

DISS. B 1100

ADATOK A KANNABIDIOLSAV
BIOLÓGIAI HATÁSMÓDJÁHOZ

Doktori értekezés.

Hullán Lehel

1974.



Ezúton is köszönetet mondok mindazoknak, akik
munkámban segítségemre voltak.

Külön szeretnék köszönetet mondani Dr.F e r e n c z y
L a j o s egyetemi tanárnak, Dr.H o l c z i n g e r L á s z l ó
h.tudományos igazgatónak, Dr.K e l l n e r B é l a akadémikusnak,
Dr.N o v á k E r v i n tudományos osztályvezetőnek, Dr.P e r é n y i
T i b o r tudományos főmunkatársnak és Dr.T u r t ó c z k y
I s t v á n egyetemi adjunktusnak szakmai irányításukért és tá-
mogatásukért.

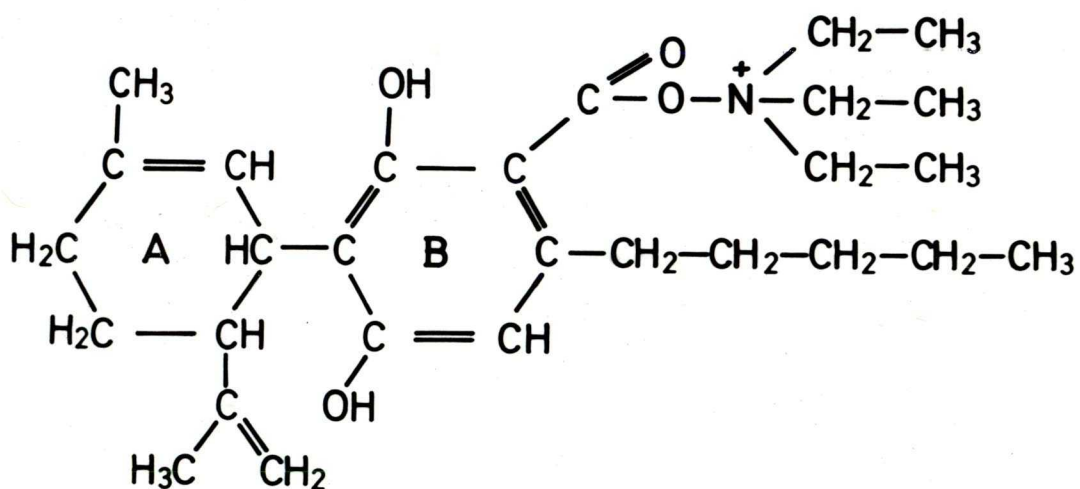
Végül megköszönöm Besztercei Anikó vegyésztechnikusnak
a kísérleti munkában való részvételét.

B E V E Z E T É S

A kannabidiolsav /CBS/ /1.ábra/ a kenderben /Cannabis sativa L./ található C_{21} -tagszámú gyűrűs vegyületcsoportba, a kannabinoidok /2.ábra/ közé tartozik. A vegyületcsoport legjobban ismert tagjai a tetrahidrokannabinolok, a Δ^1 -THC /III/ és a $\Delta^{1/6}$ -THC /IV/, amelyek a hasis /marihuana/ kábítószer hatóanyagai. A kannabinoidok közé egy izociklikus /pl.: kannabigerol /X/ /, két izociklikus /CBS/II/ /, egy izociklikus és egy heterociklikus /kannabichromén /XIII/ /, valamint két izociklikus és egy heterociklikus gyűrűt /THC /III/ / tartalmazó vegyületek tartoznak. A B gyűrű /1.ábra/ minden kannabinoidnál megvan és minden esetben aromás, az A gyűrű, ha megvan lehet aromás is, mint a kannabinolnál /VII/, de a legtöbb esetben csak egy kettős kötést tartalmaz. A heterociklikus gyűrű az egy oxigént tartalmazó hattagú pirángyűrűnek felel meg.

A kannabinoidok származtatása és ennek megfelelően a gyűrűszámozás nem egységes. Amikor a kannabinol szerkezete ismertté vált Adams /Adams 1941-1942./ és mások a dibenzopirán nomenklaturát használták, míg Todd /Todd 1946./ a pirán gyűrű heterostomjától indította a számozást. Később többen a kannabidiol típusu vegyületeket, mint difenil származékokat fogták fel /Kabelik, Krejci és Santavy, 1960; Korte, Sieper és Tira, 1965/. A legújabb irodalomban a kannabinoidokat a monoterpének szubsztituált származékainak tekintik /Mechoulam és Gaoni, 1967; Farnsworth, 1969/, ezért a disszertációban a monoterpén számozást követtem.

Az indiai és az európai kenderben /*Cannabis sativa* L. var. *indica*, illetve var. *non-indica*/ egyaránt megtalálhatók a kannabinoidek, elsősorban a növény ágcsúcsában és ennek gyantájában. A kétféle kender összetétele azonban eltérő. A kábítószer hatású THC csak az indiai kenderben található meg, az európai kenderben a kannabidiol és a CBS dominálnak. A botanikai ékek mellett a drog összetételét éghajlati tényezők is befolyásolják.

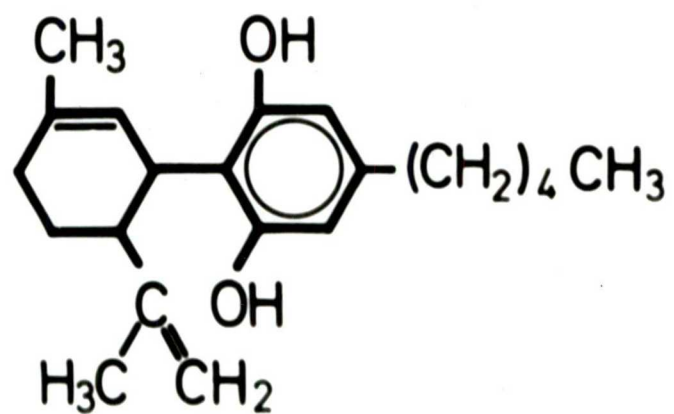


1. ábra.

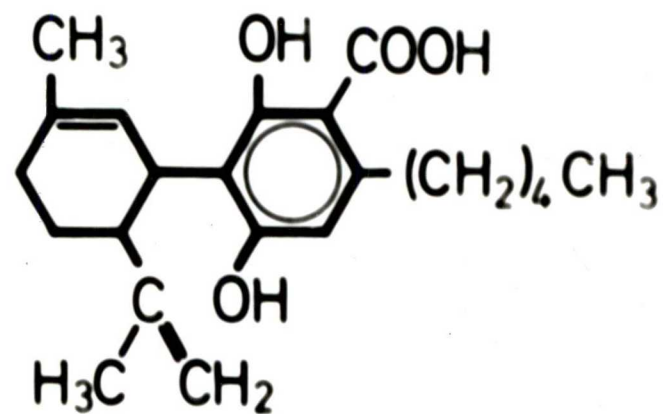
A kannabidiolsav-trietilamin képlete.

2.a. ábra.

A kannabinoidek szerkezeti képlete. I.
kannabidiol /I/, kannabidiolsav /II/.



I.



II.

Mechoulam és Gaoni egy hashis mintában az alábbi összetételt találták: kannabidiol /I/ 4 %, CBS /II/ 3,25 %, Δ^1 -THC /III/ 0,4 %, kannabinol /VII/ 1,2 %, kannabinolsav /VIII/ 0,25 %, kannabigerol /X/ 0,3 %, kannabigerolsav /XI/ 0,5 %, kannabichromén /XIII/ 0,1 % és kannabiciklol 0,1 % /Mechoulam és Gaoni 1967/.

A Cannabis extraktumok gyakorlati felhasználását - mint al-
tatót a sebészetben - már egy 2000 éves kínai forrás is említi. Ká-
bitószerként az arab hódítások során terjedt el a Közel-Keleten és
Észak-Afrikában. Európában Napóleon egyiptomi hadjárata után ismer-
ték meg és az orvosi gyakorlatban közel egy évszázadig használták
fájdalomcsillapító és nyugtató hatása miatt. A népgyógyászat is fel-
használta a kender kivonatok analgetikus, valamint antiszeptikus
tulajdonságait. Az újabb időkben a drog gyógyászati alkalmazása
háttérbe szorult, viszont mint tiltott kábítószer az egész világon
elterjedt.

A kannabinoidok kémiájával kapcsolatos első cikk több mint
130 éve jelent meg /Bohlig, 1840/. Az első kristályos vegyületet - a
kannabinol acetátját - 1899-ben állították elő /Wood, 1899/. A foly-
tatás viszonylag sokáig, 1940-ig váratott magára, amikor két munka-
csoport egymástól függetlenül megállapította és szintézissel igazol-
ta a kannabinol /VII/ szerkezetét /Adams, Baker és Wearn, 1940;
Ghosh, Todd és Wilkinson, 1940/. További fontos eredmény a kannabi-
diol /I/ izolálása, amelynek pontos szerkezetét akkor még nem tudták
megállapítani, valamint több kábítószer hatású analóg szintetikus
előállítását /Adams, Pease és Clark, 1940; Adams, 1941-1942; Adams,
MacKenzie és Loewe, 1948; Todd, 1946/.

A pszichotomimetikusan aktív komponenseket, ami a Δ^1 -THC /III/ és $\Delta^{1/6}$ -THC /IV/ keveréke, az indiai kenderből nyert ugynevezett "vörös olaj" acetilezését követően frakcionált desztillációval sikerült többé-kevésbé tisztán izolálni. A petroléteres extraktum savanyu frakciójának főkomponensét a CBS-t /II/ több kutatócsoport egymástól függetlenül találta meg és ismerte fel antibakteriális tulajdonságát növényi extraktumok baktériumokon való "screen" jellegű vizsgálata során /Ferenczy, 1956; Ferenczy, Gracza és Jakobey, 1958; Drobotko, Rasba és Ajzenman 1957; Schultz és Haffner 1958; Kabelik, Krejci és Santavy 1960/. Az utóbbi években különféle kromatográfiás módszerekkel izolálták a kenderben található többi kannabinoidot /2.ábra/, valamint nem-kannabinoid terpéneket, fenolokat, cukrokat és nitrogén bázisokat /cholin, trigonellin/ mutattak ki ezek mellett. /De Ropp, 1960; Gaoni és Mechoulam, 1964, 1964 a; Mechoulam és Gaoni, 1965; Korte és Sieper, 1960; Korte, Haag és Clausen, 1965; Korte, Sieper és Tira, 1965/.

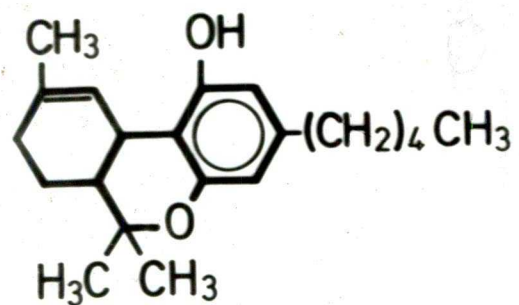
A CBS kristályos előállítása komoly nehézségekbe ütközött. Ezt Ferenczynek és munkatársainak /Ferenczy, Gyöngy, Szabó, 1959/ sikerült megoldani. A híg, vizes lúggal, vagy szerves oldószerrel történő extrakció után kapott gyantát alkoholban feloldva a CBS-t alifás terciér aminokkal, legalkalmasabban trietilaminnal képzett sója formájában kristályosították. A CBS-trietilamin savas megbonthatása után a CBS-t kristályosan elő tudták állítani.

A CBS $C_{22}H_{30}O_4$ szerkezetét, mivel dekarboxilezve kannabioldiolá alakul - a difenil számozást használva - korábban

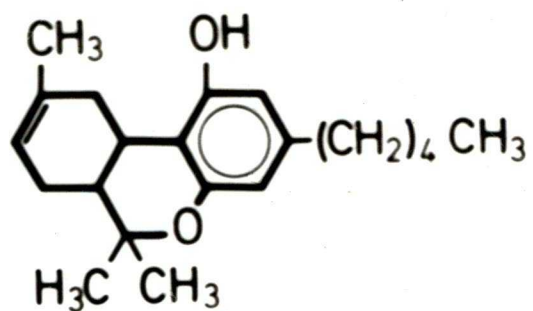
2.b. ábra.

A kannabinoidek szerkezeti képlete. II.

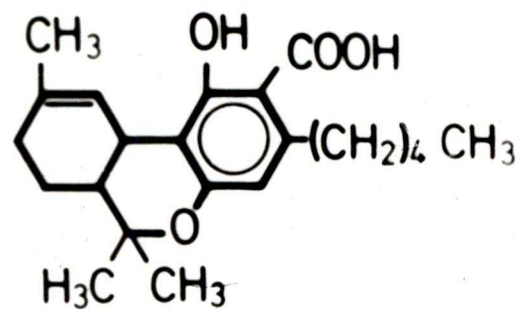
Δ^1 -tetrahidrekannabinol /III/, $\Delta^{1/6}$ -tetrahidrekannabinol /IV/,
tetrahidrekannabinolsav /V/, kannabidiolsav-tetrahidrekannabitriol-
észter /VI/.



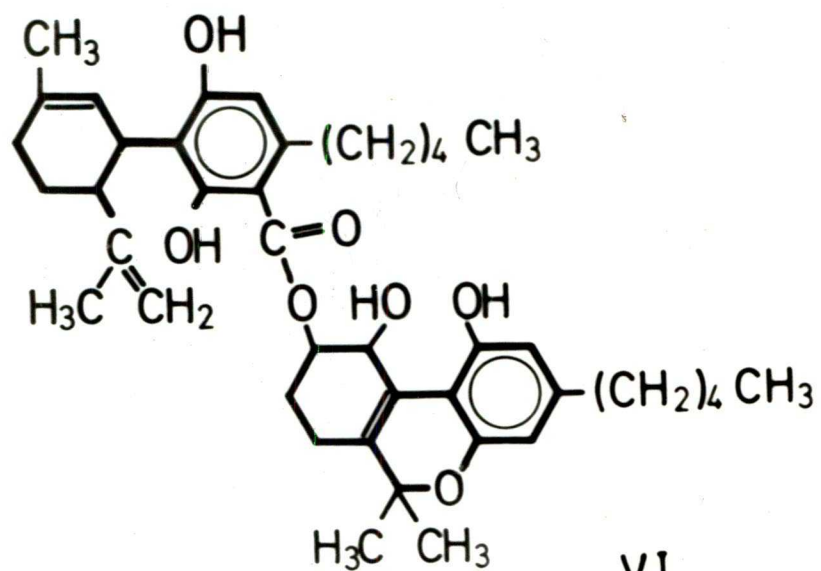
III.



IV.



V.

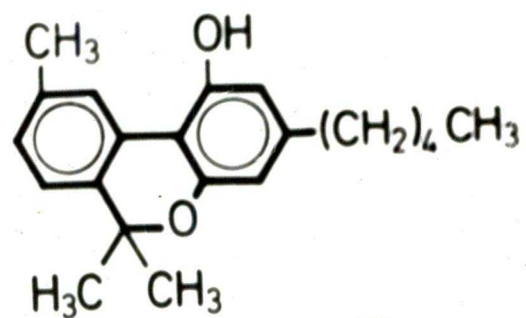


VI.

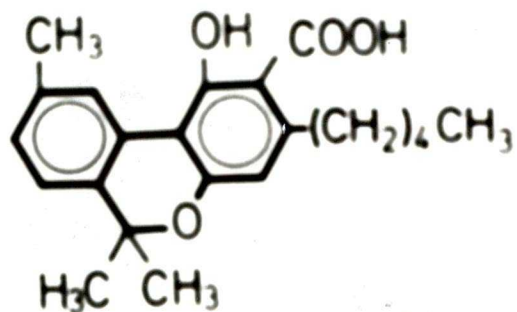
2.c. ábra.

A kannabinoidek szerkezeti képlete. III.

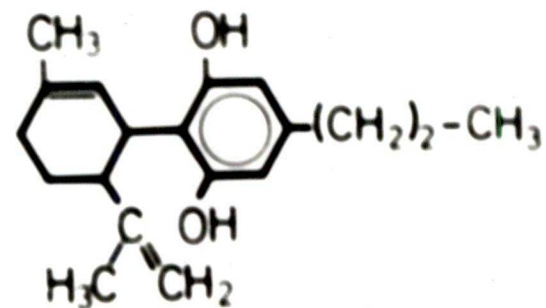
kannabinel /VII/, kannabinolsav /VIII/, kannabidivarin /IX/,
kannabigerol /X/, kannabigerolsav /XI/, kannabigerolmenometil-
éter /XII/, kannabichromén /XIII/, kannabichroménsav /XIV/.



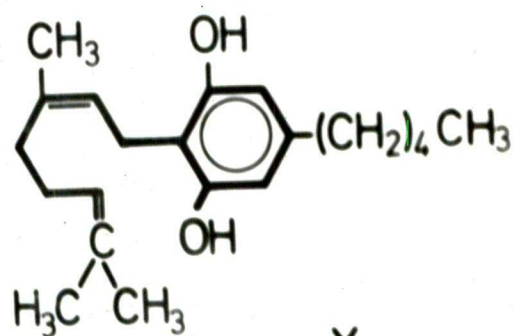
VII.



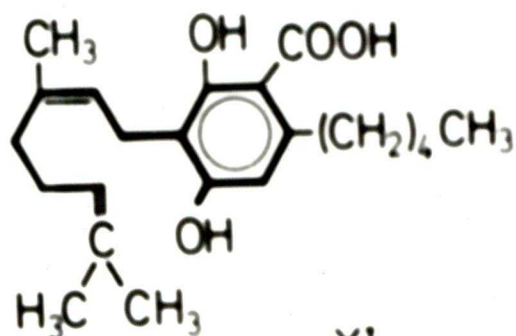
VIII.



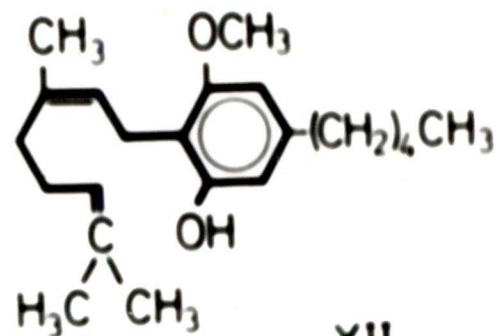
IX.



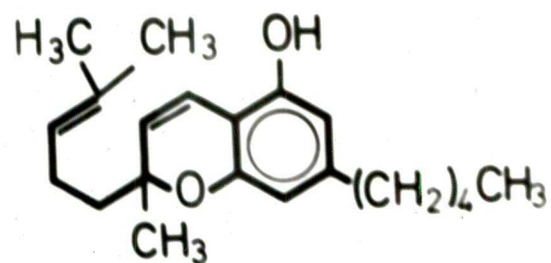
X.



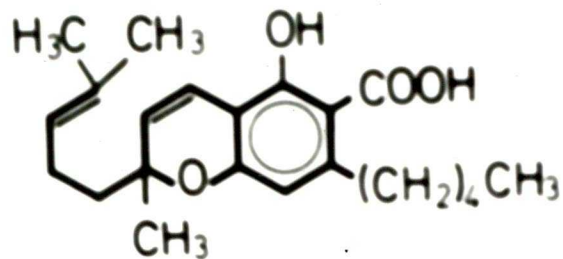
XI.



XII.



XIII.



XIV.

3-metil-6-izopropenil-4'-n-pentil-2',6'-dihidroxi-1,2,3,6-tetrahidrofenil-3'-karboxi-savnak gondolták /Krejci, Horák és Santavy, 1959; Schultz és Haffner, 1959/. Időközben a kannabidiol /I/ szerkezetét NMR vizsgálatok alapján módosították /Mechoulam és Shvo, 1963/. Az A gyűrűben lévő kettős kötés nem a Δ^5 , hanem a Δ^1 helyzetben van és az izopropenil oldallánc $\angle$ térállású, aminek megfelelően a CBS szerkezete is módosult /II/ /Mechoulam és Gaoni, 1965/. A B gyűrűben a karboxilcsoport 3' pozícióját, amelyet a CBS-acetát infravörös spektruma alapján állapítottak meg /Krejci, Horák és Santavy, 1959; Schultz és Haffner, 1959/, az NMR vizsgálatok megerősítették /Mechoulam és Gaoni, 1965/.

A CBS molekulatömege: 358. Vízben nem, szerves oldószerben korlátozott mértékben oldódik.

A kristályos CBS színtelen, olvadáspontja 48°C , optikai forgatóképessége $[\alpha]_D^{25} = -112^\circ$. A CBS trietilammal ugyancsak színtelen túlkristályokat ad, olvadáspontja 160°C /Perenczy, Gyöngy, Szabó, 1959/. A CBS-diacetát kristályok olvadáspontja $126-8^\circ\text{C}$ /Kabelik, Krejci és Santavy, 1960/, a CBS-metilészter, mono-3,5-dinitrobenzoáté $173-5^\circ\text{C}$ /Mechoulam és Gaoni, 1965/. A CBS-metilészter etanolban felvett ultraibolya spektrumára Mechoulam és Gaoni a fenti cikkben az alábbi adatokat közölték:

nm	
224	23.100
271	12.000
304	4.530

A CBS-diacetát, valamint a CBS-metilészter infravörös és

mágneses magrezonancia spektruma az irodalomban szintén megtalálható /Mechoulam és Gaoni, 1965; Kabelik, Krejci és Santavy, 1960/.

A CBS kémiai tulajdonságaival eddig kevesen foglalkoztak, de mivel hig lúgban, szobahőn igen gyorsan dekarboxileződik, reakciói szinte megegyeznek a kannabidiol /I/ reakcióival. Alkoholos KOH-dal szobahőn kannabidiolon /I/ keresztül pillanatszerű reakció során hidroxikinon származékká /XV/ és ennek dimerjévé /XVI/ oxidálódik /3.ábra/. Ez a reakció az alapja a kannabinoidok analitikájában a század eleje óta használt, de ma is igen fontos Beamtesztnek /Mechoulam, Ben-Zvi és Gaoni, 1968/.

Kannabidiolt alkoholban hig sósavval forrálva több-féle reakció zajlik le: a C₈/ pozícióban ciklizálódva kialakulhat a pirol-gyűrű, a Δ^1 kettős kötés a $\Delta^{1/6}$ helyzetbe kerülhet, a kettős kötés alkoholt addicionálhat, valamint belső éter képződhet, így az említett reakcióknak, illetve ezek kombinációinak megfelelő vegyes termék keletkezik /Gaoni és Mechoulam, 1966/.

Ferenczy leírta, hogy katalitikus hidrogénezéssel telítette a CBS-t, valamint az A gyűrűt lehasította a B gyűrűről /Ferenczy, 1966/. Az utóbbi reakció megfelel a kannabidiol /I/ piridinhidrokloriddal 220°C-on leírt reakciójának, amikor az p-cimenné és olivetollá hasadt szét /Adams, Hunt és Clark, 1940/.

A CBS aromás nukleuszán elhelyezkedő poláris szubsztituensek, a két fenolos hidroxil és a karboxilcsoport természetesen adják az ilyen típusu csoportokra jellemző reakciókat. Láthattuk, hogy a vegyület izolálásában döntő szerepe volt a karboxilcsoport észterezésének, valamint aminokkal képzett sójának, illetve a fenolos hidroxilekkel kapott diacetátnak.

A kannabinoidok biológiai hatásukat illetően jelentős változatosságot mutatnak, ami annál is szembeütőbb, mert viszonylag kis különbség az egyes kannabinoidok molekulaszervezetében lényegesen eltérő biológiai hatást eredményez. Ebből a szempontból azonban a legtöbbet közülük csak részlegesen, igen sokat pedig egyáltalán nem vizsgáltak. Jellemző, hogy eddig két természetes komponens, a Δ^1 -THC /III/ és a $\Delta^{1/6}$ -THC /IV/ bizonyult hallucinogénnek és annak ellenére, hogy érthető módon a legtöbb vizsgálatot ebből a szempontból végzik, az eddig izolált kannabinoidok felét sem erre, sem egyéb biológiai tulajdonságaira nem vizsgálták. A hallucinogén hatás mellett a THC /III, IV/ kutyában ataxiát vált ki, amit ma állatkísérletben a hallucinogén hatás legvalószínűbb indikátorának tartanak.

Több kannabinoid, köztük a CBS, antibakteriális tulajdonságu. Ferenczy, valamint Kabelik munkacsoportja egyaránt kimutatták, hogy a CBS in vitro Gram-pozitív baktériumokkal szemben baktericid, gram-negatív baktériumokra, élesztőkre és egyéb gombákra nincs hatással /Ferenczy, Gracza és Jakobey, 1958; Kabelik, Krejci és Santavy, 1960/. A CBS antibakteriális hatásával kapcsolatosan többek között az alábbi mikroorganizmusokat vizsgálták meg: a *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pneumococcus* sp., *Sarcina flava*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus haemolyticus* Gram-pozitív baktériumokkal szemben a CBS baktericid volt, viszont az *Aerobacter aerogenes*, *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas paratyphi*, *Shigella flexneri*, *Shigella shiga*, *Shigella sonnei*, *Streptomyces griseus* és *Xanthomonas malvacearum* Gram-negatív baktériumokra,

Hansenula sp., Rhodoterula rubra, Saccharomyces cerevisiae élesztőkre, különböző Aspergillus és Penicillium gombákra nem volt hatással. /Ferenczy, 1956; 1956 a; Ferenczy, Gracza és Jakobey, 1958; Kabelik, Krejci és Santavy, 1960/. Gyakorlati szempontból különösen fontosnak látszik a számos antibiotikummal és dezinficienssel szemben ellenálló Mycobacterium tuberculosisra való antibakteriális hatása.

A CBS-en kívül az eddig vizsgált kannabinoidek közül a kannabidiol /I/, a kannabigerol /X/, a kannabigerolsav /XI/ volt antibiotikus hatása, amely mindhárom esetben a Gram-pozitív baktériumokra korlátozódott /Mechoulam és Gaoni, 1965/. A Méggy anyagnak ugyancsak közös tulajdonsága, hogy in vivo, valamint különböző növényi és állati fehérjék jelenlétében a Gram-pozitív baktériumokkal szemben is hatástalanok voltak.

A CBS-nek szedatív hatása is ismert /Schultz és Haffner, 1958, 1959/. A kannabinoidek közül a CBS-en kívül eddig csak a Kannabichromént találták szedatívnak. Biztosan nem pszichotomimetikum a kannabidiol /I/, a CBS /II/, a kannabinol /VII/, a kannabigerol /X/ és a kannabichromén /XIII/. Az utóbbi annak ellenére nem hallucinogén, hogy kutyán ataxiát vált ki. A tetrahidrokannabinolsav /V/, a kannabidiolsav-tetrahidrokannabitriolészter /VI/, a kannabinolsav /VIII/, a kannabigerolmonometiléter /XII/, a kannabidivarin /IX/, a kannabichroménsav /XIV/, a kannabiciklol, valamint a kannabel biológiai aktivitását eddig még alig, vagy egyáltalán nem vizsgálták, és az utóbbi két vegyületnek a szerkezete sem tisztázott.

Drobotko, Ferenczy, Kabelik és mások széleskörű screen-vizsgálatok során kimutatták, hogy nem csekély azoknak a növényeknek a száma,

amelyek antiseptikus anyagokat termelnek /Drobotko és mtsai., 1951; Ferenczy, 1956; 1956 a; 1956 b; Kabelik, Krejci és Santavy, 1960/. Ezeket az anyagokat mevezhetjük fitoncideknek, vagy antibiotikumoknak is, amióta Gale az antibiotikumokat általában az élő szervezetek által termelt antimikróbás anyagokként definiálta /Gale, 1963./ A fitoncideknek az antibiotikumokkal való összevetése azért rendkívül hasznos, mert az antibiotikumokhoz hasonlóan a fitoncidek esetében is nagyszámu, bonyolult és változatos szerkezetű vegyülettel állunk szemben, amelyek rendszerezése célszerűbb a hatásmód, mint a kémiai szerkezet alapján. Ezenkívül egy fitoncid kísérletes vizsgálata során igen hasznos az antibiotikum irodalom analógiáinak ismerete.

A fitoncidek többnyire a Gram-pozitív baktériumokkal szemben hatásosak. Előfordulásuk nem kötődik szorosan egy-egy rendszertani egységhez, de különösen az Abiataceae, Chenopodiaceae, Cupressaceae, és Moraceae családokhoz tartozó genusokban gyakoriak. A Cannabis sativa L. is az egyik említett család, a Moraceae tagja. Legtöbb fitoncid a maghéjban, vagy a termés külső rétegében található /Ferenczy, 1956; 1956 a; 1956 b/, de a CBS-t a magon kívül a növény virágzatában és leveleiben is kimutatták /Martinec és Felklová, 1959/.

A CBS-t a nagyszámú fitoncid közül kiemeli széles hatásspektruma, a hatásos dózis kis mennyisége, alacsony toxicitása és az a tény, hogy nagymennyiségben, olcsón rendelkezésre álló nyersanyagból, egyszerű eljárással /Ferenczy, Gyöngy és Szabó, 1959/ állítható elő. Ugyanakkor kemoterápeutikumként való felhasználását megakadályozta, hogy in vivo a CBS nem mutatott antimikróbás hatást.

Még a legismertebb antibiotikumok esetében is gyakran visszatérő, kényszerű megállapítás, hogy a nagyszámu kísérlet ellenére a kemoterapeutikum pontos hatásmechanizmusára nem derült fény. Valamilyen droggal kezelt baktériumsejtben számtalan, jól mérhető változást lehet kimutatni, de azt a kérdést, hogy ezek okai, vagy következményei a szer antimikróbás hatásának, igen nehéz eldönteni. A hatásmechanizmus vizsgálatok azonban nemcsak egy elvileg nehezen megoldható probléma meg-megújuló ostromát jelentik, hanem olyan munkát, amely a gyakorlat számára több szempontból is igen értékes eredményeket szolgáltat. tathat.

Egy vegyület kemoterapeutikumként való biztonságos és hatékony alkalmazása megköveteli mind a baktérium, mind a szervezet sejtjeiben bekövetkező változások ismeretét, tekintet nélkül ezek primer vagy szekunder jellegére. Különösen fontos ez az egyre gyakrabban alkalmazott kombinált kemoterápiában. Több olyan példa ismert, hogy egyes gyógyszerek inaktiválják egymást. Korábban jelentéktelennek tűnő mellékhatások együtt drámai hatást válthatnak ki a kezelt szervezetben, de lehetséges ilyen mellékhatások igen előnyös kombinációja is.

A hatás és a kémiai szerkezet közötti összefüggés tisztázása a hatékonyabb származékok előállítása szempontjából hasznos. Különösen fontos a kémiai struktúra szerepének vizsgálata egy olyan anyag, mint a CBS esetében, amely in vitro baktericid hatását, in vivo nem mutatja.

Az antibiotikumoknál, illetve más - például a daganatellenes - szereknél a rezisztencia kialakulásának oka, valamint az ez ellen való védekezés szoros kapcsolatban van a hatásmód vizsgálatokkal.

Gyakorlati célokkal csak közvetve kapcsolatos, de az alapkuta-

tásban igen lényeges az a szempont, amit elsőként Hotchkiss vetett fel, hogy a különböző drogok hatásának vizsgálata az egyik legalkalmasabb eszköz az anyagcserének, a regulációnak, tehát magának a kísérleti objektumnak a megismerésében /Hotchkiss, 1946/.

--- --

A kannabinoidoknak rendkívül kiterjedt irodalma van. Jellemző, hogy 1967-ben egy közel 2000 közleményt feldolgozó összeállítás jelent meg /Mechoulam és Gaoni, 1967/. Ezeknek a közleményeknek a használhatósága viszont korlátozott, mert nagy részük a növény egyéb anyagai is tartalmazó kábítószer preparátumokkal kapcsolatos. A kannabinoidok tisztítási, főleg kristályosítási nehézségei csak az utóbbi években oldódott meg, de az izolált kannabinoidokat is, rossz vízoldékonyságuk miatt, biológiai rendszerekben meglehetősen nehéz vizsgálni. Ez lehet a magyarázata annak, hogy eddig elig történtek vizsgálatok az antimikrobiális, de még a hallucinogén kannabinoidok hatásmechanizmusával kapcsolatban is. A kristályos CBS megléte és a vele kapcsolatos fizikai, kémiai és mikrobiológiai adatok ismeretében célul tűztük ki a CBS hatásmódjának, valamint in vivo hatástelenné válásának vizsgálatát. Kísérleteinket, amelyeket nemcsak a korábban kifejtett elvi nehézségek korlátoztak, hanem az is, hogy a CBS-en kívül sem más természetes kannabinoid, sem származékvegyületek, illetve jelzett vegyületek nem álltak rendelkezésre, a CBS hatásmechanizmus vizsgálatának kezdeti lépéseként tekintjük. A CBS kémiai szerkezete és fizikai-kémiai tulajdonságai alapján elképzelhető volt, hogy hatásmódja hasonló a membránkárosító, úgynevezett detergens antibiotikumok, illetve a baktericid detergensnek hatásmechanizmusához, ezért elsősorban a CBS hatásának ezzel a hatásmóddal való egyezését, illetve ettől való eltérését kívántuk vizsgálni.

KISÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.

2.1 A vizsgálatokhoz használt baktériumtörzsek.

Kísérleteinkben a *Bacillus subtilis* Marburg Yale és az *Escherichia coli* B. törzseket használtuk. Baktérium törzseink az ELTE TTK Származás- és Örökléstani Intézetének törzsgyűjteményéből származnak.

2.2 Táptalajok, tenyésztési módszerek.

A baktérium törzseket az alábbi összetételű hus ferdeagaron tartottuk fenn:

1000 ml húslé kivonat
10 g pepton /Richter/
3 g NaCl
2 g Na_2HPO_4
20 g agar

A sterilizést autoklávbán 120°C -on, 20'-ig végeztük.

A húslé kivonat készítése:

Zsirtól, inaktól megtisztított marhahúst ledarálunk, 500 g-ot 24^{h} -ig 1000 ml desztillált vízben, 5°C -on inkubálunk, az anyagot szűrjük, autoklávozzuk, majd ismét szűrjük.

A tenyészeteket kísérleti célra Difco Nutrient Broth /NB/ táptalajon állítottuk elő.

<u>NB:</u>	Difco beef extract	0,3 %
	Difco bacto pepton	0,5 %
	NaCl	0,5 %

A táptalaj pH-ját NaOH-val pH 7,0-re állítottuk be.

A sterilizálást 120°C-on, 20'-ig végeztük.

A minimális gátlási koncentráció megállapításához és a növekedési görbék felvételéhez a minimál glükóz /MG/ táptalajt használtuk /Anagnostopoulos és Spizizen, 1961/:

<u>MG:</u>	$\text{NH}_4/2\text{SO}_4$	0,2 %
	K_2HPO_4	1,4 %
	KH_2PO_4	0,6 %
	Na-citrát x $2\text{H}_2\text{O}$	0,1 %
	MgSO_4 x $7\text{H}_2\text{O}$	0,02 %
	glükóz	0,5 %

A táptalaj pH-ja 7,0. A sterilizést 120°C-on, 20'-ig végeztük.

A glükózt 110°C-on külön steriliztük és a megfelelő mennyiséget az oltás előtt adtuk a táptalajhoz.

Tenyészeteinket 37°C-on, rotációs rázógépen növesztettük úgy, hogy 1 napos húsferdéről oltott, egy éjszaka növesztett inokulumokból oltottunk tovább és az így nyert tenyészeteket 3-4 órás növekedés után használtuk fel.

A sejteket a kísérlet céljának megfelelő pufferrel, vagy fiziológias sóoldattal kétszer mostuk. A mililiterenkénti sejtszámot ugyancsak a kísérlet céljának megfelelően az 530 nm-en mért optikai denzitás alapján állítottuk be. A mérhető optikai denzitásokhoz tartozó sejtszámokat logaritmikus fázisu tenyészetből, megfelelően hígított sejtszuszpenziók NB agarlemezen kinövő telepeinek számolásával határoztuk meg.

2.3 A kannabidiolsav és kimutatási módszerei.

Kísérleteink során használt vegyszerek a CBS kivételével kereskedelmi készítmények voltak. A kannabidiolsavat Dr.Ferenczy Lajos izolálta Cannabis sativa magokból. A preparátum rétegekromatográfiásan többféle szolvens rendszerben egységes volt és ultraibolya abszorpciós spektruma sem utalt szennyezésre.

A kristályos vegyület trietilaminnal képzett sója formájában állt rendelkezésre /1.ábra/. A kísérleteket a CBS-TEA vegyülettel végeztük, ezért az egyes kísérletek során megfelelő molaritásban, a trietilamin esetleges hatását is kontrolláltuk.

A trietilamin szintelen, ammóniára emlékeztető szaga, olajos folyadék. Molekulasúlya: 101, így a CBS-TEA vegyület molekulásúlya: 486. A desztillált trietilamint sötét üvegben, fém nátriumon tartottuk és felhasználás előtt szűrtük.

A kísérletek tervezésénél és kivitelezésénél igen nagy nehézséget jelentett a CBS rossz vízdékonysága. A legtöbb esetben a vegyület 11 mM-os /5 mg/ml/ etanolos oldatát készítettük el és a vizsgált rendszerbe, vagy közvetlenül ebből, vagy ennek az oldékonyság miatt minimálisan tízszeres, desztillált vizes hígításából mértük be a megfelelő mennyiségeket. A fentiekből következik, hogy a tesztnek megfelelő koncentrációban nemcsak trietilaminos, hanem etanolos kontrolokat is alkalmaznunk kellett és a kísérletek során vizsgálható CBS koncentrációkat nemcsak a drog oldékonysága, hanem a vizsgált rendszer alkohol érzékenysége is limitálta.

A kannabinoidokra leírt analitikai eljárásokra erősen rányomják a bélyeget a kábitószerhatású vegyületek jellegzetességei. A kábitószerекnél a kvantitatív mérés igénye háttérbe szorul a gyors, biztos, kvalitatív kimutatás fontossága mellett. A kannabinoidok kimutatására relative sok, többé-kevésbé specifikus színreakció ismert /Beam, 1911; Ghamrawy, 1937; Duquenois és Negm, 1938; Vierhover, 1939; Rathenasinkam, 1948; Novák, Buzás és Tóth, 1962; Grlic, 1964; Machata, 1969; Caldas, 1970; Fulton, 1970/. Az utóbbi 60 év során közölt sokféle reakció sajnos nem jelenti azt, hogy jó mérési módszerek állnak rendelkezésre, hanem a friss közlemények azt jelzik, hogy ezeket még mindig keresik. A legszélesebb körben az említett kimutatási módok közül a Beam-reakció és a Duquenois-Negm reakció használatos. Az előbbi a rendkívül egyszerű reagens ellenére /5 % KOH etanolban/ meglepően specifikus /Grlic, 1964/, míg az utóbbi, amelynél a reagens vanillin, acetaldehid és etanol sósavas oldata, kevésbé specifikus, de érzékenyebb, mint a Beam-reakció.

A vegyület-csoport kvalitatív, vagy szemikvantitatív kimutatásra igen gyakran alkalmaznak rétegekromatográfiás elválasztás után különböző reagenseket, mint KMnO_4 /Kabelik, Krejci és Santavy, 1960/, vagy Echtblausalz B /di-o-anizidin-tetrazóliumklorid/ /Korte és Sieper, 1964/. Ujabban egy érzékeny és specifikus reakciót talált a kannabinoidokra Maunder Fast Blue B-vel /3,3'-dimetoxi-bifenil-4,4'-bisz/diazóniumklorid/, amit rétegekromatogramon szemikvantitatív célokra, valamint hasis kimutatására alkalmas gyorsesztként egyaránt alkalmaztak /Maunder, 1969; 1969 a; /.

A réteglapokat sokféle szelvens rendszerben futtatják, pl. pentán-éter = 88:12 /Kabelik, Krajci és Santavy, 1960/, éter-petroléter = 1:4 /Mecheulam, Shany, Edery és Grunfeld, 1970/, vagy petroléter-dietilamin = 99:1 /Petceff, 1971/. Kerte és Sieper a jobb elválás érdekében a réteglapokat dimetilfermamid-dal impregnálta és cyclohexánnal futtatta /Kerte és Sieper, 1964/, Grlic hasonló ekekből aminekkal, illetve ezüstnitráttal kezelt réteglapokat ajánl. Legújabbán Petceff egy igen gyors szemikvantitatív módszert dolgozott ki /Petceff, 1971/. A mintákat Silica géllal töltött kisméretű eszlepekre viszi fel és az elválasztást centrifugális erő alkalmazásával teszi gyorsabbá és tökéletesebbé.

Mint sok más vegyület-csoportnál, a kannabinoidek analitikájában is az utóbbi években jelentős szerephez jutott a gázkromatográfia /Familie és Davis, 1961; Caddy, 1967; Mecheulam, Shani, Edery és Grunfeld, 1970; Robinsen, 1971/.

Egy másik modern analitikai módszer betörését jelentheti erre a területre az az újabban közölt felismerés, hogy a kannabinoidek nagy része almasavval való kondenzáció után fluorimetriáson mérhető /Bullock, 1970/.

A cannabis hatóanyagok analitikáját egészen vázlatosan áttekintve is kitűnik, hogy a CBS kimutatására többféle lehetőség kínálkozik. Kísérleteink analitikai igénye két szempontból lényegesen eltért a kannabinoideknál általában használt módszerektől. Az egyik, hogy a cannabis anyagok keveréke helyett kristályos kannabidiolsavval dolgoztunk, a másik, hogy kísérleteinkben nem elégedhettünk

meg a CBS kvalitatív kimutatásával, hanem feltétlenül szükséges volt ennek megbízható kvantitatív mérése is.

Az a tény, hogy tiszta anyaggal dolgoztunk, módszereinket egyszerűsítette, ami különösen a CBS rétegekromatográfiás kimutatásában volt hasznos. Az elválasztásokat Kieselgel HF₂₅₄ adszorbensen, a laboratóriumunkban egyébként is használt kloroform-etanol = 95:5 szolvens rendszerrel végeztük. Ilyen körülmények között a CBS R_f értéke 0,4 volt. A CBS kimutatása is egyszerűsödött. Az UV abszorbens anyag UG₅ színszűrővel ellátott, háziilag készült UV lámpa fölött kioltotta a Kieselgel HF₂₅₄ adszorbens fluoreszcenciáját. /Az UG₅ színszűrő fényáteresztő 200 - 400 nm között, maximum: 320 nm-nél. A használt UV lámpa Tungstam Germicid F, emissziós maximuma: 253,7 nm./ A fluoreszcencia kioltásának mértéke - CBS koncentráció sort használva - alkalmas volt a CBS mennyiségének szemikvantitatív becslésére. Rétegekromatogramon ezzel a módszerrel 5 µg/folt CBS még jól látható.

A CBS koncentrációjának mérésére alkalmas UV abszorpciójának 255, illetve 300 nm-en mérhető abszorpció maximuma is. A baktériumsejteknek azonban több olyan komponense van, amely mindkét hullámhosszon, de különösen a mérésre egyébként alkalmasabb 255 nm-en a koncentráció meghatározást erősen zavarná. Kísérletesen igazoltuk, hogy míg az említett UV abszorbens anyagok kloroformmal sem különböző médiumokból, sem magukból a baktériumsejtekből nem extrahálhatók, addig az igen hidrofób CBS vizes közegből már egyszeri kloroformos kirázással közel 100 %-osan

extrahálható, ezért úgy jártunk el, hogy a mintákat azonos térfogatú kloroformmal kétszer kiráztuk, az extraktumot Rotadesten szárazra pároltuk és a száraz maradékot etanolban felvéve mértük a minták extinkcióját 255, illetve 300 nm-en. A mérhetőség alsó határa 300 nm-en $22 \mu\text{M}$ / $10 \mu\text{g/ml}$ /, 255 nm-en $11 \mu\text{M}$ / $5 \mu\text{g/ml}$ / CBS.

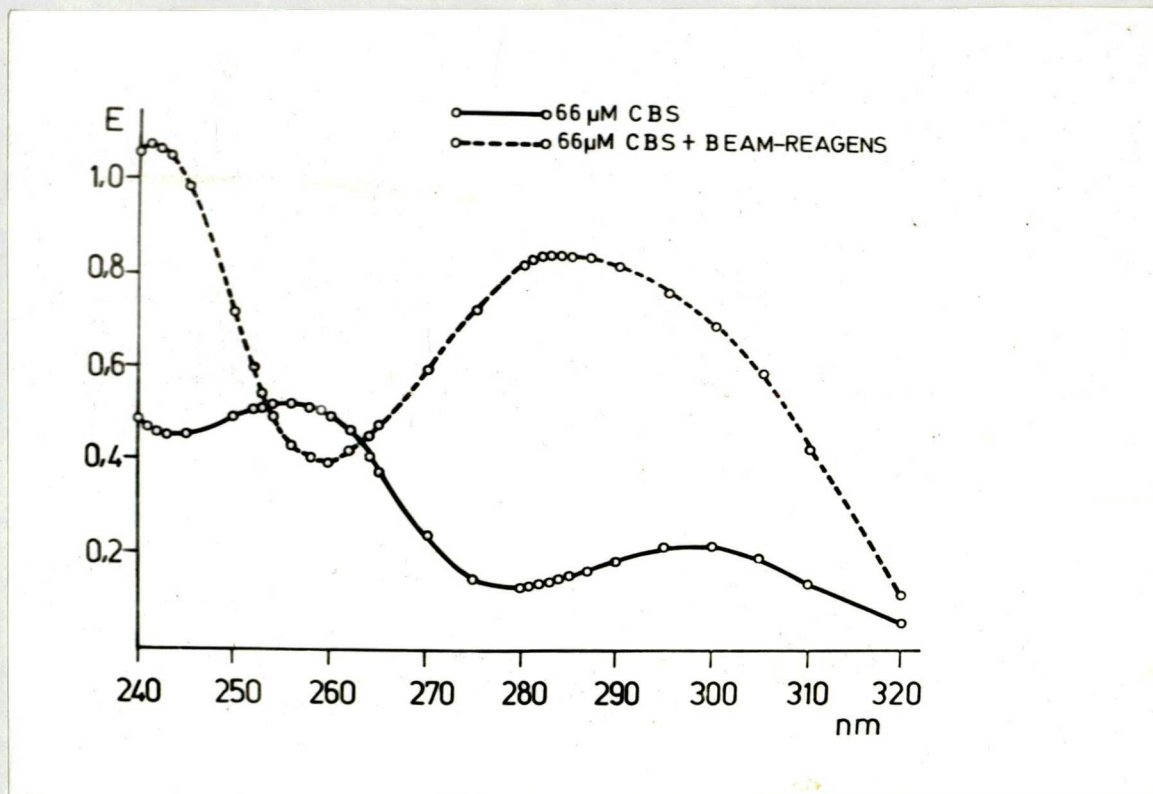
Kísérleteink során megpróbáltunk a fentínél érzékenyebb és kevésbé munkaigényes mérési módszert találni. A rendelkezésre álló kolorimetriás reakciók azonban - a kísérleteink által megszabott alacsony CBS koncentrációk miatt - még az anyag kvalitatív kimutatására sem voltak alkalmasak, nemhogy kvantitatív mérésére.

Megvizsgáltuk azonban néhány reagens hatását a kannabidiolsav UV abszorpciójára és azt találtuk, hogy a Beam-reagens a CBS spektrumát igen érzékenyen és jellemzően megváltoztatja.

$66 \mu\text{M}$ / $30 \mu\text{g/ml}$ / koncentrációju CBS desztillált vizes oldatának ultrabiolya fényabszorpció spektrumát és ennek változását módosított Beam-reagens hatására a 3.ábrán tüntettük fel.

A 3.ábrán látható, hogy az extinkcióértékek jelentős emelkedése mellett a CBS 300 nm-es abszorpciós maximuma 285 nm-re, a 255 nm-es maximum 240 nm-re tolódik el. Az eredeti és a Beam-reagenssel megváltoztatott spektrumok differenciája 241 és 282 nm-nél maximumot mutat.

A Beam-reagens hatására bekövetkező nagymértékű extinkció növekedés valószínűvé tette, hogy a CBS koncentráció az anyag extrakciója nélkül biológiai eredetű közegben is mérhető lesz, az aktu-



3. ábra.

A CBS abszorpciós spektrumának változása a Beam-reakció hatására.

ális minta eredeti UV abszorpciója és a Beam-reakcióra be-
következő extinkcióváltozás differenciája alapján. A 241,
valamint 282 nm-en bekövetkező fényabszorpció változás ana-
litikai célra való felhasználása érdekében vizsgáltuk a kvan-
titatív mérésre alkalmas kísérleti körülményeket. Ismert, hogy
a Beam-reagens mindig frissen készítendő. Az 5 % KOH tartalmu
etanolos oldat, valószínűleg a karbonátosodás miatt, sokszor
5-10 perccel az elkészítés után bezavarasodik, ami a CBS kvali-
tativ kimutatásánál nem zavar, de a koncentráció mérésnél fel-
tétlenül. 5 %, valamint 0,5 % KOH-ot tartalmazó etanolos olda-
tokkal különböző KOH végkoncentráció mellett mértük az extinkció
változásokat a megfelelő hullámhosszokon. Az eredményeket az
1.táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat.

Beam-reagenssel kezelt CBS /10 µg/ml/ vizes oldat fényabszorpciójának
változása 241 nm-en, valamint 282 nm-en, különböző KOH végkoncentráció
mellett.

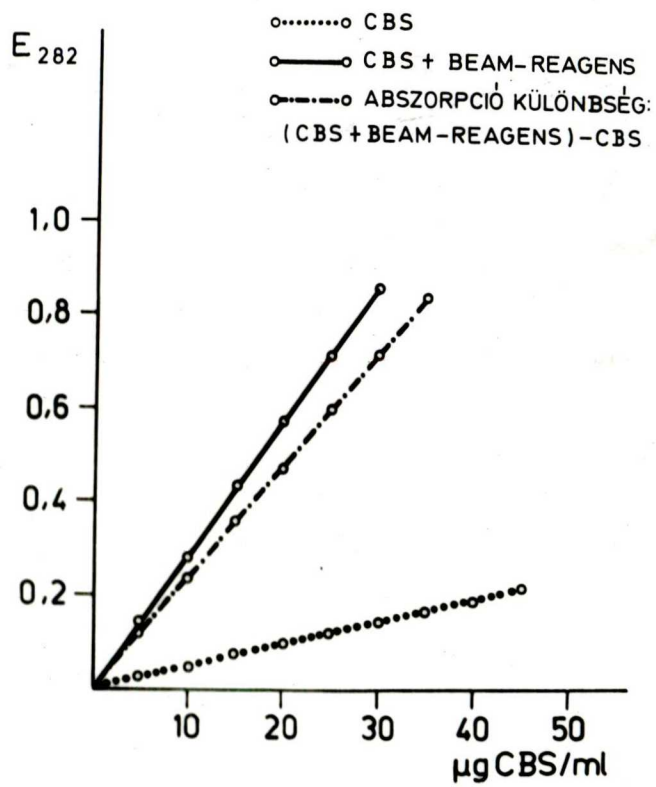
Reagens KOH konc. %	KOH végkon- centráció %	E ₂₄₁	%	E ₂₈₂	%
-	-	0,165	46	0,056	20
0,5	0,008	0,280	78	0,182	65
	0,016	0,330	92	0,256	93
	0,024	0,342	96	0,272	98
	0,032	0,351	98	0,280	100
	0,040	0,359	100	0,280	100
	0,048	0,358	100	0,282	100
0,5	0,064	0,356	100	0,278	100
5,0	0,320	0,425	119	0,330	118

Az 1. táblázat adatai szerint reagensként 0,5 % KOH-t tartalmazó etanol használva 0,04 % és 0,06 % KOH végkoncentráció között az extinkcióváltozás a reagens mennyiségétől nem függ. Ha a reakciót az eredeti Beam-reagenssel /5 % KOH etanolban/ végeztük el, körülbelül 20 %-os extinkciónövekedést kaptunk a KOH-ra egy nagyságrenddel magasabb reagenssel kapott maximális értékekhez képest. Mivel az 0,5 % KOH tartalmu módosított Beam-reagens hosszabb ideig stabil, és ezt az oldatot használva a mérési eredmények 0,04 % felett a reagens végkoncentrációtól nem függtek, valószínűnek látszik, hogy az 5 %-os oldattal kapott 20 %-os extinkciónövekedés nincs kapcsolatban a minták CBS tartalmával, hanem a reagens megváltozásának következménye.

Miután pillanatnyi állapotától függően a Beam-reagens az eredményeket különböző mértékben befolyásolhatja, a továbbiakban a CBS mérésére az 0,5 %-os oldatot használtuk.

Ezután megvizsgáltuk, hogy milyen CBS koncentrációk mérhetők az 0,5 % KOH-t tartalmazó reagenssel. Az eredményeket a 4. ábrán tüntettük fel.

Az ábrán látható a kezeletlen CBS UV abszorpciójának koncentrációfüggése 282 nm-en, valamint ugyanezen a hullámhosszon a módosított Beam-reagensre bekövetkező extinkcióváltozás, illetve a reagenssel kezelt és a kezeletlen minták közötti extinkciók differenciájának koncentrációfüggése. 2-25 µg/ml /4,4-55 µM/ CBS koncentrációk között mindhárom összefüggés lineáris, tehát 0,5 % KOH tartalmu módosított Beam-reagens ebben a tartományban alkalmas koncent-



4. ábra.

A CBS fényabszorpció változása 282 nm-en a Beam-reakció során, a CBS koncentráció függvényében.

ráció meghatározásra. A közeg elnyelésétől függően a fenti koncentrációhatárok között a CBS általában közvetlenül mérhető.

Mivel a Beam-reakció során differencia extinkciókat határozunk meg, a módszer érzékenyebb, mint a vegyület UV abszorpcióján alapuló mérés. A 241 nm-en felvett kalibrációs egyenesek közlésétől eltekintettünk. Ezen a hullánhosszon a CBS ugyancsak 2-25 $\mu\text{g/ml}$ /4,4-55 μM / koncentrációk között volt közvetlenül mérhető.

Mechoulam és Gaoni szerint a Beam-reakcióra jellemző lila szín maximális intenzitását 10-15 órán belül éri el, és legalább 24 óráig állandó /Mechoulam és Gaoni, 1968/. Az egzakt mérés érdekében vizsgáltuk, hogy a 241, valamint 282 nm-es extinkciónövekedés mennyi idő alatt alakul ki és mennyi ideig stabil. Az eredmények a 2. táblázatban találhatók.

2. táblázat

Módosított Beam-reagenssel kezelt CBS /10 $\mu\text{g/ml}$ vizes oldat/ fényabszorpciójának változása 241, valamint 282 nm-en, a kezelési idő függvényében.

Kezelési idő	1.	2.	3.	4.
0,5 perc	100	100	100	100
10 perc	101	100	101	100
30 perc	99	97	102	99
1 óra	98	95	100	102
3 óra	91	79	103	100
20 óra	45	36	101	100

1.2. KOH végkoncentráció: 0,032 %. 3.4. KOH végkoncentráció: 0,32 %

1.3. 241 nm-en, 2.4. 282 nm-en mért eredmények.

Az eredményeket a 0,5 perc reakcióidő után mért értékek százalékában adtuk meg.

A 2.táblázatban bemutatott kísérleti eredmények szerint, ellen-
tétben a lila szín időfüggő kifejlődésével, mind a 241, mind a
282-nm-es extinkciónövekedés pillanatszerűen jelentkezik. 0,32 %
KOH végkoncentrációt alkalmazva a kapott extinkcióértékek a re-
akciót követő 20 óráig gyakorlatilag változatlanok, viszont a mé-
réseink során használt reagens koncentráció /0,032 % KOH/ esetében
az eredmény leolvasását, vagy a spektrum felvételét a reakciót kö-
vető 30percen belül el kell végezni.

Beam-reagenssel kezelt CBS etanolban is hasonló spektrális válto-
zást mutatott, mint vizes közegben. Módosított Beam-reagenssel az
extinkcióváltozás meghatározása alapján 241, vagy 282 nm-en az al-
koholos extraktumok CBS tartalma is mérhető. A mérési határok -
mindkét hullámhosszon - a vizes közeghez hasonlóan 2-25 µg/ml
/4,4 - 55 µM/ koncentrációk közé esnek.

A spektrum kismértékben kloroformban is módosult, de koncentráció
meghatározásra alkalmatlan volt.

Kísérleteink során, ha CBS-t biológiai eredetű közegben mértünk,
a reakciót az aktuális kontrollal is elvégeztük és ennek kismér-
tékű, nem specifikus extinkcióváltozásai miatt a differencia extink-
ció értékeket az alábbi képlet szerint számoltuk:

$$\Delta E = T_B - /:T_{UV} + /K_B - K_{UV}/ :/$$

ahol T_{UV} , illetve K_{UV} a teszt, illetve a kontrol UV abszorpciója,
 T_B és K_B ugyanezeknek a Beam-reakció során megváltozott abszorpci-
ója, a megfelelő hullámhosszokon.

Bár a Beam-reakció mintegy hatvan éve a leggyakrabban használt módszer kannabinoidok kimutatására, igen hosszú ideig nem vizsgálták, hogy a reakciót a vegyület-csoport mely tagjai adják, és mi a reakciómechanizmus lényege. Több kutató vizsgálatai alapján /Matchett, 1938; Adams, 1942; Grlic, 1964./ ma már tisztázott, hogy ezzel a reagenssel a kannabinoidok közül kizárólag a CBS /II/, a kannabidiol /I/, és a kannabigerol /X/ ad pozitív reakciót, tehát a hasis kábítószer legfontosabb kimutatási módszere a pszichotomimetikus hatással nem rendelkező komponensek reakcióján alapul. Összehasonlítva a szerkezeti képleteket nyilvánvaló, hogy a pozitív reakcióhoz mindkét fenolos hidroxilnak szabadon kell lennie.

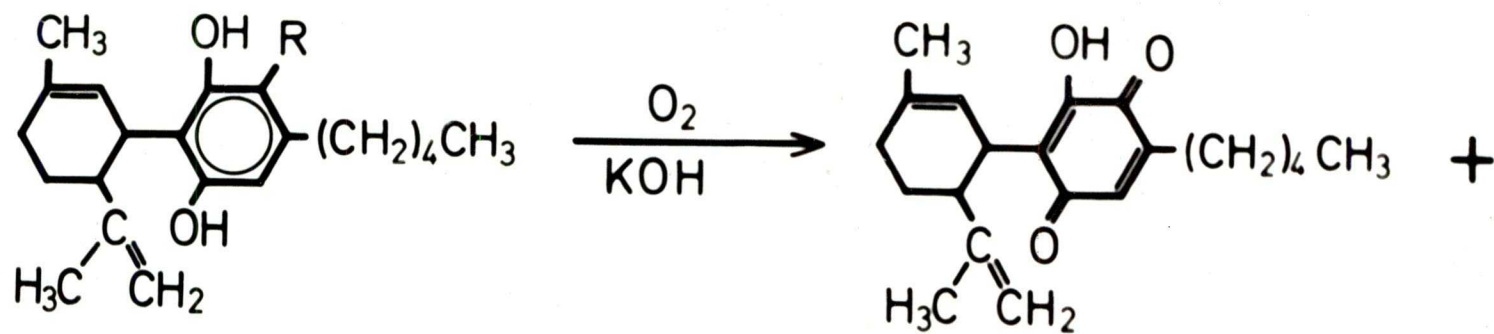
A reakciómechanizmust ujabban Mechoulam és munkatársai tisztázták /Mechoulam, Ben-Zvi és Gaoni, 1968/. Kimutatták, hogy a reakció csak levegő, illetve O_2 jelenlétében zajlik le. Mivel a CBS a bázikus közegben kannabidiollá dekarboxileződik, mindkét vegyület esetében azonos reakciótermékeket kaptak /5. ábra/, nevezetesen a kannabidiol hidroxikinon származékát /XV/, valamint ennek dimerjét /XVI/. A szerzők a reakciótermékek szerkezetét az izolált anyagok IR és UV spektruma alapján állapították meg. Az NMR spektrumok és a tömegspektrometriával meghatározott molekulaszúlyok megfeleltek a /XV/ és /XVI/ szerkezeteknek. A monomer hidroxikinon spektrumának 271, 362, 408, valamint 525 nm-nél voltak az abszorpciós maximumai, míg a dimernek 276, 367, 411 és 538 nm-en. A reakció során kapott spektrum függ a képződött /XV/ és /XVI/ anyag megoszlásától, mely a /XV/ vegyületnél 5-25 %, a /XVI/ anyagnál 50-80 % között, - tehát jelentősen - ingadozik.

5. ábra.

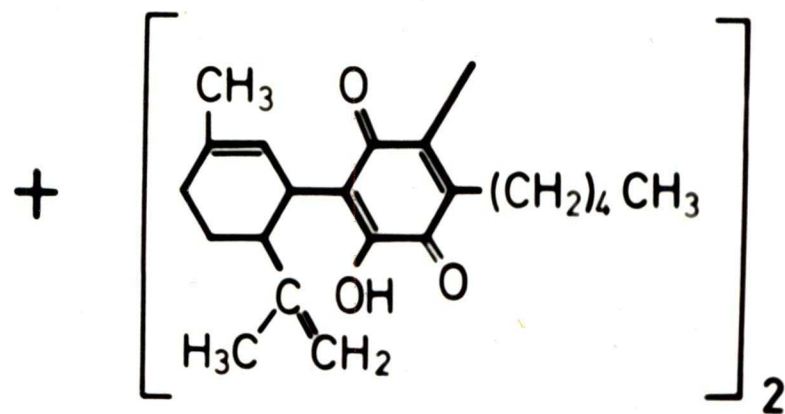
A Baum-reakció mechanizmusa.

/Mecheulan, Ben-Zvi és Gaoni, 1968/.

kannabidiol /I/, kannabidiolsav /II/, kannabidiol
hidroxikinen származékai /XV/, /XVI/.



I. : $R=H$
 II. : $R=COOH$



XVI.

A szerzők az alacsonyabb hullámhosszokon csak a tisztított termékek abszorpciós maximumait adják meg és 270 nm alatt egyáltalán nem közölnek eredményt. Saját méréseinket az irodalmi adatokkal összevetve kitűnik, hogy a kannabidiol oxidációs termékeinek még egy abszorpciós maximumuk van 241 nm-en. A tisztított anyagok 271, illetve 276 nm-es maximumát a reakcióelegyben 285 nm-nél találtuk meg. A 285 nm-en meghatározott moláris extinkciós koefficiens $\log \epsilon = 4,12$ érték igen jó egyezést mutat az irodalmi adattal /4,11/. A 245 nm-es abszorpciós maximumhoz tartozó $\log \epsilon$ -t 4,21-nek találtuk. Mechoulam és munkatársai szerint a spektrum többi maximumán a fényabszorpció mértéke lényegesen kisebb, a $\log \epsilon$ értékek 3,0 és 3,4 között vannak. Érthető tehát, hogy a CBS kinonná oxidálódásával kapcsolatos UV abszorpciós maximumeltolódások felhasználásával jóval érzékenyebb kvantitatív módszert lehetett kidolgozni, mintha ezt a Beam-reakció analitikai célra korábban is használt színváltozásával próbáltuk volna meg.

A CBS desztillált vizes oldata egy-két hónapos fényen és szobahőn való állás után igen halvány rózsaszín szineződést mutatott, ami valószínűleg szintén az anyag oxidációjával volt kapcsolatos. Sötétben, 4,0°C-on tartott desztillált vizes, vagy alkoholos CBS oldatok még fél éves tárolás esetén is szintelenek maradtak. Mivel stabilitás vizsgálatokat egyébként nem végeztünk, kísérleteinkhez minden esetben frissen készített CBS oldatokat használtunk.

2.3.1 A CBS megoszlási hányadosának mérése.

A CBS megoszlási hányadosát oktanol és víz között, az irodalomban leggyakrabban előforduló módon határoztuk meg /Hansch, Maloney, Fujita és Muir, 1962/.

25 mg CBS-t 10 ml oktanolban feloldottunk, majd 10 ml desztillált vízzel 30°C-on 90 percig rázógépen ráztuk. A vizes fázist az oktanol maradéktalan eltávolítása érdekében 90 percig 5000 g-n centrifugáltuk és a CBS koncentrációt ebben a közegben mérve 4 µg/ml-nek találtuk. A CBS megoszlási hányadosa oktanol és víz között 624:1.

A vízben maradó kismennyiségű oktanol zavaró hatását CBS nélküli kontrol használatával korrekcióba vettük. A CBS az oktanolban jelentős mennyiségű vizet köt meg a megfelelő kontrolhoz képest, amire a CBS tartalmu oktanol szemmel látható zavarossága utal. Lehetséges, hogy a vizes fázis lényegesen kisebb CBS tartalma ugyan-csak valamivel több oktanol-t tart a vízben, mint a kontrol megfelelő fázisa. Ez a tényező és az igen magas megoszlási hányados befolyásolhatta a meghatározás pontosságát.

Irodalmi adatok szerint az ugyancsak meglehetősen hidrofób rokonvegyület, a THC /III/ megoszlási hányadosát oktanol és víz között 500-nál nagyobb-nak találták, de mérési nehézségek miatt pontosan meghatározni nem sikerült /Gill, Paton és Pertwee, 1970/.

2.4 A CBS hatásának vizsgálata baktérium tenyészetekre.

2.4.1. Minimális gátlási koncentráció /MIC/ meghatározása.

A kísérleteinkben használt baktérium törzsekre a MIC értékeket a konvencionális higitásos módszerrel állapítottuk meg. MG táptalajt és 2×10^6 sejt/ml inekulumot tartalmazó csövekbe közvetlenül az oltás után CBS, illetve trietilamin koncentrációsorokat vittünk be. A baktériumok növekedését 24^h -s, $30^\circ C$ -es inkubálás után értékeltük. A növekedésgátlás baktericid, illetve bakteriosztatikus jellegének eldöntésére a kérdéses csövekből különböző higitásokat NB lemezre szélesztettünk.

2.4.2. A CBS hatásának vizsgálata növekvő tenyészetekre.

A növekedési vizsgálatokat rotációs rázógépen, $37^\circ C$ -en, MG táptalajt használva végeztük. A tenyészetek növekedését az oltást követő 48^h során sterilen vett minták optikai denzitásának mérésével állapítottuk meg. Az oltással párhuzamosan adtuk be a vizsgálandó anyagokat, amelyek koncentrációját és az inekulum mennyiségeket az egyes kísérleteknél irtuk le. A tenyészetek sterilitását mikroszkóposan gondosan ellenőriztük, mert az adalék anyagokat nem sterilizáltuk. A baktericid hatás igazolására a gátelt növekedésű lombikokból különböző higitásokat szélesztettünk NB lemezre.

2.5 A CBS sejtmembránra való hatásának és felvételének vizsgálati módszerei.

2.5.1 A CBS hatásának vizsgálata UV abszorbens anyagok sejtekből való felszabadulására.

B. subtilis és E.coli sejteket 1 %-os NaCl oldattal kétszer mostunk és ugyanebben a közegben 2×10^8 sejt/ml szuszpenziókat készítettünk. A baktériumokat különböző koncentrációju CBS-sel, trietilaminnal, illetve alkohollal 30°C -on 30 percig inkubáltuk. Az inkubálás különböző időpontjaiban vett mintákat hűtve, 5000 g-n azonnal centrifugáltuk. A kezeletlen kontrol mellett a kontrol szuszpenzió egy részét 15'-ig 100°C -on inkubáltuk, más részét ultrahanggal feltártuk, 5 %-os TCA-val fehérjementesítettük és a mintákat centrifugáltuk. A sejtfeltárást hűtve, 100 Wattos MSE ultrahang dezintegrátor 9,5 mm-es szondájával 3x1 perces, maximális energiával történő kezeléssel végeztük. A felülúszók extinkcióját 255 és 282 nm-en mértük, majd a módosított Beam-reakció elvégzése után 282 nm-en újra mértünk.

A CBS-nek az alkalmazott koncentrációkban 260 nm-en jelentős abszorpciója van, ezért a Beam-reakcióval a 282 nm-en mért differencia extinkciók alapján meghatároztuk a minták aktuális CBS koncentrációját.

A 255 nm-en mért adatokból levonva a CBS koncentrációnak ezen a hullámhosszon /a CBS egyik abszorpciós maximumán/ megfelelő extinkciókat kaptuk meg a baktériumok által leadott kismolekulasúlyu UV abszorbens anyagok mennyiségével arányos értékeket.

2.5.2 A CBS hatásának vizsgálata aminosavak sejtekből való felszabadulására.

1×10^9 sejt/ml *B. subtilis* szuszpenziókat a 2.5.1. fejezetben leírtakkal azonosan kezeltünk és a Rosen-féle kolorimetriás módszerrel mértük a minták összaminosavtartalmát /Rosen, 1957/. Kísérletesen igazoltuk, hogy sem a CBS, sem a trietilamin az aminosav mérésére szolgáló reakciót nem adja és a kísérlet körülményei között koncentrációknál nem zavarja az aminosavmeghatározást. A kísérleteinkben vizsgált nagyobb CBS és glutaminsav mennyiségeket összehozva az anyagok egy része kicsapódott és a bevitt aminosavnak megfelelő extinkciónál kisebb értékeket mértünk. Az ultrahanggal fältárt mintákat ez esetben is fehérjementesítettük TCA-val, mert enélkül az 5. táblázatban feltüntetett értéknél mintegy 40 %-kal magasabb eredményt kaptunk volna.

2.5.3. CBS hatásának vizsgálata a sejtek ionleadására.

B. subtilis tenyészetet mostunk és 0,5 %-os D-arabinóz oldatban 2×10^8 sejt/ml szuszpenziót készítettünk. A sejtszuszenzió ionleadását egy Radelkis 402 típusú konduktométerrel mértük. A hat mérőhellyel rendelkező készülék - amelyet Dr. Novák Ervin szivességéből használhattunk - egy hatcsatornás pontíró csatornaváltója és érzékelő műszere közé úgy volt bekötve, hogy az automatikus vezérlés lehetővé tette hat, különbözően kezelt szuszpenzió vezetőképességének

egy időben történő, gyakorlatilag folyamatos mérését és regisztrálását.

2.5.4. A CBS felvétel vizsgálata.

Foszfát pufferrel /pH = 7,4; 0,066 M/ kétszer mosott, 1×10^9 sejt/ml *B.subtilis* és *E.coli* sejtszuszpenziókat 220 μ M CBS-sel 37°C-on ráztunk. A különböző időben vett 1 ml mintákat Millipore HA filteren szűrtük, majd a sejteket a szűrőn 6 ml 4°C-es foszfátpufferrel mos-tuk. A baktériumokat ezután egy éjszaka 3 ml etanollal extraháltuk. A szűrlet, a mosófolyadék és az extraktum CBS tartalmát meghatároztuk a módosított Beam-reakcióval, a 282 nm-en mért differencia extinkciók alapján.

2.6. A baktériumok anyagcseréjére való CBS hatás vizsgálatának módszerei.

2.6.1. Légzés vizsgálatok.

A CBS baktériumok légzésére való hatásának vizsgálata céljából *B.subtilis* és *E.coli* tenyészeteket 66 mM-es pH 7,4-es foszfát-pufferrel kétszer mostunk és ugyanebben a közegben 5×10^8 sejt/ml szuszpenziókat készítettünk. A kísérletek kivitelezésére Warburg-készüléket használtunk.

A Warburg-edénykébe 2 ml baktérium szuszpenziót, a középső kiscdény-be 0,2 ml 10 %-os KOH-t, az egyik oldaledénybe 0,2 ml 5 %-os glükóz oldatot és 0,05 ml foszfátpuffert, a másik oldaledénybe 0,25 ml

1,1 mM-os CBS oldatot, vagy

1,1 mM-os trietilamint mértünk be. A CBS-t és a trietilamint 10 % alkoholt tartalmazó foszfátpufferben hígítottuk, így a végkoncentráció 1 % etanol mellett 110 μ M CBS, illetve 110 μ M trietilamin volt.

A mérést a glükózzal indítottuk. A gátló anyagot csak 60 perces egyenletes légzés után mostuk be a főedénybe és a nyomásváltozásokat további 60 percen keresztül követtük. Az inkubálás hőmérséklete 37°C volt. A mérési eredményekből a fogyott O_2 mennyiségét - a szokásos módon - a termobarométer nyomásváltozásának és az edénykék faktorainak figyelembevételével számoltuk.

2.6.2. TTC redukálóképesség vizsgálata.

Előzetes kísérleteink alapján a sejtek TTC redukálóképességének vizsgálatára az alábbi körülményeket és koncentrációkat találtuk optimálisnak:

66 mM-os pH 7,4-es foszfátpufferrel kétszer mosott 1×10^9 /ml

B. subtilis, illetve *E. coli* sejtet inkubáltunk szexianerob körülmények között, 37°C-on 4 óráig, 2 % glükóz és 1,25 mM trifeniltetrazoliumklorid /TTC/ jelenlétében. A rendszer térfogata minden esetben 4 ml volt és az inkubálást 4 ml acetonnal való osszerázással állítottuk be. Az acetonos fázist, amely a TTC redukciója során képződött formazánt tartalmazta, egy éjszakai állás után 546 nm-en fotometráltuk. A CBS és a trietilamin hatását a sejtek TTC redukálóképességére 11 és 110 μ M közötti koncentrációsorban

vizsgáltuk, 1 % etanol végkoncentráció mellett.

A metodikai kísérletekből kiderült, hogy bizonyos koncentráció fölött a CBS TTC jelenlétében kicsapódik. Bár 110 μ M CBS esetében ez még alig észrevehető - az esetleges zavaró hatás kiküszöbölése, illetve minimálisra csökkentése érdekében - minden esetben a TTC volt a vizsgálati rendszerbe bevitt utolsó komponens.

A fenti vizsgálatokat a glükózon kívül az alábbi metabolizálható cukorokkal és szerves savakkal is elvégeztük: fruktóz, szorbóz, mannit, arabinóz, pirosszőlősav és borestyánkősav.

2.6.3. Glükóz felvétel vizsgálata.

Foszfátpufferrel /66 mM pH 7,4/ kétszer mosott 2×10^8 /ml B. subtilis sejtszuszpenziót 0,1 % glükózt tartalmazó pufferben, 37°C-on rázattunk. A lombikokat 10 percenként mintáztuk és a 0°C-on azonnal lecentrifugált minták felülúszójából glükózt mértünk az általunk kissé módosított glükózoxidáz-peroxidáz módszerrel /Dahlqvist, 1964/. Az E. coli esetében a fentiektől csak annyiban tértünk el, hogy 0,2 % glükózt alkalmaztunk és a kísérleteket levegőztetve, valamint szemianacrob körülmények között is elvégeztük.

A "glükóz-oxidáz reagens" 0,25 M-os pH 7,0-es tris-HCl pufferben az alábbi komponenseket tartalmazta:

12,5 mg %	glükózoxidáz /Sigma/
0,5 mg %	peroxidáz /Reanal/
5,0 mg %	o-dianizidin

0,2 %	triton-x 100 /Serva/
0,5 %	metanol
0,8 %	etanol

A metanol és az etanol pusztán az o-dianizidin és a triton beoldására szolgált. A mérés során 0,5 ml mintát 3 ml reagenssel 37°C-on, 1 óráig inkubáltunk, majd 444 nm-en fotometráltuk.

2.6.4. Enzimaktivitás mérések.

A sejtmentes extraktumok készítésére NB táptalajon növesztett tenyészeteket használtunk. Yoshida vizsgálatai alapján az enzim-indukció érdekében a tejsavdehidrogenázal kapcsolatos kísérletek céljára a tenyésztés szemi anaerob körülmények között történt /Yoshida és Freese, 1965/. A baktériumokat minden esetben 66 mM-os pH 7,4-es foszfátpufferrel kétszer mostuk és a korábban leírt módon /2.5.1./ ultrahanggal feltártuk. A nyers extraktumokat 30.000 g-vel, 30 percig 4°C-on centrifugáltuk és a méréseket a felülúszóból végeztük.

A vizsgált dehidrogenázok - a tejsavdehidrogenáz /LDH/, az almasavdehidrogenáz /MDH/ és a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz /G-6-PDH/ aktivitását a megfelelő koenzim oxidációjának, illetve redukciójának spektrofotometriás követésével, 340 nm-en mértük. A NADH-oxidáz aktivitást ugyancsak a 340 nm-es extinkcióváltozás alapján határoztuk meg. A méréseket egységesen, szobahőmérsékleten, 3 ml össztérfogatban, 1 cm rétegvastagság mellett, félpercenként, 3 percig végeztük és a kezdeti reakciósebességeket az első és a harmadik perc

közötti extinkcióváltozások alapján számoltuk. A számolás a NADH és a NADPH esetében egyaránt az $\epsilon = 6,2 \times 10^3$ moláris extinkciós koefficienssel történt. Az enzimaktivitásokat a konvencionális nemzetközi egységben /NE/ adtuk meg, vagyis a percenként átalakított szubsztrát mikromólok számával. A reakció időbeli követése lehetővé tette, hogy a reakciósebességnek a szubsztrátok koncentrációjától való függetlenségét minden egyes mérésnél ellenőrizzük.

A vizsgált enzimek aktivitásmérésének részletes leírásakor feltüntettük mindazokat a szerzőket, akiknek a munkáit a mérési módszer kiválasztásánál felhasználtuk. Mérési körülményeink nem mindenben egyeznek meg az idézett irodalmakéval, mert részben a vizsgált enzimek, részben a használt mérőműszer eltérései több-kevesebb változtatást tettek szükségessé.

2.6.4.1. LDH mérése /L-Tejsav: NAD oxidoreduktáz, EC 1.1.1.27/, illetve D-Tejsav: NAD oxidoreduktáz, EC 1.1.1.28/.

A reakcióelegy az alábbi komponenseket tartalmazta:

66 mM-es pH 6,0-os foszfátpufferben 900 μ M Na-piruvát és 180 μ M NADH. A vizsgálati rendszer egy milliliterébe bevitt fehérje a B. subtilis sejtmentes extraktumból 51 μ g, az E. coli esetében 9 μ g volt.

A reakciót a koenzimmel indítottuk. A percenkénti extinkcióváltozások a jelzett fehérje bemérések mellett 0,07 illetve 0,04 körüli értékek voltak /Yoshida, 1965; Yoshida és Freese, 1965; Tarmy és Kaplan, 1968/.

2.6.4.2. MDH mérése /L-Almasav: NAD oxidoreduktáz, EC 1.1.1.37/.

66 mM-es pH 7,4-es foszfátpuffer 1,5 mM oxálecetsavat és 180 μ M NADH-t tartalmazott. A reakciót a szubsztráttal indítottuk, amelynek oldatát előzőleg NaOH-val semlegesítettük és bomlékonysága miatt naponta frissen készítettünk. A rendszerbe bevitt fehérje *B. subtilis*, illetve *E. coli* esetében 7 μ g/ml, illetve 2 μ g/ml volt. Ilyen körülmények között percenként 0,05 illetve 0,06 körüli extinkcióváltozásokat kaptunk /Yoshida, 1965a; 1965b/.

2.6.4.3. G-6-PDH mérése /D-Glükóz-6-foszfát: NADP oxidoreduktáz, EC 1.1.1.49/.

A reakcióelegy összetétele: 55 mM-es pH 7,8-as tris-HCl pufferben 3,3 mM $MgCl_2$, 3,3 mM G-6-P és 600 μ M NADP. Milliliterenként 230 μ g, illetve 97 μ g fehérjét vittünk be a *B. subtilis*, illetve az *E. coli* extraktumokból. A reakciót az enzimmal indítottuk. Az extinkcióváltozás mindkét esetben 0,1/perc volt. A G-6-P szubsztrát bárium-sóját 0,02 M ecetsavban oldottuk fel és 0,57 M Na_2SO_4 -tal bárium-mentesítettük /DeMoss, 1955/.

2.6.4.4. NADH-oxidáz mérése.

A sejtmentes extraktumok NADH-oxidáz aktivitását 66 mM-es pH 7,4-es foszfátpufferben, 67 μ M NADH és 230 μ g/ml *B. subtilis*, illetve 25 μ g/ml *E. coli* fehérje jelenlétében határoztuk meg. A reakciót a NADH-val indítottuk és a percenkénti extinkcióváltozás 0,03 il-

letve 0,05 volt. /Jackson és Lightbown, 1958; Worcel, Goldman és Cleland, 1965; Yu és Wolin, 1970; Kiskiss és Downey, 1972/.

2.6.4.5. Kristályos LDH mérése /L-Tejsav: NAD oxidoreduktáz, EC 1.1.1.27/.

Disznó vázizomból preparált Reanal készítményt használtunk, amelyet esetenként dialízissel vagy gélszűréssel sómentesítettünk.

A piroszőlősav redukció mérésekor 66 mM-os pH 7,4-es foszfát-pufferben 333 μ M volt a Na-piruvát és 67 μ M a NADH koncentráció /Kornberg, 1955; Holbrook, 1966/.

A tejsav oxidáció vizsgálatokor a reakcióelegy összetétele a következő volt: 0,2 M-os pH 9,0-es tris-HCl pufferben 400 μ M NAD és 133 mM litium-laktát /Gibson, Davison, Bachhawat, Ray és Vestling, 1953; Winer és Schwert, 1958; Robinson, Stollar, White és Kaplan, 1963/.

A reakciót mindkét esetben a szubsztráttal indítottuk és az enzimet úgy hígítottuk, hogy a 340-nm-en mért extinkcióváltozás percenként 0,03-0,04 között legyen. A mérés egyéb körülményei /hőmérséklet, osztóterefogat, rétegvastagság stb./ és a reakciósebesség számolása megegyezik a baktériális enzimeknél leírtakkal.

2.6.4.6. Alkalikus foszfatáz mérése. /Ortofoszforsav-monoészter foszfohidroláz, EC 3.1.3.1./.

A kísérletek során használt enzimpreparátumot /Reanal/ 0,05 M-os pH 7,7-es tris-HCl pufferben oldottuk. A reakció közege 0,1 M-os pH 9,8-as glicin-puffer volt, amely $83 \mu\text{M}$ MgCl_2 aktivátort és $1,67 \text{ mM}$ p-nitrofenilfoszfátot /NPP/ tartalmazott. A mérések során a p-nitrofenol termék koncentrációjával arányos extinkcióváltozásokat 420 nm -en 5 percig, percenként mértük /Brandenberger és Hanson, 1953; Hofstee, 1954; Engström, 1964/.

2.6.5. A CBS hatásának vizsgálata enzimek aktivitására.

A CBS hatását a sejtmentes extraktumok NADH-oxidáz aktivitására $5\text{-}300 \mu\text{M}$ közötti CBS koncentrációsorban vizsgáltuk. A többi bakteriális oxidoreduktáz - LDH, MDH, G-6-PDH - aktivitását 50 , 100 , illetve $300 \mu\text{M}$ CBS jelenlétében mértük. Az enzimreakció mindkét irányából meghatároztuk a CBS aktivitásgátló hatásának koncentrációfüggését a kristályos LDH-ra. Az alkalikus foszfatáz esetében a CBS hatását egyetlen koncentrációban hasonlítottuk össze ekvivalárisan alkalmazott szalicilsav, etiléndiamintetraecetsav /EDTA/ és oxitetraciklin /OTC/ hatásával.

Az alkohol végkoncentráció egységesen $3,3 \%$ volt, ezért kontrollként $3,3 \%$ etanol, illetve $3,3 \%$ etanol és a kísérletben vizsgált legnagyobb CBS koncentrációval megegyező trietilamin mennyiség jelenlétében mértük az enzimek aktivitását. A gátlóanyagot minden

esetben közvetlenül az enzimreakció indítása előtt mértük be, a reakcióelegy utolsó komponenseként. Egyetlen kísérletsorozatban tettünk kivételt, amelynek során éppen az inkubálási idő szerepét vizsgáltuk az emlős LDH-n.

2.7. A CBS-fehérje kölcsönhatás vizsgálatának módszerei.

2.7.1. A CBS enzimgátló hatásának vizsgálata BSA jelenlétében.

A kristályos LDH aktivitását mértük CBS, illetve BSA koncentrációsor és CBS jelenlétében, valamint albumin és a gátlóanyag nélkül. A kísérletnél variáltuk az egyes komponensek bemérésének sorrendjét. Általában az LDH-t és BSA-t, tartalmazó rendszerhez adtuk a CBS-t, de végeztünk olyan méréseket is, amelynek során a bemérés sorrendje albumin, CBS, LDH volt. Minden esetben, ha BSA-val dolgoztunk, koncentrációjának számítására 66500 molekulasúlyt fogadtunk el /Mahler és Cordes, 1966/.

2.7.2. Az LDH gátlás kinetikai vizsgálata.

Különböző CBS koncentrációkat használva mértük a kristályos LDH kezdeti reakcióképességét $1-4 \times 10^{-4}$ M NAD koncentrációhatárok között $1,33 \times 10^{-1}$ M Li-laktát, illetve $1-4 \times 10^{-4}$ M Na-piruvát koncentrációhatárok között, $6,7 \times 10^{-5}$ M NADH jelenlétében. Az enzimaktivitás mérésének egyéb körülményei a korábban leírtakkal

meg egyezett. /2.6.4. és 2.6.4.5./. Az említett NAD koncentrációk és Li-laktát jelenlétében laurinsav és kaprilsav gátló hatását is mértük. A zsírsavak Na-sójuk formájában álltak rendelkezésre és mindkettő Schuchardt készítmény volt.

A gátlástípusokat a mért adatok által megengedett összes lehetséges ábrázolási módszert felhasználva állapítottuk meg /Webb, 1963/.

A NAD koncentráció függvényében mért gátlási adatokat a kétféle Lineweaver-Burk módszerrel ábrázolva a kapott összefüggések megfelelő metszéspontjai alapján számoltuk a K_i inhibitor konstans, az α kölcsönhatási indexet és az inhibitor kötődése során fellépő

ΔF szabadenergia változást. A gátlást jellemző konstansokat Webb összefoglaló munkájában feltüntetett összes lehetséges módon kiszámoltuk /Webb, 1963/, a megadott eredmények a különféle számítások átlagértékei.

2.7.3. A CBS-fehérje kötődés vizsgálata differencia spektrumok felvételével.

A vizsgálatokhoz Arneur marha szérumalbumint /BSA/ és a Reanal által preparált metilezett marha szérumalbumint /m-BSA/ használtunk. Az egyéb kötődési vizsgálatokban felhasznált citokrom c ugyancsak a Reanal terméke volt.

A vizsgálatok során a kérdéses fehérje és a CBS, 66 mM-es pH 7,4-es foszfátpufferben készült oldatának, valamint az enes végkoncentrációban, de külön-külön a fehérje és a CBS oldatoknak felvettük a spektrumát 240 és 320 nm között. A méréseket 5 nm-enként, a jellemző területeken

nm-enként végeztük. A koncentrációkat úgy választottuk meg, hogy minden mért extinkció a spektrofotométer érzékeny mérési tartományán belül legyen. A kísérletek értékelésekor a fehérje-ligandum komplexek spektrofotometriai vizsgálatánál szokásos számításokat végeztük el /Laskowski, 1956; Bigelow, 1962/, vagyis az egyes hullámhosszokon a külön-külön mért CBS és fehérje extinkciók összegét vetettük össze az együtt mért értékekkel és a kapott pozitív, vagy negatív differenciákat ábrázoltuk a hullámhossz függvényében. Kontrol kísérletekben ellenőriztük, hogy a rendszerbe bekerülő trietilámbn, valamint etanol nem befolyásolja a fehérjék spektrumát.

2.7.4. A CBS-fehérje kötődés vizsgálata dializissel.

Kísérleteink során az antibiotikumok és fehérjék kötődésének vizsgálatára Perényi által egyszerűsített egyensúlyi dializist használtuk, amely Westphal szteroidok és fehérjék komplexeinek jellemzésére leírt módszerén alapul /Westphal, 1969; Perényi, 1970/.

10 cm hosszú és 2 cm átmérőjű Cuprophan dializáló hárttyákba, 66 mM-os pH 7,4-es foszfátpuffer 10 ml térfogatában 0-6,16 μmol /0-400 mg/ BSA koncentrációsort és 10-10 μmol CBS-t mértünk be. A hárttyákat előzőleg egy napig tartottuk 0,002 M EDTA-t tartalmazó foszfátpufferben, majd desztillált víz többszöri cseréjével hasonló ideig mostuk. A dializist 100 ml 66 mM-os pH 7,4-es foszfátpufferrel szemben végeztük 4°C-on, 48 óráig. A folyamat meggyorsítására a külső térben mágneses keverőt alkalmaztunk és az egyensúly beállítása után a CBS koncentrációt meghatároztuk a dializátumban. A belső térben lévő

kötetlen drog mennyiségét is figyelembevéve a kötődés mértékét $\mu\text{mol CBS/g BSA}$ egységben adtuk meg és a telítési koncentráció ismeretében, a CBS-fehérje moláris arány alapján megállapítottuk az egy BSA molekulára eső kötőhelyek számát.

2.7.5. A CBS-fehérje kötődés vizsgálata géliszűréssel.

Kísérleteink során - beleértve az LDH rutinszerű sómentesítését is - 1×30 cm méretű Sephadex G-25 fine /Pharmacia/ típusu géllal töltött oszlopokat használtunk. A gélágyat, melynek magassága 16 cm volt, 66 mM-es pH 7,4-es foszfátpufferrel hoztuk egyensúlyba. Az oszlopra felvitt minta térfogata 1 ml volt, a szedett frakcióké 3-3 ml.

A CBS-t és a fehérjét együtt, illetve külön-külön tartalmazó mintával maximálisan 10 mg fehérjét vittünk az oszlopra. Az eluált frakciókban fehérjét, illetve az LDH esetében enzimaktivitást mérünk, valamint a módosított Beam-reakcióval meghatároztuk a CBS koncentrációját.

--- --

Valamennyi kísérletünkben a fehérjemérést a Lowry-féle módszerrel végeztük /Lowry, Rosebrough, Farr és Randall, 1951/.

Az egész kísérleti munka során fotométerként Spektromom 202, illetve Spektromom 203 műszert, pH mérésre OP-205 típusu Radelkis, vagy Radiometer 27 pH-mérőket használtunk.

E R E D M É N Y E K

A kannabidiolsavat felfedező kutatók széleskörű vizsgálatokkal állapították meg, hogy az anyag a Gram-pozitív baktériumokkal és a saválló *Mycobacterium* fajokkal szemben baktericid, a Gram-negatív baktériumokra, gombákra és élesztőkre hatástalan /Ferenczy, 1956; 1956a; Ferenczy, Gracza és Jakobey, 1958; Kabelik, Krejci és Santavy, 1960/.

A fenti irodalmi adatokra támaszkodva a CBS baktériumokra kifejtett hatását - kísérleti céljainknak megfelelően - egyetlen Gram-pozitív, illetve esetenként egyetlen Gram-negatív baktérium speci-esre, nevezetesen a *Bacillus subtilis* Marburg Yale és az *Escherichia coli* B törzsekre vizsgáltuk.

3.1. A CBS hatása baktérium tenyészetek növekedésére.

3.1.1. A minimális gátlási koncentráció /MIC/ meghatározása.

A minimális gátlási koncentrációkat a hígítási módszerrel állapítottuk meg. A Gram-pozitív baktériumokat 1,36-550 μM /0,62-250 $\mu\text{g/ml}$ / CBS, a Gram-negatív baktériumokat 220-1716 μM /100-780 $\mu\text{g/ml}$ / CBS koncentrációhatárok közötti koncentrációsorok jelenlétében növesztettük. MG szintetikus táptalajba logaritmusos fázisú inokulumból úgy oltottunk, hogy az oltás után a csövekben 2×10^6 sejt/ml legyen. A gátlóanyagot az oltással párhuzamosan adtuk be. Az eredményeket, amelyeket a 3. táblázaton mutatunk be, 24 órás, 37°C-os inkubálás után értékeltük.

3. táblázat

A kannabidiolsav minimális gátlási koncentrációja.

Baktérium törzsek	C B S		T E A	
	μM	$\mu\text{g/ml}$	μM	$\mu\text{g/ml}$
B. subtilis M.Y.	11	5	2500	250
E. coli B.	1100	500	11000	1000

Amint az a 3.táblázatból látható, 11 μM volt az a legalacsonyabb CBS koncentráció, ami a vizsgált B. subtilis törzs növekedését gátolta. Ez a koncentráció egyúttal baktericid is, amit a kezelt sejtek NB lemezre való szélesztésével mutattunk ki. 9,6 μM /4,37 $\mu\text{g/ml}$ / CBS mellett már normális növekedést kaptunk, tehát a cid hatás rendkívül élesen jelentkezik.

A táblázatból leolvasható, hogy a baktericid CBS koncentrációval ekvimolárisan bekerülő trietilamin a baktériumokra nem lehet hatásos, mert önmagában csak nagyságrendekkel nagyobb koncentrációban gátolta a baktériumok növekedését. A MIC-nek megfelelő CBS koncentrációval a tesztbe kerülő 0,1 % etanol hatástalan.

A CBS MIC értéke E.colira két nagyságrenddel nagyobb, mint a B.subtilis növekedését gátló koncentráció. A minimális gátlási koncentráció az E.coli esetében is baktericid. A trietilamin a CBS-nél pontosan egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban gátolta a Gram-negatív baktériumok növekedését, ha azt a meglehetősen magas

alkohol mennyiséget /10 %/ vittük be a trietilamin mellé, ami az 1100 μM CBS-sel a tesztbe szükségszerűen bekerült.

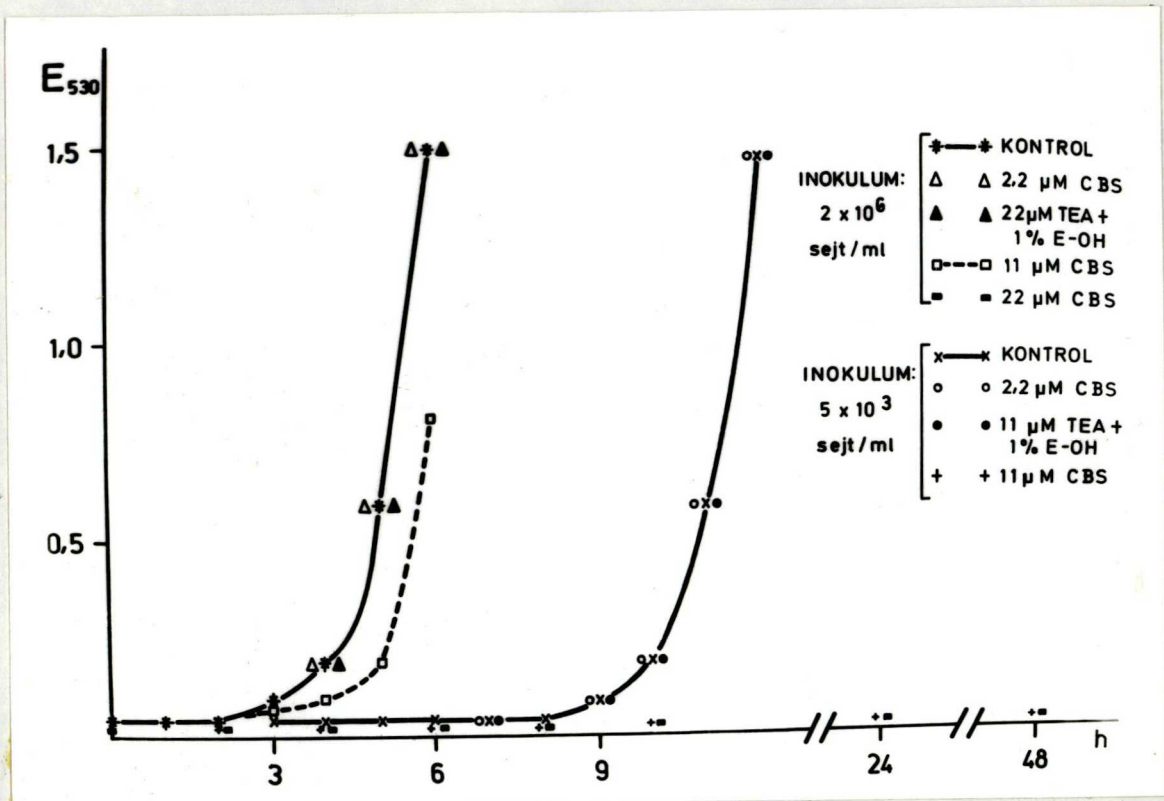
3.1.2. A CBS növekedésgátló hatása különböző oltóanyag mennyiség esetén.

Egyes antibiotikumok bizonyos koncentrációhatárok között az érzékeny baktérium tenyészetek növekedési szakaszait jellemzően befolyásolják. A CBS ilyen szempontból való vizsgálatára milliliterenként 2×10^6 B. subtilis sejtet tartalmazó, frissen oltott tenyészetet növesztettünk 2,2; 11,0; 22,0 μM CBS, illetve kontrolként 22,0 μM trietilamin és 1 % etanol jelenlétében. A növekedési vizsgálat eredményei a 6. ábrán találhatók.

A 6. ábrán látható, hogy 22,0 μM CBS a tenyészet növekedését teljesen meggátolta. 11,0 μM CBS mellett a lag fázis 2 órával megnyúlt, de ezután a tenyészet normálisan kinőtt és rövid időn belül gyakorlatilag elérte a kontrol extinkcióját. 2,2 μM CBS, valamint 22,0 μM trietilamin 1 % etanollal kiegészítve a tenyészetek növekedését nem befolyásolta. 22 μM CBS, a lombikból való kioltás alapján baktericidnek bizonyult.

Mivel a baktérium tenyészetek növekedési szakaszait módosító antibiotikum hatás különösen kis inokulum mennyiségeknél válik kifejezetté és a hatásos koncentráció változása az inokulum mennyiséggel az antibiotikumok jellemző adata, a növekedési kísérletet 5×10^3 sejt/ml inokulumot használva 2,2; 11,0 μM CBS, valamint 11,0 μM





6. ábra.

A CBS hatása *B. subtilis* tenyészetek növekedésére.

trietilamin és 1 % etanol jelenlétében ismételtük meg. Az eredmények szerint, amelyek ugyancsak a 6. ábrán találhatók, 11,0 μM CBS teljes növekedésgátlást okozott és egyúttal az inokulumot is elpusztította. 2,2 μM CBS, valamint a trietilamin a növekedést nem befolyásolták.

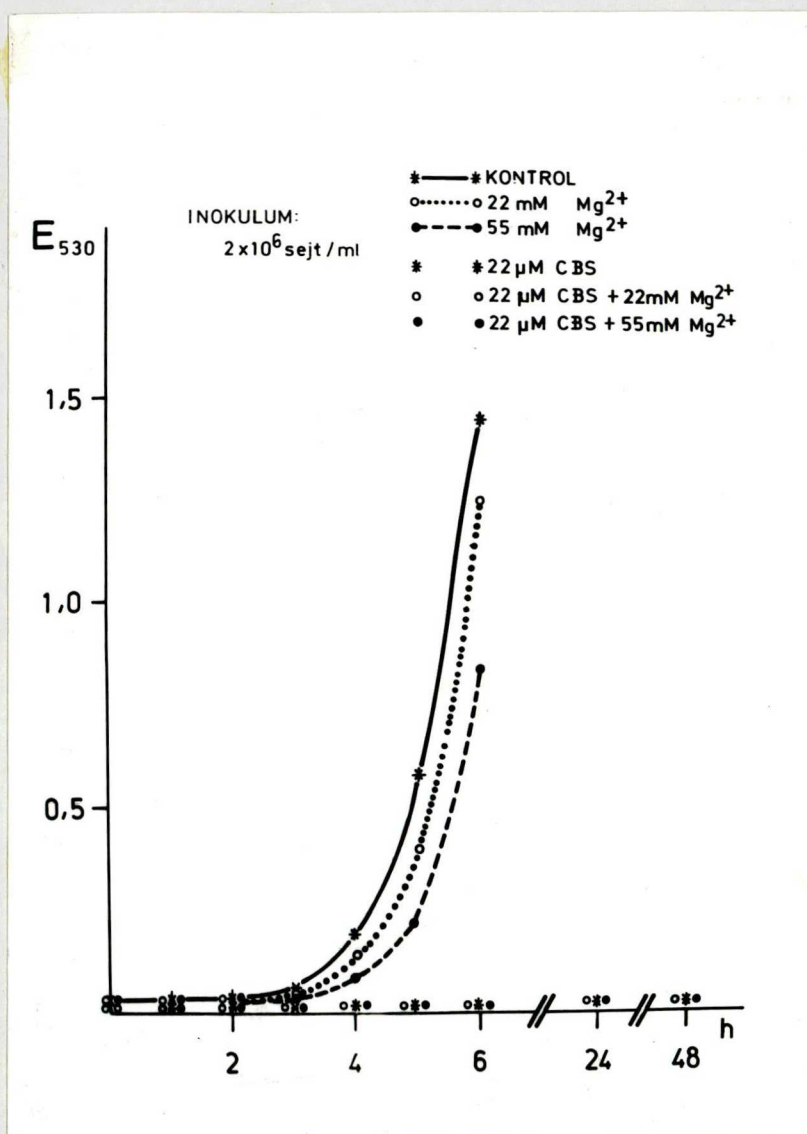
3.1.3. A CBS növekedésgátló hatása Mg^{2+} ionok jelenlétében.

A további növekedési kísérletek során minden esetben 2×10^6 sejt/ml inokulumot használtunk. Különböző MgSO_4 koncentrációk jelenlétében vizsgáltuk, hogy Mg^{2+} ionok befolyásolják-e a CBS növekedésgátló hatását *B. subtilis* sejtekre. A 7. ábrán azoknak a Mg^{2+} koncentrációknak a hatását tüntettük fel, amelyek a növekedésgátló CBS koncentrációknál /22 μM / nagyságrendekkel nagyobbak voltak és kismértékben már önmagukban is megnyújtották a tenyészetek lag fázisát. Az ábrán látható, hogy a Mg^{2+} még ilyen nagy moláris fölöslegben sem befolyásolta a CBS növekedésgátló hatását.

3.1.4. A CBS hatása baktérium tenyészet növekedésére marha szérum-albumin /BSA/ jelenlétében.

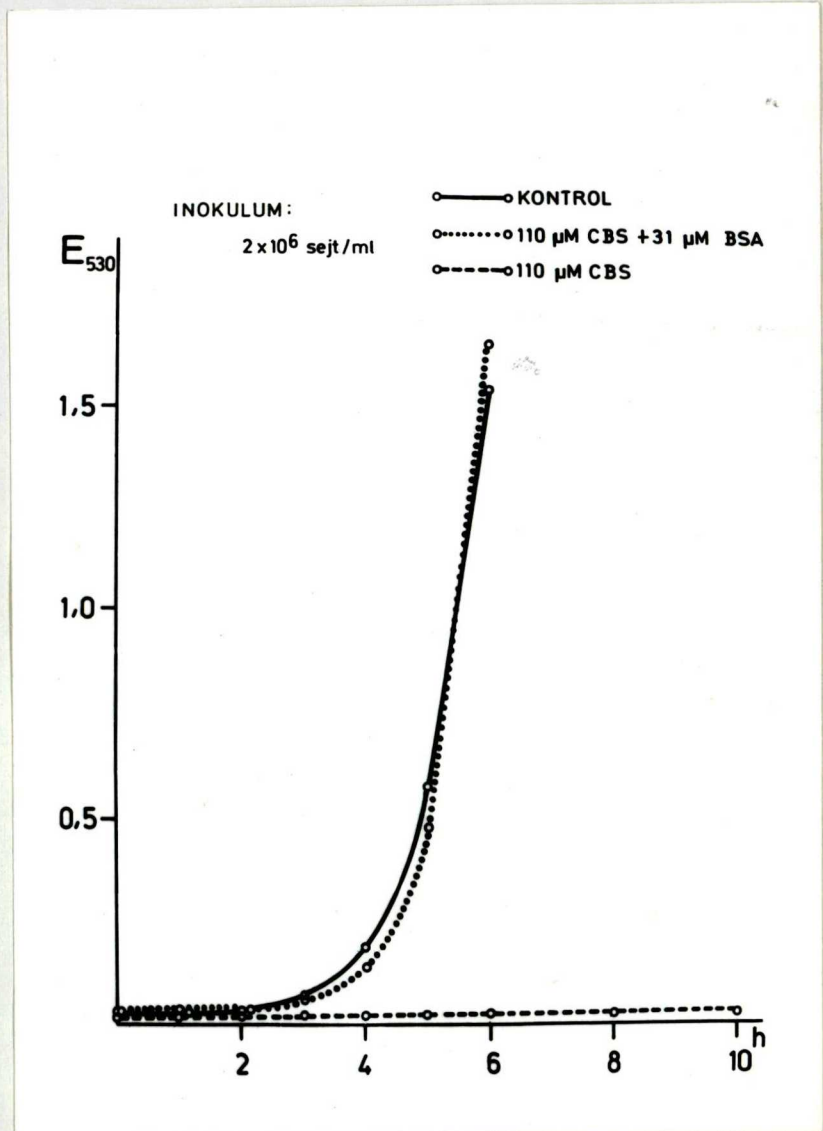
A 8. ábrán mutatjuk be annak a kísérletnek az eredményeit, amelynek során *B. subtilis* tenyészeteket növesztettünk 110 μM CBS, illetve 110 μM CBS és 31 μM /2 mg/ml/ BSA jelenlétében.

Bár - a várakozásnak megfelelően - ez a CBS koncentráció a növekedést gátolta, az albumint is tartalmazó tenyészetek növekedése zavartalan volt. A mintegy 31 μM BSA tehát felfüggesztette a 110 μM



7. ábra.

A CBS hatása *B. subtilis* tenyészetek növekedésére
Mg²⁺ ionok jelenlétében.



8. ábra.

A CBS hatása *B. subtilis* tenyészetek növekedésére
BSA jelenlétében.

CBS növekedésgátló hatását, attól függetlenül, hogy a BSA önmagában a tenyészetek növekedésére gyakorlatilag nem hatott. /Az utóbbi eredményt a 8. ábrán nem tüntettük fel./

3.2. A CBS hatása a sejtmembránra.

3.2.1. A CBS hatása UV abszorbens anyagok sejtekből való felszabadulására.

Az ugynevezett detergens antibiotikumok, valamint általában a felületaktív baktericid vegyületek sejtmembránt károsító hatása jól detektálható az érzékeny sejtekből az ozmótikus barrier megszűnése következtében felszabaduló kismolekulású anyagok mérésén keresztül. A CBS sejtmembránra való hatását először Newton módszere szerint teszteltük, aki a 260 nm-en abszorbeáló, kismolekulású anyagok elszívárgását mérte polymyxinnal kezelt *Pseudomonas aeruginosa* sejtekből /Newton, 1953/.

2×10^8 sejt/ml mosott *B. subtilis* és *E. coli* sejtszuszpenziókat kezeltünk 11 μ M, 110 μ M CBS-sel, illetve 110 μ M trietilamminnal és 1 % etanollal. A felülúszókból a méréseket a kezelés első 30 percében végeztük el. A kezeletlen kontrol mellett megmértük a forrált sejtekből, valamint az ultrahanggal feltárt sejtekből felszabadítható UV abszorbens anyagok mennyiségét. A CBS jelentős fényelnyelése miatt a méréseket nem 260 nm-en, hanem 255 nm-en végeztük és a függetlenül meghatározott CBS koncentrációkat a 2.5.1. fejezetben leírt módon korrekcióba véve kaptuk a leadott kismolekulású UV abszorbens

anyagokból arányos extinkciókat. A 4. táblázatban megadott eredményeket a forralt kontrol százalékaiban fejeztük ki.

4. táblázat.

A CBS hatása UV abszorbens anyagok B. subtilis és E. coli sejtekből való felszabadulására.

K e z e l é s			B. subtilis			E. coli	
TEA	CBS	EOH	Kezelési idő			Kezelési idő	
µM	µM	%	0'	15'	30'	0'	30'
0	0	0	13	20	36	6	8
0	0	0 ^x	100	-	-	100	-
0	0	0 ^{xx}	106	-	-	-	-
110	0	1	19	23	29	6	8
11	11	1	18	24	31	6	9
110	110	1	17	28	37	5	11

x = forralt sejtek
xx = ultrahanggal feltárt sejtek.

A táblázat adataiból látható, hogy a CBS a kezeletlen kontrolhoz képest lényegesen egyik baktérium esetében sem fokozta az UV abszorbens anyagok leadását, ha a drogot a B. subtilisre baktericid, illetve ennél egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban vittük be. A leadott anyagmennyiség lényegesen alatta marad a sejtek összes kismolekulasúlyu UV abszorbens anyagmennyiségének, vagyis az ultrahanggal feltárt sejtek fehérjementesített felülúszójában lévő, illetve a forralt sejtekből felszabaduló mennyiségnek. Az utóbbi kettő gyakorlatilag megegyezik.

A táblázatban nem tüntettük fel a közeg CBS koncentrációjának az inkubálás idejével való változását, melyet a korrekciós számításokhoz határoztunk meg.

Figyelemre méltó volt, hogy a CBS koncentráció a kezelési idő során nemcsak a *B. subtilis*, hanem az *E. coli* sejteket tartalmazó közegben is jelentősen csökkent.

3.2.2. A CBS hatása aminosavak sejtekből való felszabadulására.

Gale szerint árgok membránkárosító hatását Gram-pozitív baktériumok esetében aminosavleadás mérésével is lehet vizsgálni, ha megfelelő táptalajt használunk, vagy a baktériumokat a kísérlet előtt aminosavakat tartalmazó közegben inkubáljuk. /Gale, 1967/.

NB táptalajon növesztett 1×10^9 /ml *B. subtilis* sejtszuszpenziókat 110 μ M CBS-sel, illetve 110 μ M trietilaminnal és 1 % etanollal inkubáltunk. A sejtekből felszabaduló összes aminosav mennyiségét a kezelt sejtekből, valamint a kezeletlen kontrolltól függetlenül meghatároztuk forrált, illetve ultrahanggal feltárt sejtek esetében is.

5. táblázat.

A CBS hatása aminosavak *B. subtilis* sejtekből való felszabadulására.

CBS μ M	K e z e l é s		Kezelési idő perc		
	TEA μ M	E-OH %	0	15	30
0	0	0	15	28	40
0	0	0 ^x	100	-	-
0	0	0 ^{xx}	162	-	-
0	110	1	17	26	42
110	110	1	12	30	45
x = forrált sejtek;			xx= ultrahanggal feltárt sejtek.		

Az 5. táblázatban bemutatott eredményeket a ferralt sejtekből felszabaduló aminosavmennyiség százalékában adtuk meg. A táblázatban látható, hogy a CBS csak igen kis mértékben növelte meg a sejtek aminosav leadását a kezeletlen kontrolhoz képest és ez az érték a felét sem éri el annak az aminosav mennyiségnek, ami a sejtekből forralással felszabadítható.

Eltérően az UV abszorbens anyagoktól, a ferralt és az ultrahanggal feltárt kontrol között jelentős különbség volt még a feltárt anyag fehérjementesítése után is.

A kísérletet elvégeztük 6,8 mM glutaminsavat tartalmazó közegben 37°C-on, 30'-ig rázatott baktériumokkal is. A B. subtilis sejtek azonban - legalábbis ezek között a kísérleti körülmények között - a glutaminsavat nemcsak nem halmozták fel, hanem a belső szabad aminosav szintjük egy nagyságrenddel kisebb volt, mint a glutaminsavval való inkubálás nélkül. A módszer érzékenysége lehetővé tette a leadott aminosavak mennyiségének mérését ilyen körülmények között is. Mivel az így kapott eredmények az aktuális kontrol százalékában kifejezve az 5. táblázat adataival gyakorlatilag megegyeznek, részletes közlésüktől eltekintettünk.

3.2.3. A CBS hatása a sejtek ionleadására.

A CBS sejtnembránra való hatásának további vizsgálata céljából 0,5 %-os D-arabinóz oldatban szuszpendált, különböző módon kezelt 1×10^9 /ml B. subtilis sejtsuszpenziók ionleadását vizsgáltuk a közeg vezetőképességének változása alapján, a 2.5.3. fejezetben

leírt módon. Az eredményeket a 9. ábrán tüntettük fel.

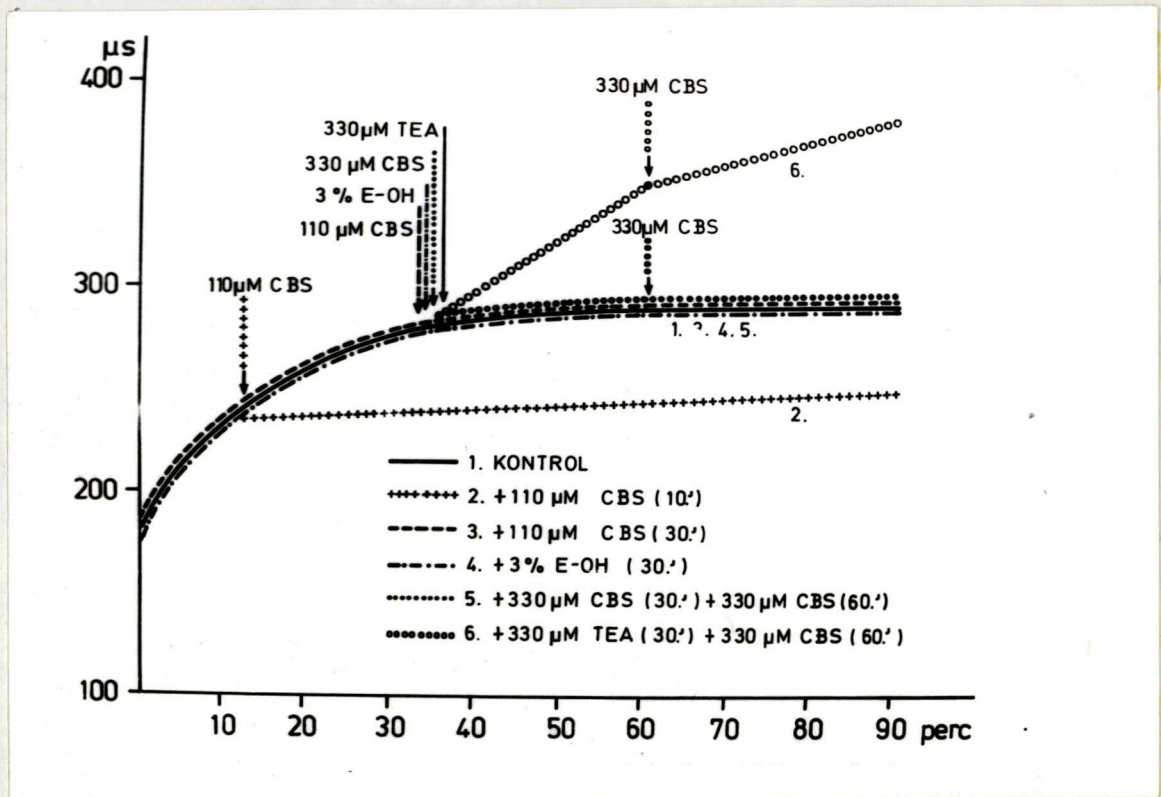
Az inkubálás 10. percében a konduktométer 2. edényébe $110\ \mu\text{M}$ CBS-t adtunk be. 30 perccel az inkubálás és a mérés megkezdése után a 3. edény $110\ \mu\text{M}$ CBS-t, az 5.-ik $330\ \mu\text{M}$ CBS-t, a 6.-ik $330\ \mu\text{M}$ trietilamin, a 4.-ik 3 % etanol kapott. A kontrol szuszpenzióba /1. mérő-edény/ nem mértünk be semmit az egész mérés során. Az inkubálás 60. percében az 5. és 6. edénybe további $330\text{--}330\ \mu\text{M}$ CBS-t mértünk be.

A 9. ábrán látható, hogy az inkubálás elején - amikor az ionleadás az idő függvényében még exponenciális jellegű görbét ad - $110\ \mu\text{M}$ CBS az ionleadást, vagy legalábbis egy részét gátolni látszik. Később az ionleadás lineáris szakaszán $110\ \mu\text{M}$, illetve $330\ \mu\text{M}$ CBS az ionleadást nem befolyásolta.

A kontrollal azonos maradt a lefutás akkor is, amikor a 60. percben a CBS koncentrációt $660\ \mu\text{M}$ -ra növeltük. Meglepő módon a 6. edénybe bevitt $330\ \mu\text{M}$ trietilamin a lineáris szakaszon megnövelte az ionleadás mértékét. Ugyanakkor a 60. percben beadott $330\ \mu\text{M}$ CBS határozottan csökkentette az ionleadást annak ellenére, hogy ebben az esetben a TEA : CBS moláris arány 2 : 1, a CBS-sel ekvimolárisan bevitt trietilamin miatt.

Nyilvánvaló, hogy a 9. ábrán feltüntetett eredmények a CBS és a trietilamin ellentétes hatásának eredője, ennek ellenére a kísérletből világosan látszik, hogy a CBS-nek nincs membránkárosításra utaló ionleadást fokozó hatása.

A 3 % etanol tartalmazó kontrol a normál kontrollal megegyezik.



9. ábra.

CBS és a trietilamin hatása *B. subtilis* sejtszuszpenziók vezetőképességére.

3.2.4. A CBS felvétele a sejtekbe.

Az UV abszorbens anyagok mérése során felmerült annak a lehetősége, hogy nemcsak az érzékeny Gram-pozitív, hanem a droggal szemben ellenálló *E.coli* sejtek is felveszik a CBS-t. Ennek a kérdésnek a vizsgálata céljából 1×10^9 /ml *B.subtilis* és *E.coli* sejtszuszpenziókat inkubáltunk 220 μ M CBS-sel.

A különböző időpontokban vett mintákat Millipore szűrőn átszűrtük, hideg pufferrel mostuk, majd meghatároztuk a szűrlet, a mosófolyadék és a sejtek CBS tartalmát. Az eredményeket a 6. táblázatban mutatjuk be.

6. táblázat.

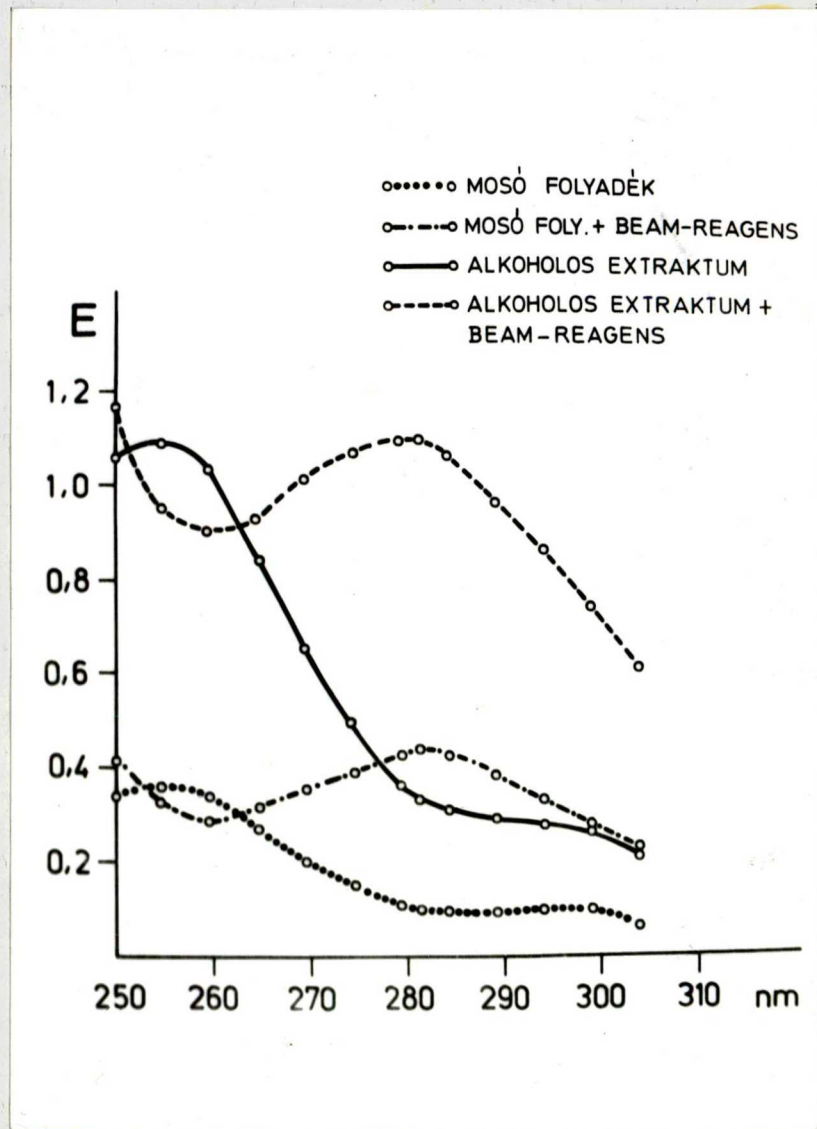
A CBS százalékos megoszlása a közeg, a sejtfelszín és a sejt között.
CBS-sel kezelt *B.subtilis* és *E.coli* sejtszuszpenziókban.

Kezelt baktérium	Kezelési idő perc	Szűrlet	Mosó foly.	Sejt extr.	Összesen CBS
<i>B. subtilis</i>	0	100	0	0	100
	10	50	11	35	96
	30	36	16	40	92
<i>E. coli</i>	0	100	0	0	100
	10	69	16	0	85
	30	42	40	1	83

A 6. táblázat adataiból látható, hogy a *B. subtilis* esetében a CBS mintegy 50 %-a a sejtekhez kötődik. Ennek kisebb része a sejtekről lemosható, a zöme azonban csak a baktériumok alkoholos extrakciójával

nyerhető vissza. A kötetlen és a kötött CBS mennyisége egyaránt
tízegyszeresedik a beadott drogmennyiséggel. A CBS jelentős része
40% / kapcsolatra került az E. coli sejtekkel is, de a megkötött
drog teljes mennyisége a baktériumokból lemosható és a mosott sej-
tekből etanolal CBS-t extrahálni nem lehetett. A megkötött és a
szűrletben kimutatható CBS az összes bevitelt CBS-nek 85-90 %-a.

Egyetlen kísérlet során felvettük a különböző vizsgálati anyagok
ultrabolya spektrumát. A 10. ábrán feltüntetett egy CBS-sel in-
kubált B. subtilis sejtszuszpenzió alkoholos extraktumának, vala-
mint az ehhez a mintához tartozó mosó folyadéknak az abszorpció
szinkrópét Beam-reagenssel való kezelés előtt és után. Bár a sejtek-
ből felszabadult UV abszorbeens komponensek a spektrumokat befolyá-
solják, a 10. ábrán mindkét esetben jól felismerhető a CBS spektruma,
illetve annak jellegzetes megváltozása a reakció során.



10. ábra.

CBS-sel kezelt *B.subtilis* sejtek mosófolyadékának, illetve alkoholos extraktumának UV abszorpciós spektruma Beam-reakció előtt és után.

3.3. A CBS hatása a baktériumsejtek néhány anyagcsere folyamatára.

3.3.1. A CBS hatása a baktériumok légzésére.

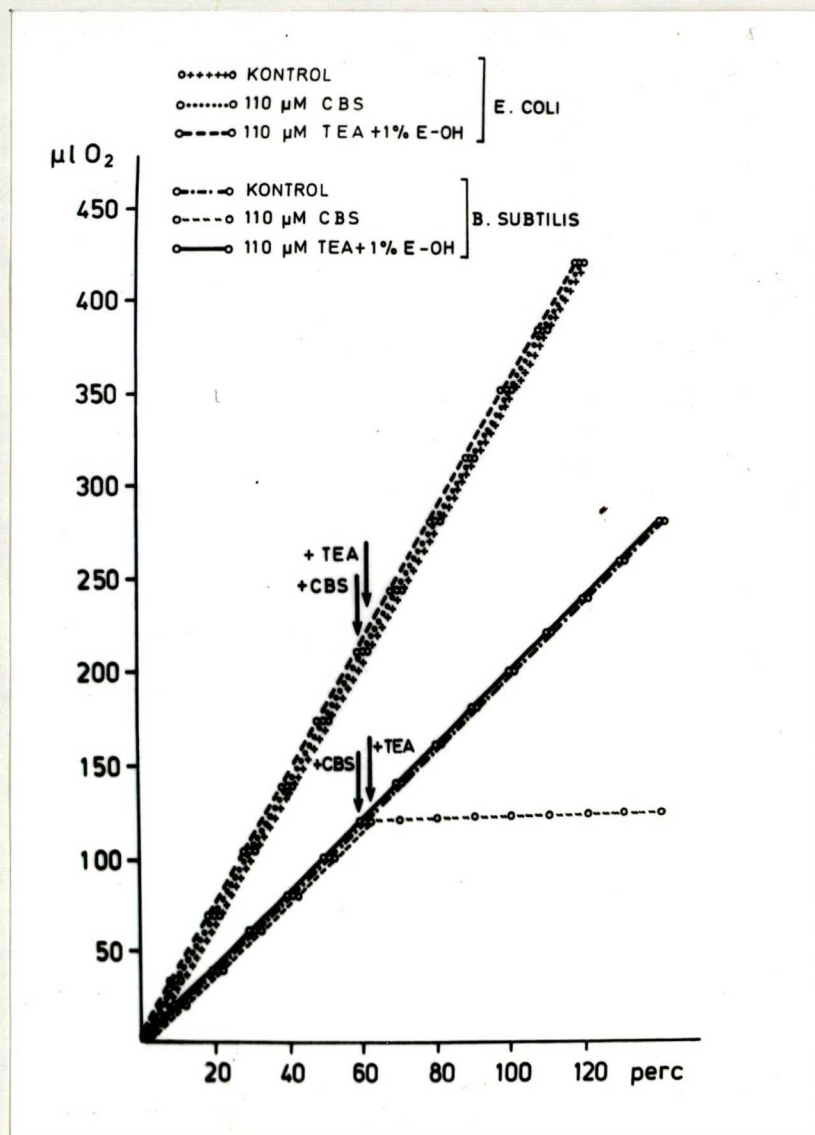
Kezeletlen, valamint 110 μM CBS-sel, illetve kontrolként 110 μM trietilaminnal és 1 % etanollal kezelt 5×10^8 /ml B.subtilis és E.coli sejtek O_2 fogyasztását a 11.ábrán mutatjuk be.

A 11.ábrán látható, hogy 110 μM CBS a Gram-pozitív sejtek légzését azonnal és tökéletesen megszüntette. A trietilamin és az etanol az O_2 fogyasztást nem befolyásolta. Az E.coli sejtek légzésére a vizsgált koncentrációban sem a CBS, sem az alkohollal kiegészített trietilamin nem hatott.

3.3.2. A CBS hatása a baktériumok TTC redukáló képességére.

A TTC redukciója - amely a terminális oxidációval kapcsolatos - /Brodie és Gots, 1951; 1952; Jámor, 1958/ az életképes sejtek jellemző tulajdonsága. Megléte egyaránt feltételezi az alkalmazott szénforrás felvételét a sejtbe, valamint a katabolizmus enzimátikus reakcióláncának intaktságát. Ez a metodika részben a légzésvizsgálat kevésbé munkaigényes modelljének tekinthető, de kiegészítve más mérésekkel, konkrétabb eredményekre is vezethet annak.

A metodikát optimalizáló kísérletek után, amelyeket a disszertációban nem részletezünk, először glükóz jelenlétében CBS, illetve



11. ábra.

A CBS hatása *B. subtilis* és *E. coli* sejtszuszpenziók légzésére.

trietilamin koncentrációsor /0-110 μM / hatását vizsgáltuk, 1×10^9 /ml B. subtilis, valamint E.coli sejtszuszpenziók TTC redukáló képességére. A kezeletlen kontrol százalékában kifejezett eredményeket a 7. táblázatban állítottuk össze.

7. táblázat

A CBS hatása B.subtilis és E.coli sejtek TTC redukálóképességére.

K e z e l é s			TTC redukció %	
CBS μM	TEA μM	E-OH %	B. subtilis	E. coli
0	0	0	100	100
0	0	1	100	97
0	0	5	95	82
0	11	1	101	100
0	22	1	103	98
0	55	1	98	96
0	110	1	101	92
11	11	1	68	97
22	22	1	14	88
55	55	1	2	82
110	110	1	1	80

A mérési adatok szerint a B.subtilis sejtek a CBS koncentráció függvényében egyre kisebb mértékben képesek a TTC-t redukálni.

A gátlás már 22 μM -nál igen nagy, 55 μM -nál pedig tökéletes.

A trietilamin és a tesztbe bekerülő alkohol mennyisége /1 %/ a TTC redukciót nem zavarja.

Az E.coli sejtek TTC redukciója is csökkent, de kérdés, hogy ez mennyire tulajdonítható a CBS-nek, ugyanis némileg a trietilamin

és az alkohol is így hat. A legnagyobb vizsgált koncentrációknál kimutatott 20 %-os gátlás esetleg a három anyag kooperatív hatásának eredménye.

A továbbiakban a CBS hatását a *B. subtilis* sejtek TTC redukciójára különböző légzési szubsztrátokat használva vizsgáltuk meg. A kísérlet körülményei az előző vizsgálatával megegyeztek. Az eredményeket - amelyek az egyes szubsztrátokra a megfelelő kontrol százalékában vannak megadva - a 8. táblázatban mutatjuk be.

A táblázat adatai szerint a CBS az összes vizsgált cukor, illetve szerves sav felhasználását gátolta, méghezzá gyakorlatilag azonos mértékben.

8. táblázat

A CBS hatása a *B. subtilis* sejtek TTC redukálóképességére, különböző légzési szubsztrátok jelenlétében.

K e z e l é s			TTC redukció %							
CBS μM	TEA μM	E-OH %	Glükó- z	Galak- tóz	Fruktóz	Szer- bóz	Mannit	Arabi- nóz	Borostyán- kősav	Piro- szőlő- sav
0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100
0	110	1	99	100	102	98	98	102	101	100
11	11	1	65	68	-	-	-	-	49	49
22	22	1	16	16	-	-	-	-	18	13
55	55	1	2	0	1	3	4	2	2	2
110	110	1	0	1	0	2	2	1	0	1

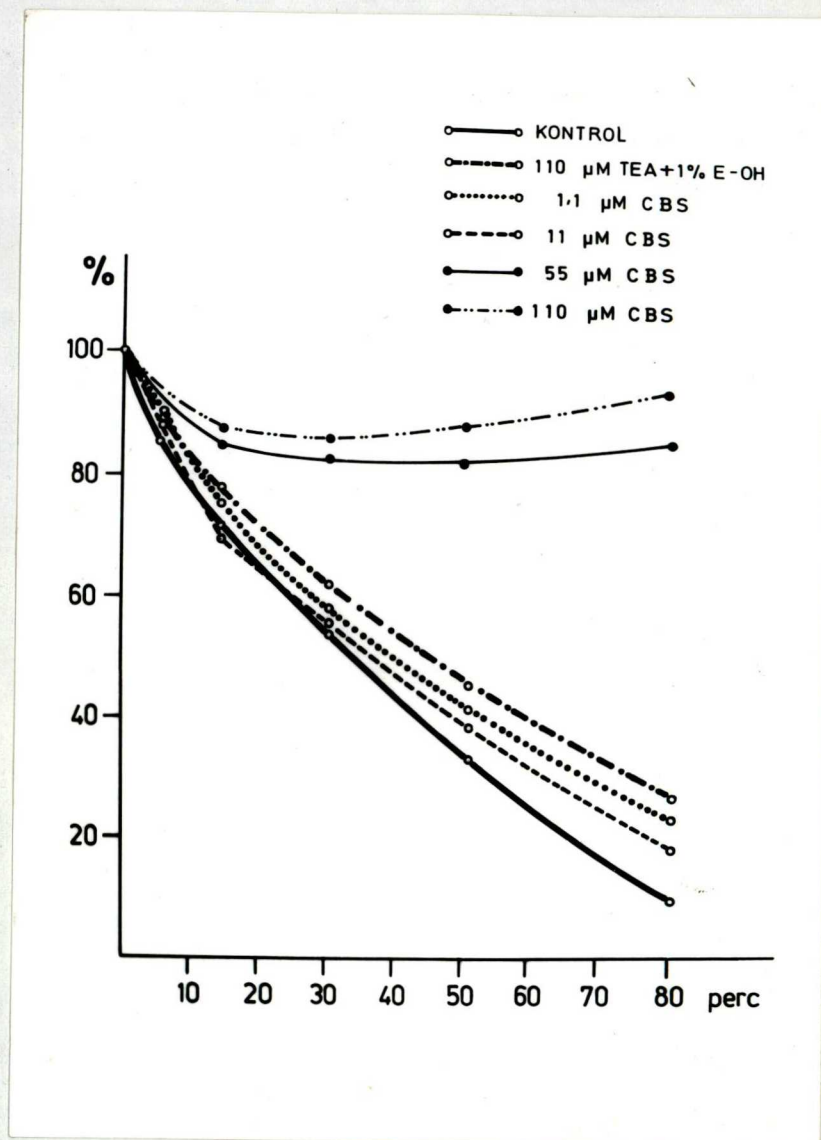
3.3.3. A CBS hatása baktériumok glükóz felvételére.

A légzés és a TTC redukció gátlása során felmerült lehetőségek közül megvizsgáltuk, hogy a CBS zavarja-e a légzési szubsztrátként használt glükóz felvételét. A 12. ábrán mutatjuk be 0-110 μM CBS koncentráció-sorral kezelt, 2×10^8 /ml *B. subtilis* sejtszuszpenziók glükóz mennyiségének változását az inkubálási idővel. Az eredmények a kiindulási glükóz koncentráció százalékában vannak kifejezve.

Az ábrán látható, hogy a CBS 11 μM koncentrációig, valamint az 1 % etanollal kiegészített 110 μM trietilamin a baktériumok glükóz felvételét nem zavarja. 55 μM CBS koncentráció fölött a *B. subtilis* sejtek glükóz felvétele jelentősen gátolt. A kezdeti kismértékű koncentráció-csökkenés után egy még kisebb fokú, időben elnyújtott koncentráció-növekedés figyelhető meg.

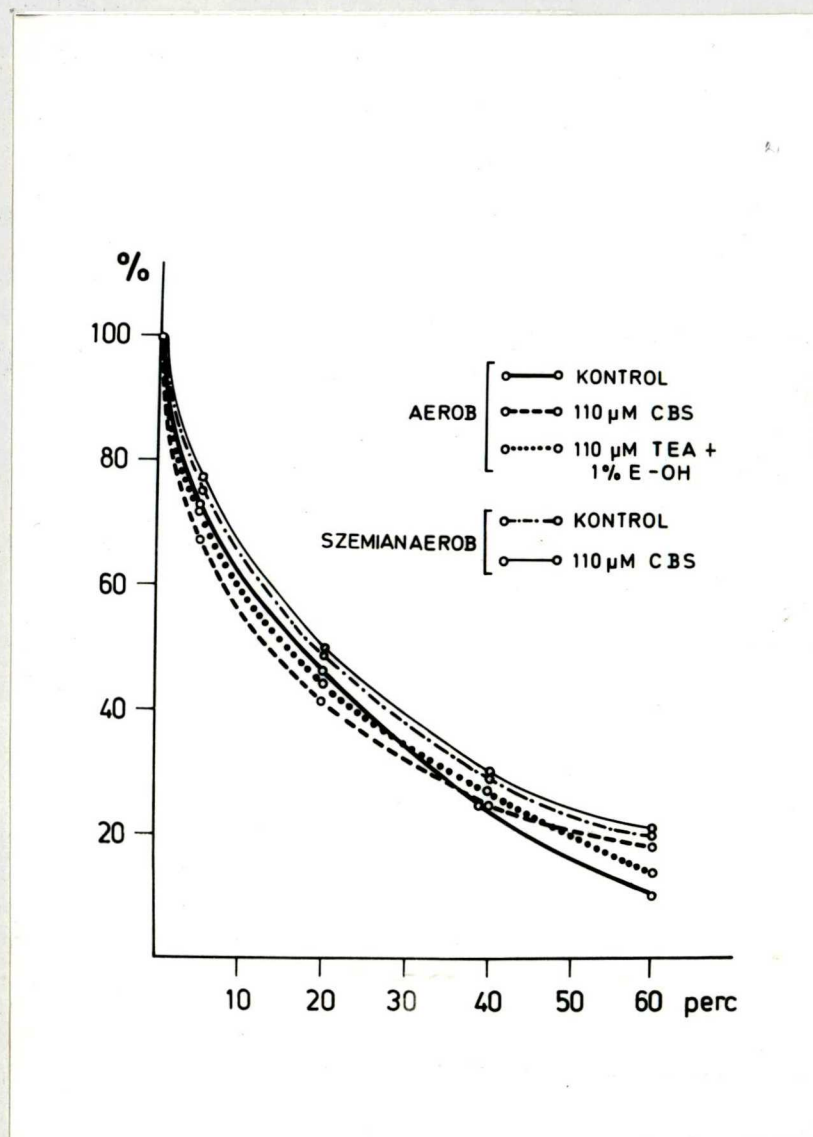
A CBS hatását *E. coli* sejtszuszpenziók glükóz felvételére nemcsak aerob, hanem szimianerob körülmények között is elvégeztük. A 2×10^8 /ml sejtet tartalmazó közegben a glükóz koncentráció változása a kezelési idő függvényében a 13. ábrán látható.

A mérési eredmények szerint 110 μM CBS, valamint az ennek a koncentrációnak megfelelő trietilamin és alkohol mennyiség sem aerob, sem szimianerob viszonyok között nem befolyásolja az *E. coli* sejtek glükóz hasznosítását.



12. ábra.

A CBS hatása *B. subtilis* sejtek glükóz felvételére.



13. ábra.

A CBS hatása *E.coli* sejtek glükóz felvételére aerob, illetve szemianerob körülmények között.

3.3.4. A CBS hatása néhány katabolikus enzimre.

A baktériumok égzésével és TTC redukciójával kapcsolatos eredmények indokoltá tették a CBS hatásának vizsgálatát a szénhidrát katabolizmus enzimeire. *B. subtilis* és *E. coli* sejtmentes extraktumokban mértük az LDH, MDH, G-6-PDH és NADH-oxidáz aktivitásokat. A 9. táblázatban a gátlási eredmények érthetőbbé tétele céljából megadjuk az enzimek specifikus aktivitását és a vizsgálati rendszerbe bekerülő fehérjemennyiségeket.

9. táblázat

B. subtilis és *E. coli* LDH, MDH, G-6-PDH és NADH-oxidáz enzimek specifikus aktivitása és a vizsgálati rendszer fehérjetartalma.

Sejtmentes extraktum	LDH	MDH	G-6-PDH	NADH-oxidáz
NE/mg fehérje ^x				
<i>B. subtilis</i>	0,214 ± 0,03	1,28 ± 0,11	0,091 ± 0,02	0,022 ± 0,003
<i>E. coli</i>	0,515 ± 0,04	5,25 ± 0,41	0,140 ± 0,03	0,324 ± 0,010
µg fehérje/teszt ml				
<i>B. subtilis</i>	51 ± 10	7 ± 2	230 ± 20	230 ± 98
<i>E. coli</i>	9 ± 2	2 ± 1	97 ± 15	25 ± 5
^x NE µmol átalakított szubsztrát x perc ⁻¹				

A 9. táblázat adatai szerint az egyes enzimek specifikus aktivitása lényegesen különbözik. Az *E. coli* enzimek az összes vizsgált esetben magasabb

aktivitást mutattak, mint a B. subtilis megfelelő enzimét. A leg-
nagyobb különbség - egy nagyfajrend - a NADH-oxidáz esetében van.
Az említett eltérések arra vezettek, hogy a gátlóanyag hatását az
egyes enzimekre igen eltérő fehérfékoncentráció mellett lehetett
vizsgálni, ami megnehezíti az eredmények értékelését. Nehézséget
okozott az is, hogy az LDH és az MDH aktivitásához elkerülhetetlen-
en hozzáadódik a NADH-oxidáz aktivitása is. A B. subtilis enzimek-
nél és az E. coli MDH-nál, a NADH-oxidáz aktivitás a vizsgált oxido-
reduktázok aktivitásához mérten elhanyagolható volt. Az E. coli LDH
esetében azonban - még az enzimindukció szempontjából optimális te-
nyésztési körülmények között is - a piruvát nélkül mért NADH oxidáció
elérte az LDH szubsztitáltjának jelenlétében mért érték 35-40 %-át.
A 9. táblázatban közölt adat az E. coli LDH valódi értéke, amelyet a
NADH-oxidáz aktivitás korrekcióba vétele után kaptunk.

Különböző CBS koncentrációk hatását a vizsgált B. subtilis E. coli
enzimekre a 10. táblázatban mutatjuk be. Az alkohol végkoncentráció
minden esetben 3,3 % volt, ezért kontrollként az enzimaktivitásokat
3,3 % alkohol, illetve 3,3 % alkohol és a legnagyobb CBS koncentráci-
óval megfigyző trietilamin mennyiség /300 µM/ jelenlétében mértük,
valamint alkalmazzunk CBS, trietilamin és alkohol nélküli kontrolokat
is. A gátlási értékeket az utóbbinak a százalékosan adtuk meg. Az
E. coli LDH gátolt aktivitási számított értékek. Ez esetben a mért
aktivitásokból az azonos CBS koncentráció jelenlétében mért NADH-oxidáz
aktivitásokat vontuk le és az eredményt az ugyancsak számított, kontrol
LDH aktivitás százalékában fejeztük ki.

10. táblázat

A CBS hatása B.subtilis és E.coli NADH-oxidáz, LDH, MDH és G-6-PDH
enzimeire.

Sejtmentes extraktum	Kezelés			E n z i m a k t i v i t á s %							
	CBS μM	TEA μM	E-OH %	NADH- oxidáz	LDH	MDH	G-6-PDH				
B.subtilis	0	0	0	100	±2	100	± 2	100	± 3	100	± 5
	0	0	3,3	99	±2	101	± 2	100	± 2	97	± 4
	0	300	3,3	100	±2	99	± 2	97	± 2	99	± 4
	5	5	3,3	93	±1	-	-	-	-	-	-
	10	10	3,3	86	±2	-	-	-	-	-	-
	30	30	3,3	79	±2	-	-	-	-	-	-
	50	50	3,3	74	±3	98	± 3	98	± 3	99	± 5
	100	100	3,3	56	±2	93	± 2	93	± 2	99	± 4
300	300	3,3	38	±2	85	± 2	85	± 3	96	± 4	
E.coli	0	0	0	100	±2	100	± 3	100	± 2	100	± 4
	0	0	3,3	101	± 3	44	± 3	98	± 3	86	± 3
	0	300	3,3	100	±2	45	± 3	98	± 3	82	± 4
	5	5	3,3	76	±2	-	-	-	-	-	-
	10	10	3,3	66	± 3	-	-	-	-	-	-
	30	30	3,3	46	±	-	-	-	-	-	-
	50	50	3,3	32	±2	43	± 4	96	± 3	81	± 4
	100	100	3,3	15	±2	36	± 3	91	± 3	72	± 5
300	300	3,3	13	±2	22	± 3	85	± 2	45	± 5	

A 10. táblázat adatai szerint a CBS, az alkalmazott koncentrációhatáron belül - a B.subtilis G-6-PDH kivételével - az összes vizsgált enzimet kisebb-nagyobb mértékben gátolta. A CBS gyakorlatilag azonos hatást fejtett ki a B.subtilis LDH és MDH enzimekre, valamint az E.coli MDH-ra. A táblázatban nem tüntettük fel, hogy az említett három enzim aktivitását 600, illetve 900 μM CBS jelenlétében is mértük. A gátlóhatás a CBS koncentráció függvényében - a hasonló mennyiségben alkalmazott trietil-

amin kontrolltól függetlenül - tovább fokozódott. Az E.coli LDH-ra és G-6-PDH-ra a CBS lényegesen nagyobb hatással volt, mint a B.subtilis megfelelő enzimeire. Figyelembe kell vennünk azonban, hogy az alkohol ennek a két enzimnek az aktivitását szembetűnően csökkenti. Mindkét baktérium esetében a NADH-oxidáznál volt a legnagyobb mértékű gátló hatás. A NADH-oxidázok aktivitását azok a kisebb CBS koncentrációk is jelentősen csökkentették, amelyek a többi vizsgált enzim aktivitását gyakorlatilag nem befolyásolták.

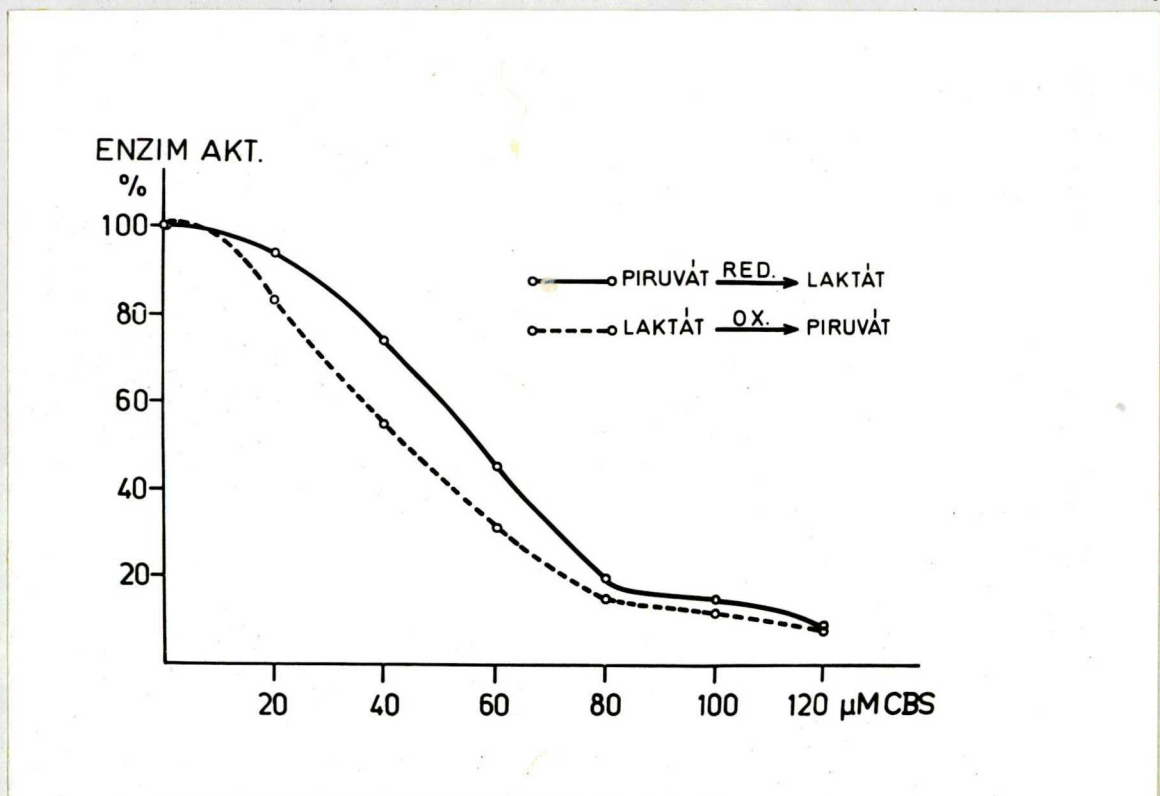
A hatásos CBS koncentrációkat és az egyes enzimek mérési rendszerébe bekerülő fehérjemennyiségeket összevetve, ugyancsak az tűnik ki, hogy a NADH-oxidázok jelentős gátlása - különösen a B.subtilis extraktum esetében - a viszonylag magas fehérjekoncentráció ellenére következett be. Összehasonlítva ebből a szempontból a kétféle NADH-oxidázt, valószínűnek látszik, hogy ha a specifikus aktivitások nagyságrendnyi különbségét az enzimek tisztításával csökkentenénk, az eltérés a két enzim gátlása között ugyancsak csökkenne, vagy megszűnne.

3.4. A CBS-fehérje kölcsönhatására vonatkozó eredmények.

3.4.1. A CBS hatása kristályos LDH-ra.

CBS koncentrációsor jelenlétében mértük disznó vázizom LDH piruvát redukáló, valamint laktát oxidáló aktivitását. A CBS koncentrációsor függvényében kimutatható enzimaktivitásokat a kezeletlen kontrol százalékában kifejezve a 14. ábrán mutatjuk be.

Az ábrán a két gátlási görbe lefutásában 20-80 μ M CBS koncentrációk



14. ábra.

A kristályos LDH aktivitása a CBS koncentráció függvényében.

között kisebb eltérés látható, de a közel 100 %-os gátlás azonos CBS koncentrációknál jelentkezett az enzimreakció mindkét irányára. Az ábrán nem tüntettük fel, hogy 3,3 % alkohol, illetve 3,3 % alkohol és 120 μ M trietilamin az enzimaktivitásokat nem befolyásolta.

Egy másik kísérletben megvizsgáltuk, hogy a gátlóanyagot a reakció előtt az enzimmel inkubálva változik-e a gátlás mértéke. A kísérlet során kizárólag a 40 μ M CBS koncentrációt használtuk, amely mintegy 40 %-os gátlást okoz. Az inkubálási időt 0 és 20 perc között variáltuk, majd a keenzimet és a tejsav szubsztrátot egyszerre bemérve indítottuk el a reakciót. Az eredmények azt mutatták, hogy a 20 percen belül választott bármely időpontban a gátlás mértéke megegyezett a gyakorlatilag 0 percre inkubált mintában mért értékkel. A CBS tehát pillanatszerűen gátolja az LDH-t és a gátlás mértéke - legalábbis a vizsgált időtartamon belül - az inkubálás során nem változik.

3.4.2. A CBS enzimgátló hatása BSA jelenlétében.

60 μ M CBS hatását mértük disznó vázizem LDH aktivitására különböző BSA koncentrációk jelenlétében. A komponensek bemérési sorrendjét megcserélve azt is megvizsgáltuk, hogy a BSA képes-e az LDH-t a gátlás alól felszabadítani. Az eredményeket a 11. táblázatban tüntettük fel.

11. táblázat

A CBS hatása LDH-ra, BSA jelenlétében.

V i z s g á l t r e n d s z e r			LDH aktivitás
LDH μM	BSA μM	CBS ^{x/} μM	%
3×10^{-3}	0	0	100
3×10^{-3}	0	60	41
3×10^{-3}	3×10^{-5}	60	41
3×10^{-3}	3×10^{-4}	60	45
3×10^{-3}	3×10^{-3}	60	56
3×10^{-3}	3×10^{-2}	60	78
3×10^{-3}	3×10^{-1}	60	92
3×10^{-3}	3×10^{-1}	0	100
LDH μM	CBS μM	BSA ^{x/} μM	LDH aktivitás %
3×10^{-3}	0	0	100
3×10^{-3}	60	0	40
3×10^{-3}	60	3×10^{-3}	39
3×10^{-3}	60	3×10^{-1}	70

x/ A feltüntetett sorrend megfelel az egyes komponensek bekeverési sorrendjének.

A táblázat adatai azt mutatják, hogy ha a rendszer az enzim mellett albumint is tartalmaz, a BSA koncentráció növekedésével a CBS gátlóhatása csökken, de a gátolatlan enzimaktivitást még az LDH mennyiségénél két nagyságrenddel nagyobb BSA koncentráció sem biztosította. Ha a sorrendet megváltoztatva az albumint az enzim és a CBS után mértük be a közegbe, azonos BSA koncentráció mellett kisebb enzimaktivitást kaptunk, mint az előző esetben. Az a tény viszont, hogy nagy BSA fölösleg mellett az enzimaktivitás lényegesen magasabb,

mint amikor a gátlóanyag után nem adunk albumint a rendszerhez, arra utalt, hogy a gátlás alól az LDH felszabadítható BSA-val. Az albumin önmagában az LDH aktivitását nem befolyásolta.

3.4.3. Az LDH gátlás kinetikai vizsgálata.

0, 20, 40, illetve 60 μM CBS koncentrációkat 100, 200, 300, 400 μM NAD koncentrációkkal, valamint a fenti CBS mennyiségeket 100, 200, 300, 400 μM piroészőlősavval megfelelően variálva mértük a kristályos LDH aktivitását és az enzimgátlás kinetikai típusának megállapítása céljából a kezdeti reakciósebességeket a kétféle Lineweaver-Burk és az Augustinsson-Hofstee módszerrel ábrázoltuk /Webb, 1963/. A CBS-en kívül az LDH aktivitásra laurinsav, valamint kaprilsav hatását is vizsgáltuk. Mindkét esetben a különböző zsírsav és a fenti NAD koncentrációk mellett mért aktivitásokat az említett módon ábrázolva megállapítottuk a gátlás típusát.

A vizsgált vegyületek hatásának mértékét az 50 %-os gátlást okozó inhibitor koncentrációval, $I/50$ -el adtuk meg. A CBS esetében a NAD koncentrációssorral szemben mért adatokat Lineweaver és Burk szerint ábrázolva a szakasos módokon meghatároztuk a K_i inhibitor konstanst, és az α kölcsönhatási indexet, valamint a $\Delta F = RT \ln K_i$ képlet alapján számoltuk a szabadenergia-változást /Webb, 1963./

Az eredményeket a 12. táblázatban foglaltuk össze.

12. táblázat

A CBS, a kaprilsav /K/ és a laurinsav /L/ disznó vázizom LDH gátlását jellemző kinetikai adatok.

Szubsztrát	Inhibitor	Gátlás ti- pusa	$I/50$ M	K_i M	α	ΔF kcal/mol
Píreszőlősav	CBS	NC	$5,7 \times 10^{-5}$	-	-	-
NAD	CBS	M	$4,4 \times 10^{-5}$	5×10^{-5}	4	- 5,86
NAD	K	C	$3,0 \times 10^{-3}$	-	-	-
NAD	L	C	$3,0 \times 10^{-4}$	-	-	-

NC = nemkompetitív gátlás
C = kompetitív gátlás

M = kevert gátlás
 $I/50$ = 50 %-es gátlást előidéző
inhibitor koncentráció.

Mint az a táblázatból látható, a CBS a píreszőlősavval nemkompetitív, a NAD-dal kevert gátlást mutatott. A két vizsgált karbonsav a keenzimmel kompetitív volt. A CBS-től eltérően a zsírsavak esetében a gátlás mértéke függ az enzimvel való inkubálás idejétől.

A táblázatban 3 perces előinkubálással kapott értékeket tüntettünk fel, amely inkubálás során a rendszer a tejsav szubsztráton kívül minden komponenst tartalmazott. Ha a reakciót a zsírsavak beadása után azonnal indítottuk, az 50 %-es gátlást okozó koncentrációk mintegy megkétszereződtek. A CBS $I/50$ értékeihez viszonyítva a laurinsav egy, a kaprilsav két nagyságrenddel nagyobb koncentrációban mutat azonos hatást.

3.4.4. A CBS hatása egyéb tisztított enzimekre.

CBS, szalicilsav, exitetraciklin, valamint EDTA hatását vizsgáltuk Mg^{2+} aktivátorral működő, tisztított alkalikus foszfatázra. Az eredményeket a 13. táblázatban mutatjuk be.

13. táblázat

A CBS, a szalicilsav, az exitetraciklin, valamint az EDTA hatása alkalikus foszfatáz aktivitására.

Aktivátor	μM	Inhibitor	μM	Enzimaktivitás %
Mg^{2+}	83	-	-	100
Mg^{2+}	0	-	-	65
Mg^{2+}	83	CBS	333	98
Mg^{2+}	83	S	333	100
Mg^{2+}	83	OTC	333	83
Mg^{2+}	83	EDTA	333	72

A táblázatból látható, hogy míg a kelát-képzők, az OTC és az EDTA csökkentik az enzim aktivitását, a CBS és rekonvegyülete az alkalmazott viszonylag magas koncentrációban sincsenek rá hatással.

Az enzimes glükózméréssel kapcsolatban megvizsgáltuk a CBS hatását a glükózoxidáz és peroxidáz enzimekre. Különböző CBS koncentrációkat használva a két enzim aktivitását együtt mértük a korábban leírt glükóz meghatározási módszerrel /2.6.3./.

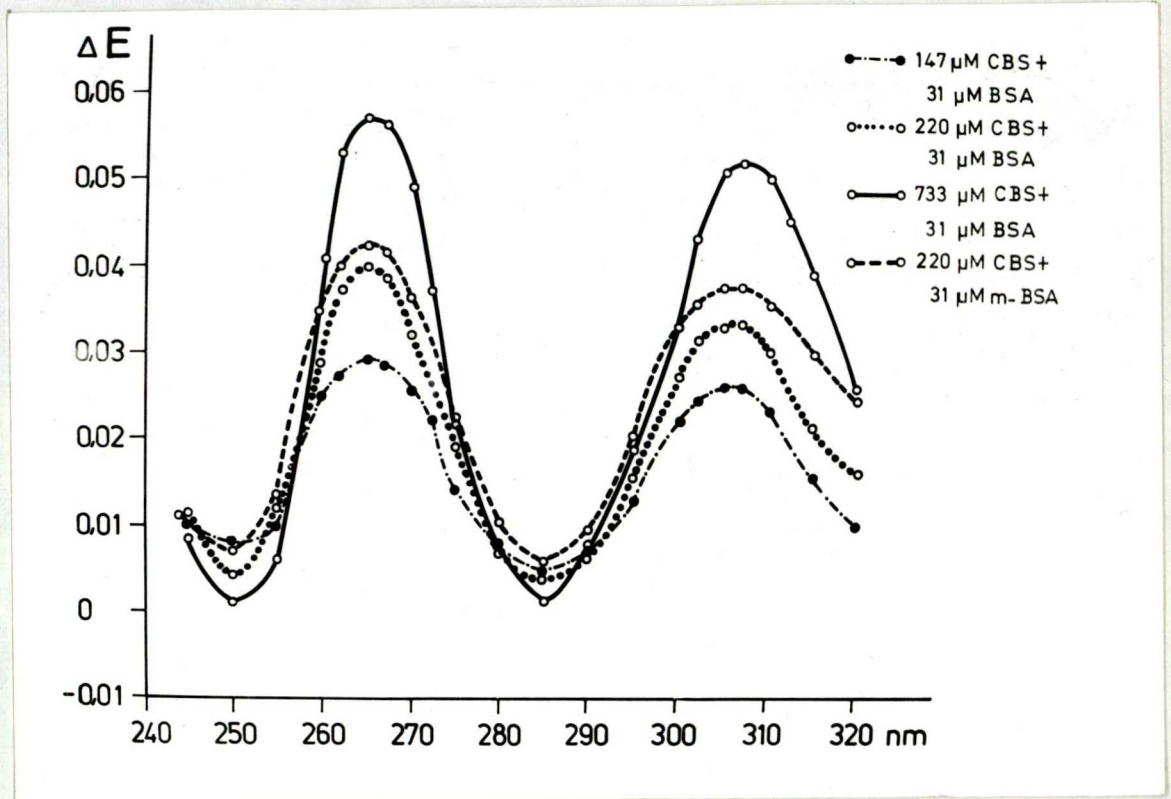
A CBS gátolta a glükóz oxidációt. A gátlást jellemző $I/50$ érték 6×10^{-4} M CBS volt. A megfelelő koncentrációban alkalmazott trietilamin és alkehel hatástalanok voltak. Ennek a CBS hatásnak egyébként a sejtek glükóz felvételével kapcsolatos vizsgálatokban nem volt jelentősége. Ugyan a CBS gátlóhatása a kisebb koncentrációknál is jelentős volt, de a baktériumokkal való inkubálás után jelenlévő hatóanyag mennyisége a glükóz meghatározást már nem zavarta.

3.4.5. A CBS fehérje komplexek vizsgálata differencia spektrofotometriával.

Az albuminnal, illetve általában a fehérjékkel komplexet képező vegyületekre jellemző, hogy megváltoztatják a fehérje elnyelési szinképét, illetve, ha a kis molekulasúlyú ligandum is tartalmaz kromofor csoportokat, a fehérje-ligandum komplex abszorpciós szinképe bizonyos hullámhossz tartományokban eltérhet az egyes komponensek fényabszorpciójának együttes értékétől.

A 15. ábrán bemutatjuk különböző CBS és azonos BSA koncentrációk jelenlétében mért spektrumok differenciáit, amelyeket a konvencionális módon kaptunk, vagyis a BSA és a CBS együttesen mért abszorpciós spektrumának extinkcióértékeiből levonva a külön-külön mért spektrumok megfelelő hullámhosszaihoz tartozó extinkciók összegét.

A 15. ábrán látható, hogy a CBS a BSA-val jellegzetes differencia spektrumot ad, amelynek két maximuma 265 és 310 nm/, illetve két minimuma 250 és 285 nm/ van. A differencia extinkciók általában a pozitív tartományba esnek, vagyis, a komplex képződéssel az elnyelés fekeződött.



15. ábra.

A CBS és a BSA, valamint a CBS és az m-BSA differencia spektruma.

A CBS koncentráció növelésével a differencia maximumekhez tartozó értékek nőttek. A minimumok több esetben a negatív tartományba kerültek át, a koncentráció viszonyok hatását ezek értékeire nem lehetett egyértelműen meghatározni. Nem ábráztuk azokat az eseteket, amikor a CBS mennyiséget változatlanul hagyva a BSA koncentrációt variáltuk. A görbe jellege, a maximumok és minimumok helye azonos volt és a 265, illetve 310 nm-en mért differencia extinkciók a BSA koncentráció növekedésével szintén fekeződtek.

A 15. ábrán az is látható, hogy a CBS ad a metilált albuminnal is differencia spektrumot, amelynek nemcsak a lefutása egyezik meg a BSA-val kapott görbékkel, hanem az azonos koncentrációk esetén a differencia maximumokhoz tartozó extinkciók is közel azonosak.

A maximumokon való méréssel megállapítható volt, hogy a spektrális változások pillanatszerűen jelentkeztek a komponensek összemérése után. A CBS - BSA esetében további spektrumváltozást nem lehetett kimutatni. Ezzel szemben a CBS - m-BSA differencia spektrum nem volt állandó, hanem már 30 perccel az összemérés után kimutatható volt a teljes spektrum fekezatos eltolódása a pozitív irányba. A jelenség oka abban keresendő, hogy az m-BSA eldatnak - feltehetően az anyag rossz vízelédékenysége miatt - a spektrum egész területén csökken az abszorpciója, míg ha CBS is van a közegben, az extinkciók hosszú ideig változatlanok maradnak.

A kísérleteket általában semleges pH-n végeztük, de néhány esetben a közeg savanyú, vagy lúgos volt. 6,6 pH-n, valamint pH 8,6-en felvéve a spektrumokat azt tapasztaltuk, hogy a differencia spektrum maximumai és minimumai a semleges közegben mért hullámhosszokkal megegyeztek. Azonban CBS és albumin koncentrációkat használva, a pH 6,6-es differencia spektrum a semleges közegben meghatározott értékektől 280 és 340 nm között nem különbözött, míg 280 nm alatt az egész spektrum kismértékben a pozitív irányban tolódott el. A pH 8,6-en felvett differencia extinkciók a teljes mérési tartományon belül nagyobbak voltak, mint a semleges pH-n, és ez az eltérés különösen 280 nm alatt volt kifejezett.

A CBS albumin komplex természetét illetően igen szemléletes volt, a BSA izoelektromos pontja közelében, pH 4,8-en végzett kísérlet. A CBS pH 6 alatt a koncentrációtól függően erősen opáles kolloid oldatot ad. Ha a CBS és az albumin oldatát összekeverjük, az opáleszcencia pillanatszerűen megszűnik, jelezve, hogy a fehérje a CBS-t komplexként oldatba vitte.

A méréseket ilyen körülmények között elvégezve egy igen nagy negatív differencia spektrumot kapunk, amelyen a korábbiaknál lényegesen nagyobb értékekkel jelentkeznek a differencia maximumok 260, illetve 310 nm-nél, valamint a 280 nm-es minimum is megtalálható. /260 nm alatt nem mértünk./ Hasonlóan a 8,6-es pH-n kapott görbéhez, a két maximum közül az alacsonyabb hullámhosszon mért a nagyobb. Valószínű, hogy a differencia spektrum eltolódását a negatív tartományban kizárólag a CBS oldat opáleszcenciájának és ebből adódó fényszórásának megszűnése okozza. Eltekintve ettől, valamint attól,

hogy a maximum-minimum közötti extinkciókülönbség a magasabb pH-n mért hasonló értékek többszöröse, a pH 4,8-on kapott görbe lényegesen nem különbözik az egyéb pH-ken mért differencia spektrumektól.

A BSA-n és az m-BSA-n kívül a citekrom c-t is megvizsgáltuk, hogy mutat-e a CBS-sel spektrumváltozást. 7,4-es pH-n 240-370 nm között 110 μ M CBS-sel és 15 μ M citekrom c-vel mérve, illetve 370-440 nm között a CBS koncentrációt ötszörösre emelve, a külön-külön és együtt mért abszorpciós spektrumek között semmiféle eltérést kimutatni nem lehetett.

A trietilszén és az alkehol az alkalmazott koncentrációkban egyik vizsgált fehérje spektrumát sem befolyásolta.

3.4.6. A CBS fehérje kötődés vizsgálata egyensúlyi dialízissel és gélszűréssel.

A CBS albumin kötődését egyensúlyi dialízissel vizsgálva a dializáló hüvelyekbe 0-6 μ mol közötti BSA koncentrációk mellett 10-10 μ mol CBS-t mértünk be és a megkötött CBS mennyiségét a dializátumban mért dreg koncentrációja alapján számoltuk. A kísérleteket pH 7,4-es pufferben végeztük és az eredményeket a 14. táblázatban mutatjuk be.

14.táblázat

A CBS egyensúlyi dialízissel mért BSA kötődése.

Vizsgált rendszer		Dializátum	Kötött	Kötött
BSA	CBS	CBS tartalma	CBS	CBS / BSA
μmol	μmol	μmol	μmol	M/M
6,0	10	0	10	1,67
4,5	10	0	10	2,22
3,0	10	0	10	3,33
1,5	10	1,1	8,9	5,95
0,75	10	5,4	4,6	6,12
0	10	10,0	0	-

A 14.táblázat adataiból látható, hogy az egyensúlyi dialízis körülményei között a BSA hatszeres moláris fölöslegben tud CBS-t stabilan megkötni.

A fentiek szerint 1 g BSA-hez mintegy 90 μmol CBS kötődik.

Az albumin, valamint kristályos LDH CBS komplexeivel kapcsolatos géliszűrési vizsgálataink eredményét csak mint kvalitatív megfigyelést közöljük. A CBS-BSA komplex - legalábbis a felvitt anyag zöme - az eszlepen megbenlott és a CBS az albumintól különválva a későbbi frakciókban jelentkezett. Ezzel szemben az LDH esetében az enzimet követő frakciók egyikében sem tudtunk kimutatni CBS-t és az enzimaktivitás a legkisebb mértékben sem szabadult fel a gátlás alól.

AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A kérdés elméleti és gyakorlati fontossága miatt már az első antibiotikumok felfedezése után megindult hatásmechanizmusuk tisztázásának vizsgálata. Az utóbbi években ez a probléma egyre növekvő számmal vonzotta a biokémikusokat és mikrobiológusokat, aminek eredményeként igen nagy vizsgálati anyag gyűlt össze. Ezekre az eredményekre támaszkodva többen megkísérelték az antibiotikumokat hatásmechanizmusuk alapján csoportosítani /Gale, 1963; Newton, 1965; Woodruff és Miller, 1962; Davis és Feingold, 1962; Gottlieb és Shaw, 1967/.

A hatásmechanizmuson alapuló legegyszerűbb osztályozás Galetől származik /Gale, 1963/:

1. A bakteriális sejtfal szintézisére, szerkezetére, vagy mindkettőre ható antibiotikumok.
2. A sejtmembrán funkcióját, szintézisét, vagy mindkettőt károsító antibiotikumok.
3. A fehérje, a nukleinsav, vagy mindkettő szintézisét gátló antibiotikumok.

A legszélesebb körben valószínűleg Newton jóval részletesebb beosztását fogadják el, amely a következő /Newton, 1965/:

1. A sejtfal szintézisét befolyásoló antibiotikumok.
2. A sejtfal és a membrán szintézisét befolyásoló antibiotikumok.
3. A membrán permeabilitását befolyásoló antibiotikumok.
4. Az elektrontranszport inhibitorai és a "szétkapcsoló" ágensek.
5. A metallepteidek szintézisét gátló és kelátképző antibiotikumok.
6. A purinek és purinnukleotidok szintézisének inhibitorai.
7. A DNS szintézis inhibitorai.
8. A genetikai információ transzkripcióját befolyásoló antibiotikumok.
9. A fehérjeszintézist gátló antibiotikumok.

Ezek a hatásmechanizmus típusok természetesen csak az első közelítésben való tájékozódást szolgálhatják. A merev osztályozás veszélyére maguk a szerzők hívják fel a figyelmet, hiszen léteznek olyan antibiotikumok is, amelyeket mai ismereteink szerint akár több csoportba is be lehet sorolni. Más esetekben egy-egy anyagról kialakult vélemény az újabb adatok fényében jelentősen megváltozott és az ilyen "meglepetések" a ma már nagyszámú kísérleti munka ellenére a jövőben is várhatók. Ez nagyon is érthetővé válik, ha meg gondoljuk Newton ide vonatkozó megállapítását: "A szenzitív sejt specifikus kötőhelye és az antibiotikum közötti kölcsönhatás reakciók láncolatát indítja el, amely végül a sejt osztódásának és

normális növekedésének gátlásához vezet, és gyakran a sejt teljes autelizisét vonja maga után." Ez egy dinamikus folyamat, amely rövidebb-hosszabb idő alatt a sejten belül nagyszámú változást hoz létre, kísérleteinkben pedig akár intakt sejteket, akár sejtmentes rendszereket vizsgálunk, a nyomonkövethető változások száma mindig alatta marad a további vizsgálatra váró paramétereknek.

A fenti szempontok és az a tény, hogy a CBS és általában a kanna-bineidek hatásmechanizmusával kapcsolatban nagyon kevés irodalmi támpontot találtunk arra késztetett, hogy első lépésben ép sejtek komplex fiziológiai folyamatait vizsgálva próbáljuk a drog hatását behatárolni. A vizsgálatok irányát megszabta, hogy a CBS már ismert biológiai hatásai és kémiai szerkezete - poláris és apoláris csepertekkel egyaránt rendelkező vegyület - elképzelhetővé tették, hogy hatásában közel áll a sejtmembrán permeabilitását befolyásoló antibiotikumokhoz. Ezt alátámasztották bizonyos irodalmi adatok, amelyek az anakardinsavról, az *Anacardium occidentale*-ből előállítható baktericid drogról állnak rendelkezésre. Ez a vegyület biológiai tulajdonságait tekintve meglepően hasonló a CBS-hez, kémiailag pedig, mint egy C_{15} -tagszámú alifás oldalláncot viselő szalicilsav származék, a CBS B-gyűrűjével rokon. Az anakardinsavat igen aktív anionos detergensként tartják számon /Flerey és mt., 1949/.

A tipikusan a baktériumok membránját károsító antibiotikumok a tyrocidinek, a gramicidinek és a polymyxinek peptid természetűek, általában ciklikusak, jellemző rájuk a felületaktivitás és az, hogy a molekulák hidrofób láncokat és poláris csoportokat is tartalmaznak. Ezek az antibiotikumok sokszor a hasonló kémiai szerkezet ellenére nagyfokú heterogenitást mutatnak antibakteriális spektrumukat, hatás módjukat és számos egyéb tulajdonságukat illetően. Legfontosabb közös jellemzőjük az, hogy a detergenssekhez hasonlóan a sejtmembránt olyan mértékben dezorganizálják, hogy az ozmótikus barrier megszűnik és a sejtől a kis molekulasúlyú "peel" anyagok, aminosavak, purinek, pirimidinek és anorganikus ionok rövid időn belül kiürülnek. Ez a hatás azonnal bekövetkezik, ahogy az anyag a baktériumokkal kapcsolatba kerül, fehérjeszintézis gátlók nem befolyásolják, és nem függ a sejtek növekedésétől, vagy metabolizmusától. Az említett antibiotikumok által előidézett sztatikus, vagy cid hatásért az ozmótikus barrier megszüntetése mellett egyes esetekben más membránfunkciók gátlását is felelőssé teszik /Gale és Tyler, 1947; Gale, 1963; Newton, 1953; 1965; Gottlieb és Shaw, 1967/.

4.1. A CBS hatása baktérium tenyészetek növekedésére.

Kísérleti körülményeink között a *B. subtilis* baktérium esetében 11 μ M CBS volt a minimális gátlási koncentráció. Az *E. coli* baktériumokat a dőg két nagyságrenddel nagyobb koncentrációban gá-

telta. A MIC ilyen nagy különbsége gyakran specifikus hatást jelez, amit az *E.coli*-nál nem is tulajdoníthatunk kizárólag a CBS-nek. Figyelembe véve a CBS és az *E.coli* sejtek kölcsönhatásával kapcsolatos eredményeket, /3.2.4./ nagyon valószínűnek látszik, hogy magas drog koncentráción kívül a szükségszerűen ugyancsak nagy alkohol és trietilamin mennyiségek tették lehetővé a CBS-nek a hatóhelyéhez való eljutását.

Nem lehet figyelmen kívül hagyni azt sem, hogy ezeknek az alkohol és trietilamin mennyiségeknek már önmagában is van hatásuk a sejtekre.

Az irodalomban fellelhető meglehetősen heterogén kísérleti körülmények miatt nem mondhatunk sokat a CBS-sel kapott MIC összevetése, más antibiotikumok MIC értékeivel. Az összehasonlítást megnehezíti, hogy az eredményeket általában nem moláris egységben adják meg. A membránra ható antibiotikumok MIC értékei az érzékeny baktériumokkal szemben 1-100 µg/ml között mozognak, így a CBS 5 µg/ml-es értéke ezen határon belül esik. Érdekes viszont, hogy sem a MIC meghatározásánál, sem a növekedési görbék felvételénél a CBS koncentrációjában a hatástalan és a cid értékek között sztatikus hatást kimutatni nem lehetett. A detergens antibiotikumok általában cid koncentrációjuk alatt, szűk határok között sztatikus hatásúak, de például a gramicidineknél kifejezetten a bakteriosztatikus hatás dominál. Az ép sejtekkel végzett kísérletekben a *B.subtilis*-re kapott MIC-nek megfelelő koncentráció körüli értékekkel dolgoztunk, figyelembe véve az itt alkalmazott nagyobb sejtszámokat is.

A membránkárosító antibiotikumokra jellemző, hogy különösen kis-mennyiségű oltóanyagot használva a lag fázis időtartamát hosszú időre megnyújtják. A gramicidin például a *Str. haemolyticus* lag fázisát több mint 10 órára telte ki. A hatást a metabolizmusnak a pool anyagok elszivárgása következtében létrejövő lelassulásával magyarázzák. A CBS nem mutatta ezt a jelenséget, akár 2×10^6 , akár 5×10^3 sejt/ml inekulumokat használtunk a növekedési vizsgálat során /6.ábra/. Az ábrán feltüntetettük a lag fázis maximális megnyúlását, ami igen ritkán és csak a nagy inekulumszámnál jelentkezett. Ennek nyilván nem a metabolitok elszivárgása az oka, hanem egy olyan határesetről van szó, amikor a drog mennyisége az inekulum jelentős, de nem teljes elpusztítására volt elegendő. A növekedési kísérletek során kiderült, hogy Mg^{2+} széles koncentráció határek között a CBS hatását nem befolyásolja /7.ábra/, BSA jelenlétében viszont a gátlás felfüggesztődik /8.ábra/.

4.2. A CBS hatása az ozmótikus barrierre.

A membrádestrukció közvetlen kimutatására végzett kísérletek teljesen negatív eredményt adtak. Az UV abszorbens anyagok és az aminoszavak leadásának CBS jelenlétében való fehozódása - ha egyáltalán a kísérleti hibákat meghaladja - olyan kicsi /4. és 5. táblázat/, hogy összevetve a sejtekben kimutatható teljes mennyiségekkel, valamint a detergens antibiotikumok hatásával /Gale és Taylor, 1947; Newton, 1953/, semmiféle jelentősége nem lehet.

A konduktemetriás mérések értékelésénél óvatosságra int a baktériumokból felszabadítható ionok kis mennyisége. Az azonban egyértelműen

kiderült, hogy a CBS nem fekezza az ionleadást /9.ábra/. A trietilaminnal végzett összes kísérlet közül egyedül a konduktometriás mérések során kaptunk pozitív eredményt. Kérdéses, hogy a vezetőképesség fekeződése az ionleadás növekedésének, vagy másoknak a következménye, de a trietilamin MIC értéke, valamint a tenyészetek növekedésére és az egyéb vizsgált paraméterekre való hatástalansága mellett szól, hogy ennek a jelenségnek a CBS baktericid hatásában valószínűleg nincs szerepe. Ezt bizonyítja, hogy a kezelési idő függvényében a vezetőképesség növekedését jelző egyenes iránytangense határozottan csökkent, amikor a trietilamin mellé CBS-t mértünk be, bár a moláris arány még mindig 2:1 maradt a trietilamin javára. Ha a két anyag ekvimolárisan volt jelen, a kontrollal azonos eredményt kaptunk, illetve a kersai, exponenciális jellegű szakyszen a CBS az ionleadást kifejezetten csökkentette.

Bár a konduktometriás vizsgálatok további kérdéseket vetettek fel, a membrándestrukció kimutatására szolgáló három független kísérletsorozat eredménye alapján kimondhatjuk, hogy a CBS durva membránkárosítást nem okoz. Hatásmechanizmusa tehát elkülöníthető a detergenseknek, illetve a tyrecidin, gramicidin és polymyxin antibiotikumoknak az oszmotikus barriert megszüntető hatásától. Ezek a kísérletek természetesen nem zárják ki annak a lehetőségét, hogy a CBS hatás más membránfunkciók gátlásával kapcsolatos.

4.3. A CBS hatása a baktériumsejtek néhány anyagcsere folyamataira.

110 μM CBS a *B.subtilis* sejtek légzését azonnal leállította, az *E.coli*ra pedig hatástalan volt. /11.ábra/. A Gram-pozitív baktériumok TTC redukciója 22 μM CBS mellett igen erősen lecsökkent, 55 μM -nál pedig gyakorlatilag megszűnt. A légzéssel ellentétben a CBS csökkentette az *E.coli* sejtek TTC redukcióját is /7.táblázat/. A vizsgálatot glükózon kívül más metabolizálódó cukrokkal és szerves savakkal elvégezve nemcsak a gátlást kaptuk meg, minden esetben, hanem ennek a CBS koncentráció függése is azonos volt. /8.táblázat/.

A CBS gátolja a *B.subtilis* glükóz felvételét, de még 110 μM CBS jelenlétében is a felvétel több, mint 10 perc után szűnik meg. Érdekes, hogy egy rövid stagnáló periódus után a közegben a glükóz mennyisége emelkedni látszik és ez a tendencia a nagyobb CBS koncentrációnál még kifejezettebb. Az *E.coli* glükóz felvétele zavartalan volt, bár a TTC-s eredmények miatt a kísérletet szemi-anzeroz körülmények között is elvégeztük.

A TTC-s vizsgálatokkal a légzésgátlás helyét kívántuk behatárolni. A sejtek jelentéktelen endogén tartaléka miatt a redukció zavartalan lefolyása feltételezi a légzési szubsztrát felvételét és a

katholikus reakciólánc intaktságát egészen az elektronakceptor belépési helyéig. A glükóz felvételt a CBS ugyan megszünteti, de ezt mégsem tekinthetjük a légzés^{gátlás} okának. Azonos CBS koncentrációk hatását összehasonlítva, a TTC redukció és a légzés azonnal megszünt, míg a glükóz felvétel csak egy idő után. Ez annál ellenére történt így, hogy metódikai okok miatt a két előző esetben nagyobb sejtszámú szuszpenziókat alkalmaztunk, mint a felvételi kísérletben. Másrészt a TTC-s vizsgálatokban sokkal valószínűbb, hogy a CBS nem a különböző szubsztrátok anyagfelvételét gátolja azonosan, hanem a gátlás helye metabolizmusuk közös szakaszára esik. Ismert, hogy különböző flavin-enzimek, mint a berestyánkő-sav-dehidrogenáz /EC 1.3.99.1./, a xantinoxidáz /EC 1.2.3.2./, vagy a NADH-citokrom c-reduktáz /EC 1.6.2.1./ redukálják a tetrazoliumokat, míg a piridinnukleotid dependens oxidoreduktázok, illetve redukált koenzimek nem képesek erre. A TTC esetén a közvetlen elektron donor a citokrom a_3 . /Brodie és Gets, 1951; 1952; 1952a; Jánber, 1958/.

Feltételezve, hogy magának a TTC-nek a sejtekbe való bejutását a CBS nem akadályozza, a légzés^{gátlás} okát a berestyánkő-sav-dehidrogenáz és a citokrom a_3 , illetve általánosabban a hidrogéntranszportot az elektrontranszporttal összekötő flavoproteinek és az említett citokrom között kell keresnünk, mivel a TTC redukció szukcinát jelenlétében is gátolt volt.

A hatóhely további megközelítésére a NADH-oxidáz sejtmentes rendszerben való vizsgálata igen alkalmasnak látszott. Ebben az esetben nem egyetlen enzimmel, hanem egy komplex rendszerrel, a sejtmembrán különböző méretű töredékeivel dolgozunk, amely összerendezett működésre alkalmas állapotban tartalmazza a hidrogén-elektrontranszportban résztvevő flavoproteineket és a citokromrendszert. Összetettségéből adódó hátránya egyúttal előny is, mert mérésével a biológiai oxidációnak éppen a számunkra érdekes szakasza velt tesztelhető.

A vársorozásnak megfelelően a CBS jelentős mértékben gátolta a NADH-oxidáz aktivitást és kisebb-nagyobb mértékben a vizsgált oxidoreduktázokét mindkét baktérium esetében, kivéve a *B. subtilis* G-6-PDH-t.

/10. táblázat/.

Weber májextraktumokban kimutatta, hogy a glükolitikus kulcsenzimeket a glükokinázt /EC 2.7.1.2./, a foszfofruktokinázt /EC 2.7.1.11./, valamint a piroszőlősavkinázt /EC 2.7.1.40./ különböző zsírsavak a szénlanc hosszának függvényében gátolják és ezután regulálják a szénhidrát metabolizmust. /Lee és Weber, 1968; Weber és m., 1966./. Baktériumokkal hasonló eredményeket kapott Ferdinandus és Clark, azzal a kiegészítéssel, hogy a zsírsavak kisebb mértékben csökkentik a regulációban szerepet nem játszó dehidrogenázok aktivitását is /Ferdinandus és Clark, 1969/. A fenti irodalmi adatok alapján nem meglepő, hogy a CBS az összes vizsgált enzimet gátolta. Elsősorban alkil csoportja miatt valószínű, hogy van még néhány enzim a szénhidrát metabolizmus területén, a vizsgálatokon kívül is, amire hat.

A CBS hatásmódja szempontjából azonban a szénhidrát metabolizmus enzimeit közül a legnagyobb valószínűséggel a NADH-oxidáz funkciójának zavara játszhat szerepet. A gátláshoz szükséges CBS koncentráció a *B. subtilis* esetében jelentősen nagyobb a MIC értéknél, de egy membrán-kötött lipoprotein esetében, figyelembevéve a CBS hidrofób jellegét, ennek nem lehet jelentősége.

A NADH oxidáz gátlása összeegyeztethető a drog egyéb hatásaival, nevezetesen az szenneli légzésgátlással és az energiaigényes folyamatok - mint pl. a glükózfelvétel - rövid időn belüli leállításával.

4.4. A CBS hatása fehérjékre.

A CBS-sel és kristályos LDH-val, illetve BSA-val végzett kísérletek együttes eredménye arra utalt, hogy a CBS bizonyos fehérjékkel komplexeket képez. A CBS-nek a fehérjékre való hatásában a nem túl nagy számú kísérleti példa ellenére bizonyos specificitás megfigyelhető. A bakteriális enzimeken kívül a CBS gátolja a disznó vázizom LDH, valamint a glükózoxidáz-peroxidáz rendszer aktivitását. /3.4.4./, de nincs hatással az alkalikus foszfatázra /13. táblázat/, és a tripszinre sem /Perényi, 1974/.

A CBS komplexet képez a BSA-val, de - legalábbis differencia spektrum alapján - nem mutatható ki kölcsönhatás a citokrom c-val /3.4.5./. Ugyancsak gátló hatást mutattunk ki ascites tumorek sejtmentes extraktumában LDH-val /Hullán, Gaál, Holczinger és Kremmer, 1972/, illetve NADH-oxidázzal, valamint NADH-2,6-diklórfenilindofenol-oxidoreduktázzal szemben /Hullán, Gaál, Holczinger és Kremmer, 1973/.

A CBS-fehérje kölcsönhatásra jellemző, hogy mind az enzim gátlása, /3.4.1./, mind a BSA-val létrejövő komplex kialakulása pillanatszerű /3.4.5./ és a hatások a kezelési idővel nem fekeződnek.

Az LDH gátlása reverzibilis /3.4.2./ és így egyensúlyi konstanssal jellemezhető. A BSA molekulán pedig a CBS számára hat viszonylag stabil kötőhelyet lehetett kimutatni /3.4.6./

A pH függvényében az LDH gátlást nem vizsgáltuk. Nemi felvilágosítást ad az eltérő pH optimumok miatt - 7,4, illetve 9,0 - az ellentett reakciók gátlásának vizsgálata, ami véleményünk szerint nem mutat nagy különbséget, különösen ha figyelembe vesszük a reakciókörülmények egyéb szükségszerű eltéréseit is. /14.ábra/.

Ugyanakkor a CBS-BSA kötődést jellemző differencia spektrumok jellege a pH-val, az alkalikus irányban szintén kevésbé változott és a kiugróan legnagyobb mértékű kötődést feltételező spektrális változást éppen a BSA izoelektromos pontja közelében kaptuk, ahol egyébként a CBS poláris csoportjai sincsennek disszociált állapotban /3.4.5./. Ezzel összhangban van az az eredmény is, hogy míg egy bázikus karakterű fehérjével - a citokrom c-val - a CBS differencia spektrumot nem adott egyáltalán, a metilált BSA-val felvett differencia spektrumok kvalitatív és kvantitatív szempontból egyaránt megegyeztek az azonos koncentrációjú BSA-val mért értékekkel /3.4.5./.

Magának a differencia spektrumnak az értékelését bizonytalanná teszi, hogy a ligandum is abszorbeál az UV tartományban. Véleményünk szerint az látszik legvalószínűbbnek, hogy a kötődés következtében a CBS abszorpció maximumai 10-10 nm-es vörös, az albumin 280 nm-es

maximuma 15 nm-es kék eltolódást szenvedtek. Pelet és Steinhardt az albumin differencia spektrumában jelentkező kék eltolódás magyarázatára többféle lehetőséget is leír /Pelet és Steinhardt, 1968/.

A 285 nm-es minimumot is figyelembe véve úgy gondoljuk, hogy a CBS kötődése során a BSA kisebb konformációs változására lehet számítani, mint a hasonlóan kis koncentrációkban vizsgált anionos detergenssek esetén /Bigelow, 1962; Pelet és Steinhardt, 1968/.

A spektrális változás alapján a CBS-t illetőleg valószínűnek tartjuk, hogy a kötődés érinti a B gyűrű π elektronrendszerét.

Arra a kérdésre, hogy mi a közös a piridinnukleotid-oxidoreduktázak gátlásában úgy látszik, hogy az LDH gátlás kinetikai vizsgálata magyarázatot ad. A CBS nemkompetitív gátlást mutatott a piroesszőlósavval és kevert gátlást az oxidált keenzimmal /12. táblázat/. Számunkra az utóbbi eredmény mond többet, jelezve, hogy az inhibitor és a keenzim kötőhelye részben fedik egymást.

Andersen és munkatársai különböző keenzimanalógok kölcsönhatásának kinetikai analizisével feltérképezték az L- α -glicerofoszfátdehidrogenáz /EC 1.1.1.8./ keenzim kötőhelyét, és a NAD szerkezetének megfelelő három régió mellett egy hidrofób régiót is találtak /Kim és Andersen, 1968/.

Az említett enzimen kívül többek között ADH-t, G-6-PDH-t, LDH-t és MDH-t is vizsgáltak. N^1 -alkilnikotinamid-kloridok homológ sorozatával a metiltől a dodecyl származékig. Véleményük szerint az

egyes dehidrogenázok NAD kötésében a hidrefób régiók szerepe különböző, mert a három utóbbi enzim esetében a gátló koncentrációknál már valószínűleg a gátlásban a detergens hatások domináltak /Anderson, Reynolds, Anderson, 1965/. A CBS inhibitor konstansa viszont még az LDH-val szemben is kisebb, mint ez az érték az említett hemológ sor leghatékonyabb tagja és az ADH esetén. Az N^1 -alkilnikotinamidkloridok detergens jellegű, aspecifikus gátlásával szemben tehát a CBS az LDH-t specifikusan gátolta és az inhibitor konstansból számolt jelentékeny kötési energia olyan értéknek felel meg, amely az alkilcsepegt és a gyűrűk - elsősorban a B gyűrű - hidrefób kötőhellyel való diszperziós kölcsönhatásából származhat /Webb, 1963/.

Bár alternatív magyarázatok is lehetségesek, valószínű, hogy kölcsönhatásba lépve a NAD kötőhely hidrefób régiójával a CBS nemcsak az általunk vizsgált, hanem egyéb dehidrogenázokat is gátol és ez a gátlások esetben kifejezettebb lehet az LDH gátlásánál.

A szalicilsavról és a fenolról egyaránt kimutatták, hogy gátolja a D-aminesav-oxidáz /EC 1.4.3.3./ és a gátlásban többféle mechanizmus is szerepet játszik. Mindkét vegyület komplexet képez a keenzimmel és egyúttal vetélkedik a FAD kötőhelyért. A szalicilsav ráadásul a szubszt-ráttal is kompetitív, így háromféle mechanizmussal is gátolja az enzimet /Webb, 1963/.

A szalicilsavval való kémiai rokonságon kívül egy sor többé-kevésbé indirekt adatunk van arra, hogy a CBS különböző flavoproteineknek is inhibitora. A CBS NADH-oxidázra való hatásában szerepet játszhat a szalicilsavval leírt egyik, vagy másik gátlási mechanizmus, de elméleti

meggondelések alapján még egy specifikus inhibitor hatást is feltételezhetünk. Ujabban több membrán-kötött, lipoproteín enzimekről kimutatták, hogy működésükhöz reverzibilisen eltávolítható lipidek szükségesek. Ezek között van a NADH-citokrom-c-reduktáz /EC 1.6.99.3./ is, amely aktivitásához 1:1 arányban lecitint és lizelecitint igényel. A CBS-ről joggal feltételezhetjük, hogy mind a lipidekkel, mind a kötőhelyükkel kapcsolatba léphet és ez akár döntő is lehet a NADH-oxidázra való hatásában.

Összegezve a különböző kísérletek eredményeit megállapíthatjuk, hogy a CBS a fehérjével kovalens kötéseket nem létesít és az elektrosztatikus kölcsönhatások is valószínűtlenek. A BSA-n és a vizsgált enzimeken kívül feltehetően több más fehérjével is kapcsolatba lép és minden bizonnyal ennek előfeltétele a CBS számára megfelelő hidrofób kötőhely megléte a fehérjemolekulán.

4.5. A CBS szelektivitásával, in vivo inaktiválódásával és hatás- módjával kapcsolatos eredmények áttekintése.

A CBS és a baktériumok kapcsolatának vizsgálatakor kiderült, hogy a drog nemcsak a *B. subtilis*, hanem az *E. coli* sejtekhez is kötődött. Ezekről a baktériumokról azonban hideg pufferrel lemosható volt, és a mosott sejtekből CBS-t kimutatni nem lehetett /6. táblázat/.

Hansch igen szemléletes kifejezése szerint a különböző vegyületek

a baktériumok membránjáig a sejtfalon keresztül egy "random walk" során jutnak el. Kimutatták, hogy ennek bekövetkezése, vagy elmaradása az anyag polaritásától függ, amelynek optimális értéke a Gram-pozitív, illetve a Gram-negatív sejtek esetében különböző /Lien, Hansch és Anderson, 1968/.

Ismert, hogy a lipideknek szerepük van a baktériumok rezisztenciájában és megfelelő tenyésztési viszonyok között a celluláris lipidek növekedésével ezt fekozni lehet. /Váci, 1967; /Clarke és Lilly pedig elektronmikroszkópos felvételekkel kimutatták, hogy az E.coli sejtfalának mindkét oldalán lipoprotein membrán található /Clarke és Lilly, 1962/. A CBS baktériumsejtekkel való kölcsönhatásának eredményeit a fenti irodalmakkal egybevetve az antimikróbás szelektivitás okaiban kereshető, hogy a Gram-negatív sejtek magas lipid-tartalmú, lipoprotein membránnal védett sejtfala megakadályozza a hidegérőbb drog eljutását hatóhelyéhez.

A CBS és a többi antimikróbás hatású kannabinoid különböző fehérjék, vagy szérum jelenlétében inaktiválódnak /Kabelik, Krejci és Santavy, 1960; Mecheulam és Gaoni, 1967/. Kísérleteink során bebizonyosodott, hogy a CBS viszonylag stabil komplexeket képez a BSA-val /3.4.5. és 3.4.6./. Nagyon sok kemoterápeutikumról ismert azonban, hogy kötődik az albuminhez és ennek ellenére in vivo hatásos.

A BSA a szérumhoz viszonyítva egy nagyságrenddel kisebb koncentrációban egyértelműen felfüggesztette B.subtilis tenyésztés növekedé-

sére az aktuális gátlási koncentráció ötszörösének hatását /7.ábra/, mégis a CBS rendkívül hidrofób karaktere /2.3.1./ és a különböző fehérjékkel szemben mutatott viselkedése miatt valószínű, hogy az in vivo aktivitásvesztés oka elsősorban nem az albuminhoz, hanem a lipoproteinekhez való kötődése lehet. Ezt részben alátámasztják jelzett Δ^1 -THC-vel kapott eredmények, amelyek alapján feltételezik, hogy a drog transzportja lipoproteinekhez kötötten történik /Wahlquist és m., 1970/.

Ugyanakkor ez az elképzelés és a Δ^1 -THC gyors megabiolizmusáról közölt adatok felvetik annak a lehetőségét is, hogy az antimikrobiális hatás elvesztésének okát esetleg nem, vagy nem kizárólag a fehérjekötődésben kell keresni.

Kísérleteink alapján a CBS hatásmechanizmusával kapcsolatban néhány negatív, illetve pozitív megállapítást tehetünk.

Megállapítható, hogy a CBS a tyrocidinek, gramicidinek és polymyxinnek hatásához hasonló durva membránkárosítást nem okoz. A CBS szerkezetében ehhez a hatásához valószínűleg két feltétel is hiányzik. Az említett antibiotikumok lipofil és lipofób része szterikusan a molekula ellentétes oldalán helyezkedik el és a poláris csoportok karaktere valószínűleg erősebb, mint a CBS-é.

Hatástalansága az alkalikus foszfátázra, valamint az a tény, hogy Mg^{2+} a CBS gátló hatását baktérium tenyészet növekedésére nem befolyásolta, emellett szól, hogy nem fémkomplexek képzésén keresztül hat. Ez azonban korántsem biztos, különösen ha a szalicilsav komplex-

képző tulajdonságait figyelembe vesszük.

A fent említett két következtetés összhangban van a CBS kémiai módosításáról, valamint a többi antimikróbás hatású kannabineidről rendelkezésre álló adatokkal. Igaz, hogy a karboxil-csepert helyettesítése más csepertekkel az aktivitás elvesztését vonta maga után /Ferenczy, 1962/, de a négy ismert antimikróbás hatású kannabineid közül kettőnek, a kannabidiolnak /I/ és a kannabigárolnak /X/, a molekuláján nincs karboxil-csepert.

Az ép sejtek anyagcseréjével kapcsolatos vizsgálatok a biológiai oxidáció zavarára hívták fel a figyelmet, egyúttal kizárták azt a lehetőséget, hogy a CBS, mint szétkapcsoló ágens hat. A légzésgátlást a NADH-oxidáz, illetve valószínűleg a funkciójában résztvevő flavoproteinek gátlása okozza.

A BSA-val képzett CBS komplexek vizsgálata és disznó vázizom LDH gátlásának kinetikai analízise szerint a CBS hatása a fehérjékre nem mutat specifikus, detergens jellegűt, sőt, a poláris csepertek szerepe valószínűleg alárendelt és a kötődésben a diszperziós erők dominálnak. A CBS-t ez a tulajdonsága specifikussá teszi, de specifikusa nem szűkül le nagyon, így a glükóz oxidáció reakciói közül három enzimecsepertet emelhetünk ki, amelyeknek várhatóan többé-kevésbé minden tagjára hathat a CBS. Az egyik a flavoproteinek, a másik a piridinnukleotid dependens oxidoreduktázak, a harmadik a glükolitikus kulcsenzimek csepertje. Míg a flavoproteinekre és a

dehidrogenázokra vonatkozóan több kísérleti eredménnyel rendelkezünk, a Weber-féle regulációs enzimekre való CBS hatás csak feltételezés.

A MIC jelenlétében a sejteken belül a CBS gátló hatása a NADH-oxidázra valószínűleg tökéletes. A sejt membránján lokalizált lipoproteinek a közegben lévő hatóanyag koncentráció többszörösét köthetik meg. Ha a tökéletes légzésgátlás mellett az Embden-Meyerhof reakciók közül is megfelelő mértékű gátlás alá kerül valamelyik enzim, a baktericid hatás az energiaellátás zavara miatt következhet be.

A CBS hatásmódjával kapcsolatos kísérleteink szükségszerűen a vizsgálható lehetőségek töredékére szorítkoztak. Véleményünk szerint a hatásmechanizmus további tisztázására ugyancsak a sejtmembránnal kapcsolatban kellene kísérleteket végezni és elsősorban a CBS-nek a membrán-kötött, lipid dependens lipoproteinekre való hatását vizsgálni.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben a kannabidiolsavat /CBS/, a Cannabis sativa L. baktericid hatóanyagát vizsgáltuk.

Az eredményeket az alábbiakban foglaljuk össze:

1. A CBS koncentráció biológiai eredetű közegben alkalmas meghatározására differencia spektrofotometrián alapuló módszert dolgoztunk ki.
2. A CBS gátolta a B.subtilis tenyészetek növekedését, légzését, trifeniltetrazeliumklorid redukcióját és glükózfelvételét.
3. A CBS hatására nem fekeződött az ionok és a kismolekulásúlyú metabolitok leadása az érzékeny sejtekből.
4. A CBS mind a B.subtilis, mind az E.coli sejtmentes extraktumokban jelentősen gátolta a NADH-oxidáz aktivitást, és különböző mértékű gátlásokat produkált piridinnukleotid dependens oxidoreduktázakkal szemben.
5. Marha szérumalbuminnal képzett komplexének, valamint a disznó vázizom tejsavdehidrogenáz gátlás kinetikájának vizsgálatával megkíséreltük a CBS fehérjékre való hatását jellemezni, amelyben - véleményünk szerint - a hidrofób kölcsönhatások dominálnak.
6. Kísérleti eredményeink alapján diszkutáltuk a CBS szelektivitásának, in vivo hatástalanná válásának és a baktericid hatás módjának valószínű okait.

I R O D A L O M

1. Adams, R. /1941-1942/: Marihuana. Harvey Lect. 37, 168.p.
2. Adams, R. /1942/: Lásd: Mechoulam, R. - Ben Zvi, Z. és Gaoni, Y. /1968/.
3. Adams, R., - Baker, B.R., és Wearn, R.B. /1940/: Structure of cannabinol.III. Synthesis of cannabinol, 1-hydroxy-3-n-amy-6,6,9-trimethyl-6-dibenzopyran. J.Amer.Chem.Soc. 62, 2204.p.
4. Adams, R., - Hunt, M. és Clark, J.H. /1940/: Structure of cannabidiol, a product isolated from the marihuana extract of Minnesota wild hemp. I. J.Amer.Chem.Soc. 62, 196.p.
5. Adams, R., - MacKenzie, S. - Leewe, Jr. és S. /1948/: Tetrahydrocannabinol homologs with doubly branched alkyl groups in the 3-position. XVIII. J.Amer.Chem.Soc. 70, 664.p.
6. Adams, R., - Pease, C., - Clark, R. /1940/: Lásd: Mechoulam, R. és Gaoni, Y. /1967/.
7. Anagnostopoulos, C. és Spizizen, J. /1961/: Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. J.Bacterial. 81, 741.p.
8. Anderson, B.M., - Reynolds, M.C., és Anderson, C.D. /1965/: Hydrophobic interactions of inhibitors with yeast alcohol dehydrogenase. Biochim.Biophys. Acta, 99, 46.p.
9. Beam, W., /1911/: Lásd: Novák, I., - Búzás, G. és Tóth, L. /1962/: ill. Grlic, L. /1964/.
10. Bigelow, C.C., /1962/: The effect of dodecyl sulfate on the ultra-violet spectra of proteins. Biochemistry, 1, 197.p.
11. Bishop, D.G., - Rutberg, L. és Samuelson, B. /1967/: The solubilization of the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis* by sodium dodecyl sulphate. Eur.J. Biochem. 2, 454.p.
12. Bohlig, K. /1940/: Lásd: Mechoulam, R. és Gaoni, Y. /1967/.
13. Brandenberger, H. és Hanson, R. /1953/: Spectrophotometric determination of acid and alkaline phosphatases. Helv.Chim. Acta, 36, 900.p.
14. Brodie, A.F., és Gets, J.S. /1951/: Effects of an isolated dehydrogenase enzyme and flavoprotein on the reduction of triphenyltetrazolium chloride. Science 114, 40.p.

15. Bredie, A.F., és Gets, J.S., /1952/: The reduction of tetrazolium salts by an isolated bacterial flavoprotein. *Science*, 116. 588.p.
16. Bredie, A.F., és Gets, J.S., /1952a/: Bacterial DPN-cytochrome-c reductase. *Fed.Proc.* 11. 289.p.
17. Brown, H.D., /1971/: Chemistry of the cell interface. Part. A. Academic Press, New York and London.
18. Bullock, F.J.; /1970/: Lásd: Mecheulam, R. és Gaoni, Y. /1967/.
19. Caddy, B., /1967/: Gas chromatography of Indian hemp /Cannabis sativa L./. *J.Pharm.Pharmacol.* 19. 851.p.
20. Caldas, A., /1970/: Chemical identification of cannabis. *Anal.Chim. Acta*, 49. 194.p.
21. Clarke, P.H., és Lilly, M.D., /1962/: A general structure for cell walls of Gram-negative bacteria. *Nature*, 195. 516.p.
22. Dahlqvist, A., /1964/: *Anal. Biochemistry*, 7. 18.p.
23. Davis, B.D., és Feingold, D.S., /1962/: Antimicrobial agents; Mechanism of action and use in metabolic studies. Szerk: Gunsalus, I.C. és Stanier, D.S. "The bacteria, Vol.4. The Physiology of growth." Academic Press, New York, London.
24. Dawson, R.M.C., - Elliott, D.C., - Elliott, W.H. és Jones, K.M., /1969/: Data for biochemical research. Oxford at the Clarendon Press.
25. DeMess, R.D., /1955/: Glucose 6-phosphate and 6-phosphogluconic dehydrogenases from *Leuconostoc mesenteroides*. Szerk.: Celowick, S.P. és Kaplan, N.O., "Methods in enzymology, Vol. 1.p. 328. Academic Press, Inc., New York.
26. De Repp, R.S., /1960/: Chromatographic Separation of the Phenolic Compounds of *Cannabis sativa*. *J.Amer.Pharmac.Ass., Sci. Ed.* 49. 756.p.
27. Dikstein, S., /1959/: The active surface of yeast lactic acid dehydrogenase. /*Biochim. Biophys. Acta*, 36. 397.
28. Drebotke, V.G., - Rasha, E.J., - Ajzenman, B.E., és mt., /1957/: Fitenyoidj ich rol v prirode. *Izd. Leningrad. Univ.*, 143.p.
29. Duquenois, Pl, és Negm, H. /1938/. Lásd: Novák, I., Búzás, G., és Tóth L., illetve Grlic, L. /1964/.
30. Engström, L., /1964/: Studies on bovine-liver alkaline phosphatase, purification, phosphate incorporation. *Biochem. Biophys. Acta*, 92, 71.

31. Familie, C.G., és Davis, T.W.M., /1961/: J.Pharm. Pharmacol. 13. 767. Lásd: Mecheulam, R., Shani, A., Edery, H. és Grunfeld, Y. /1970/.
32. Farnsworth, N.R., /1969/: Pharmacognosy and chemistry of "Cannabis sativa". J.Amer. Pharm.Assec. NS9. 410.p.
33. Ferdinandus, J., és Clark, J.B., /1969/: Selective inhibition of bacterial enzymes by free fatty acids. J.Bacteriol. 98. 1109.
34. Ferenczy, L., /1956/: Antibacterial Substances in Seeds. Nature, 178. 639.p.
35. Ferenczy, L.; /1956a/: Occurence of Antibacterial Compounds in Seeds and Fruits. Acta Biol. Hung. 6. 317.p.
36. Ferenczy, L., /1956b/: Növénymagvak bakteriosztatikus hatása patogén baktérium-fajokra. Acta Pharm. Hung. 26. 122.p.
37. Ferenczy, L., /1962/: Acta Biologica Szeged, 8. /suppl./ 37. Die Forschungen über die pflanzlichen Antibiotika /Phytenzide/.
38. Ferenczy, L., - Gracza, L., és Jakebey, I., /1958/: An antibacterial preparatum from Hemp. /Cannabis sativa/. Die Naturwissenschaften, 45. 1.p.
39. Ferenczy, L., - Gyöngy, I., és Szabó, V., /1959/: Élettaniilag hatásos kristályos anyagok nyerése Cannabis sativa L. növényből. 148.002 számú szolgálati találmány.
40. Flerey, H.W., - Chain, E., - Heatley, N. G., - Jennings, M.A., - Sanders, A.G., - Abraham, E.P. és Flerey, M.E., /1949/: Antibiotics. Vol. 1, 2. Oxford University Press, London, New York, Toronto.
41. Fulton, C.C., /1970/: Furfurel test for Cannabis resin. Bull. Narcotics, 22. /2/, 23.
42. Gale, E.F., /1963/: Mechanisms of antibiotic action. Pharmacol. Rev., 15. 481.p.
43. Gale, E.F., - Taylor, E.S. /1947/: Assimilation of amine-acids by bacteria. /2/ The action of tyrocidin and some detergent substances in releasing amine-acids from the internal environment of Streptococcus faecalis. J.gen.Microbiol. 1, 77.p.

44. Gaoni, Y. és R. Mecheulam, /1964/: Hashish II. The Structure and Synthesis of Cannabigerol, a New Hashish Constituent. *Proc.Chem.Soc. /London/* 82.
45. Gaoni, Y. és R. Mecheulam, /1964/: Hashish III. The Isolation, Structure and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J.Amer.Chem.Soc.* 86. 1646.p.
46. Ghanrawy, M.A., /1937/: Lásd: Novák, I., Bázás, G., és Tóth L. /1962/, ill. Grlic, L. /1964/.
47. Ghosh, R., - Tedd, A.R., és Wilkinson, S. /1940/: Cannabis indica. V. The Synthesis of Cannabinol. *J.Chem.Soc. /London/*. 1393.
48. Gibson, D.M., - Davissen, E.O., - Bachhawat, B.K., - Ray, B.R. és Vestling, C.S. /1953/: Rat liver lactic dehydrogenase I. Isolation and chemical properties of the crystalline enzyme. *J. Biol. Chem.* 203. 397.p.
49. Gill, E.W., - Paten, W.D.M., és Pertwee R.G. /1970/: Preliminary experiments on the chemistry and pharmacology of Cannabis. *Nature*, 228. 134.p.
50. Gettlieb, D., és Shaw, P.D. /1967/: Antibiotics. Vol. 1. Mechanism of action. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
51. Grlic, L. /1970/: Simple thin-layer chromatography of cannabinoids by means of silica gel sheets treated with amines. *J. Chromatography*, 48. 562.p.
52. Grlic, L. /1970/: Highly sensitive chromatographic detection of cannabis constituents by means of silica gel sheets treated with silver nitrate. *Acta Pharm.Jugoslav.* 20. 19.p.
53. Grlic, L. /1964/: Recent advances in the chemical research of Cannabis. *Bull. Narcotics*, 16, 4, 29.
54. Hansch, C., - Maloney, P.P., - Fujita, T., és Muir, R.M. /1962/: Correlation of biological activity of phenoxycetic acids with Hammett substituent constants and partition coefficients. *Nature*, 194. 198.p.
55. Hefstee, B.H. /1954/: Direct and continuous spectrophotometric assay of phosphomonoesterases. *Arch. Biochem., Biophys.* 51. 139.p.
56. Holbrook, J.J. /1966/: The importance of SH-groups for enzymic activity V. The coenzyme-binding capacity of pig heart lactate dehydrogenase, isozyme I, after inhibition by various maleimides. *Biochem. Z.* 344. 141.p.
57. Hetchkiss, R.D. /1946/: Chemotherapy: applied cytochemistry, a "Currents in Biochemical Research"-ben, szerk.: D.E. Green, 379. Interscience, New York.

58. Hullán, L., - Gaál, D., - Helczinger, L., és Kremmer, T. /1972/: Effect of Vincristine on the lactate and malate dehydrogenases of serum, ascites fluid and ascites cells in tumor bearing mice. EACR symposium on mechanism of action of cytostatic agents., 1972. Budapest, Akadémiai Kiadó, 55.p.
59. Hullán, L.- Gaál, D., - Helczinger, L., és Kremmer, Z. /1973/: Effects of the Vinca alkaloids on membrane-bound enzymes., IX. International Congress on Biochemistry of IUB, 1973., Stockholm, 5a. 25.
60. Jackson, F.L., és Lightbown, J.W. /1958/: Inhibition of dihydrocymaseoxidase activity of heart-muscle preparations and of certain cell-free bacterial preparations by 2-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide. Biochem. J. 69. 63.
61. Jámber, B. /1958/: Tetrazóliumsók a biológiában. Doktori értekezés.
62. Kabelik, J., - Krejci, Z. és Santavy, F. /1960/: Cannabis as a medicament. Bull. Narc. XII. 5.
63. Kim, S.J. és Andersen, B.M. /1968/: Properties of the nicotinamide adenine dinucleotide-binding sites of L- α -glycerophosphate dehydrogenase. J.Biol.Chem. 243. 3351.p.
64. Kiskiss, D.F., és Downey, R.J. /1972/: Physical aggregation and functional reconstitution of solubilized membranes of *Bacillus stearothermophilus*. J.Bacteriol. 109. 811.p.
65. Kornberg, A. /1955/: Lactic Dehydrogenase of Muscle. "Methods in Enzymology." Szerk: S.P.Cellewick és N.O. Kaplan, 1. 441. Academic Press.
66. Korte, F., - Haag M., és Claussen, U. /1965/: Tetrahydrocannabinol-carboxylic Acid, a Component of Hashish. Angew. Chem. /Internat.Ed./ 4. 872.p.
67. Korte, F. és Sieper, H. /1960/: Isolierung von Hashish-Inhaltsstoffen aus Cannabis sativa non indica. Liebigs Ann.Chem. 630. 71.
68. Korte, F. és Sieper, H. /1964/: J. Chromatograph. 13. 90. Lásd: Mecheulam, R. /1970/.
69. Korte, F., - Sieper, H. és Tira, S. /1965/: New Results on Hashish-specific Constituents. Bull. Narcotics 17. 35.p.
70. Krejci, Z., - Horák, M. és Santavy, F. /1959/: Hanf /Cannabis sativa/ - antibiotisches Heilmittel. III. Isolierung und Konstitution zweier aus C. sativa gewonnener Säuren. Pharmazie 14. 349.p.
71. Laskewski, M.Jr., - Widom, J.M., - McFadden, M.L. és Scheraga, H.A. /1956/: Differential ultraviolet spectra of insulin. Biochim. Biophys. Acta, 19. 581.p.
72. Lien, E.J., - Hansch, C. és Andersen, S.M. /1968/: Structure-activity correlation for antibacterial agents on Gram-positive and Gram-negative cells. J.Med.Chem. 11. 430.p.
73. Lea, M.A. és Weber, G. /1968/: Role of enzymes in homeostasis VIII.

Inhibition of the activity of glycolytic enzymes by
from fatty acids. J.Biol.Chem. 243. 1096.p.

74. Lowry, O.H., - Rosebrough, N.J., - Farr, A.L., és Randall, R.J.
/1951/: Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J.Biol.Chem. 193. 256.p.
75. Machata, G. /1969/: Analytical procedure for the identification
and estimation of hashish /marijuana/. Arch.Toxikel.
25. 19.p.
76. Mahler, H.R. és Cordes, H.H. /1969/: Biological chemistry. Harper-
Row; New York, Evanston, London, and John Weatherhill, Inc.
Tokyo.
77. Martinec, T., és M. Felklová /1959/: Veränderungen der antibakteri-
ellen Aktivität im Verlauf der individuellen Entwicklung
des Hanfes. /Cannabis sativa L./ Die Pharmazie, 14.
279.p.
78. Matchett, J.R. és mt. /1938/: Lásd: Mecheulam, R., Ben-Zvi, Z. és
Gaeni, Y. /1968/.
79. Maunder de Faubert M.J. /1969/: Simple and specific test for
Cannabis. J.Assoc. Pub. Anal. 7. 24.
80. Maunder de Faubert, M.J. /1969a/: Two simple colour tests for
Cannabis. Bull. Narcotics, 21. 37.
81. Mecheulam, R. /1970/: Marijuana chemistry. Science, 168. 1159.p.
82. Mecheulam, R., - Ben-Zvi, Z., és Gaeni, Y. /1968/: Hashish XIII.
On the nature of the Beam test. Tetrahedron, 24.
5615.p.
83. Mecheulam, R. és Gaeni, Y. /1965/: Hashish IV. The Isolation and
Structure of Cannabinolic, Cannabidiolic and Cannabigerol-
lic Acids. Tetrahedron 21. 1223.p.
84. Mecheulam, R. és Gaeni, Y. /1967/: Recent advances in the chemistry
of hashish. /Fortschritte der Chemie organischer Natur-
stoffe. Szerk: L.Zechmeister/ 25. 175.p. Springer Verlag,
Vienna.
85. Mecheulam, R., - Shani, A., - Edery, H. és Grunfeld, Y. /1970/:
Chemical basis of hashish activity. Science. 169.
611.p.
86. Mecheulam, R. és Shvo, Y. /1963/: Hashish I. The Structure of
Cannabidiol. Tetrahedron 19. 2073.p.
87. Newton, B.A. /1953/: The Release of Soluble Constituents from
Washed Cells of Pseudomonas aeruginosa by the action
of Polymyxin. J.gen. Microbiol. 9. 54-64.p.
88. Newton, B.A. /1965/: Mechanisms of antibiotic action. Ann.Rev.
Microbiol. 19. 209.p.

89. Nevák, I., G. Búzás, és L.Tóth /1962/: Vergleichend-qualitative Untersuchungen über ungarische und indische Hanfsorten. Die Pharmazie, 17. 166.p.
90. Perényi, T./1974/ - Szóbeli közlés.
91. Perényi, T., - Biró, L., - Nevák, E.K. és Szőke, S. /1970/: Tetraciklin származékok albumin kötődésének vizsgálata I. A kötődés jelentősége és mérési módszerei. XI. Biokémiai Vándorgyűlés, Sopron, 3. 73.p.
92. Petceff, D.G. /1971/: Marijuana: identification of cannabinoids by centrifugal chromatography. Science, 173. 824.p.
93. Pelet, H. és Steinhardt, J. /1968/: Binding-induced alterations in ultraviolet absorption of native serum albumin. Biochemistry, 1. 1348.
94. Rathenasinkam, E. /1948/: Lásd: Nevák, I., Búzás, G. és Tóth L., ill. Grlic, L. /1964/.
95. Robinsen, A.E. /1971/: Recovery of cannabis constituents from the hands at autopsy. Bull. on Narcotics, 23. /3/ 37.p.
96. Robinsen, D., - Stellar, D., - White, S., és Kaplan, N.O. /1963/: Structural and catalytic alterations of dehydrogenases after photooxidation. Biochemistry, 2. 486.
97. Resen, H. /1957/: A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. Arch. Biochem. Biophys. 67. 10.p.
98. Salten, M.R.J. és Ehtisham-Ud-Din, A.F.M. /1965/: The localization of cytochrome and carotenoids in isolated bacterial membranes and envelopes. Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci. 43. 255.p.
99. Schultz, O.E., és G. Haffner /1958/: Zur Kenntnis eines sedativen Wirkstoffes aus deutschem Faserhanf /Cannabis sativa/. I. Arch.Pfarm. 291, 391.p.
100. Schultz, O.E., és G. Haffner /1959/: Zur Kenntnis eines sedativen und antibakteriellen Wirkstoffes aus dem deutschen Faserhanf /Cannabis sativa/. Z. Naturforsch. 14a, 98.p.
101. Tarmy, E.M. és Kaplan, N.O. /1968/: Chemical characterization of d-lactate dehydrogenase from Escherichia coli B., J. Biol.Chem.243. 2579.p.
102. Tarmy, E.M. és Kaplan, N.O. /1968/: Kinetics of Escherichia coli B d-lactate dehydrogenase and evidence for pyruvate-controlled change in conformation. J.Biol.Chem. 243. 2587.

103. Váczi, L. /1967/: A lipidek szerepe a baktériumok rezisztenciájában és a pathogenesisben, különös tekintettel zsírsav összetételükre. Doktori értekezés.
104. Vierheever, A. /1939/: Lásd: Nevák, I., Búzás, G., és Tóth, L., illetve Grlic, L. /1964./
105. Webb, J.L. /1963/: Enzyme and metabolic inhibitors. Vol. 1. General Principles of Inhibition. Academic Press, New York and London.
106. Weber, G., - Convery, H.J.H., - Lea, M.A. és Stamm, M.B. /1966/: Feedback inhibition of key glycolytic enzymes in liver by action of free fatty acids. Science, 154, 1357.
107. Westphal, U. /1969/: Assay and properties of corticosteroid-binding globulin and other steroid-binding serum proteins. /Clayton, R.B. Steroids and terpenoids. Methods in enzymology. 15. Academic Press, New York and London./
108. Winer, A.D. és Schwert, G.W. /1958/: Lactic dehydrogenase.VII. Fluorescence spectra of ternary complexes of lactic dehydrogenase, reduced diphosphopyridine nucleotide, and carboxylic acids.
109. Weed, R. /1899/: Lásd: Mechoulam és Gaoni, /1967./.
110. Weedruff, H.B. és Miller, I.M. /1963/: Antibiotics. /Szerk: Hechter, R.M. és Quastel, J.H. "Metabolic inhibitors: A comprehensive treatise". Vol. 2. Academic Press, New York, London.
111. Werbel, A., - Goldman, D.S. és Cleland, W.W. /1965/: An allosteric reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase from Mycobacterium tuberculosis. J.Biol.Chem. 240, 3399.
112. Yeshida, A. /1965/: Enzymic properties of lactate dehydrogenase of Bacillus subtilis. Biochem. Biophys. Acta. 99, 66.
113. Yeshida, A. /1965a/: Purification and chemical characterization of malate dehydrogenase of Bacillus subtilis. J.Biol.Chem. 240, 1113.
114. Yeshida, A. /1965b/: Enzymic properties of malate dehydrogenase of Bacillus subtilis. J.Biol.Chem. 240, 1118.
115. Yeshida, A. /1965c/: Structural and serological similarity of three dehydrogenases of Bacillus subtilis. Biochem. Biophys. Acta, 105, 70.
116. Yeshida, A. és Freese, E. /1965/: Purification and chemical characterization of lactate dehydrogenase of Bacillus subtilis. Biochem. Biophys. Acta, 99, 56.
117. Yu, L. és Welin, M.J. /1970/: Factors affecting deoxycholate inactivation and Mg^{++} reactivation of Bacillus megaterium KM membrane nicotinamide adenine dinucleotide /reduced from/ oxidase. J.Bacteriol. 103, 467.

118. Wahlqvist, M. - Nilsson, I.M. - Sandberg, F. - Agurell, S.
és Granstrand, B. /1970/: Metabolism of Cannabis IV. Binding
of delta-1-tetrahydrocannabinol to human plasma proteins.
Biochem. Pharmacol. 19, 2579.p.

Rövidítések

BSA	marha szérumalbumin
C	kompetitív gátlás
CBS	kannabidiolsav
EDTA	etiléndiamintetraecetsav
E-OH	etilalkohol
G-6-P	glükóz-6-foszfát
G-6-PDH	glükóz-6-foszfátdehidrogenáz
IR	infravörös
K	keprilsav
L	laurinsav
LDH	tejsavdehidrogenáz
M	kevert gátlás
m-BSA	metilált marha szérumalbumin
MDH	almesavdehidrogenáz
MG	minimál glükóz táptalaj
MIC	minimális gátlási koncentráció
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	redukált NAD
NADH-oxidáz	redukált NAD-oxidáz
NADP	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NADPH	redukált NADP
NB	nutrient broth táptalaj
NC	nem kompetitív gátlás
NMR	mágneses magrezonancia
NPP	p-nitrofenilfoszfát
OTC	oxytetracyclin
S	szalicilsav
TCA	triklórecetsav

TEA	trietylamin
THC	tetrahidrekannabinol
TTC	trifeniltetrazoliumklorid
UV	ultrasibelys

TARTALOM JEGYZÉK

Oldal

B E V E Z E T É S

A kannabinoidek fizikai-kémiai, kémiai és biológiai tulajdonságai.

A munka célkitűzése.

<u>KLISÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</u>	15
2.1 A vizsgálatokhoz használt baktériumtörzsek . .	15
2.2. Táptalajok, tenyésztési módszerek	15
2.3. A kannabidiolsav és kimutatási módszerei . . .	17
2.3.1. A CBS megoszlási hányadosának mérése	31
2.4. A CBS hatásának vizsgálata baktérium tenyészete- tekre	32
2.4.1. Minimális gátlási koncentráció /MIC/ meghatá- rása	32
2.4.2. A CBS hatásának vizsgálata növekvő tenyészetekre	32
2.5. A CBS sejtmembránra való hatásának és felvételé- nek vizsgálati módszerei.	33
2.5.1. A CBS hatásának vizsgálata UV abszorbeáló anyagok sejtekből való felszabadulására.	33
2.5.2. A CBS hatásának vizsgálata aminosavak sejtekből való felszabadulására	34
2.5.3. A CBS hatásának vizsgálata a sejtek ionleadására	34
2.5.4. A CBS felvétel vizsgálata	35
2.6. A baktériumok anyagcseréjére való CBS hatás vizs- gálatának módszerei.	
2.6.1. Légzés vizsgálatok	35

2.6.2.	TTC redukálóképesség vizsgálata	36
2.6.3.	Glükóz felvétel vizsgálata	37
2.6.4.	Enzimaktivitás mérések	38
2.6.4.1.	LDH mérése	39
2.6.4.2.	MDH mérése	40
2.6.4.3.	G-6-PDH mérése	40
2.6.4.4.	NADH-oxidáz mérése	40
2.6.4.5.	Kristályos LDH mérése	41
2.6.4.6.	Alkalikus foszfatáz mérése	42
2.6.5.	A CBS hatásának vizsgálata enzimek aktivi- tására	42
2.7.	A CBS-fehérje kölcsönhatás vizsgálatának módszerei	43
2.7.1.	A CBS enzimgátló hatásának vizsgálata BSA jelenlétében	43
2.7.2.	Az LDH gátlás kinetikai vizsgálata	43
2.7.3.	A CBS-fehérje kötődés vizsgálata differen- cia spektrumok felvételével	44
2.7.4.	A CBS-fehérje kötődés vizsgálata dializis- sel	45
2.7.5.	A CBS-fehérje kötődés vizsgálata gélszűrés- sel	46
E R E D M É N Y E K		47
3.1.	A CBS hatása baktérium tenyészetek növeke- désére	47
3.1.1.	A minimális gátlási koncentráció /MIC/ meg- határozása	47
3.1.2.	A CBS növekedésgátló hatása különböző eltó- anyag mennyiség esetén	49
3.1.3.	A CBS növekedésgátló hatása Mg^{2+} ionok je- lenlétében	51

3.1.4.	A CBS hatása baktérium tenyészet növekedésére, marha szérumalbumin /BSA/ jelenlétében	51
3.2.	A CBS hatása a sejtmembránra	54
3.2.1.	A CBS hatása UV abszorbeáló anyagok sejtekből való felszabadulására	54
3.2.2.	A CBS hatása aminosavak sejtekből való felszabadulására	56
3.2.3.	A CBS hatása a sejtek ionleadására	57
3.2.4.	A CBS felvétele a sejtekbe	60
3.3.	A CBS hatása a baktériumsejtek néhány anyagcsere folyamatára	63
3.3.1.	A CBS hatása a baktériumok légzésére	63
3.3.2.	A CBS hatása a baktériumok TTC redukáló képességére	63
3.3.3.	A CBS hatása baktériumok glükóz felvételére	67
3.3.4.	A CBS hatása néhány katabolikus enzimre	70
3.4.	A CBS-fehérje kölcsönhatására vonatkozó eredmények	73
3.4.1.	A CBS hatása kristályos LDH-ra	73
3.4.2.	A CBS enzimgátló hatása BSA jelenlétében.	75
3.4.3.	Az LDH gátlás kinetikai vizsgálata	77
3.4.4.	A CBS hatása egyéb tisztított enzimekre	79
3.4.5.	A CBS-fehérje komplexek vizsgálata differencia spektrofotometriával	80
3.4.6.	A CBS fehérje kötődés vizsgálata egyensúlyi dialízissal és gélszűrőssel	84
AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA		86
4.1.	A CBS hatása baktérium tenyészetek növekedésére	89

4.2.	A CBS hatása ^{az} ozmótikus barrierre	91
4.3.	A CBS hatása a baktériumsejtek néhány anyagcsere folyamatára	93
4.4.	A CBS hatása fehérjékre	96
4.5.	A CBS szelektivitásával, in vivo inaktiváló- dásával és hatásmódjával kapcsolatos ered- mények áttekintése	100
ÖSSZEFOGLALÁS		105
IRODALOM		106
RÖVIDÍTÉSEK		115
TARTALOMJEGYZÉK		117

