizmusa¹⁷



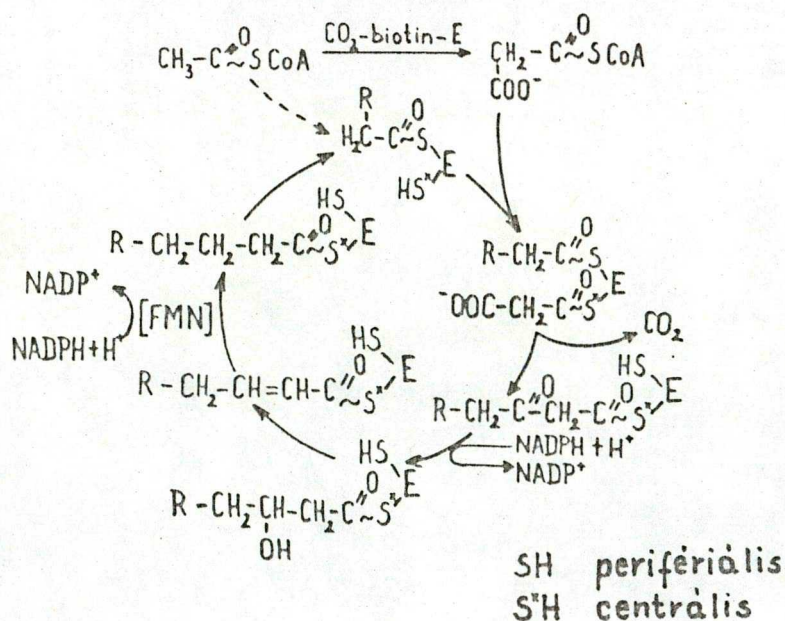
2.2.3. Biotin-enzimek szerepe a zsírsavak bioszintézisében

Az első megfigyelés, amely szerint a biotin kapcsolatban van a mikroorganizmusok zsírsav szintézisével az volt, hogy néhány telítetlen zsírsav csökkentette a *Lactobacillus*ok biotin igényét²². A zsírsav szintézist tanulmányozva kimutatták, hogy a biotin-enzimek közvetlenül résztvesznek a bioszintézisben^{23,24}.

A zsírsav bioszintézis Lynen-féle sémája²⁵ az 5. ábrán látható. A ciklus egyik kiindulási anyaga, a malonil-CoA acetil-CoA-ból keletkezik egy biotin-enzim, az acetil-CoA karboxiláz hatására. Ha a biotin-enzimet gátoljuk pl. avidinnal²⁵ /ez a protein sztöchiometrikus arányban komplexet képez a biotinnal, ezáltal a biotin enzimeket teljesen blokkolja/, a zsírsav szintézis leáll.

5. ábra

Zsírsavak bioszintézise Lynen²⁵ szerint



2.3. Biotin antagonista vegyületek

A kemoterápiás szerek kutatása során számos olyan

vegyületet találtak /természetes és szintetikus eredetűt egyaránt/, amely mikroorganizmusok szaporodását gátolta, de a gátló hatás biotin jelenlétében megszűnt. Ezeket a vegyületeket összefoglaló néven biotin antagonistáknak nevezzük.

2.3.1. Biotin antagonista vegyületek csoportosítása szerkezetük szerint

A. A biotin heterogyűrűje változatlan, a szubsztitúensek változnak:

biotin szulfon /III/²⁶

norbiotin /IV/ és szulfonja^{27,28,29,30}

homobiotin /V/, biszhomobiotin, triszhomobiotin és szulfonjaik^{27,28,29,30}

α -metilbiotin /VI/^{31,32}

α -dehidrobiotin /VII/³³

hexahidro-2-oxo-4-hidroxibutil-1-furo[3,4]imidazol /VIII/²⁹

B. A biotin heterogyűrűjében kén helyett oxigén van, és az oldallánc is változik:

oxibiotin szulfonsav /IX/^{34,35}

noroxibiotin³⁴

homooxibiotin, biszhomo- triszhomooxibiotin és szulfonsavjaik^{34,35}

C. Izo- és heterociklusos, karbonsav oldallácot tartalmazó vegyületek:

imidazol-2-on-4-karbonsavhidrazidok /X/³⁶

imidazolid-2-on-4-valeriánsavhidrazid /XI/³⁷

imidazolid-2-on-4-kaprónsav^{29,38,39} és hidrazidja^{40,41,37}

tiazolidin-4-karbonsav /XII/³⁶ és hidrazidja

tiazolid-4-on-2-kaprónsav /Mycobacidine, Acidomycin, Actithiazic acid/ /XIII/^{8,10,42,43,44}

11-/2-ciklopenten-1-il/undekánsav /hidnokarposz-sav/ /XIV/⁴⁵

piperid-2-on-6-karbonsav /XV/ és hidrazidja³⁶

indolil-karbonsav /XVI/ és hidrazidja³⁶

indolecetsav /auxin/ /XVII/⁴⁶

γ-/3,4-ureilénciklohexil/vajsav /XVIII/³⁵

2-amino-4-p-nitrofenil-vajsav /Amiclenomycin/ /XIX/¹⁵

tiofen-2-il-valeriánsav /XX/⁴⁷

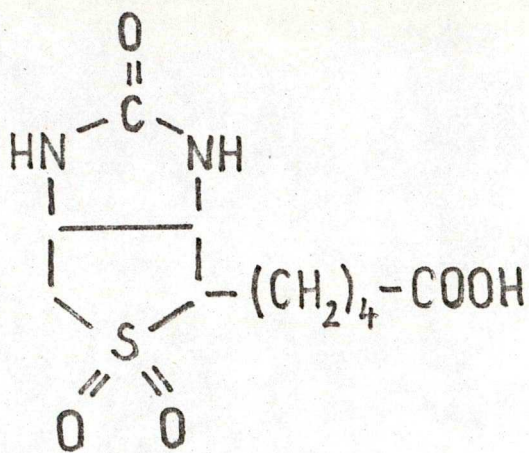
D. Nyílt szénláncu vegyületek

hidrazidok /XXI/⁴⁸

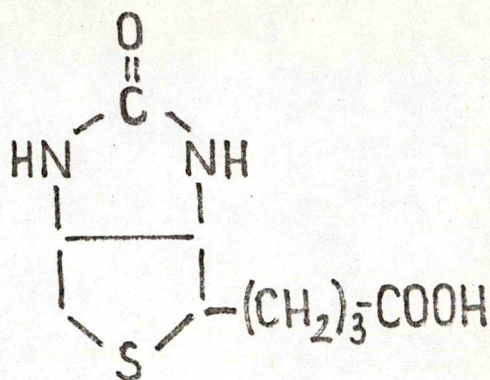
tioszemikarbazonok /XXII/⁴⁸

dikarbonsavhidrazidok /XXIII/⁴⁹

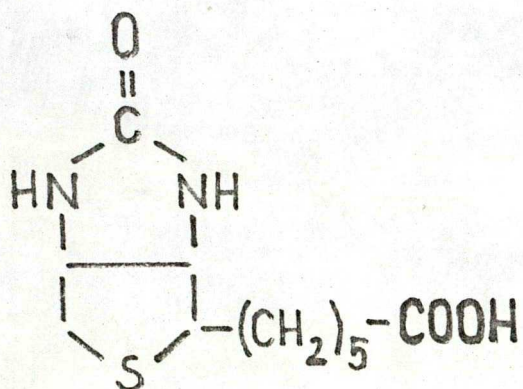
olajsav⁵⁰



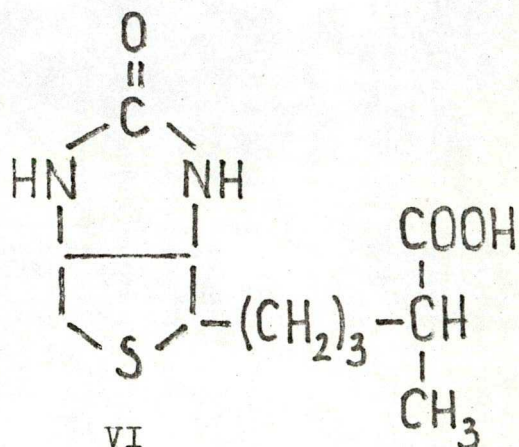
III



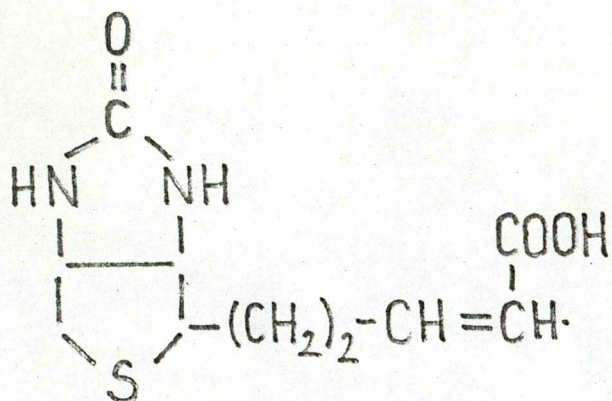
IV



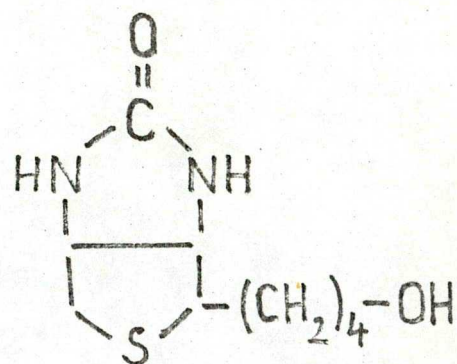
V



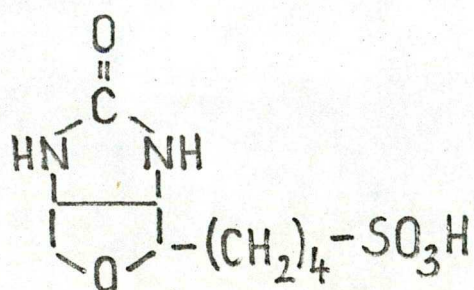
VI



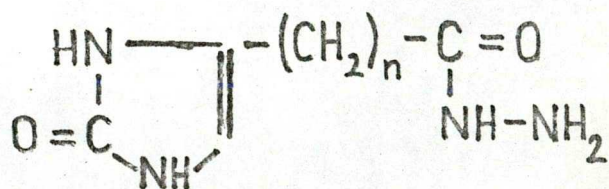
VII



VIII

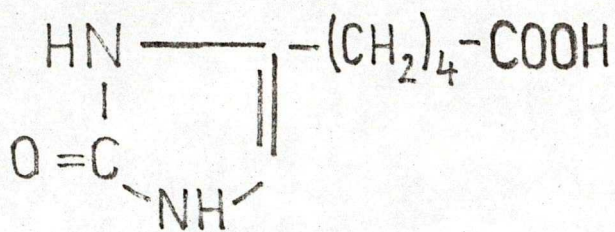


IX

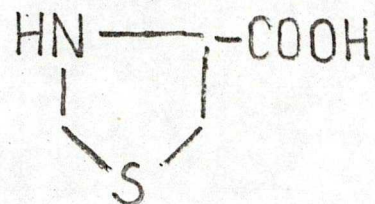


$n = 0, 4, 5$

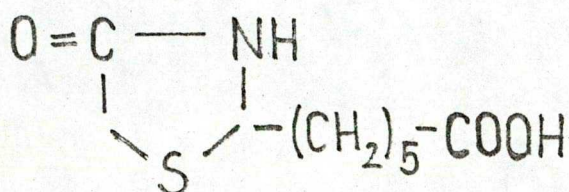
X



XI

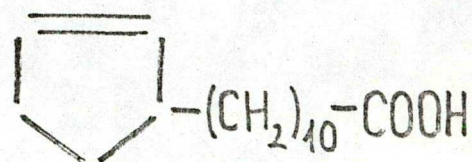


XII



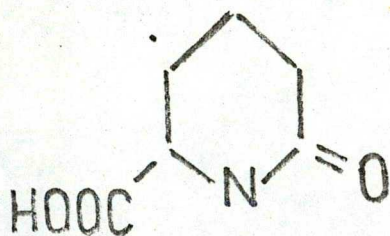
XIII

Mycobacidine stb.

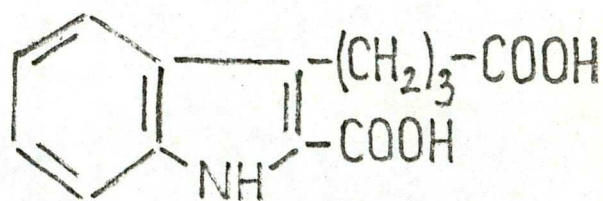


XIV

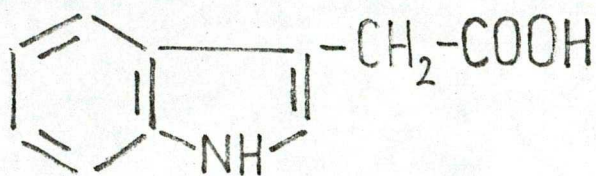
Hidnokarpuszsav



XV

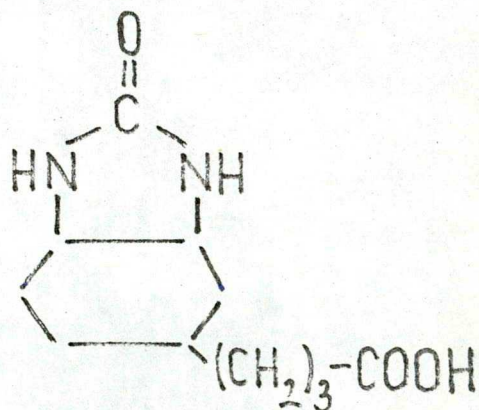


XVI

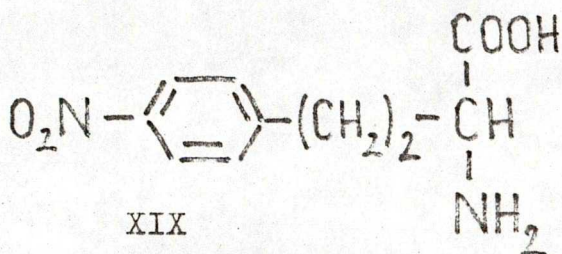


XVII

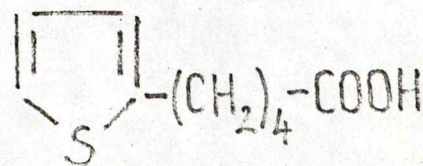
Auxin



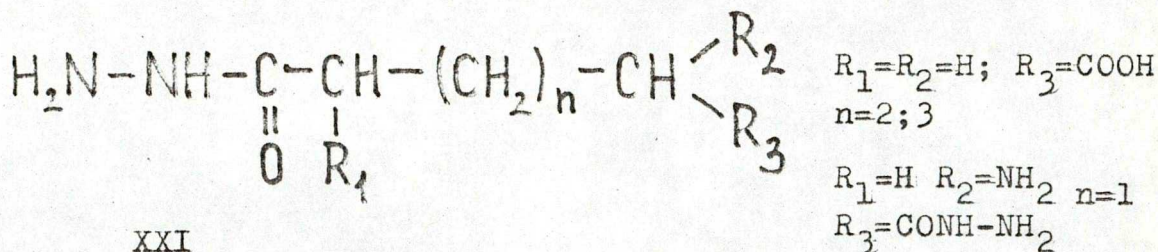
XVIII



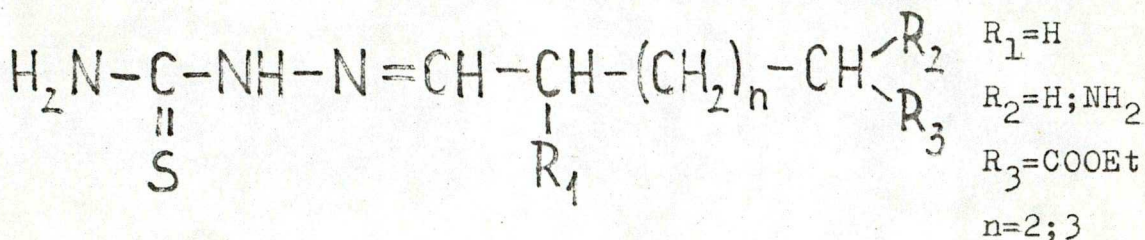
XIX
Amiclenomycin



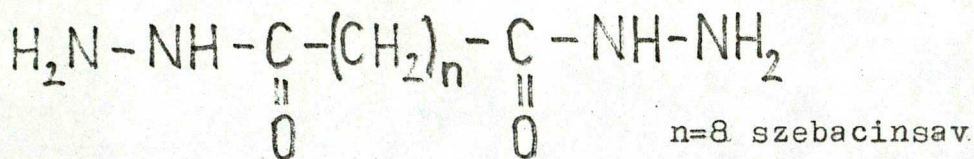
XX



XXI



XXII



$n=8$ szebacinsav

$n=6$ parafasav

XXIII

E. Néhány antibiotikum és kemoterápeutikum antibakteriális hatása szintén csökken biotin jelenlétében.

Ide sorolhatók:

Aureomycin^{51,52,53}

Streptomycin⁵³

Terramycin^{51,52}

Paraaminoszalicilsav⁵⁴

Chloromycetin^{51,52}

Izonikotinsavhidrazid⁴⁴

2.3.2. Biotin antagonista vegyületek csoportosítása hatásmódjuk szerint

A biotin antagonista vegyületek attól függően, hogy melyik metabolikus folyamatra hatnak, három csoportba sorolhatók:

- a. biotin bioszintézist gátló
- b. holoenzim kialakulását gátló
- c. holoenzim funkciót gátló vegyületek.

A biotin bioszintézist gátló vegyületek közös jellemzője, hogy igen kis mennyiségű biotin /az inhibitor koncentrációnak 10^{-3} - 10^{-4} -szerese/ elegendő az általuk okozott baktérium-szaporodás gátlás megszüntetéséhez, továbbá a biotinra nézve nem-kompetitív jellegű az inhibíció. Az Amiclenomycin¹⁵ és a tiofen-2-il-valeriánsav⁴⁷ a 7-oxo-8-aminopelargonsav $\rightarrow$ 7,8-diaminopelargonsav átalakulást gátolja. A Mycobacidine^{15,42,44} és az imidazolid-2-on-4-kapronsav^{29,39,41} a destiobiotin $\rightarrow$ biotin átalakulást gátolja.

A biotin enzimatikusan aktív formává alakulását /holoenzim képződést/ gátló vegyületek a biotinra nézve kompetitív antagonisták. Ilyen módon hatnak a homobiotin²⁹, a γ -/3,4-ureilénciklohexil/vajsav³⁵, a homooxibiotin³⁵, az oxibiotinszulfonsav³⁵ és a biotinszulfon²⁶.

A holoenzim működésének gátlására példa lehet



a hidnokarpuszsav⁴⁵, bár a szerzők nem tisztázták ezt a kérdést, és feltételezik, hogy a biotin bioszintézisének gátlása is szóba jöhet. Mindenesetre tiszta hatás bizonyítása /karboxiláz ill. transzkarboxiláz enzim gátlása/ csak sejtmentes rendszerben, izolált enzimmel történhet, míg az összes eddig vizsgált biotin antagonistá vegyületnél in vitro rendszerekben mikroorganizmus szaporodás gátlást mértek.

3. Kisérleti anyagok és módszerek

3.1. Táptalajok készítése

3.1.1. Kirchner táptalaj

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ /Reanal/	6,00 g
K_2HPO_4 "	4,00 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,60 g
Trinátriumcitrát /Merck/	2,50 g
L-Aszparagin /Reanal/	5,00 g
Ferriammóniumcitrát "	<u>0,05 g</u>

ad 1000 ml deszt. viz

Az oldat pH-ját 6,5-re állítjuk, 126 C°-on autoklávban sterilizzük, majd 900 ml oldathoz 100 ml sterilre szűrt /G 5 baktériumszűrő/ 5 %-os glukóz /Difco/ oldatot mérünk, steril körülmények között.

3.1.2. Biotin-mentes komplett táptalaj⁵⁷ /kétszeres
töménységű/

Vitamin-mentes kazein-hidrolizátum /Difco/	1,00 g
Glukóz /Difco/	4,00 g
Nátriumacetát /Reanal/	1,20 g
DL-Triptofán /Reanal/	40 mg
L-Cisztin "	20 mg
Adeninszulfát "	1 mg
Guanin.HCl "	1 mg
Xantin "	1 mg
Uracil "	1 mg
KH_2PO_4 "	100 mg
K_2HPO_4 "	100 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ "	40 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ "	2 mg
NaCl "	2 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ "	2 mg
Piridoxin.HCl /B ₆ -vitamin/ /Fluka/	400 µg
Riboflavin /B ₂ -vitamin/ "	200 µg
Kalciumpantotenát "	200 µg
Nikotinsav "	200 µg
Tiamin.HCl /B ₁ -vitamin/ "	400 µg
p-Aminobenzoésav /Reanal/	<u>100 µg</u>

ad 100 ml deszt. viz

Az oldat pH-ját 6,6-6,8-ra állítjuk, 121 C°-on 15
percig autoklávban sterilizzük.

3.1.3. Cukor-élesztő táptalaj

Glukóz /Difco/ 10,00 g

Élesztő-kivonat /Difco/ 10,00 g

ad 1000 ml deszt. viz

Az oldat pH-ját 6,6-6,8-ra állítjuk, autoklávban

121 C°-on 15 percig sterilizzük.

3.1.4. Szilárd táptalajok /törzsek fenntartásához/

A szilárd táptalajok a megfelelő folyékony táptalajokból készültek 1,5 % szálaspénz agar /g/v/ hozzáadásával a sterilizálás előtt.

3.2. A kísérletekben felhasznált egyéb anyagok

A vizsgált modellvegyületek /jelük NYT/ a Budapesti Műszaki Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén készültek⁹.

A deztiobiotint biotin /Calbiochem/ katalitikus redukciójával állítottuk elő⁵⁵. A termék jellemzői: O.p. 158-9 C°, biotin-tartalom mikrobiológiai módszerrel mérve⁵⁷ 0,01 %, kitermelés 10,6 %.

A diazometánt N-nitrozometil-p-toluolszulfonsavamid prekursorból fejlesztettük⁵⁶, a felhasználás napján. Az éteres oldat diazometán-tartalma 1,14 g/100 ml volt.

A 2-[¹⁴C]-nátriumacetát 3,7 GBq/g /100 mCi/g/ specifikus aktivitású készítmény volt /Gyógyszerkutató Intézet, Dr. Bánfi Dezső/.

A palmitinsav-metilésztert és a sztearinsav-metilésztert a Gyógyszerkutató Intézet Gázkromatográfiás Csoportjától kaptam.

A mikolsavakat *Mycobacterium phlei*-ből preparáltuk az alábbiak szerint:

10 g centrifuga-nedves *M. phlei*-t /15 % száraz súly/ 3x200 ml etanol-éter = 3:1 /v/v/ eleggyel extraháltunk⁵⁸. A maradékot 100 ml 5 % KOH/50 % metanol oldattal 85 C°-on 4 órán át refluxáltuk⁵⁹, 15 ml 6 n HCl-val savanyítottuk, majd 3x100 ml éterrel extraháltuk. Az egyesített éteres fázist 2x100 ml deszt. vízzel savmentesre mostuk, Na₂SO₄ felett szárítottuk, majd szárazra pároltuk. A maradékot 20 ml metanollal 30 percig refluxáltuk⁶⁰, a metanolos oldatot leöntve a maradékot még egyszer refluxáltuk 20 ml metanollal. A metanolos oldatot elöntve a lombikban a metanolban oldhatatlan mikolsavak maradtak. A hozam 1,5 g száraz baktériumból 30 mg mikolsav volt. Észterezését diazometánnal végeztük.

3.3. Mikroorganizmusok

A kísérletekben használt mikroorganizmusok a

Gyógyszerkutató Intézet törzsgyűjteményéből származtak.

3.3.1. Törzsek fenntartása

Mycobacterium phlei /*M. phlei*/

szilárd, ferdített Kirchner táptalajon

tenyésztés 37 C°-on

tárolás hűtőben, havonta átoltva

Lactobacillus plantarum ATCC 8014 /*L. plantarum*/

szilárd, ferdített cukor-élesztő táptalajon

tenyésztés 30 C°-on

tárolás hűtőben, havonta átoltva

Saccharomyces cerevisiae /*Sacch. cerevisiae*/

szilárd, ferdített cukor-élesztő táptalajon

tenyésztés 30 C°-on

tárolás hűtőben, havonta átoltva

3.3.2. Inokulum készítés

Mycobacterium phlei

Szilárd táptalajról 1 kacsnyi baktériumot 5 ml folyé-

kony Kirchner táptalajra oltunk, 3 napig 37 C°-on in-

kubáljuk. A tenyészetből 1 %-nyit friss táptalajba

oltunk, majd 37 C°-on 3 napig rázatva tenyésztjük.

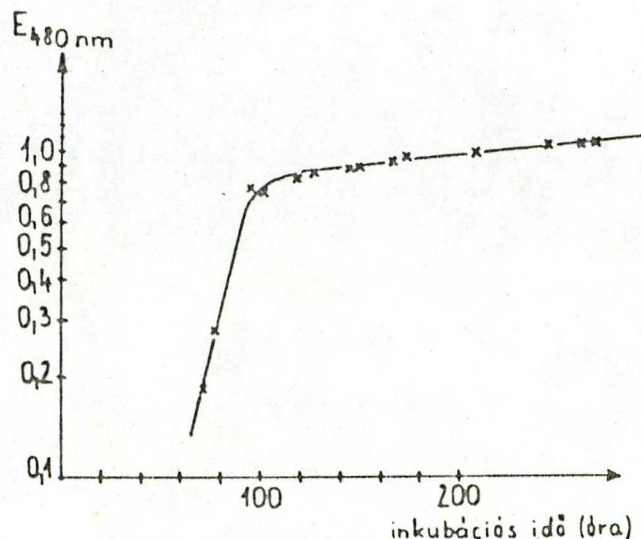
Az így nyert tenyészetet használjuk inokulumként a

különböző kísérletekben, 2-10 % mennyiségben A *M. phlei*

szaporodási görbéje a 6. ábrán látható.

6. ábra

Mycobacterium phlei szaporodási görbéje Kirchner táptalajon, 37 C°-on rázott tenyészetben



Lactobacillus plantarum

Szilárd táptalajról 1 kacsnyi baktériumot 6-8 ml folyékony cukor-élesztő táptalajra oltunk, 30 C°-on 24 órán át inkubáljuk. A tenyészetet centrifugáljuk /2000 fordulat/perc, 10 perc/, majd 2x10 ml 0,8 %-os steril NaCl oldattal táptalaj-mentesre mossuk. Az utolsó centrifugálás után a baktériumot 10 ml 0,8 %-os NaCl oldatban szuszpendáljuk, 100-szorosára hígítjuk fiziológiás sóoldattal, és ebből 1 % mennyiséget használunk inokulumként.

Saccharomyces cerevisiae

Szilárd táptalajról 1 kacsnyi élesztőt 6-8 ml folyékony cukor-élesztő táptalajra oltunk, 30 °C-on 4 órán át inkubáljuk. Centrifugáljuk /2000 fordulat/perc, 10 perc/, 2x10 ml 0,8 %-os NaCl oldattal mossuk, majd 10 ml fiziológiás sóoldatban szuszpendáljuk. 10 % inokulummal fertőzünk a kísérleteknél.

3.3.3. Mikroorganizmusok szaporodásának mérése

A szaporodási görbék felvétele a tenyészet fényelnyelésének mérésével történt, Spektromom 402 típusu spektrofotométerrel. Vakpróbaként steril táptalajt használtunk. A steril körülmények biztosítása miatt a méréseket nem küvettában, hanem közvetlenül a kémcsőben végeztük, ezért a mért értékeket a kiindulási extinkciós értékekkel korrigáltuk.

3.4. Kísérleti módszerek és eszközök

3.4.1. Sorozathigitás

Kétszeres higitási sorral dolgoztunk⁶¹. A minimális inhibitor koncentráció /MIC/ meghatározásakor közvetlenül a kémcsőben végeztük a higitást. Kombiációs kísérleteknél lombikban előhigitást készítettünk kétszeres töménységben, és a két lombikból 1:1 arányban mértünk be a megfelelő kémcsővekbe.

3.4.2. Deztiobiotin $\rightarrow$ biotin átalakulás vizsgálata

Saccharomyces cerevisiae törzsszel

Egy 0,3 mm rétegvastagságú Kieselgel HF₂₅₄ /Reanal/ vékonyréteg-kromatográfiás lemezt 9 mezőre osztottunk. Minden mező közepére egy pontban felcseppentettük a deztiobiotin és a vizsgált NYT vegyület oldatát. A felvitt deztiobiotin mennyisége 0,25; 0,5; 1,0 μg volt /100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációju oldatból 2,5; 5; 10 μl -t cseppentettünk fel/, az inhibitor mennyisége változott. Száradás után a lemezt üveglapokkal bekereteztük, majd a vékonyrétegre 25 ml 10 % *Sacch. cerevisiae* inokulumot /3.3.2./ tartalmazó biotin-mentes komplett táptalajt rétegeztünk /3.1.2. szerint, 1,5 % agar-agarral kiegészítve/. A lemezt az agar-agar dermedése után steril üveglappal lefedtük, majd 30 °C-on 2 napig inkubáltuk. Az agar tetejére ezután 3 ml 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációju 2-/4-jódifenil/-3-/4-nitrofenil/-5-fenil-tetrazoliumklorid /Fluka/ oldatot rétegeztünk. Azokon a helyeken, ahová a deztiobiotin diffúzió útján eljutott és a *Sacch. cerevisiae* kinőtt /vagyis a deztiobiotin $\rightarrow$ biotin átalakulás lejátszódott/, a lemezen halványlila foltot észleltünk. Ahol a NYT vegyület gátolta az átalakulást, nem észleltünk növekedési gyűrűt.

3.4.3. Biotin meghatározása

A biotin tartalom mérését mikrobiológiai módszerrel végeztük⁵⁷, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 törzssel. A baktérium szaporodását, amely a jelenlévő biotin koncentrációjától függ, a tejsav termelés visszatitrálásával /0,1 n NaOH-dal/ mértük, brómtimolkék indikátor mellett.

3.4.3.1. Baktériumok összes biotin tartalmának mérése

Kb. 100 mg /analitikai mérlegen mért súlyu/ száraz baktériumot 5 ml 6 n H_2SO_4 oldattal 121 °C-on /1 at/ 1 órán át autoklávbán hidrolizáltunk. A hidrolízis befejezése után a hidrolizátumot 10 n NaOH-dal semlegesítettük, 100 ml-re töltöttük deszt. vízzel, majd redős papírszűrőn szűrtük. Ebből az oldatból 5 ml-t 100 ml-re hígítottunk deszt. vízzel, és az így nyert oldatból végeztük a meghatározást az alábbi módon:

Hidrolizátum	Deszt. viz	Táptalaj
/ml/	/ml/	/ml/
1	4	5
2	3	5
3	2	5
5	0	5

Minden hígításból 3 párhuzamost mértünk, így egy értéket 12 mérés átlagából számítottunk.

3.4.3.2. Baktériumok szabad biotin tartalmának mérése

Kb. 100 mg /analitikai mérlegen mért súlyu/ száraz baktériumot 5 ml foszfát pufferben /pH=7,0/ szuszpendáltunk /6,5 ml 0,25 M KH_2PO_4 + 3,5 ml 0,25 M K_2HPO_4 /. A feltárást 18 perces ultrahangos kezeléssel végeztük, MSE ultrahang készülékkel. A mintát közben só-jég keverékkel 0-4 C°-on tartottuk. A feltárt mintát 100 ml-es normállombikba mostuk, és 1, 2, 3, 5 ml aliquotokból végeztük a biotin tartalom meghatározását.

3.4.4. Mycobacterium phlei zsirsav szintézisének vizsgálata

3.4.4.1. Zsirsav szintézis jelzése

80 ml logaritmikus szaporodási fázis elején levő / $E_{480}=0,15$ / M. phlei tenyészetéhez /Kirchner táptalaj/ 2,5 μmol 2- ^{14}C -Na-acetátot /836,2 MBq/ adtunk, majd hozzámértük a vizsgált anyagot a megfelelő koncentrációban. A tenyésztést 37 C°-on rázatva további 30 percig folytattuk, majd a sejtek szaporodását 16 ml 12 %-os HClO_4 -val leállítottuk. A sejteket 0,45 μ pórusméretű Millipore szűrőn leszűrtük, és 10x10 ml deszt. vízzel mostuk.

3.4.4.2. Zsirsavak preparálása

A 3.4.4.1. szerint nyert sejteket 20 ml 5 %-os KOH/50 % metanol oldattal 4 órán át 85 C°-on refluxál-

va elszappanosítottuk, 4,8 ml 6 n HCl-val semlegesítettük, 3x20 ml dietiléterrel extraháltuk. Az egyesített éteres extraktumot 3x20 ml deszt. vízzel savmentesre mostuk, Az éteres fázist Na_2SO_4 felett 24 órán át szárítottuk, majd az extraktumot vakuumban szárazra pároltuk. A maradékot 1 ml éterben oldottuk.

3.4.4.3. Zsirsavak észterezése

Az 1 ml éterben oldott zsirsav-keverékhez 2 ml diazometán oldatot /3.2./ mértünk. Szobahőmérsékleten 1 órán át állni hagytuk, majd a diazometán felesleget ill. az étert N_2 -árammal elpárologtattuk. A visszamaradt mintát 1 ml éterben újraoldottuk, majd analitikai mérlegen mért súlyu kémcsőbe pipettáztuk. Ujra lefuvattuk nitrogéngázzal, exsikkátorban egy éjszakan át CaCl_2 felett szárítottuk, majd analitikai mérlegen mértük a minta súlyát.

3.4.4.4. Zsirsav-észterek szétválasztása vékonyrétegkromatográfiás módszerrel

Lemez: Kieselgel G /Reanal/ 0,5 mm

Futtató: petroléter-dietiléter = 8:2

Minta mennyisége: 500-1000 μg a zsirsav-észter elegyből

100 μg a kontrollként futtatott

palmitinsav-metilészterből

sztearinsav-metilészterből

mikolsav-metilészterből /3.2./

Előhívás: kémiailag, jódgőzzel

A radioaktivitás százalékos megoszlásának vizsgálatára a vékonyrétegre röntgen-filmet tarítottunk és 24 órás expozíció után a filmet előhívtuk. A feketedés helyét a kromatográfiás lemezen bejelöltük, a réteget a foltoknak megfelelően Packard-edénybe kaptuk és mértük a minta radioaktivitását.

3.4.4.5. Radioaktivitás mérése

A radioaktivitást Packard Tricarb 3380 folyadékszintillációs spektrofotométerrel mértük, toluolos szintillációs folyadék alkalmazásával.

4. Kisérleti eredmények és értékelésük

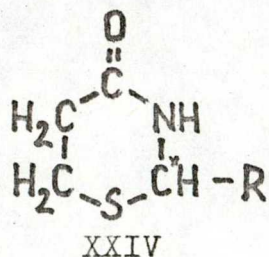
4.1. Perhidrotiazin származékok hatása *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_v törzsre

A Nyitrai és mtsai⁹ által előállított perhidrotiazin származékok /XXIV/ antituberkulotikus hatását in vitro sorozathigitásos módszerrel vizsgáltuk Dubos⁶² táptalajon. A *M. tuberculosis* H₃₇R_v törzs szaporodását legjobban gátló vegyületek szerkezeti képletét és a minimális inhibitor koncentráció /MIC/ értékeket az 1. táblázatban foglaltuk össze.

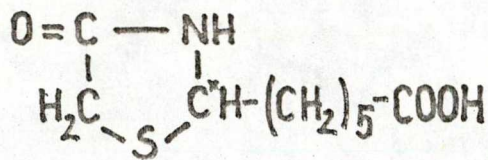
Az optimális hatáshoz C₅ oldallánchossz szükséges, karboxil vagy karboxil-származék /észter, sav-

1. táblázat

Perhidrotiazin származékok in vitro hatása *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_v törzsre Dubos táptalajon

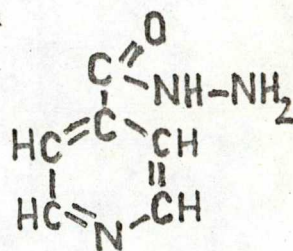


XXIV



XIII

Mycobacidine



XXV

INH

R	Mol- suly	Minimális inhibitor konc.	
		µg/ml	M
-/CH ₂ / ₅ COOH /NYT 105/	231	0,06	2,59.10 ⁻⁷
-/CH ₂ / ₅ COOEt /NYT 59/	259	0,015	5,79.10 ⁻⁸
-/CH ₂ / ₄ COOH	217	12,5	5,76.10 ⁻⁵
-/CH ₂ / ₄ COOEt	245	6,2	2,53.10 ⁻⁵
-/CH ₂ / ₂ COCOC	217	25,0	1,15.10 ⁻⁴
-COOEt	189	25,0	1,32.10 ⁻⁴
-NH- 	214	0,15	7,00.10 ⁻⁷
-  -O-CH ₂ -COOEt	295	0,03	1,01.10 ⁻⁷
-  -O-CH ₂ COOH	267	8,0	2,99.10 ⁻⁵
-  -O-CH ₂ -COOEt	452,8	12,5	2,76.10 ⁻⁵
-  -O-CH ₂ -COOH	424,8	100,0	2,35.10 ⁻⁴
Mycobacidine	217	0,12	5,53.10 ⁻⁷
INH	137	0,03	2,19.10 ⁻⁷

amid/ végződéssel. A szénlánc hosszának csökkentésével csökkent a hatás erőssége is. Az alifás karbonsavlánc helyettesíthető p-fenoxiecetsavészterrel a hatás elvesztése nélkül. A szabad sav, vagy a benzolgyűrű nagy térkitöltésű helyettesítései azonban a hatás csökkenéséhez vezettek.

A további kísérletek során az egyik igen hatásos vegyülettel, a /3,4,5,6-tetrahidro-4-oxo-2H-1,3-tiazin-2-il/-kapronsavval /jele NYT 105/ végeztünk szisztematikus vizsgálatokat a hatásmechanizmus tisztázása érdekében. Az emberpatogén *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_v törzs helyett ezeknél a vizsgálatoknál az apatogén *Mycobacterium phlei* törzsszel dolgoztunk, a fertőzési veszély elkerülése miatt.

4.2. NYT 105 hatása *Mycobacterium phlei* törzsre

Az apatogén *M. phlei* törzsszel mérve a minimális inhibitor koncentráció 0,8 µg/ml /3,46.10⁻⁶ M/ volt /sorozathigitációs módszer, Kirchner táptalaj/. Érdekes, hogy a másik apatogén mikobaktérium törzsre, a *Mycobacterium pellegrinora* a vizsgált vegyület még 100 µg/ml koncentrációban sem fejtett ki szaporodásgátló hatást.

A NYT 105 *M. phlei*re kifejtett hatása még a



vizsgált legmagasabb inhibitor koncentrációnál, 100 $\mu\text{g/ml}$ -nél $/4,32 \cdot 10^{-4} \text{ M/}$ is bakteriosztatikus jellegű volt. A baktérium 10 napos, inhibitor jelenlétében történt inkubálás után is szaporodni kezdett, ha inhibitor-mentes táptalajba oltottuk át, vagy az inhibitor mellé a táptalajba 0,5 $\mu\text{g/ml}$ $/2,05 \cdot 10^{-6} \text{ M/}$ biotint mértünk.

4.3. NYT 105 Mycobacterium phleire kifejtett hatásának antagonizálása biotinnal

A biotin védőhatásának vizsgálatát a 7. ábra szerinti kísérleti elrendezésben végeztük. A NYT 105 koncentráció 0 - 50 $\mu\text{g/ml}$ $/2,16 \cdot 10^{-4} \text{ M/}$, a biotin koncentráció 0 - 1 ng/ml $/4,09 \cdot 10^{-9} \text{ M/}$ között változott. A két anyag összemérése után *M. phlei* tenyésztettel fertőztük a táptalajt. A kiértékelés szabad szemmel, a táptalaj zavarosságának megállapításával történt, mivel a *M. phlei* csomósan nő, kémcsőben nehezen szuszpendálható, gyorsan ülepszik, így a fényelnyelés mérése nem nyújt több információt, mint a szabad szemmel történő leolvasás.

A kísérleti eredményből látható, hogy a NYT 105 *M. phleire* kifejtett szaporodás-gátló hatását a biotin megszüntette. A minimális inhibitor koncentráció

7. ábra

NYT 105 hatásának antagonizálása biotinnal *M. phlei* törzs esetén, Kirchner táptalajon

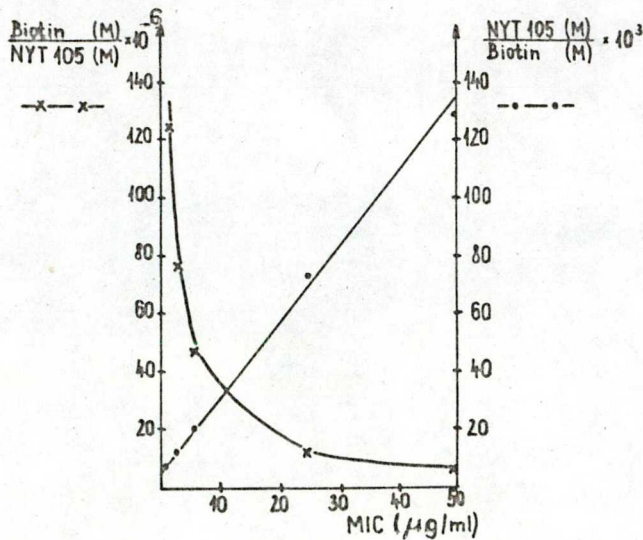
	NYT 105 konc. ($\mu\text{g/ml}$)									
	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8	0,4	0,2	0
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,50	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,45	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,40	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,35	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
0,30	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
0,25	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
0,20	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
0,15	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
0,10	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
0	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

- : táptalaj tiszta, baktérium nem szaporodik
+ : táptalaj zavaros, baktérium szaporodik

egyre nagyobb lett a biotin koncentráció növelésével. Ha a teljes gátlás eléréséhez szükséges inhibitor koncentráció /MIC/ függvényében ábrázoljuk az adott pontban fennálló inhibitor/biotin koncentrációk arányát /8. ábra/, azt látjuk, hogy ez az arány nem konstans, hanem lineárisan nő, tehát a hatás nem független az inhibitor és a szubsztrát /biotin/ abszolút kon-

8. ábra

NYT 105 hatásának antagonizálása biotinnal *M. phlei* törzs esetén



centrációjától. Ez annyit jelent, hogy a biotinra, mint szubsztrátra nézve a NYT 105 által okozott gátlás nem-kompetitív jellegű.

4.4. NYT 105 hatásának antagonizálása deztiobiotinnal *Mycobacterium phlei* esetén

Mivel a NYT 105 *M. phlei*re kifejtett hatását minimális mennyiségű biotinnal meg lehetett szüntetni 10^{-4} - 10^{-5} -szörös mennyiségű biotin elegendő volt a szaporodás megindításához/, feltételeztük, hogy a ve-

gyület a biotin bioszintézisét gátolja. Feltételeztük továbbá, hogy a *M. phleiben* a biotin bioszintézise az *E. coliban* lejátszódó reakciósor szerint¹³ megy végbe. Ezért megvizsgáltuk, hogy az utolsó lépést, a deztibiotin → biotin átalakulást hogyan befolyásolja a vegyület.

A kísérleti elrendezés a 9. ábrán látható.

9. ábra

NYT 105 hatásának antagonizálása deztibiotinnal *M. phlei* törzs esetén, Kirchner táptalajon

	NYT 105 konc. (μg/ml)										NYT 105 (M) Deztibiotin (M)
	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8	0,4	0	
Deztibiotin konc. (μg/ml)	48,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8
	23,1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	8
	11,5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	4
	5,8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	8
	2,9	-	-	-	-	-	+	+	+	+	4
	1,4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	8
	0,7	-	-	-	-	-	-	+	+	+	8
	0	-	-	-	-	-	-	-	+	+	

+ : baktérium szaporodik

- : baktérium nem szaporodik

A NYT 105 koncentráció 0 - 100 μg/ml / $4,32 \cdot 10^{-4}$ M/, a deztibiotin koncentráció 0 - 46,2 μg/ml / $2,16 \cdot 10^{-4}$ M/ között változott. Az anyagok összemérése után fertőztük a táptalajt a *M. phlei*-vel.

A minimális inhibitor koncentrációhoz tartozó pontokban a NYT 105 - deztibiotin arány 4-8 volt, ami azt jelenti, hogy 1 mol deztibiotin 4-8 mol NYT 105 hatását védi ki. Ez az arány nem függött az abszolút koncentrációktól, hanem állandó volt, tehát a NYT 105 kompetitíve gátolta a deztibiotin $\rightarrow$ biotin átalakulást.

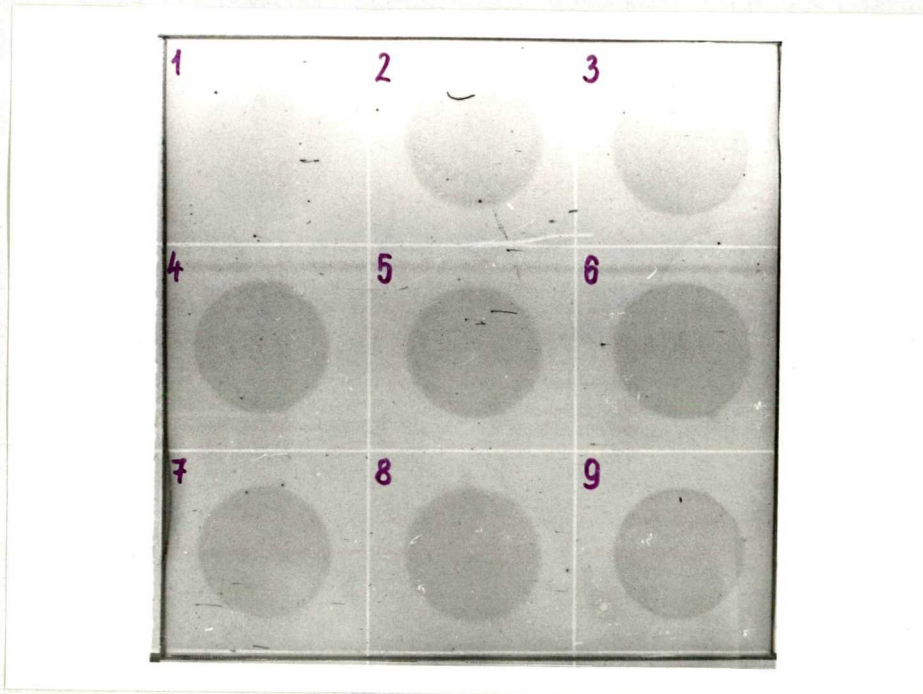
4.5. NYT 105 hatásának antagonizálása deztibiotinnal *Saccharomyces cerevisiae* törzsön

A *M. phlei*-vel ellentétben, amely a biotin teljes bioszintézisére képes¹¹, a *Sacch. cerevisiae*-ben a biotin szintézisnek csak az utolsó lépése, a deztibiotin $\rightarrow$ biotin átalakulás játszódik le⁶³. A törzs azonos koncentrációban igényli biotin-mentes komplett táptalajon a deztibiotint vagy a biotint.

A *Sacch. cerevisiae* törzs szaporodását a NYT 105 a standard vizsgálati körülmények között nem gátolta /cukor-élesztő táptalajon a MIC $> 1000 \mu\text{g/ml}$ /. Ezért a vizsgálatokat biotin-mentes komplett táptalajon /3.1.2./ végeztük. A rendelkezésre álló rendkívül csekély deztibiotin mennyiség miatt mikromódszert dolgoztunk ki a vizsgálatokhoz /3.4.2./. A 10. ábrán egy bioautográfias módszerrel előhívott lemez képe látha-

10. ábra

Deztiobiotin → biotin átalakulás vizsgálata NYT 105-
tel *Sacch. cerevisiae* törzsön



Minden mezőben 1 ng $/4,67 \cdot 10^{-12} \text{ mol/}$ deztiobiotin van.

NYT 105 mennyisége az egyes mezőkben:

- | | |
|---|---|
| 1. 20,0 ug $/8,65 \cdot 10^{-8} \text{ mol/}$ | 6. 0,6 ug $/2,70 \cdot 10^{-9} \text{ mol/}$ |
| 2. 10,0 ug $/4,32 \cdot 10^{-8} \text{ mol/}$ | 7. 0,3 ug $/1,35 \cdot 10^{-9} \text{ mol/}$ |
| 3. 5,0 ug $/2,16 \cdot 10^{-8} \text{ mol/}$ | 8. 0,1 ug $/6,75 \cdot 10^{-10} \text{ mol/}$ |
| 4. 2,5 ug $/1,08 \cdot 10^{-8} \text{ mol/}$ | 9. 0 ug |
| 5. 1,2 ug $/5,40 \cdot 10^{-9} \text{ mol/}$ | |

Az 1. mezőben teljes szaporodás-gátlás látható.

tó. A lemezek kiértékelésénél azt a mezőt vettük figyelembe, amelynél nem tapasztaltunk szaporodást.

A 2. táblázatban foglaltuk össze a NYT 105 vizsgálatánál alkalmazott kísérleti elrendezést.

2. táblázat

NYT 105 hatásának antagonizálása deztiobiotinnal Sacch. cerevisiae törzsön

NYT 105 mennyisége /mol/	Növekedési gyűrű átmérő /mm/		
	Deztiobiotin mennyisége /mol/		
	$1,16 \cdot 10^{-12}$	$2,33 \cdot 10^{-12}$	$4,67 \cdot 10^{-12}$
$8,65 \cdot 10^{-8}$	0	0	0
$4,32 \cdot 10^{-8}$	0	0	31
$2,16 \cdot 10^{-8}$	0	26	31
$1,08 \cdot 10^{-8}$	23	26	31
$5,40 \cdot 10^{-8}$	23	26	32
$2,70 \cdot 10^{-9}$	23	26	31
$1,35 \cdot 10^{-9}$	22	26	31
$6,75 \cdot 10^{-10}$	23	26	31
0	23	26	31

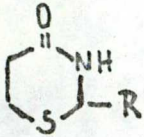
A teljes gátláshoz szükséges NYT 105/deztiobiotin molarány változatlan volt, 18500-nak adódott. Tehát nemcsak a mikobaktérium, hanem az élesztő deztiobiotin $\rightarrow$ biotin átalakítását is kompetitív módon gátolta a NYT 105. De amíg a *M. phlei* esetén 1 mol deztio-

biotin 4-8 mol NYT 105 hatását tudta kivédeni, a *Sacch. cerevisiae* lényegesen kevésbé volt érzékeny a vegyületre. Az eltérés adódhat abból, hogy más a vegyület áthatolási képessége a mikobaktérium és az élesztőgomba sejtfalán ill. membránján, de eltérő lehet a két mikroorganizmus biotin szintetáz enzimjének érzékenysége is a NYT 105-tel szemben.

A deztibiotin $\rightarrow$ biotin átalakulás gátlásának vizsgálatát *Sacch. cerevisiae* törzsön több perhidrotiazin származékkal és a Mycobacidine-nel is elvégeztük. Az eredményt a 3. táblázatban foglaltuk össze.

3. táblázat

Perhidrotiazin származékok /XXIV/ hatásának antagonizálása deztibiotinnal *Sacch. cerevisiae* törzsön

 R =	<u>Inhibitor /mol/</u> Deztibiotin /mol/	MIC M. tub. H ₃₇ R _v /M/
-/CH ₂ / ₅ COOH	18 500	2,59.10 ⁻⁷
-/CH ₂ / ₅ COOEt	66 000	5,79.10 ⁻⁸
-/CH ₂ / ₄ COOH	490 000	5,76.10 ⁻⁵
-/CH ₂ / ₄ COOEt	870 000	2,53.10 ⁻⁵
Mycobacidine	82 000	5,53.10 ⁻⁷

A 3. táblázat eredményei azt mutatták, hogy a kaproil-származékok erősebb inhibitorok, mint a valeril-oldalláncu vegyületek, a *M. tuberculosis* $H_{37}R_v$ esetén tapasztaltakhoz hasonlóan. Azonban a mikobaktériumtól eltérően, az élesztőgombánál az észter származékok kevésbé gátolták a deztiobiotin $\rightarrow$ biotin átalakulást, mint a szabad karboxil oldalláncot tartalmazó származékok. A *Mycobacidine*-nél is ki lehetett mutatni a deztiobiotin $\rightarrow$ biotin átalakulás kompetitív gátlását.

4.6. NYT 105 hatása *Lactobacillus plantarum* biotin-hasznosítására

A *L. plantarum* nem képes sem teljes, sem részleges biotin bioszintézisre. Ezért érdekesnek találtuk megvizsgálni, vajon erre a baktériumra hat-e a NYT 105, vagyis a biotin bioszintézisének gátlásán kívül van-e más hatása is a vegyületnek.

Biotin nélküli komplett táptalajon felvéve a baktérium szaporodási görbéjét /4. táblázat, 11. ábra/ azt találtuk, hogy a baktérium szaporodását még a vizsgált legmagasabb koncentrációban /100 $\mu\text{g/ml}$ = $4.32 \cdot 10^{-4} \text{M}$ / sem gátolta teljesen a NYT 105, de kis mértékben csökkentette. A csökkenés mértéke függött az

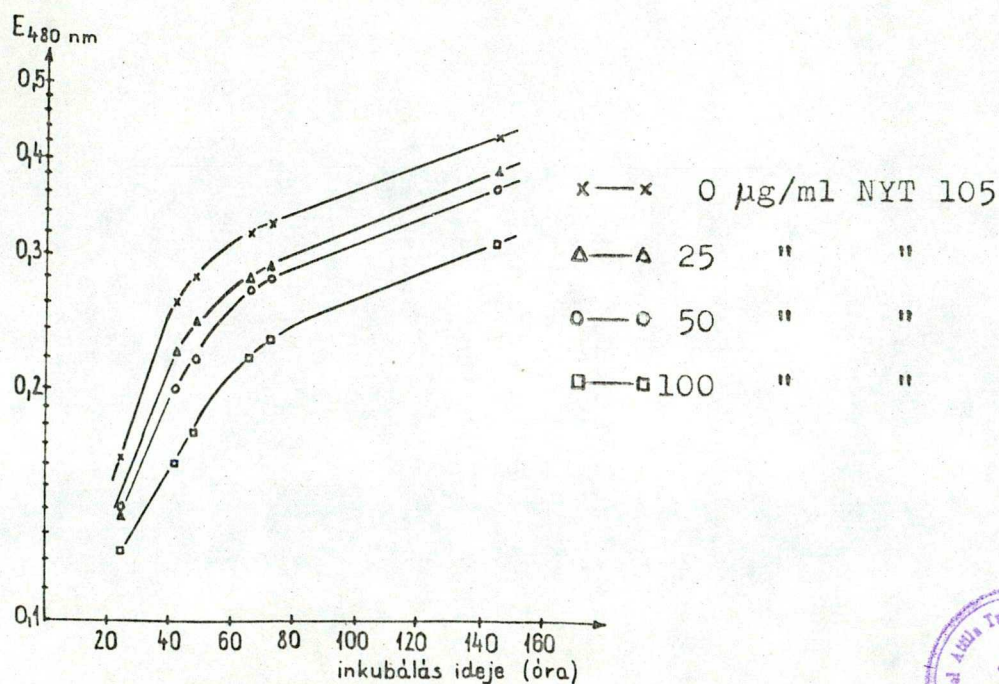
4. táblázat

NYT 105 hatása *L. plantarum*ra biotin-mentes komplett táptalajon

Inkubálás ideje (óra)	E _{480 nm}									
	NYT 105 konc. (μg/ml)									
	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8	0,4	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0,123	0,140	0,136	0,125	0,138	0,128	0,121	0,156	0,138	0,163
44,5	0,160	0,200	0,223	0,211	0,238	0,233	0,235	0,230	0,228	0,260
48	0,176	0,220	0,243	0,245	0,241	0,243	0,241	0,243	0,251	0,280
65,5	0,220	0,270	0,280	0,281	0,285	0,283	0,285	0,296	0,295	0,320
72	0,233	0,280	0,290	0,298	0,298	0,293	0,295	0,306	0,305	0,326
144	0,313	0,373	0,390	0,385	0,388	0,376	0,388	0,400	0,391	0,426

11. ábra

L. plantarum szaporodási görbéje NYT 105 jelenlétében biotin-mentes komplett táptalajon



inhibitor koncentrációjától. /A *L. plantarum* biotinmentes táptalajon mért kis mértékű szaporodása a baktérium biotin-pool-jával magyarázható./ A NYT 105 tehát csökkentette az eleve a baktériumban meglevő vitamin felhasználását.

Ha a táptalajt kiegészítettük 0,02 - 0,2 ng/ml / $8,19 \cdot 10^{-11}$ - $8,19 \cdot 10^{-10}$ M/ biotinnal /ebben a koncentráció-tartományban a baktérium növekedési válasza arányos a biotin koncentrációval/, a következőket figyelhettük meg.

0,02 ng/ml biotinnal kiegészítve a komplett táptalajt /5. táblázat, 12. ábra/, megfigyelhető a *L. plantarum* szaporodásának gátlása /kb. 13 % 100 µg/ml NYT 105 jelenlétében/, és a szaporodási görbe logaritmikus fázisa is késett a kontroll /NYT 105 nélkül mért/ görbéhez viszonyítva. 25 µg/ml alatti NYT 105 koncentrációknál már nem tapasztaltunk koncentrációfüggést, de a kis mértékű /kb. 8 %-os/ gátlás még a vizsgált legalacsonyabb inhibitor koncentrációnál /0,4 µg/ml/ is megmaradt. Ugyanezt tapasztaltuk, ha a biotin koncentrációját 0,04 ng/ml-re emeltük /6. táblázat, 13. ábra/. 100 µg/ml NYT 105 koncentrációnál kb. 17 %-os a gátlás, 50 µg/ml-nél kb. 10 % és 0,4 µg/ml-nél kb. 4 %-os gátlást mértünk.

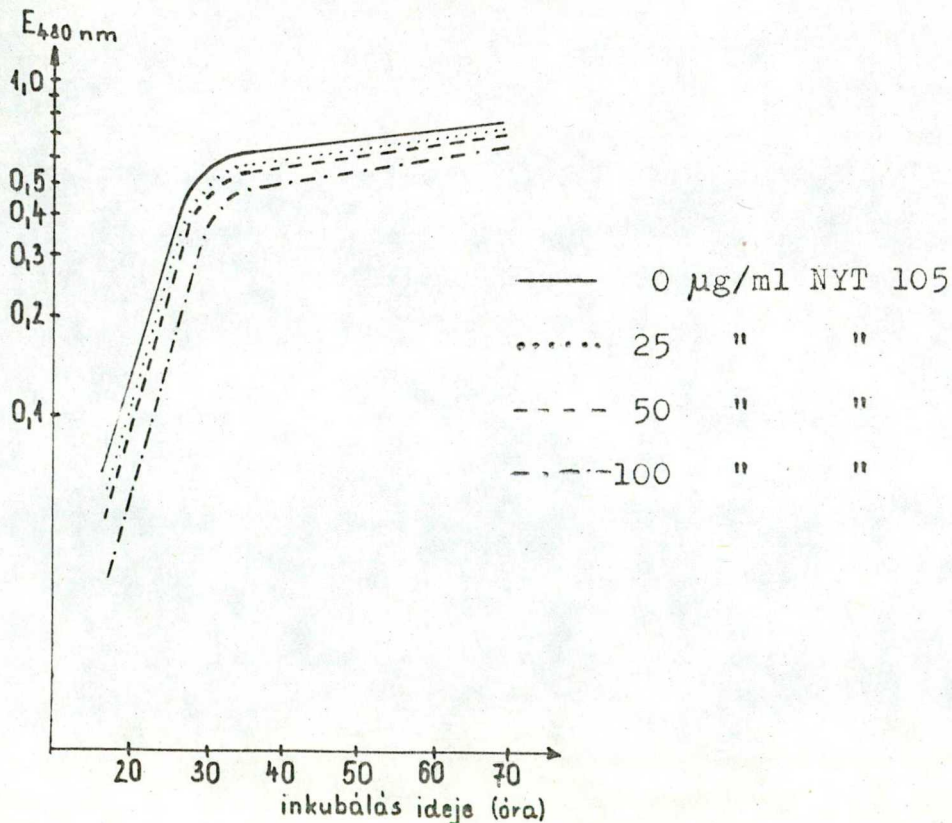
5. táblázat

NYT 105 hatása *L. plantarum*ra 0,02 ng/ml biotin jelenlétében, komplett táptalajon

Inkubálás ideje (óra)	$E_{480\text{ nm}}$									
	NYT 105 konc. ($\mu\text{g/ml}$)									
	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8	0,4	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0,028	0,033	0,045	0,034	0,033	0,035	0,045	0,040	0,043	0,063
19	0,055	0,078	0,086	0,083	0,081	0,080	0,095	0,090	0,093	0,123
21	0,085	0,110	0,125	0,126	0,126	0,124	0,135	0,140	0,138	0,180
23	0,103	0,161	0,168	0,170	0,183	0,186	0,188	0,196	0,198	0,243
25	0,156	0,222	0,243	0,243	0,258	0,256	0,275	0,283	0,281	0,316
40,5	0,496	0,553	0,571	0,571	0,583	0,588	0,603	0,591	0,588	0,626
42	0,510	0,570	0,578	0,585	0,590	0,605	0,606	0,608	0,615	0,660
45	0,520	0,575	0,601	0,590	0,578	0,605	0,606	0,618	0,608	0,653
48	0,563	0,606	0,621	0,635	0,626	0,628	0,651	0,640	0,641	0,670
65	0,643	0,710	0,705	0,705	0,716	0,735	0,732	0,735	0,725	0,760
72	0,873	0,720	0,725	0,711	0,723	0,748	0,738	0,738	0,715	0,770

12. ábra

L. plantarum szaporodási görbéje 0,02 ng/ml biotin tartalmu komplett táptalajon, NYT 105 jelenlétében



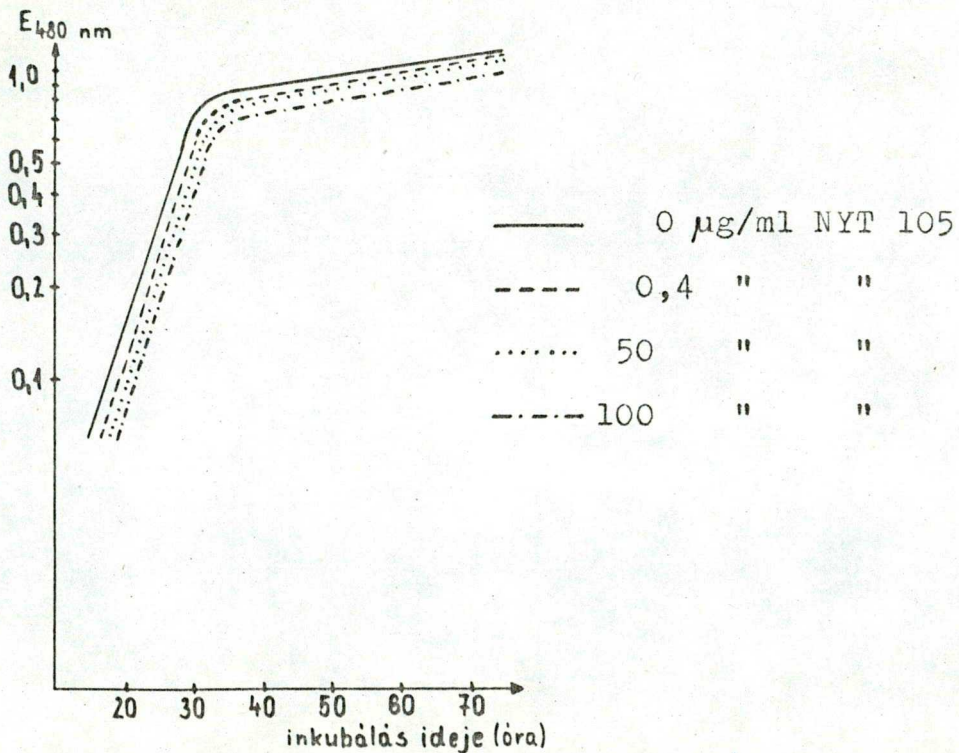
6. táblázat

NYT 105 hatása *L. plantarum*-ra 0,04 ng/ml biotin jelenlétében, komplett táptalajon

Inkubálás ideje (óra)	$E_{480\text{ nm}}$									
	NYT 105 konc. ($\mu\text{g/ml}$)									
	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8	0,4	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0,033	0,033	0,023	0,040	0,038	0,028	0,037	0,035	0,036	0,093
19	0,071	0,080	0,078	0,088	0,088	0,076	0,082	0,088	0,085	0,136
21	0,090	0,108	0,108	0,131	0,125	0,120	0,123	0,118	0,127	0,181
23	0,130	0,143	0,163	0,171	0,180	0,166	0,166	0,168	0,173	0,231
25	0,186	0,218	0,230	0,271	0,263	0,260	0,270	0,251	0,278	0,341
40,5	0,721	0,796	0,790	0,811	0,838	0,806	0,820	0,803	0,833	0,881
42	0,745	0,813	0,820	0,841	0,838	0,850	0,850	0,826	0,846	0,895
45	0,765	0,860	0,833	0,878	0,858	0,835	0,840	0,833	0,860	0,925
48	0,798	0,880	0,868	0,915	0,921	0,900	0,883	0,876	0,903	0,951
65	0,935	1,023	1,030	1,095	1,081	1,043	1,043	1,043	1,086	1,108
72	0,931	1,000	1,040	1,095	1,078	1,050	1,036	1,043	1,100	1,121

13. ábra

L. plantarum szaporodási görbéje 0,04 ng/ml biotin tartalmu komplett táptalajon, NYT 105 jelenlétében



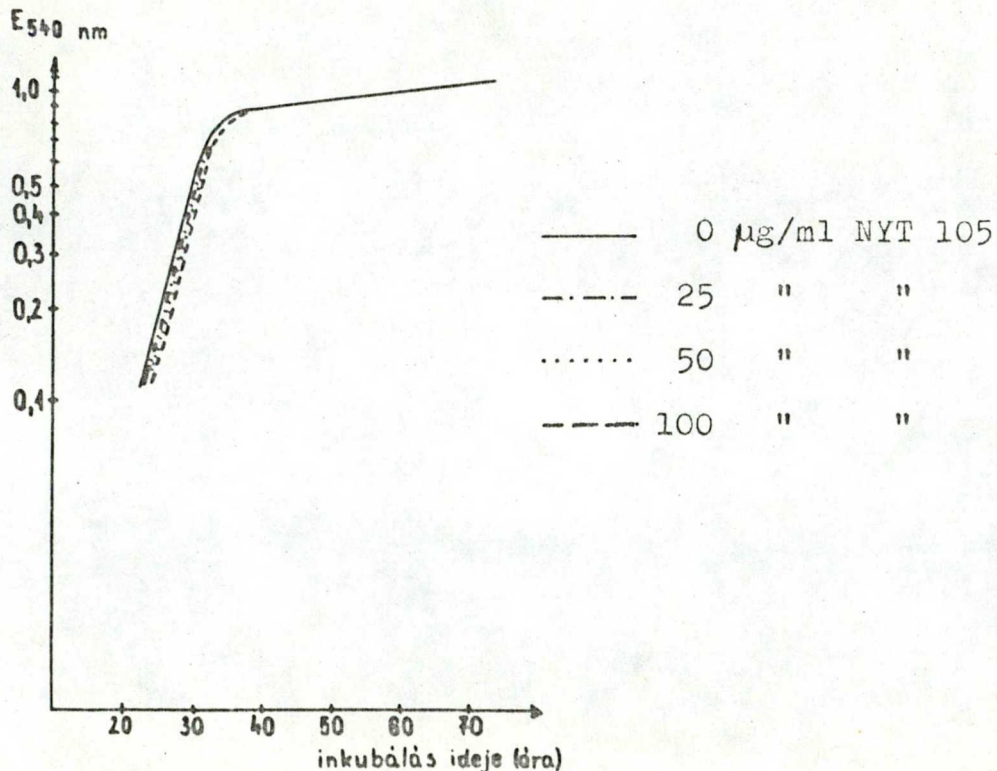
7. táblázat

NYT 105 hatása *L. plantarum*ra 0,06 ng/ml biotin jelenlétében, komplett táptalajon

Inkubálás ideje (óra)	E _{540 nm}									
	NYT 105 konc. (µg/ml)									
	400	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8	0,4	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0,046	0,068	0,086	0,086	0,078	0,086	0,078	0,093	0,108	0,150
25	0,095	0,142	0,125	0,126	0,125	0,128	0,120	0,134	0,153	0,183
26	0,175	0,193	0,210	0,223	0,203	0,211	0,205	0,230	0,260	0,280
27	0,248	0,261	0,280	0,283	0,271	0,268	0,273	0,295	0,356	0,388
28	0,288	0,298	0,320	0,325	0,315	0,323	0,325	0,351	0,368	0,408
29	0,358	0,378	0,398	0,406	0,381	0,393	0,386	0,408	0,441	0,473
30	0,432	0,438	0,451	0,460	0,445	0,450	0,455	0,450	0,491	0,516
31	0,515	0,501	0,540	0,550	0,535	0,553	0,560	0,525	0,576	0,610
48	0,968	0,961	0,920	0,950	0,945	0,986	0,900	0,891	0,935	0,968
54	1,051	1,045	1,020	1,033	1,031	1,053	1,020	1,011	1,035	1,060
72	1,135	1,078	1,086	1,093	1,085	1,086	1,103	1,055	1,088	1,136

14. ábra

L. plantarum szaporodási görbéje 0,06 ng/ml biotin tartalmu komplett táptalajon, NYT 105 jelenlétében



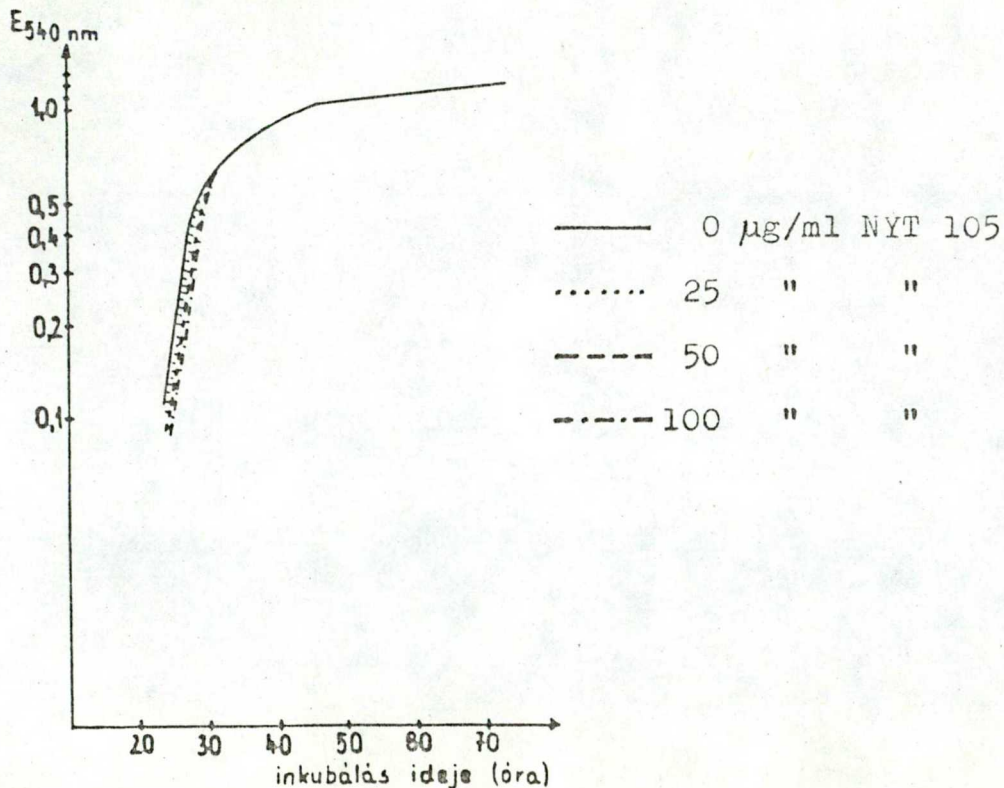
8. táblázat

NYT 105 hatása *L. plantarum*-ra 0,08 ng/ml biotin jelenlétében, komplett táptalajon

Inkubálás ideje (óra)	E _{540 nm}									
	NYT 105 konc. (μg/ml)									
	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8	0,4	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0,078	0,088	0,105	0,108	0,105	0,105	0,101	0,095	0,095	0,138
25	0,158	0,170	0,215	0,196	0,210	0,196	0,205	0,200	0,178	0,235
26	0,200	0,220	0,253	0,245	0,238	0,253	0,255	0,238	0,226	0,283
27	0,266	0,283	0,351	0,346	0,340	0,335	0,360	0,336	0,308	0,376
28	0,320	0,348	0,405	0,391	0,381	0,398	0,386	0,380	0,355	0,421
29	0,400	0,423	0,488	0,493	0,456	0,488	0,443	0,480	0,446	0,511
30	0,476	0,500	0,555	0,546	0,513	0,538	0,511	0,530	0,516	0,558
31	0,585	0,603	0,655	0,645	0,615	0,633	0,631	0,641	0,638	0,650
48	1,033	1,030	1,091	1,053	1,023	1,021	1,043	1,063	1,065	1,055
54	1,120	1,118	1,168	1,133	1,106	1,108	1,123	1,166	1,161	1,145
72	1,216	1,200	1,265	1,236	1,223	1,221	1,210	1,216	1,225	1,215

15. ábra

L. plantarum szaporodási görbéje 0,08 ng/ml biotin tartalmu komplett táptalajon, NYT 105 jelenlétében



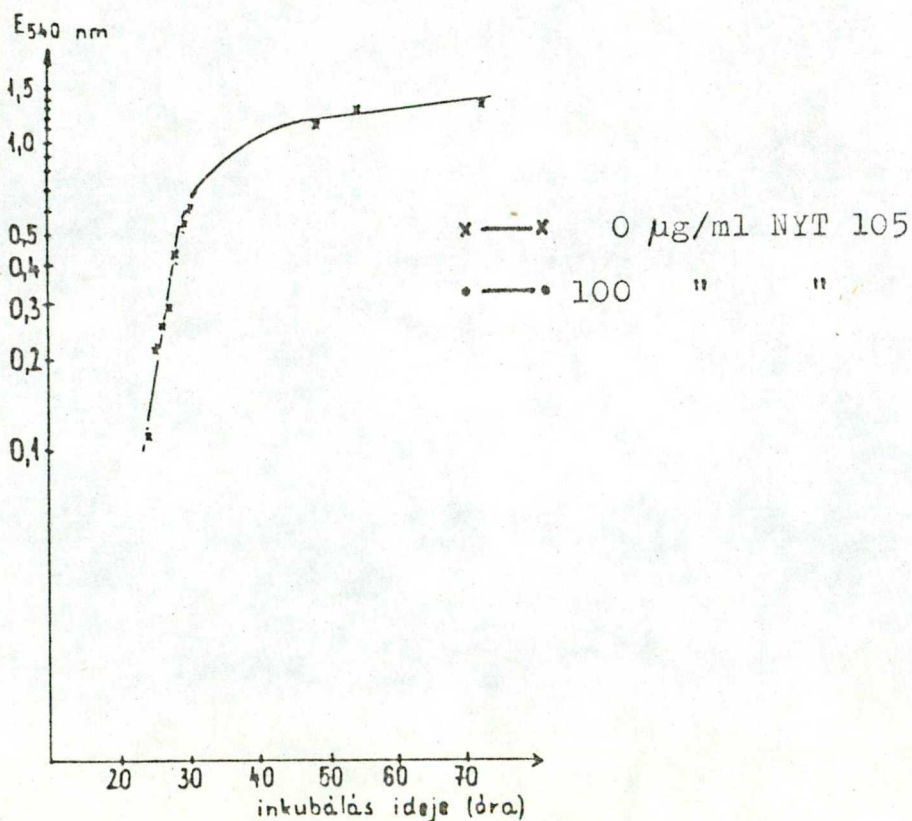
9. táblázat

NYT 105 hatása *L. plantarum*-ra 0,12 ng/ml biotin jelenlétében, komplett táptalajon

Inkubálás ideje (óra)	E _{540 nm}									
	NYT 105 konc. (μg/ml)									
	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8	0,4	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0,113	0,115	0,108	0,100	0,098	0,100	0,100	0,110	0,088	0,126
25	0,216	0,206	0,215	0,221	0,193	0,205	0,191	0,221	0,175	0,223
26	0,258	0,266	0,268	0,253	0,225	0,285	0,241	0,210	0,208	0,261
27	0,280	0,370	0,376	0,365	0,326	0,335	0,341	0,320	0,278	0,356
28	0,435	0,430	0,448	0,431	0,393	0,401	0,408	0,350	0,341	0,403
29	0,545	0,543	0,543	0,535	0,483	0,501	0,511	0,516	0,453	0,506
30	0,611	0,608	0,598	0,598	0,551	0,581	0,598	0,543	0,533	0,598
31	0,695	0,700	0,703	0,685	0,670	0,681	0,691	0,658	0,638	0,698
48	1,131	1,180	1,156	1,141	1,183	1,178	1,208	1,173	1,151	1,196
54	1,281	1,300	1,286	1,265	1,276	1,285	1,291	1,296	1,278	1,306
72	1,331	1,350	1,340	1,271	1,330	1,378	1,375	1,340	1,335	1,330

16. ábra

L. plantarum szaporodási görbéje 0,12 ng/ml biotin tartalmu komplett táptalajon, NYT 105 jelenlétében



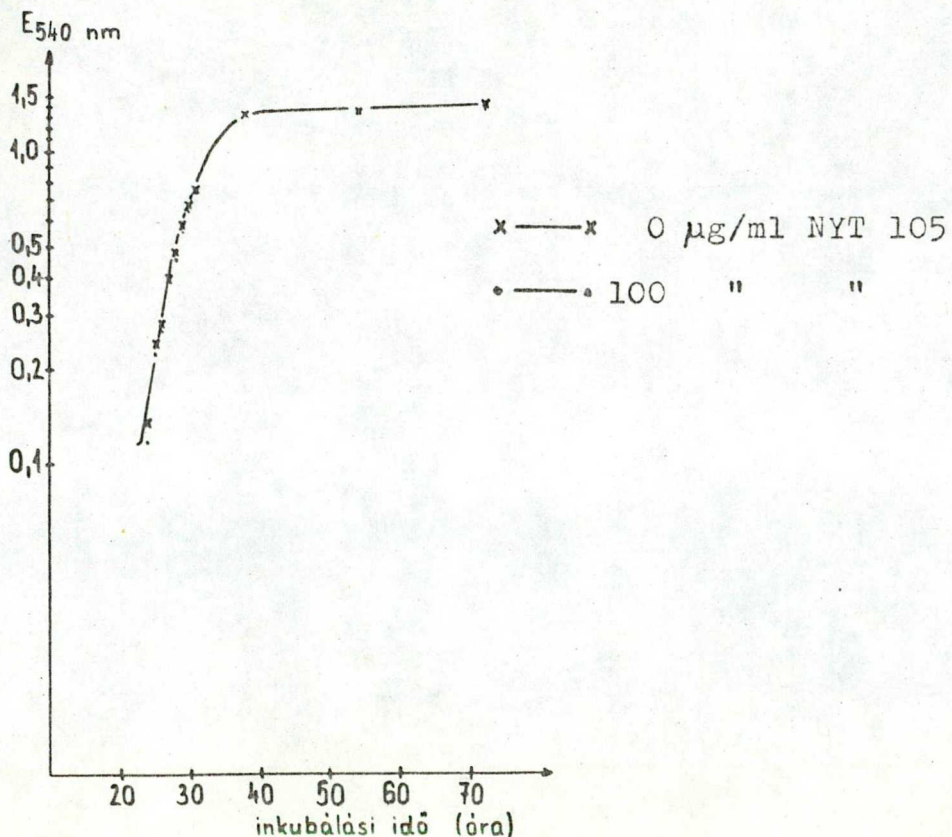
10. táblázat

NYT 105 hatása *L. plantarum*-ra 0,2 ng/ml biotin jelenlétében, komplett táptalajon

Inkubálás ideje (óra)	E _{540 nm}									
	NYT 105 konc. (μg/ml)									
	400	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8	0,4	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0,118	0,128	0,123	0,128	0,113	0,106	0,106	0,126	0,111	0,138
25	0,228	0,245	0,218	0,246	0,240	0,236	0,221	0,233	0,228	0,241
26	0,268	0,305	0,308	0,298	0,288	0,281	0,270	0,280	0,263	0,283
27	0,393	0,418	0,421	0,418	0,396	0,406	0,398	0,390	0,370	0,391
28	0,450	0,496	0,475	0,491	0,491	0,470	0,451	0,480	0,451	0,475
29	0,576	0,608	0,586	0,608	0,603	0,573	0,571	0,590	0,585	0,598
30	0,641	0,673	0,646	0,691	0,656	0,640	0,631	0,656	0,661	0,681
31	0,743	0,775	0,763	0,781	0,760	0,743	0,740	0,716	0,745	0,765
48	1,320	1,341	1,330	1,351	1,286	1,256	1,271	1,283	1,295	1,313
54	1,386	1,375	1,366	1,451	1,363	1,363	1,338	1,333	1,345	1,383
72	1,453	1,475	1,430	1,451	1,403	1,373	1,405	1,393	1,391	1,478

17. ábra

L. plantarum szaporodási görbéje 0,2 ng/ml biotin tartalmu komplett táptalajon, NYT 105 jelenlétében



0,06 ill. 0,08 ng/ml biotin koncentrációnál már csak a logaritmikus fázis időbeli eltolódása figyelhető meg a kontroll görbéhez képest. A végső baktériumszám /ami a fényelnyeléssel arányos/ már azonos a kontrolléval /7. és 8. táblázat; 14. és 15. ábra/.

0,12 ng/ml és 0,2 ng/ml biotin koncentrációnál a 0 és 100 µg/ml inhibitor koncentráció esetén mért értékek egybeesnek /9. és 10. táblázat; 16. és 17. ábra/. Ilyen biotin koncentrációknál tehát a NYT 105 már nem gátolta a *L. plantarum* biotin-felvételét a táptalajból.

Mivel a *L. plantarum*-ban nem lehet szó deztio-biotin → biotin átalakulásról, és ha kis mértékben is, de ennek a mikroorganizmusnak a szaporodását is gátolta a NYT 105, amely gátlás biotin hozzáadására megszűnt, feltételeztük, hogy az általunk vizsgált vegyület nemcsak a biotin bioszintézisét, hanem a biotin biológiai funkcióját /holoenzim képződése vagy a holoenzim működése/ is gátolja.

4.7. NYT 105 hatása *Mycobacterium phlei* biotin tartalmára

Annak igazolására, hogy a NYT 105 a biotin biológiai funkcióját is befolyásolja, megvizsgáltuk a

logaritmikus szaporodási fázis végén lévő /tehát már adott biotin tartalommal rendelkező/ *M. phlei* tenyészetre kifejtett hatását.

250 ml logaritmikus szaporodási fázisban lévő *M. phlei* tenyészetéhez /Kirchner táptalaj, $E_{480\text{ nm}} = 0,6$ / 1 ml végtérfogatban adtuk a megfelelő koncentrációjú NYT 105 alkoholos oldatát, a kontroll tenyészetéhez 1 ml alkoholt mértünk. A tenyészeteket $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 6 órán át rázattuk. A kezelés végén a tenyészetet Millipore szűrőn / $0,45\text{ }\mu$ pórusméret/ szűrtük, exsikkátorban szárítottuk és a 3.4.3. pontban leírtak szerint mértük a mikobaktérium biotin tartalmát.

A kísérlet eredményét a 11. táblázatban foglaltuk össze.

11. táblázat

NYT 105 hatása a *M. phlei* összes biotin tartalmára

Kezelés ideje /óra/	NYT 105 konc. / $\mu\text{g/ml}$ /	Összes biotin	
		ng/100 mg bakt.	%
0	0	$590 \pm 5\%$	100,00
6	0	$579 \pm 5\%$	98,13
6	50	$437 \pm 3\%$	74,06

Hat órás kezelés alatt a *M. phlei* mérhetően nem szaporodott /fényelnyelése és szárazsulya változat-

lan a 0 órás kontrollhoz viszonyítva/. NYT 105 nélkül sem biotin szintézis, sem spontán biotin-kiürülés nem történt a baktériumsejtből 6 óra alatt. A *M. phlei* biotin tartalmának csökkenése tehát valóban a NYT 105 hatásának tulajdonítható. Az 50 µg/ml koncentrációban jelenlevő NYT 105 a mikobaktérium összes biotin tartalmát 26 %-kal csökkentette.

Ehhez a jelenséghez hasonlóan az irodalomból is ismerünk, amikor Mycobacidine-nel kezelt nyulak vizelésében mutattak ki biotint¹⁰.

A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a mikobaktérium biotin tartalmának csökkenése hogyan függ a jelenlevő NYT 105 koncentrációjától /12. táblázat/. A kezelés ideje változatlanul 6 óra volt.

12. táblázat

M. phlei összes biotin tartalmának változása a NYT 105 koncentráció függvényében

NYT 105 konc. /µg/ml/	Összes biotin	
	ng/100 mg bakt.	%
0	611 ± 6 %	100,0
10	425 ± 9 %	69,6
50	501 ± 5 %	82,0
100	432 ± 8 %	71,1

A 12. táblázat adataiból látható, hogy a kiválasztott koncentráció-tartományban /10 - 200 $\mu\text{g/ml}$ NYT 105/ a baktérium összes biotin tartalmának csökkenése nem mutatott koncentráció-függést. A 10 $\mu\text{g/ml}$ és 200 $\mu\text{g/ml}$ NYT 105 koncentrációnál mért értékek gyakorlatilag megegyeznek. Ezért a következő kísérletben alacsonyabb koncentrációk felé terjesztettük ki a mérést, és az összes biotin tartalom mellett mértük a mikobaktérium szabad biotin tartalmának alakulását is /az összes biotin és szabad biotin közötti különbség adja a kötött biotin tartalmat/. Az eredményeket a 13. táblázatban tüntettük fel.

13. táblázat

M. phlei összes és szabad biotin tartalmának változása a NYT 105 koncentráció függvényében

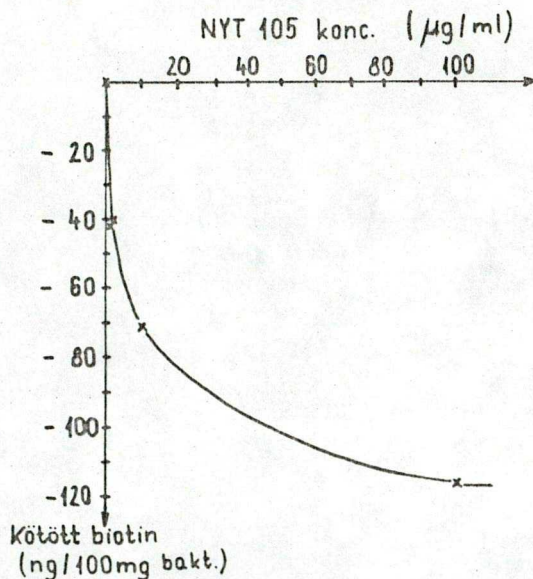
NYT 105 konc. ($\mu\text{g/ml}$)	Összes biotin	Szabad biotin	Kötött biotin	Összes biotin	Kötött biotin
	ng / 100 mg baktérium			%	
0	506 $\pm$ 8%	9,8	496,2	100,0	100,0
1	460 $\pm$ 11%	6,8	453,8	90,1	91,7
2	463 $\pm$ 14%	6,7	456,3	91,5	92,1
10	437 $\pm$ 12%	10,4	426,6	86,4	86,2
100	436 $\pm$ 11%	56,9 $\pm$ 9%	379,1	86,2	76,9



A 13. táblázat eredményei azt mutatják, hogy míg az összes biotin tartalom a NYT 105 koncentráció növelésével szinte alig csökkent /1 $\mu\text{g/ml}$ -nél 90 %, 100 $\mu\text{g/ml}$ -nél 86 % a kontrollhoz képest/, a szabad biotin tartalom lényegesen nagyobb lett /1 $\mu\text{g/ml}$ -nél 6,8 ng/100 mg baktérium, 100 $\mu\text{g/ml}$ NYT 105 koncentrációnál már 56,9 ng/100 mg baktérium/. Ezért az összes biotin és a szabad biotin különbségéből számított kötött biotin tartalom már koncentrációtól függően változott, mégpedig negatív telítési görbe szerint /18. ábra/.

18. ábra

M. phlei kötött biotin tartalmának változása a NYT 105 koncentráció függvényében



A 13. táblázat eredményeiből az is látszik, hogy nemcsak szabad formában levő biotin ürült ki a baktériumsejtből a kezelés hatására, hanem eredetileg kötött formában levő biotin is szabaddá vált. Mivel a biotin a biotin-enzimekben az apoenzimhez kovalensen olyan erősen kötődik, hogy csak tömény savas hidrolizissal tehető szabaddá, valószínű, hogy a NYT 105 nem ezt a kötést bontotta, hanem az enzimhez nem-kovalensen kötött biotint szorította ki a helyéről. Ilyen kötőhely pl. az acetil-CoA karboxiláz biotin karboxiláz alegységén levő aktív hely /3. ábra/, amely az irodalom szerint^{18,19,20} valóban képes szabad biotin kötni és azt karboxilálni, de a karboxil csoport átvitele már energetikai okok miatt gátolt. Ezért ha a baktériumokban a biotin-enzimen levő aktív helyek egy részét szabad biotin foglalja el, a karboxilálási és transzkarboxilálási folyamatok gátolva vannak. A biotin-enzimeken lévő másodlagos kötőhelynek és a biotinnak így valószínűleg reguláló szerepe is van az enzimek működésében.

4.8. NYT 105 hatása a *Mycobacterium phlei* zsírsav szintézisére

A *M. phlei*-vel végzett kísérletek során megfi-

gyeltük, hogy a NYT 105-re rezisztenssé vált *M. phlei* szintelen telepeket képezett - szemben a sárga színű, vad *M. phlei*-vel. A mikobaktérium Ziehl-Neelsen-féle⁶⁴ festődési tulajdonsága is megváltozott. A rezisztens *M. phlei* nem festődött savállóan. Mivel a saválló festődésért a mikobaktériumok sejtfalának magas lipid tartalma /a sejtek szárazanyag tartalmának kb. 30 %-a// felelős, feltételeztük, hogy a NYT 105 hatására a *M. phlei* lipid tartalma is megváltozott. Ezért szükségesnek tartottuk megvizsgálni a *M. phlei* zsírsav szintézisét NYT 105 jelenlétében.

A *M. phlei* zsírsav szintézisének mértékeként a ¹⁴C-acetát beépülést mértük a logaritmusos szaporodási fázis elején lévő baktériumsejtekbe 37 °C-on, 30 perces reakcióidővel. Arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a vizsgált vegyület befolyásolja-e a zsírsav szintézis mértékét, és ezen túl megváltoztatja-e a baktérium lipidjeinek zsírsav-összetételét akár mennyiségileg, akár minőségileg. Az INH-ról, az egyik legelterjedtebben használt tbc-ellenes szerről ugyanis kimutatták^{58,59}, hogy specifikusan gátolja a mikobaktériumok mikolsav szintézisét /ami a tbc-baktérium patogenitásáért felelős Cord-faktor⁶⁵ alkotórésze/.

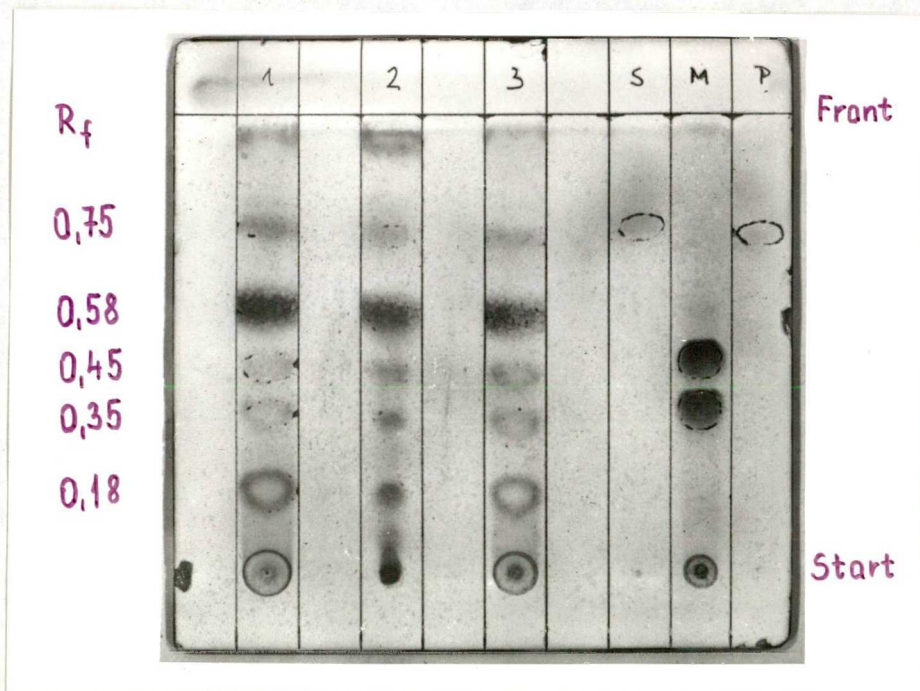
Első kísérletként a logaritmusos fázis elején lévő *M. phlei* kultúrához 10 µg/ml NYT 105-öt / $4,3 \cdot 10^{-5}$ M// ill. 11,2 µg/ml NYT 105-etilésztert /NYT 59; $4,3 \cdot 10^{-5}$ M//

mértünk. A kontroll tenyészetéhez azonos térfogatu oldószert /etanol/ adtunk. A kísérletet a 3.4.4. pontban leírtak szerint végeztük, a lipideket extraháltuk, elszappanosítottuk, majd a zsírsavakat diazometánnal észtereztük. A zsírsav-észter elegyet vékonyrétegen kromatografáltuk. A lemezeket kémiailag és kontakt autoradiográfiás módszerrel hívtuk elő. A 19. ábra a kémiai előhívást, a 20. ábra a röntgen-filmes előhívást mutatja. Az összlipidek fajlagos aktivitását és a radioaktivitás R_f szerinti %-os megoszlását a 14. táblázat tartalmazza.

Kísérleti körülményeink között a jelenlévő ^{14}C -acetátnak 7-8 %-a épült be a *M. phlei* lipidjeibe. A kontrollhoz képest a NYT 105 37 %-kal, a NYT 59 51,4 %-kal csökkentette a ^{14}C -acetát beépülését, vagyis az összes zsírsav-szintézist. A radioaktivitás megoszlásában a következők figyelhetők meg. A 0,58 R_f értékű zsírsav-észter frakcióban egyáltalán nem találtunk radioaktivitást. A radioaktivitás zöme /kb. 35 %/ a normál-zsírsav frakcióban, és egy, a mikolsavaknál még kisebb retenciós faktorú / R_f 0,18/ frakcióban található. A mikolsavakban / R_f 0,35 ill. 0,45/ a radioaktivitás 22-25 %-a található. A radioaktivitás %-os megoszlása a kísérleti hiba határain belül egyezett a kontroll és a NYT vegyületekkel kezelt baktériumok

19. ábra

M. phlei zsírsav-észtereknek vékonyréteg-kromatogramja



Lemez: Kieselgel G 0,5 mm

Futtató elegy: petroléter - éter = 8:2

Előhívás: I_2 -gőzzel

1. 10 ug/ml NYT 105-tel kezelt
2. 11,2 ug/ml NYT 59-cel kezelt
3. Kontroll

S: sztearinsav-metilészter

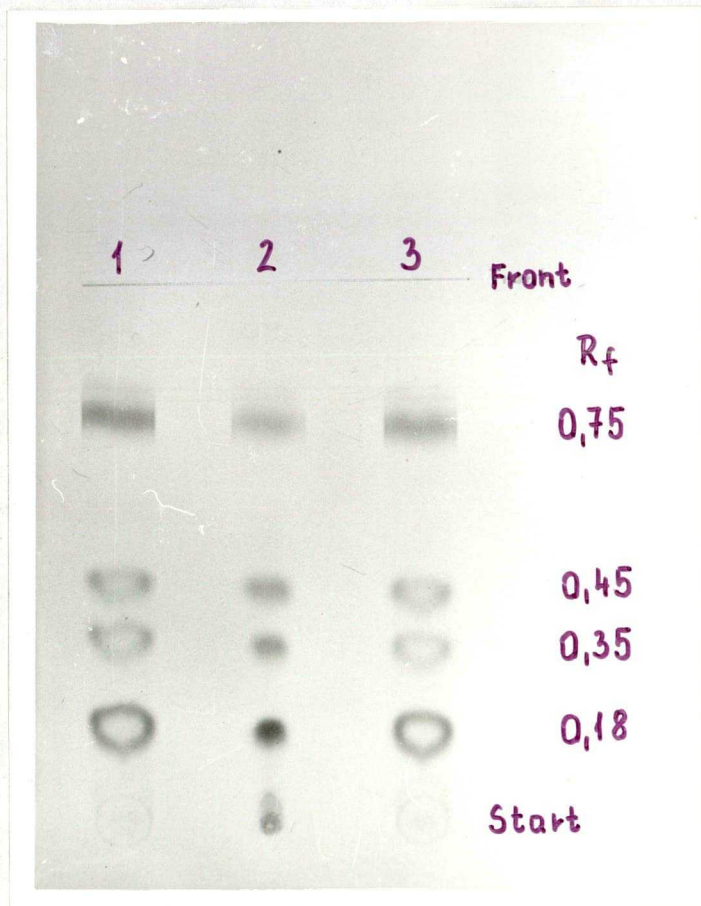
M: M. phlei-ből izolált mikolsav-metilészterek /3.2./

P: palmitinsav-metilészter



20. ábra

M. phlei zsírsav-észtereinek vékonyréteg-kromatogramja



Lemez: Kieselgel G 0,5 mm

Futtató elegy: petroléter - éter = 8:2

Előhívás: röntgen-filmmel

1. 10 µg/ml NYT 105-tel kezelt
2. 11,2 µg/ml NYT 59-cel kezelt
3. Kontroll

14. táblázat

NYT 105 és NYT 59 hatása M. phlei lipid szintézisére és a radioaktivitás R_f szerinti %-os megoszlására

	10,0 μ g/ml NYT105		11,2 μ g/ml NYT 59		Kontroll	
	$\frac{\text{Beütés}}{\text{perc} \cdot \text{mg}}$	%	$\frac{\text{Beütés}}{\text{perc} \cdot \text{mg}}$	%	$\frac{\text{Beütés}}{\text{perc} \cdot \text{mg}}$	%
Összes lipid	453 617	63,07	350 174	48,68	119 214	100,00
R_f	$\frac{\text{Beütés}}{\text{perc}}$	%	$\frac{\text{Beütés}}{\text{perc}}$	%	$\frac{\text{Beütés}}{\text{perc}}$	%
0	17 881	3,84	53 758	14,51	24 561	5,53
0,18	168 476	36,23	134 238	36,23	166 560	37,56
0,35	59 923	12,88	47 845	12,91	47 418	10,69
0,45	54 319	11,68	48 724	13,15	55 058	12,41
0,58	0	0	0	0	0	0
0,75	164 421	35,35	85 866	23,17	149 761	33,77
Összes	465 023	100,00	370 433	100,00	443 360	100,00

esetében, csak a NYT 59-cel kezelt sejteknél feltűnő, hogy a normál zsírsavakból hiányzó 10 % aktivitás a startpontban mérhető többletként.

Következő kísérletünkben megvizsgáltuk, hogy nagyobb /10-szeres/ NYT 59 koncentráció esetén van-e változás a zsírsav szintézisben, és azt, hogy M. phlei esetén reprodukálható-e a M. tuberculosis $H_{37}R_v$ -re leírt mikolsav szintézis gátlás^{58,59}. A kísérlet eredménye a 21. ábrán és a 15. táblázatban látható.

15. táblázat

NYT 59 és INH hatása M. phlei lipid szintézisére és a radioaktivitás R_f szerinti %-os megoszlására

	100 μ g/ml INH		100 μ g/ml NYT 59		Kontroll	
	$\frac{\text{Beütés}}{\text{perc} \cdot \text{mg}}$	%	$\frac{\text{Beütés}}{\text{perc} \cdot \text{mg}}$	%	$\frac{\text{Beütés}}{\text{perc} \cdot \text{mg}}$	%
Összes lipid	930 226	74,80	728 517	58,60	1243 331	100,00
R_f	$\frac{\text{Beütés}}{\text{perc}}$	%	$\frac{\text{Beütés}}{\text{perc}}$	%	$\frac{\text{Beütés}}{\text{perc}}$	%
0	5329	4,39	7318	3,59	16 278	2,84
0,18	6475	5,34	88 981	43,75	253 326	44,23
0,35	2203	1,81	26 914	13,23	65 414	11,42
0,45	2126	1,75	25 023	12,30	84 844	14,81
0,58	0	0	0	0	0	0
0,75	105 047	86,68	55 124	27,10	152 764	26,67
Összes	121 180	100,00	203 360	100,00	572 626	100,00

A 15. táblázat adataiból látszik, hogy 100 μ g/ml NYT 59 koncentráció hatására nem csökkent az össz ^{14}C -acetát beépülés jobban, mint az előző kísérletben alkalmazott 11,2 μ g/ml NYT 59 jelenlétében. A NYT 59 koncentráció növelésével nem lehetett 40-50 %-nál nagyobb össz lipid szintézis gátlást elérni. A NYT vegyület az INH-nál valamivel erősebben csökkentette a ^{14}C -acetát beépülést, vagyis a lipid szintézist.

Az INH a M. phlei-ben is specifikusan gátolta

21. ábra

M. phlei zsírsav-észtereinek vékonyréteg-kromatogramma



1. 100 µg/ml INH-val kezelt

2. 100 µg/ml NYT 59-cel kezelt

3. Kontroll

Lemez: Kieselgel G 0,5 mm

Futtató elegy: petroléter - éter = 8:2

Előhívás: röntgen-filmmel

a mikolsavak szintézisét. A $0,45 R_f$ -ű foltban a kontroll aktivitásának 11,8 %-a, $0,35 R_f$ -nél 15,8 %-a és $0,18 R_f$ -nél 12,1 %-a található meg. Ugyanakkor a normál zsirsavak aktivitásában akkumulációt észleltünk. A kontroll tenyészet normál-zsirsav frakciójának aktivitásához képest a kezelt sejteknél 325 % aktivitás volt jelen. Az INH tehát a *M. phlei* mikolsavjainak szintézisét is gátolja, mégpedig a normál-zsirsavak továbbalakulását blokkolja hosszabb, elágazó szénláncu zsirsavak kialakításához.

A NYT 59-cel kezelt sejtek zsirsavjainak összetétele /a radioaktivitás %-os megoszlása/ nem mutatott eltérést a kontrollhoz viszonyítva.

A kísérleti adatokból megállapíthattuk, hogy a NYT 105 és a NYT 59 kis mértékben gátolták a *M. phlei* össz-lipid szintézisét anélkül, hogy a zsirsavak %-os összetétele megváltozott volna. A gátlás /mivel itt már adott biotin-tartalmu baktériumot vizsgáltunk/, valószínűleg a biotin-enzim működésének gátlásából származott, és nem a biotin bioszintézisének gátlása volt az ok. Mivel a kezelt sejtekben egyik zsirsav-frakcióban sem észleltünk akkumulációt a kontrollhoz viszonyítva, feltehetőleg a zsirsav szintézis első lépésében szerepet játszó biotin-enzim, az acetyl-CoA karboxiláz gátlásáról van szó. A NYT 105 valószínű-

nüleg a biotin karboxilázon, míg a NYT 59 az észtereket jobban kötő karboxil transzferáz alegységen levő aktív helyek egy részét foglalja el, ezáltal gátolja a zsírsav szintézis iniciáló lépését, az acetil-CoA $\rightarrow$ malonil-CoA átalakulást.

5. Összefoglalás

Dolgozatomban a perhidrotiazin származékok, ezek közül részletesen a /3,4,5,6-tetrahidro-4-oxo-2H-1,3-tiazin-2-il/-kapronsav /NYT 105/ hatásmódját vizsgáltam. A vegyületek antimikobakteriális hatása új, az irodalomból nem ismert. A kísérletekben felhasznált módszereket kisebb-nagyobb változtatással más mikroorganizmusokra leírt módszerekből alakítottam ki.

Munkám során az alábbi eredményekre jutottam:

- 1./ A /3,4,5,6-tetrahidro-4-oxo-1,3-tiazin-2-il/-származékok in vitro igen jelentős /ismert tbc-ellenes szerekekkel azonos nagyságrendű/ hatást mutattak *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_v törzs ellen. Az optimális hatáshoz C₅ oldallánchossz szükséges, karboxil vagy karboxil-származék végződéssel. Az alifás karbonsavlánc a hatás elvesztése nélkül helyettesíthető p-fenoxiecetsav-észterrel.

- 2./ A NYT 105 az apatogén *Mycobacterium phlei* szaporodását is gátolta, igen alacsony koncentrációban. A gátlás bakteriosztatikus jellegű volt, biotin hozzáadással vagy inhibitor-mentes táptalajra átváltással a gátlást meg lehetett szüntetni.
- 3./ A NYT 105 *Mycobacterium phlei*re kifejtett hatását a biotin nem-kompetitív módon antagonizálta. 1 mol biotin 10^4 - 10^5 mol NYT 105 hatását tudta kivédeni.
- 4./ A NYT 105 a *Mycobacterium phlei*ben végbemenő deztiobiotin $\rightarrow$ biotin átalakulást kompetitív gátolta. 1 mol deztiobiotin 4-8 mol NYT 105 hatását volt képes kivédeni. Ezzel bizonyítottuk azt is, hogy a *M. phlei*ben is az *E. coli*ra leírt módon, deztiobiotinon keresztül megy végbe a biotin bioszintézise.
- 5./ A deztiobiotin $\rightarrow$ biotin átalakulás kompetitív gátlását NYT 105-tel *Saccharomyces cerevisiae* törzs esetén is kimutattuk. Ez az élesztőgomba kevésbé volt érzékeny a perhidrotiazinokkal szemben, mint a mikobaktériumok. Az eltérés oka a sejtfalon keresztüli áthatolás képességében és/vagy a biotin szintetáz enzim érzékenységében fennálló különbség lehet.

- 6./ A NYT 105 - koncentrációtól függően - csökkentette a biotint nem szintetizáló *Lactobacillus plantarum* biotin-hasznosítását is. A hatást fokozódó biotin hozzáadással teljesen meg lehetett szüntetni. Mivel ebben az esetben nem lehetett szó deztiobiotin → biotin átalakulás gátlásáról, feltételeztük, hogy a NYT 105 nemcsak a biotin bioszintézisét, hanem a vitamin biológiai funkcióját /holoenzim képződését vagy holoenzim működését/ is gátolja.
- 7./ A NYT 105 csökkentette a már jelentős mennyiségű biotinnal rendelkező *Mycobacterium phlei* biotin tartalmát. Kísérleteink szerint nemcsak a szabad biotin ürült ki a sejtből, hanem kötött - erélyes hidrolizis nélkül a mérő organizmus számára nem hozzáférhető - biotin is szabaddá vált. A hatás koncentráció-függő volt, a mikobaktérium kötött biotin tartalma a NYT 105 koncentráció függvényében negatív telítési görbe szerint változott. A biotin a biotin-enzimekhez olyan erősen kötődik kovalensen, hogy csak tömény savas hidrolizissal bontható a kötés. Ezért feltételeztük, hogy a NYT 105 nem ezt a kötést bontotta, hanem az enzim levő másodlagos kötőhelyről szorította ki a biotint. Ilyen kötőhely pl. az acetyl-CoA kar-

boxiláz biotin karboxiláz alegységén található. Ha ezt a helyet a prosztetikus csoport helyett szabad biotin tölti ki, az enzim működését gátolja. Ezért feltételezhetjük, hogy a másodlagos kötőhelynek és a biotinnak reguláló szerepe is van a karboxilációs és transzkarboxilációs folyamatokban.

- 8.// A NYT 105-re rezisztenssé vált *Mycobacterium phlei* külső megjelenése és festődési tulajdonságának megváltozása arra utalt, hogy változás történt a baktérium lipid tartalmában. Ezért megvizsgáltuk a *M. phlei* zsírsav szintézisét NYT 105 jelenlétében. Megállapítottuk, hogy a vegyület hatására a mikobaktérium össz-lipid szintézise kis mértékben csökkent, anélkül, hogy a radioaktivitás százalékos megoszlása az egyes zsírsav-frakciókban megváltozott volna. /Ellentétben az INH-val, amely *M. phlei*-ben is specifikusan gátolta a mikolsavak szintézisét./
- A zsírsav szintézis gátlása - mivel adott biotin tartalommal rendelkező baktériumot vizsgáltunk - valószínűleg a biotin-enzim működésének gátlásából származott. Mivel a kezelt sejtekben egyik zsírsav-frakcióban sem észleltünk akkumulációt a kontrollhoz képest, feltételeztük, hogy a zsír-

sav szintézis első lépésében szerepet játszó enzim, az acetyl-CoA karboxiláz gátlása okozta az összes zsírsav szintézis csökkenését. A NYT 105 valószínűleg a biotin karboxilázon, a NYT 59 az észterekre érzékenyebb karboxil transzferáz alegységen levő aktív helyek egy részének elfoglalásával gátolta a zsírsav szintézis első lépését.

A perhidrotiazinokról megállapítottuk, hogy a Mycobacidine-hez hasonlóan gátolták a biotin bioszintézisét a deztiobiotin $\rightarrow$ biotin átalakulás kompetitív gátlása révén. Ez valószínűleg az antimikobakteriális hatás fő oka. Másrészt kimutattuk, hogy a biotinenzimek funkcióját is gátolták, valószínűleg az enzimen levő másodlagos kötőhelyek egy részének elfoglalása révén. Ha a perhidrotiazinoknál sikerülne erősíteni az ilyen jellegű hatást - pl. különböző oldallánc-helyettesítések bevezetésével - elképzelhető lenne olyan vegyületek kialakítása, amelyek in vivo is hatnak.

6. Irodalom

1. Kögl, F., Tönnis, B.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 1936, 242, 43
2. Melville, D. B., Moyer, A. W., Hofmann, K., Du Vigneaud, V.: J. Biol. Chem. 1942, 146, 487
3. Harris, S. A., Wolf, D. E., Mozingo, R., Arth, G. E., Anderson, R. C., Easton, N. R., Folkers, K.: J. Am. Chem. Soc. 1945, 67, 2096
4. Chemical Constitution and Biological Activity
W. A. Sexton. London E. F. N. Spon Ltd. 1949, 145. o.
5. McLamore, W. M., Celmer, W. D., Bogert, V. V., Pennington, F. C., Sabin, B. A., Solomons, I. A.: J. Am. Chem. Soc. 1952, 74, 2946
6. Pennington, F. C., Celmer, W. D., McLamore, W. M., Bogert, V. V., Solomons, I. A.: J. Am. Chem. Soc. 1953, 75, 109
7. Clark, R. K., Schenk, J. R.: Arch. Biochem. Biophys. 1952, 40, 270
8. Umezawa, H., Oikawa, K., Okami, Y., Maeda, K.: J. Bacteriol. 1953, 66, 118
9. Nyitrai, J., Fetter, J., Hornyák, Gy., Zauer, K., Lempert, K., Koczka, I., Sági, I., Rétháti, Cs.: Tetrahedron 1978, 34, 1031

10. Hamada, Y., Kawashima, M., Miyake, A., Okamoto, K.: J. Antibiotics, Ser. A 1953, 6, 158
11. Fermente . Hormone . Vitamine Vol. III/1, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1974
12. Lezius, A., Ringelmann, E., Lynen, F.: Biochem. Z. 1963, 366, 510
13. Pai, C. H.: J. Bacteriol. 1972, 112, 1980
14. Niimura, T., Shimada, S.: Bitamin 1967, 35, 444
15. Kitahara, T., Hotta, K., Yoshida, M., Okami, Y.: J. Antibiotics 1975, 28, 215
16. Ogata, K., Izumi, Y., Tani, Y.: Agr. Biol. Chem. 1973, 37, 1087
17. Lynen, F.: Bull. Soc. Chim. Biol. 1967, 46, 1771
18. Lane, M. D., Guchhait, R. B., Polakis, S. E., Moss, J.: Paabs Symposium Vol. 1. /Eds.: Gaede, K., Horecker, B. L., Whelan, W. J./ Acad. Press New York-London 1972
19. Polakis, S. E., Guchhait, R. B., Zwergel, E. E., Lane, M. D.: J. Biol. Chem. 1974, 249, 6657
20. Guchhait, R. B., Polakis, S. E., Hollis, D., Fenselau, C., Lane, M. D.: J. Biol. Chem. 1974, 249, 6646
21. Moss, J., Lane, M. D.: J. Biol. Chem. 1972, 247 4952
22. Potter, R. L., Elvehjem, C. A.: J. Biol. Chem. 1948, 172, 531



23. Wakil, S. J., Titchener, E. B., Gibson, D. M.:
Biochim. Biophys. Acta 1958, 29, 225
24. Wakil, S. J., Gibson, D. M.: Biochim. Biophys.
Acta 1960, 41, 122
25. Lynen, F.: Biochem. J. 1967, 102, 381
26. Ravel, J. M., Shive, W.: Arch. Biochem. Biophys.
1955, 54, 341
27. Goldberg, M. W., Sternbach, L. H., Kaisers, S.:
Arch. Biochem. 1947, 14, 480
28. Rubin, S. H., Schneider, J.: Arch. Biochem. 1949,
23, 400
29. Pope, H.: J. Bacteriol. 1952, 63, 39
30. Briggs, M. H.: New Zealand J. Sci. 1960, 3, 72
31. Martin, D. G., Hanka, L. J.: Tetrahedron Letters
1970, 41, 3791
32. Hanka, L. J., Martin, D. G., Reinecke, L. M.:
Antimicrob. Agents Chemother. 1972, 1, 135
33. Field, G. F., Sternbach, L. H.: Ger. Offen. 2,
008,626 /Cl.C. 07d/ 1970
34. Hofmann, K., Axelrod, A.E.: Proc. XI. Intern.
Congr. Pure and Applied Chem. /London/ 1947, 2,
433
35. Axelrod, A. E., Purvis, S. E., Hofmann, K.: J.
Biol. Chem. 1948, 176, 695
36. Farmaceutici Italia Soc. anon. Brit. 811,816
1959

37. di Marco, A., Ghione, M.: Atti Soc. Lombardia
Sci. Med. e Biol. 1956, 11, 395
38. Dittmer, K., du Vigneaud, V.: J. Biol Chem.
1947, 169, 63
39. Rogers, L. L., Shive, W.: J. Biol. Chem. 1947,
169, 57
40. di Marco, A., Zanchi, B., Zavaglio, V.: Sperimen-
tale 1952, 102, 339
41. di Marco, A.: Antibiotics Chemother. 1953, 3, 807
42. Umezawa, H., Oikawa, K., Maeda, K., Okami, Y.:
Japan J. Med. Sci. Biol. 1953, 6, 395
43. Kawashima, M., Hamada, Y., Fujii, S.: Pharm.
Bull. /Japan/ 1953, 1, 94
44. Pittillo, R. F., Foster, J. W.: J. Bacteriol.
1954, 67, 53
45. Jacobsen, P. L., Levi, L.: Antimicrob. Agents
Chemother. 1973, 3, 373
46. Quintin-Jerebzoff: Compt. Rend. 1959, 248, 727
47. Izumi, Y., Fukuda, H., Tani, Y., Ogata, K.:
Biochim. Biophys. Acta 1977, 499, 315
48. Farmaceutici Italia Soc. anon. Brit. 811,780
1959
49. di Marco, A., Ghione, M., Sanfilippo, A., Zavaglio,
V.: Giorn. Microbiol. 1955, 1, 481
50. Minami, K., Honda, T., Goto, S.: Fukushima Igaku
Zasshi 1957, 7, 399

51. Osteux, R., Laturaze, J.: Compt. Rend. 1952, 234, 677
52. Osteux, R., Laturaze, J., Bruck, J., Boulanger, M. P.: Journées méd. Bordeaux, Colloque immuno-chim. 1952, 145; J. Med. Bordeaux 1953, 130, 393
53. Miura, Y., Iwamoto, T.: Kagaku /Science/ 1956, 26, 362
54. Hedgecock, L. W.: J. Bacteriol. 1956, 72, 839
55. Melville, D. B.: Science 1943, 98, 497
56. De Boer, T. J., Backer, H. J.: Recueil 1954, 73, 229
57. Skeggs, H.: Analitical Microbiology /F. Kavanagh ed. Academic/ 1963, 421. o.
58. Winder, F. G., Collins, P. B.: J. Gen. Microbiol. 1970, 63, 41
59. Takayama, K., Wang, L., David, H. L.: Antimicrob. Agents Chemother. 1972, 2, 29
60. Acharya, P. V. N., Goldman, D. S.: J. Bacteriol. 1970, 102, 733
61. Wallhäuser, K. H., Schmidt, H.: Sterilisation, Desinfection, Konservierung, Chemotherapie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1967, 420, 417, 418. o.
62. Dubos, R., Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc. 1947, 56, 334

63. Dittmer, K., Melville, D. B., du Vigneaud, V.:
Science 1944, 99, 203
64. Klinikai Laboratóriumi Diagnosztika /szerk. Dr.
Bálint Péter/ Medicina Könyvkiadó Budapest, 1962,
700. o.
65. Lederer, E.: Angew. Chem. 1964, 76, 241

