

A kobalaminmonokarbonsav mikrobiológiai
vizsgálata.

dr.Simon Ágoston

1967.

B 203



Diss. B 503



Tartalomjegyzék.

Bevezetés.....	7 o.
Nomenklatura.....	13
Felhasznált anyagok és kísérleti módszerek..	15
<u>Kísérleti eredmények.....</u>	24
<u>I.A kobalaminmonokarbonsav B₁₂-vitaminra vo-</u> <u>natkoztatott inhibíciós indexe.....</u>	24
I/1.A kobalaminmonokarbonsav gátló hatásának kvantitatív vizsgálata agarlemezen, hígítási módszerrel.....	24
I/2.A kobalaminmonokarbonsav antagonista ha- tásának felismerése agarlemezen, autobio- grammon.....	26
I/3.A kobalaminmonokarbonsav antibiotikum- jellegének felismerése. Gátlási zónák.....	27
I/4.A kobalaminmonokarbonsav által kiváltott gátlási zónák méretének függése az agarlemez B ₁₂ -vitamin-tartalmától.....	29
I/5.Az antagonizmus kimutatása E.L.Smith szerint és e módszer módosítása.....	32
I/6.A B ₁₂ -vitamin és a kobalaminmonokarbon- sav antagonizmusa kompetitív voltának de- monstrálása agardiffúziós módszerrel, a Wol- ters féle "csatornateszt" felhasználásával..	35

I/7.A B ₁₂ -vitamin hatásának teljes gátlása kobalaminmonokarbonsavval folyékony tápta- lajon.....	40 o.
I/8.Az <u>E.coli 113-3</u> fejlődésének 50%-os gát- lása kobalaminmonokarbonsavval.....	42
I/9.A B ₁₂ -vitamin - kobalaminmonokarbonsav antagonista pár egymásra való hatásának függő- sége a beadás viszonylagos időpontjától, szil- lárd táptalajon.....	46
I/10.A B ₁₂ -vitamin - kobalaminmonokarbonsav antagonista pár egymásra való hatásának füg- gősége a beadás viszonylagos időpontjától, folyékony táptalajon.....	49
<u>II.A kobalaminmonokarbonsav antagonista ha- tásának és képződésének törzs-specifitása..</u>	
II/1.A hatás specifitása.....	53
II/2.Kobalaminmonokarbonsav hatása az <u>E.coli</u> <u>113-3</u> életképességére.....	55
<u>III.A kobalaminmonokarbonsav hatása egyes B₁₂-vitamin-faktorokkal szemben.....</u>	
III/1.A B ₁₂ -vitamin és a kobalaminmonokarbonsav keverékek által agarlemezen létrehozott "négy- szögletes" növekedési zónák.....	58
III/2.A kobalaminmonokarbonsav antagonista hatása kobinamiddal és III.faktorról szemben.	60

III/3. Kobalaminmonokarbonsav, B₁₂-vitamin és kobinamid ill. III.faktor agarlemezre való együttes felvitele esetén képződő hármas, gyűrűszerű növekedési zónák..... 62

IV.A B₁₂-vitamin és egyes faktorok kötődése az E.coli 113-3 baktériumokhoz rádióaktív izotópokkal jelzett B₁₂-vitaminnal ill.kobinamiddal végzett kísérletek alapján..... 64

IV/1.A B₁₂-vitamin és a kobinamid kötődése a steril agarlemezhez..... 65

IV/2A B₁₂-vitamin megkötődése az E.coli 113-3-mal benőtt agarlemezen..... 65

IV/3.⁶⁰Co-tal jelzett kobinamid kötődése az E.coli 113-3-mal benőtt agarlemezen..... 67

IV/4.A kobinamid és a III.faktor hatása a rádióaktív izotóppal jelzett B₁₂-vitaminnak az E.coli 113-3 sejtekhez való kötődésére..... 69

IV/5.A kobalaminmonokarbonsav 50%-os inhibíciós indexének meghatározása rádióaktív izotóppal jelzett B₁₂-vitamin segítségével..... 71

IV/6.Az E.coli 113-3 által megkötött jelzett B₁₂-vitamin kicserélődése B₁₂-vitaminra, III.-faktorra ill. kobalaminmonokarbonsavra..... 75

<u>V.A kobalaminmonokarbonsav inhibíciós indexe kobinamidra és III.faktorra vonatkoztatva,</u> <u>E.L.Smith módszere szerint vizsgálva.....</u>	77
V/1.A kobalaminmonokarbonsav III.faktorra vonatkoztatott inhibíciós indexe.....	78
V/2.A kobalaminmonokarbonsav kobinamidra vonatkoztatott inhibíciós indexe.....	80
<u>VI.A kobalaminmonokarbonsav gyakorlati alkalmazásának néhány lehetősége.....</u>	83
VI/1.A kobalaminmonokarbonsav farmakológiai és klinikai felhasználása.....	83
VI/2.A kobalaminmonokarbonsav, mint kiindulási anyag más B ₁₂ -vitamin-antagonisták szintéziséhez.....	83
VI/3.Metionin kimutatása B ₁₂ -vitamin jelenlétében.....	84
VI/4.A B ₁₂ -vitamin-faktorok "biokromatográfiája".....	87
VI/5.A B ₁₂ -vitamin-faktorok biológiai értékének vizsgálata.....	91
<u>VII.Az eredmények megbeszélése.....</u>	93
VII/1.A kobalaminmonokarbonsav, mint természetes antimetabolit.....	93

VII/2. Az inhibíciós index fogalmának szabatos meghatározása.....	96 o.
VII/3. Az inhibíciós index függősége a két versengő komponens beadásának időpontjától...	99
VII/4. A kobalaminmonokarbonsav, mint antibiotikum.....	102
VII/5. A kobalaminmonokarbonsav antagonizmusának hatásmechanizmusa.....	104
<u>Függelék</u>	108
1/. A B ₁₂ -vitamin, a kobinamid, a III. faktor és a kobalaminmonokarbonsav diffúziós állandójának meghatározása.....	108
2/. A kobalaminmonokarbonsav III. faktorra ill. kobinamidra vonatkoztatott inhibíciós indexének számítása E. L. Smith módszerének felhasználásával.....	112
<u>Összefoglalás</u>	117
Ábrák jegyzéke.....	121
Táblázatok jegyzéke.....	123
Köszönetnyilvánítás.....	126
Irodalomjegyzék.....	127
Szerző kobalaminmonokarbonsavval kapcsolatos közleményeinek jegyzéke.....	134

Bevezetés.

Az ötvenes évek folyamán nagy lendülettel indult meg a kutatómunka azzal a céllal, hogy a B₁₂-vitaminnak olyan származékait állítsák elő, amelyek a természetes vitaminnál hatékonyabbak, vagy új, addig ismeretlen hatással rendelkeznek. E munka során csakhamar felfedezték, hogy az előállított származékok egyike-másika antagonistá hatást mutat a B₁₂-vitaminnal szemben és számos ilyen származékot állítottak azután elő, abban a reményben, hogy ezeknek esetleg daganatellenes hatása lesz.- A farmakológiai vizsgálatok sajnos nem igazolták a kérdéses vegyületekhez fűzött reményeket és ha nem is voltak teljesen negatívak, jelenleg az orvosi gyakorlatban sehol sem alkalmazzák rutinszerűen a B₁₂-vitamin-antagonistáit: ilyen gyógyszer nincs forgalomban. Kétségtelen azonban, hogy ilyen vegyületek mutattak bizonyos átmeneti hatást mieloid leukémiánál és policitémia veránál /15, 16, 19, 24, 52, 53/.

A B₁₂-vitamin antagonistái közt különféle vegyületcsoportok szerepelnek. Így, egyebek közt a kobalaminmonokarbonsav, annak metil- és etilésztere, anilidja stb. /3, 77, 78, 79, 80, 81/. Bonyolultabb antagonistá B₁₂ vitamin-származékot ír le egy angol szabadalom /95/.

Antagonista hatást észleltek bizonyos benzimidazol-származékoktól /20, 34, 63/, valamint klórbenzilezett indanoloktól /70/. Ez az antagonizmus azonban nem bi-

zonyult kompetitívnek és ezért nem is tekintik valódi antagonistának /81/.

A B₁₂-vitamin eddig leghatásosabb antagonistái az u.n. alkanolamin-szubsztituált származékok /29,33/, amelyek 3:1 - 8:1 arányban kompetitív 50%-osan gátolják a B₁₂-vitamin hatását az E.coli 113-3 törzsre.

Dolgozatom célja nem a B₁₂-vitamin antagonistáinak vizsgálata általában, hanem egyetlen antagonistá vegyülete, a kobalaminmonokarbonsavé. Erről tehát kissé részletesebben kell e helyen beszélni.

A kobalaminmonokarbonsavat először Armitage és munkatársai /1/ állították elő. A vegyület antagonistá tulajdonságát E.L.Smith /77/ fedezte fel.

A kobalaminmonokarbonsavat nemcsak szintetikusan sikerült előállítani, hanem Bernhauer és munkatársai /6/ megtalálták egy P.shermanii törzs fermentációs levében is és abból dikarbonsavak mellett ki is preparálták. A kobalaminmonokarbonsav ezekben a kísérletekben az összes korrinoidoknak közel 20%-át tette ki.

Ezzel körülbelül egyidőben és e kísérletektől függetlenül egy Propionibacterium shermanii-törzs vizsgálata során /a törzset a Magyaróvári Tejkisérleti Intézet bocsátotta a rendelkezésemre/ olyan B₁₂-vi-

tamin-készítményt állítottunk elő Chinoin-gyárbeli munkatársaimmal, amelynek alaposabb vizsgálata közben dr. Kelemen Ágnes /Gyógyszerkutató Intézet/ papírkromatográfiával ill. elektroforézissel két jól elkülöníthető foltot kapott.

A papírkromatogrammok ill. elektroforogrammok E.coli 113-3-mal fertőzött agarlemezen /14/ végzett vizsgálata során először azt találtam, hogy az egyik folt a B₁₂-vitaminnak megfelelő biológiai aktivitást mutatott: növekedési zónákat hozott létre, a másik folt ellenben, noha a B₁₂-vitamin jellegzetes piros színét mutatta, nem hozott létre növekedési zónát, azaz biológiailag inaktívnak látszott.

A papírkromatogrammok autobiográfias vizsgálata azonban mást mutatott. Az első foltnak megfelelően növekedési zóna jött létre, amely a másik folt felé hirtelen, éles széllel ért véget, mintha "keresztbe levágták volna" a növekedési zóna végét. /A kísérlet részletes ismertetésére visszatérünk/. Ez az észlelés keltette fel a gyanunkat az iránt, hogy egy természetes B₁₂-vitamin-antagonistával van dolgunk és ez után az előzmény után kezdtük meg a kérdéses vegyület rendszeres vizsgálatát.

Ennek a természetes antagonistának az adott különleges érdekességet, hogy abban az időben még egyedülálló volt az irodalomban. Nem sokkal ezután /és előbb, mint mi/ leírták a kobalaminmonokarbonsav természetes előfordulását /6/. Azóta találtak más, még aktívabb, természetes eredetű B₁₂-vitamin-antagonistát is fotoszintetikus

baktériumokban, amely sem kobaltot, sem vasat nem tartalmazó korrinoid vegyület /66/.

A Propionibacterium-tenyészetből kinyert antagonista faktor vizsgálatának kémiai részét dr. Kelemen Ágnes, mikrobiológiai részét e sorok írója végezte. Az eredmények részletes leírása két dolgozatban /54,55/ található. A kémiai vizsgálatokra nem térek ki részletesen, csak röviden összefoglalom a főbb eredményeket:

1/. Megállapítást nyert, hogy az antagonista faktor savanyu természetű.

2/. Az antagonista faktor /25/ szerint végzett papirkromatográfiás vizsgálatnál lassabban vándorol, mint a B₁₂-vitamin /Rf = 0,14, szemben a B₁₂-vitamin 0,27-es Rf értékével/.

3/. A B₁₂-vitamin és az antagonista faktor ultraibolya abszorpciós spektruma azonos, ami arra mutat, hogy a két vegyület szerkezete közt lényeges eltérés nem lehet /pl. a nukleotid-részben/.

4/. Az elektroforézis-vizsgálatok azt mutatták, hogy míg a B₁₂-vitamin majdnem semleges, pH 7,0-nél igen kis mértékben vándorol a negatív pólus felé, az antagonista faktor a pozitív sarok felé vándorol.

5/. Óvatos savas hidrolizissel sikerült a B₁₂-vitaminból

az antagonista faktort előállítani és ezt sikerült amidálással /1/ szerint B_{12} -vitaminná visszaalakítani.

Ezáltal sikerült az antagonista faktorunkat azonosítani a kobalamin-monokarbonsavval. Megállapítást nyert, hogy a B_{12} -vitamin hidrolizisekor három izomér kobalaminmonokarbonsav keletkezik - bár nem egyenlő mennyiségben - a természetes antagonista faktor viszont egy-egy-egy vegyület: a három említett izomér egyike.

A továbbiakban dr. Kelemen Ágnes eljárást dolgozott ki a kobalaminmonokarbonsavnak a B_{12} -vitamintól való elválasztására, illetőleg közös eljárást dolgoztunk ki a vegyület fermentációs úton való előállítására /97/, majd dr. Kelemen Ágnes eljárást szabadalmaztatott a kobalaminmonokarbonsav aktív izomérjének B_{12} -vitamin hidrolizise útján kristályos formában való előállítására /100/.

Miután azonban felmerült az a gondolat /64/, hogy a fermentációs úton előállított kobalaminmonokarbonsav esetleg műtermék, amely a B_{12} -vitamin hidrolizise útján keletkezik, dr. Kelemen Ágnes úgy is kipreparálta a kobalaminmonokarbonsavat, hogy az izolálási műveletek során a közeg pH-ját a semleges tartományban tartotta. Végül, döntő bizonyíték volt ezen a téren, hogy ^{60}Co -tal jelzett rádióaktív B_{12} -vitamint állítottunk elő, ezt adtuk

hozzá a fermentléhez és ezután preparálta ki belőle dr. Kelemen Ágnes a kobalaminmonokarbonsavat. Kiderült, hogy az így kipreparált antagonista faktor nem volt rádióaktív, tehát nem B₁₂-vitamin bomlásterméke.

A kobalaminmonokarbonsav azonosítása és antagonista jellegének felderítése után a Chinoin Gyógyszergyár nagyobb mennyiséget állított elő ebből a vegyületből farmakológiai és klinikai vizsgálatok céljára és így nekem is módom nyílt e vegyület részletesebb mikrobiológiai vizsgálatára.

Dolgozatom további részében - e rövid bevezetés után és a történelmi előzmények ismertetése után - a kérdéses vegyület mikrobiológiai vizsgálatának részletes leírásával foglalkozom.

Az utolsó fejezetben visszatérek a kobalaminmonokarbonsav alkalmazásának gyakorlati lehetőségeire. Ugy gondolom, hogy ezek a gyakorlati alkalmazások ma is érdekesé teszik e vegyületet a kutató számára és aktuálissá a vele való foglalkozást.

2.Nomenklatura.

A B₁₂-vitamin és származékai megnevezésénél a Vitamin B₁₂ und Intrinsic Factor - 2.Europaeisches Symposion által javasolt nomenklaturát használjuk általában, vagyis:

B₁₂-vitamin: az 5,6 dimetilbenzimidazoilkobalamin-cianid triviális,de megengedett,rövid elnevezése.Dolgozatunkban ezt használjuk.

Kobinamid: a B-faktor = etiokobalamin = corfinamid = cobinamid legujabb neve magyar helyesírás szerint.

III.faktor: az alfa-/5-hidroxibenzimidazoil/-kobamid-cianid triviális neve,amely a nomenklatura szerint nem megengedhető ugyan,a rövidség és egyszerűség kedvéért azonban mégis ezt használjuk a jelen dolgozatban.

Kobalaminmonokarbonsav: ez a vegyület az idézett nomenklaturában nem szerepel ugyan,de E.L.Smith,a nomenklatura-bizottság elnöke,ugyanabban a kötetben /81/ szintén ezt az elnevezést használja.- Hangsúlyozni kell, hogy voltaképen egy hexakarbonsav pentaamidjáról van szó.Ismeretes,hogy a hexakarbonsavnak három propionát és három acetát-gyöke van és a kérdéses izomérnél az egyik propionsav-gyök szabad.E vegyületnek még az utóbbi megszorítással is 3 izomérje van.Ezek közül csak az egyik aktiv és a természetes aktiv antagonista

kobalamínmonokarbonsav azonos azzal az izomérrel, amely savas hidrolíziskor zömmel keletkezik. Egyelőre nem ismeretes, hogy ez az aktív izomér melyik a három lehetséges közül. - Elnevezésünk a továbbiakban az aktív /és egyben természetes/ izomérre vonatkozik.

Helyesírás.

Az újabb szokásnak megfelelően az idegen szavakat általában magyaros /fonetikus/ helyesírással írjuk - kivéve szerzők, baktériumfajták stb. neveit.

3/.Felhasznált anyagok és kísérleti módszerek.

A/.Felhasznált anyagok.

B₁₂-vitamin-standard. - A Chinoin gyár által előállított terméket többször átkristályosítottuk és tisztaságát egyrészt elektroforézis-vizsgálattal, másrészt spektrofotometriás uton ellenőriztük /8/ szerint.- A megfelelő tisztaságu, homogén termékből készült oldat koncentrációját spektrofotometriásan /8/ állítottuk be.

Kobalamínmonokarbonsav. - Kísérleteink első szakaszában fermentációs uton /97/ szerint nyert, később B₁₂-vitamin hidrolizise útján /100/ előállított terméket használtunk.- Minden esetben ellenőriztük az anyag antagonistá tulajdonságát és olyan anyagokkal dolgoztunk, amelyek az 1/.kísérletben leírt módszerrel vizsgálva általában 40-szeres, de legalább 80-szoros inhibíciós indexet mutattak.

Kobinamid. - Ezt a vegyületet, amelyet kristályosítani nem lehet, nem állítottuk elő tisztán, hanem Propionibacterium shermanii-tenyészeteket /a tenyésztés módját 1. e címszó alatt/ lecentrifugáltunk, az üledéket vízzel feliszapoltuk és ismét lecentrifugáltuk, majd /99/ szerint metanollal extraháltuk, az extraktumot 60 C^o-ot meg

nem haladó hőmérsékleten vákuumban bepároltuk és a betöményített oldatot megszürtük. - A kromatográfiás vizsgálat /1. e címszó alatt/ azt mutatta, hogy az oldat kobinamidon kívül más E.coli 113-3-mal szemben aktív korrinoidokat nem tartalmaz. - Az oldat koncentrációját agardiffúziós módszerrel állítottuk be, standardként B₁₂-vitamin-oldatot használva. Ford /26/ szerint az ilyen oldat valódi - súly szerinti - koncentrációja kb. az ötöd része a látszólagos aktivitásnak.

⁵⁸CoB₁₂-vitamin. - Az NDK.-ból importált kereskedelmi készítményt használtuk, amelyet dr.Gács adjunktus és dr.Stützel Mária /Bp.Orvostud.Egyetem, III.Belklinika/ volt szíves rendelkezésemre bocsátani. Szívességükért ezuton mondok köszönetet.

⁶⁰CoB₁₂-vitamin. - A /99/ szerinti táptalajon, 500 ml-es Erlenmeyer-lombikokban, 1 mC "hordozómentes" CoCl₂ jelenlétében és más Co-sók hozzátétele nélkül szobahőmérsékleten tenyésztettünk egy jó B₁₂-vitamin-termelő törzset /P.shermanii/. - A pH-t NH₄OH-oldattal naponta egyszer 7,0-re állítottuk és a tenyésztés 8.napján 1 ml 1%-os metanolos 5,6-dimetilbenzimidazol-oldatot adtunk a tenyészethez /47/ szerint. További 3 nap múlva a tenyészetet úgy kezeltük, ahogy a kobinamidnál leirtuk. A betöményített oldatot /96/ szerint 1:1 arányu

kloroformos fenol-oldattal extraháltuk és a fenolos oldatból a rádióaktív B₁₂-vitamint ismét vízbe vittük át főlős kloroform hozzátétele révén. Az így nyert 51 ug/ml-es koncentrációju oldatot tovább nem tisztítottuk a benne levő vitamin csekély mennyiségére való tekintettel, de kromatográfiával /25 szerint/ meggyőződünk róla, hogy az oldat B₁₂-vitaminon kívül más aktív korrin-származékot mérhető mennyiségben nem tartalmaz.

⁶⁰Co-Kobinamid. - Előállítása ugyanugy történt, mint a jelzett B₁₂-vitaminé, azzal a különbséggel, hogy a baktériumtenyészethez nem adtunk hozzá 5,6-dimetilbenzimidazolt.

III.faktor. - A Kőbányai Gyógyszergyártól vásárolt terméket átkristályosítás és elektroforézissel való ellenőrzés után használtuk. A termék tisztítását dr. Kelemen Ágnes volt szives elvégezni.

Oxitetraciklin. - A Chinoín gyár oxitetraciklin-dihidrát-termékét használtuk átkristályosítás nélkül.

Egyébként, a lehetőséghez képest tiszta - pro analísi ill. purissimum minőségű vegyszereket használtunk, egyes nem jól definiált anyagoknál azonban /kukoricafehérje, agar-agar stb./, tekintettel arra, hogy a kísérletek több éven át folytak, nem tudtunk mindig azonos minőségű árut biztosítani.

B. Kisérleti módszerek.

a/. Felhasznált törzsek, fenntartásuk és tenyésztésük.

Propionibacterium-törzsek. - Munkánk során megvizsgáltunk: 4 P. shermanii-törzset, amelyeket különféle hazai és külföldi intézményektől szereztünk be, azonkívül 4 olyan törzset, amelyeket tejtermékekből magunk tenyésztettünk ki.

- 2 P. freudenreichii-törzset
- 1 P. rubrum-törzset
- 1 P. petersenii-törzset
- 1 P. technicum-törzset

E törzsek nagy részét Bukin professzor /Moszkva/ volt szíves a rendelkezéseimre bocsátani, amiért e helyen is kifejezem köszönetemet.

E törzsek fenntartása a /98/ szerinti, 1,8% agar-agarral kiegészített táptalajon történt, szűrt tenyészetben, paraffinolaj alatt.

A törzsek szaporítása a /98/ szerinti folyékony táptalajon történt 26 C^o-on /általában 400 ml táptalajon, 500 ml-es Erlenmeyer-lombikokban, stationer tenyészetben/.

b/. Ochromonas malhamensis. - Ezt a törzset dr. Magyar Károly /Gyógyszerkutató Intézet/ bocsátotta a rendelkezéseimre. Tenyésztése a köv. összetételű táptalajon történt:

10 g glukóz, 0,6 g citromsav, 0,3 g KH₂PO₄, 1 µg B₁₂-vitamin, 30 ml kukoricafehérje-kivonat, 1200 ml csapviz. A pH-t

ammóniumhidroxid-oldattal 5,5-re állítottuk be. Sterilizálás 120°C -on 20 percig.

Kukoricalevár-kivonat készítése: 1 kg kb. 50% szárazanyag-tartalmu kukoricalevárhoz 1000 ml metanolt adunk és alaposan összekeverjük, majd egy órán át kevergetjük. Szűrés után a tiszta oldathoz azonos térfogatu acetont adunk, mire csapadék válik ki és az oldat kivilágosodik. Szűrés után a halványsárga oldatot jól záró üvegben hűtőszekrényben évekig eltarthatjuk.

Az O. malhamensis-törzset kémcsőben tartjuk fenn szobahőmérsékleten, 10-15 naponként oltjuk át - 1-2 cseppet egy kémcsőbe,

E. coli 113-3. - A törzs fenntartása a köv. táptalajon történik:

Kukoricalevárkivonat /készítését l. fent/ - 3,0 ml, K_2HPO_4 0,2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,005 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2 g, glicerin - 2,0 g, agar-agar - 2,0 g, viz ad 100,0 ml, B_{12} -vitamin 20,0 μg . - pH 7,2, sterilizálás 120°C -on 20 percig, kiferdítés kémcsővekben.

Inkubáció 18-24 óra 26°C -on, utána jégszekrényben 4-6 hónapig eltartható.

Szaporítás: 1%-os peptonos táptalajon /agardiffúziós B_{12} -

vitaminmeghatározás céljára/.Tenyésztés folyékony táptalajon az antagonista-kísérletekhez: a használt táptalaj, eltekintve attól, hogy agar-agar nem tartalmaz, azonos a /14/ szerinti agardiffúziós meghatározáshoz használt szintetikus táptalajjal, B₁₂-vitaminnal szükség szerint kiegészítve.

A Kétyi-Szendrey féle B₁₂-vitamin- és prolin-dependens törzset /58/ ugyanezen a táptalajon tenyésztettük, de 1%-nyi dl-prolinnal egészítettük ki.

b/.Agardiffúziós módszer B₁₂-vitamin meghatározására. -

Az eredeti E.Harrison és munkatársai /36/ által ajánlott módszert Csajkovszkaja és Druzsina módosítása /14/ szerint alkalmaztuk, Davis E.coli 113-3-törzsét alkalmazva teszt-organizmusként.

A meghatározásokat Petri-csészékben, vagy 14-35 cm-es agarlemezekben végeztük. A Petri-csészékbe 4, a nagy agarlemezekbe 65 0,8 cm átmérőjű lyukat furtunk és a lyukakba 0,05 ml vizsgálandó anyagot mértünk be.

Az összehasonlító standard oldatok koncentrációja 0,1 µg/ml ill. 0,025 µg/ml volt.- Az eredmények kiszámítása Jeruslinszkij és munkatársai /48/ képlete alapján történt egy saját készítésű 1:4 hígítási arányra érvényes táblázat segítségével.- A zónák méretét egy házilag készült vetítőkészüléken olvastuk le 3,3-szoros nagyítással, 0,1 cm-es pontossággal. A vizsgálandó oldatokat - kivéve azokat az ese-

tekét, ahol csak kvalitatív eredményekre volt szükség - 24 vagy 48 lyukba bemérve vizsgáltuk. Kobinamid-meghatározásoknál, minthogy ott a zóna széle elmosódottabb, mindig 48 lyukban vizsgáltuk a koncentrációt.

A meghatározások hibahatára J.S.Simpson táblázata alapján /76/ minden esetben legalább $p = 0,95$ volt.

c/.A B₁₂-vitamin és rokonvegyületek papir-kromatográfiája.

Nevezett vegyületek szétválasztása ill.vizsgálata felszálló kromatográfiával történt Whatman-1 vagy ennek megfelelő más papíron, vízzel telített sekunder butanol-rendszerben /25/ szerint.

Az autobiográfiát úgy végeztük, hogy a papirkromatogramokból 2-3 mm széles hosszanti csikokat vágunk ki, ezeket /14/-szerinti agarlemezekre helyeztük és inkubáltuk.

Az agarlemezek fényképezése Hutner /46/ módszere szerint történt.

d/.Rádióaktívan jelzett B₁₂-vitamin és származékainak kötődése az E.coli 113-3 baktériumokhoz. - A baktériumtenyészetet megolvasztott agarba kevertük és a megdermedt agarlemezben tenyésztettük a megfelelő mennyiségű jelzett B₁₂-vitamin ill. kobinamid hozzátétele után. Inkubáció után a meg nem kötött rádióaktivitást vízben való áztatással eltávolítottuk és a visszamaradt rádióaktivitást az agartáptalaj egy alikvot részének kémcsőbe való átvitele után

kristály-detektorral vizsgáltuk, általában 2 x 10 percig, kis aktivitásoknál hosszabb ideig.

e/. Diffúziós állandók meghatározása.- A diffúziós állandók meghatározása /86/ szerint történt. A kobalaminmonokarbon-sav-koncentrációk mérése - mivel fényabszorpció szempontjából épp úgy viselkedik, mint a B₁₂-vitamin, a /8/-ban megadott spektrofotometriás módszerrel történt. A B₁₂-vitamin, a kobinamid és a III.faktor meghatározását agar-diffúziós módszerrel végeztük. Összehasonlító oldatnak mindig B₁₂-vitamin-standardot használtunk. Így a módszer faktorok esetében nem ad ugyan pontos eredményt, ami az abszolút értékeket illeti, erre azonban nincs is szükség, mert a diffúziós állandó számításánál nem abszolút koncentrációkra, hanem csak koncentráció-arányokra van szükség /a diffúzió előtti és utáni koncentráció hányadosára/.

A módszer pontosságát döntő mértékben a koncentrációk meghatározásának pontossága szabja meg, tehát esetünkben $p \geq 0,95$.

Miután a diffúziós állandók meghatározása nem biológiai, hanem fizikokémiai mérésen alapszik, e méréseket nem a kísérleti részben, hanem a Függelék 1.pontjában ismertetjük, további felhasználás céljából azonban itt közöljük a mérések eredményét, a meghatározott diffúziós állandókat /az értékek 26 C° hőmérsékletre vonatkoznak/:

$$D_{B_{12}} = 2,85 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$$

$$D_{III\text{f}} = 2,91 \cdot 10^{-6} \quad "$$

$$D_{\text{MKS}} = 2,95 \cdot 10^{-6} \quad "$$

$$D_{\text{Kob}} = 3,50 \cdot 10^{-6} \quad "$$

Jelmagyarázat: MKS = kobalaminmonokarbonsav

Kob = kobinamid.

Kísérleti eredmények.
=====

I. A kobalaminmonokarbonsav inhibíciós indexe.

1/.A kobalaminmonokarbonsav gátló hatásának kvantitatív vizsgálata agarlemezen,higitásos módszerrel.

A /14/ szerinti agarlemezbe lyukakat furtunk és azokba olyan oldatokat töltöttünk, amelyek 0,100 $\mu\text{g/ml}$ illetőleg 0,025 $\mu\text{g/ml}$ B₁₂-vitamint és változó mennyiségű kobalaminmonokarbonsavat tartalmaztak /kétszeres higitási sorozatban/.- Az agarlemezeket inkubáltuk, majd a kapott növekedési zónákat vizsgáltuk. Az eredményeket az 1.táblázatban mutatjuk be.

A táblázatból látható, hogy mindkét B₁₂-vitamin-koncentráció esetén 40-szeres kobalaminmonokarbonsav-mennyiség alkalmazása ad teljes gátlást.

Kis kobalaminmonokarbonsav-koncentrációk esetén a zóna széle éles, nagyobb koncentrációk esetén a zóna átmérője valamelyest nő / 8-15%-kal/ és a széle felé fokozatosan mind elmosódottabbá válik. Végül az antagonista faktor koncentrációjának emelésével a zóna úgy tűnik el, hogy a helyén csak egy egész halvány "udvar" marad, majd ez is teljesen elenyészik.

Ellenőrzésképpen ezt a kísérletet úgy is elvégeztük, hogy kobalaminmonokarbonsav helyett antibiotikumot vagy anti-

1.táblázat.

=====

A kobalaminmonokarbonsav gátló hatásának kvan-
titativ vizsgálata agarlemezen.

Kobalaminmono- karbonsav-kon- centráció, µg/ml	A növekedési zóna átmérője mm-ben.	
	0,100 µg/ml	0,025 µg/ml
	B ₁₂ -vitamin-koncentráció esetén	
4	0,0	0,0
2	22,0	0,0
1	21,6	0,0
0,5	20,8	20,0
0,25	20,8	19,0
0,125	20,6	17,1
0,06	20,6	17,0
0,03	20,6	16,9
0,015	20,6	16,9
0,0	20,6	16,6

=====

szeptikumot kevertünk a B₁₂-vitamin-oldathoz /oxitetra-
ciklin, ill. formalint/. Ebben az esetben azt találtuk, hogy az
antiszeptikum ill. antibiotikum centrális gátlási zónát hoz
létre, amelyet - feltéve, hogy a gátló anyag koncentrációja
nem volt túl nagy - növekedési gyűrű vett körül. A növeke-
dési gyűrű külső átmérője általában lényegesen nagyobb,
mint az azonos koncentrációju tiszta B₁₂-vitamin-oldat
által kiváltott növekedési zóna átmérője.

A kísérlet azt mutatja, hogy a kobalaminmonokarbonsav más
tipusu antagonistája a B₁₂-vitaminnak, mint pl. az oxitetra-
ciklin vagy a formalin. Az a tény, hogy két különböző B₁₂-vi-
taminkoncentráció mellett ugyanolyan arányban kell a kobal-
aminmonokarbonsavat hozzáadni ahhoz, hogy teljes gátlást
kapjunk, kompetitív antagonizmusra utal, amikor is az inhi-
biciós index teljes gátláskor:

$$\frac{\text{Kobalaminmonokarbonsav-koncentráció}}{\text{B}_{12}\text{-vitamin-koncentráció}} = 40$$

2/. A kobalaminmonokarbonsav antagonista hatásának felisme- rése agarlemezen, autobiogrammon.

A kobalaminmonokarbonsavat termelő P.shermanii törzsünk te-
nyészetéből készült B₁₂-vitamin-koncentrátumot papíron kro-
matografáltuk /25/ szerint és két jól elkülöníthető foltot
kaptunk. A foltokat kivágva és biológiai aktivitásukat vizs-
gálva azt találtuk, hogy az egyik folt /R_f = 0,27/ biológiai-
lag aktív - /14/ szerinti agarlemezen növekedési zónát hoz

létre - a másik folt azonban inaktív, annak ellenére, hogy a B₁₂-vitamin jellemző piros színét mutatja /R_f = 0,14/.

Mikor azonban a foltokat nem külön-külön vizsgáltuk, hanem a kromatogrammból keskeny hosszanti csíkokat vágunk ki és ezeket a /14/ szerinti agarlemezekre fektetve autobio-grammokat készítettünk, azt találtuk, hogy a B₁₂-vitaminnak megfelelő folt helyén növekedési zóna keletkezett, amelynek a vége a másik folt felé "mintha le lett volna vágva", hirtelen, élesen végződött. Ez a különös jel hívta fel a figyelmet arra, hogy az R_f = 0,14-nek megfelelő foltban levő anyag biológiailag nem inaktív, hanem a B₁₂-vitamin antagónistája. /L. az 1. ábra baloldali részét/.

3/. A kobalaminmonokarbonsav antibiotikum-jellegének felismerése. Gátlási zónák.

A kobalaminmonokarbonsavnak ez a kimutatása, épp úgy, mint az E.L. Smith módszerével való kimutatása is /1. a 4. kísérletet/ csak indirekt: a B₁₂-vitamin okozta növekedési zóna eltorzulásából következtethetünk a jelenlétére. Sikertelen azonban olyan módszert találnunk, amely lehetővé teszi a kobalaminmonokarbonsav direkt kimutatását is. E célból a /14/ szerinti összetételű agarlemezt kiegészítettük 1/300-1/500 µg/ml B₁₂-vitaminnal - olyan vitaminmennyiséggel, amely már biztosítja a teszt-organizmus elszaporodását az agarlemezen.

Ha a kobalaminmonokarbonsav-oldatot ilyen agarlemezbe furt lyukba töltjük, szabályos gátlási zónát kapunk. E gátlási zónákat kvantitatív szempontból is tanulmányoztuk és a következő eredményeket kaptuk /2.táblázat/.

==2.táblázat==

Összefüggés kobalaminmonokarbonsav-oldatok koncentrációja és az általuk kiváltott gátlási zónák mérete közt.

Kobalaminmono- karbonsav-konc. µg/ml	A koncentráció 2-alapu loga- ritmusa	A gátlási zóna átmé- rője/d/mm-ben	Két szomszédos zóna-átm.közti különbség, Δd
400	8,64	47,3	0,6
200	7,64	46,7	1,3
100	6,64	45,4	1,6
50	5,64	43,8	2,8
25	4,64	41,0	2,9
12,5	3,64	38,1	2,8
6,25	2,64	35,3	3,0
3,12	1,64	32,3	

A táblázatból kitűnik, hogy 3 és 50 µg/ml koncentrációhatárok közt a kobalaminmonokarbonsav koncentrációjának logaritmusa egyenesen arányos a gátlási zóna átmérőjével, vagyis hasonló törvényszerűség áll fenn, mint az antibiotikumok agar-

diffúziós meghatározásánál általában. Így, a megjelölt koncentrációhatárok közt a kobalaminmonokarbonsav mennyiségileg is meghatározható agardiffúziós módszerrel, feltéve, hogy kellő tisztaságu standard készítmény áll a rendelkezésünkre és a vizsgálandó oldat B_{12} -vitamin-aktivitást nem mutat.

Ha a 2/. kísérletben felhasznált papírkromatogrammból kivágott keskeny hosszanti csíkot B_{12} -vitamin-nyomokat tartalmazó /14/ szerinti agarlemezre helyezzük és a lemezt inkubáljuk, olyan autobiogrammot kapunk, amelyen a B_{12} -vitaminnak megfelelő folt láthatatlan marad, ellenben a kobalaminmonokarbonsavnak megfelelő folt helyén gátlási zónát kapunk. Így a kobalaminmonokarbonsav közvetlenül kimutathatóvá vált./Lásd az 1. ábra jobb oldalát/.

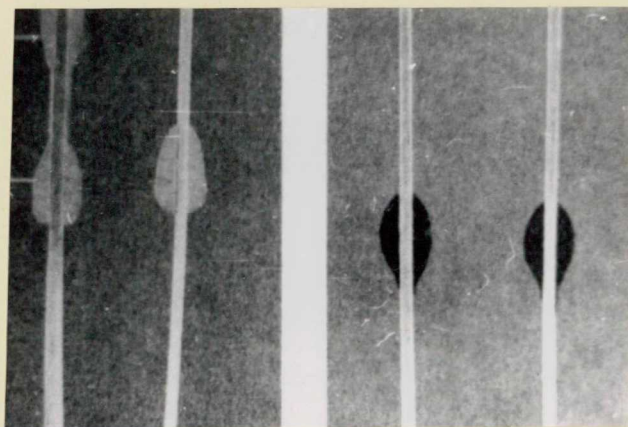
Az ábra bal ill. jobb oldalán látható autobiogrammok tehát egyoldaluan tükrözik a valóságot. Képletesen azt mondhatjuk, hogy egy érme egy-egy oldalát mutatják be. Teljes képet akkor kapunk, ha a két autobiogrammot együtt értékeljük.

4/. A kobalaminmonokarbonsav által kiváltott gátlási zónák függése az agarlemez B_{12} -vitamin-tartalmától.

/14/ szerinti agarlemezeket készítettünk, azzal a módosítással, hogy különböző ismert mennyiségű B_{12} -vitamint tartalmaztak. Minden Petri-csészébe 4 lyukat furtunk és ezekbe rendre 100, 10, 1 ill. 0,1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációju kobalaminmo-

1. ábra.

=====



Természetes antagonista faktort tartalmazó B₁₂-
vitamin-koncentrátum autobiogrammja.

Baloldalt: A B₁₂-vitaminnak és a bal csikon felül a kobinamidnak megfelelő növekedési zóna /14/ szerinti agarlemezen.- A B₁₂-vitaminnak megfelelő zóna alsó része hirtelen végződik /"mintha le lenne vágva"/.

Jobboldalt: Ugyanazon kromatogramokról készült autobiogrammok /14/ szerinti, de B₁₂-vitamin-nyomokat tartalmazó agarlemezen.- A kobalaminmonokarbonsavnak megfelelő gátlási zónát látunk.

A bal- ill. jobboldali autobiogrammok külön-külön hiányosak. Csak együtt adnak teljes képet a vizsgált pircsikon levő faktorokról.

nokarbonsav-oldatot töltöttünk.16 órai inkubálás után a következő eredményeket kaptuk / 3.táblázat/:

3.táblázat.
=====

A kobalaminmonokarbonsavval kiváltott gátlási zónák
méretének függése az agarlemez B₁₂-vitamin-tartalmától.

B ₁₂ -vitamin koncentráció az agarban. µg/ml	A bemért kobalaminmonokarbonsav-oldat koncentrációja µg/ml-ben			
	100	10	1	0,1
	----- Zónaátmérők mm-ben.			
0,0001	23,0	20,0	17,0	13,0
0,0004	18,5	16,0	14,0	9,5
0,0016	17,0	14,5	12,0	-
0,0064	15,5	12,5	-	-

=====

Az eredmények azt mutatják, hogy a zóna átmérője igen nagy mértékben függ az agarban levő B₁₂-vitamin koncentrációjától, továbbá, hogy a minimális gátlási zóna létrejöttéhez a jelenlevő B₁₂-vitamin-koncentráció 400-800-szorosára van szükség kobalaminmonokarbonsavból, vagyis a mért inhibíciós indexet legalábbis 10-szeresen meghaladó koncentrációra. Ennek a feltűnő jelenségnek a magyarázatát a később leírandó kísérletek fogják megadni.

5/.Az antagonizmus kimutatása E.L.Smith szerint /77,78/ és e módszer módosítása.

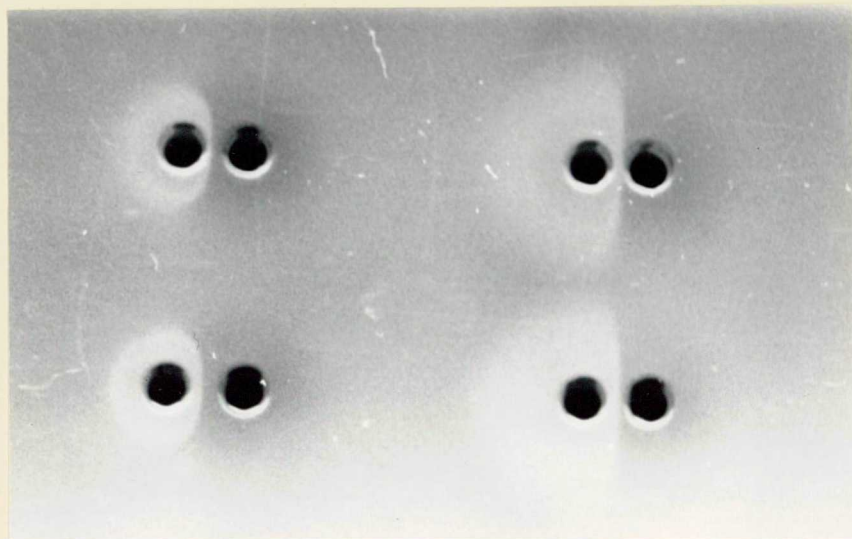
E.L.Smith módszere abban áll, hogy a /14/ szerinti vagy hasonló célt szolgáló más agarlemezbe egymás közelében két lyukat furunk. Az egyikbe B_{12} -vitamint töltünk, a másikba antagonista-oldatot. Ekkor a B_{12} -vitamin által kiváltott kör alakú növekedési zóna eltorzul, az antagonista felőli oldalon a zónának egy része éles széllel le van vágva. /L.2. ábra, 33. oldal/.

A módszer alapjában véve kvalitatív, ha azonban különböző koncentrációarányokkal végezzük el a kísérletet, lesz olyan, amelynél a levágott szél nagyjából a két lyuk középpontját összekötő szakasz felezőpontjára esik. Az ilyen gátlásnak megfelelő koncentrációarány adja meg Smith szerint az inhibíciós indexet.

Ezt a módszert Wolters /90/ "csatornateszt"-jének felhasználásával úgy változtattuk meg, hogy az agarlemezbe kör alakú lyukak helyett 8-10 cm hosszú és 6 mm széles csikokat vágunk és ezeket kiemelve csatornákat kaptunk. Ha két ilyen párhuzamos vályuba mérjük be a B_{12} -vitamin, illetőleg a ko-balamínmonokarbonsav oldatát, egyenes szélű növekedési zónát kapunk, amelynek széle párhuzamos a csikkal / 1. a 3. ábrát, 34.o./ . Ennek a módszernek magában véve nincs különösebb előnye az E.L.Smith által leírt módszerrel szemben, legfeljebb az, hogy ugyanabban a kísérletben a csik hosszára mérő-

2. ábra.

=====

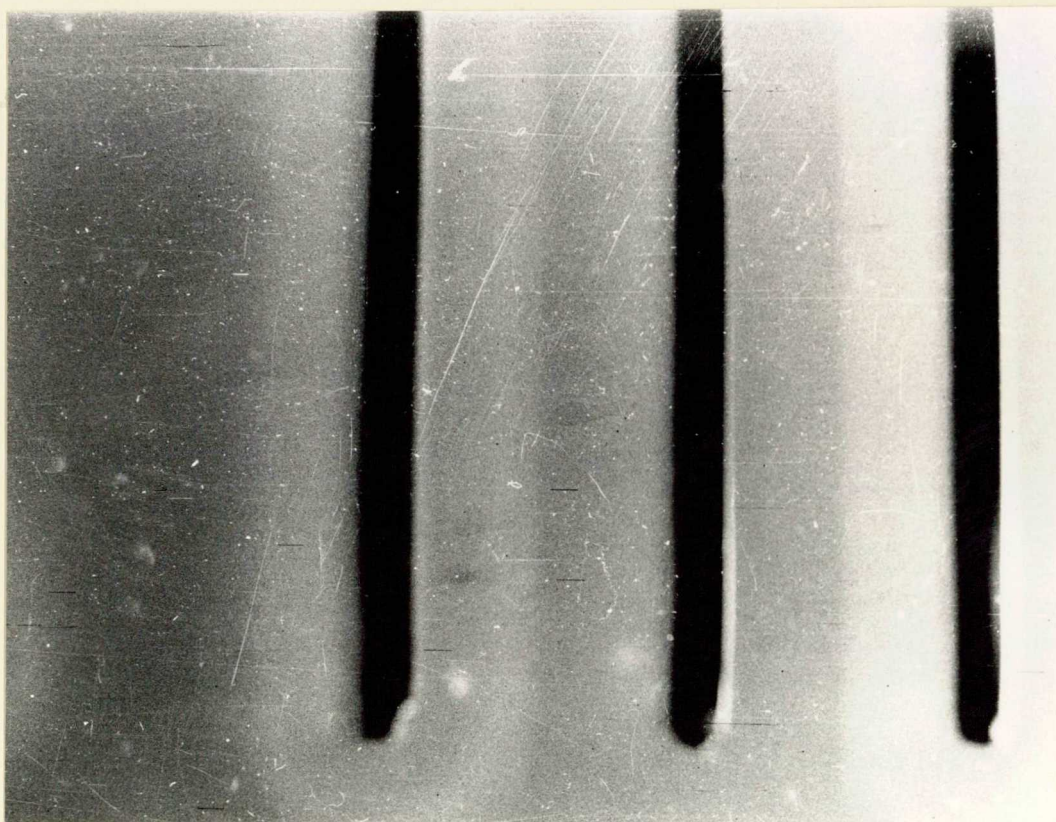


A B₁₂-vitamin és a kobalaminmonokarbonsav antago-
nizmusának kimutatása E.L.Smith nyomán,
különböző koncentrációarányok mellett.

A baloldali lyukakba B₁₂-vitamint, a jobboldaliakba kobalaminmonokarbonsavat töltöttünk. Jól látható a növekedési zónák eltorzulása és az, hogy a gátlási vonal sokkal élesebben határolt, mint a növekedési zóna el nem torzult részének a széle.

3. ábra.

=====



E.L. Smith módszerének módosítása Wolters nyomán.

A két szélső csikba B₁₂-vitamint, a középsőbe kobalaminmonokarbonsavat töltöttünk.

A baloldali csik bal szélén, ahol a növekedési zóna minden gátlás nélkül alakult ki, a zóna széle olyan elmosódott, hogy a fényképen csak sejteni lehet. A középső csik felé néző oldalon, ahol a kobalaminmonokarbonsav gátló hatása érvényesül, a zónák keskenyebbek és feltűnően éles szélűek.

legesen több párhuzamos mérést tudunk végezni a gátlás fokának meghatározására. Elméletileg az lehet az előnye Wolters módszerének, hogy a szokásos kétdimenziós diffúzió helyett egydimenziós diffúzió megy végbe, amelynek viszonyai kevésbé bonyolultak és K.E. Cooper képletével /11, 12, 13/ nyomon követhetők.

A mi számunkra Wolters módszerének kipróbálása azért volt jelentős, mert fontos lépés a következő pontban ismertetendő kísérlet bevezetésére.

6/. A B₁₂-vitamin és a kobalaminmonokarbonsav antagonizmusa kompetitív voltának demonstrálása agar diffúziós módszerrel, a Wolters-féle "csatornateszt" felhasználásával.

/14/ szerint készült agarlemezekből 6 mm széles csikokat vágunk ki egy külön e célra készített eszközzel /két borotvapenge csavarokkal egy műanyag-szárhoz rögzítve/, ami a csikok egyenlő szélességét biztosította. A csikok hossza $11 \pm 0,2$ cm volt.

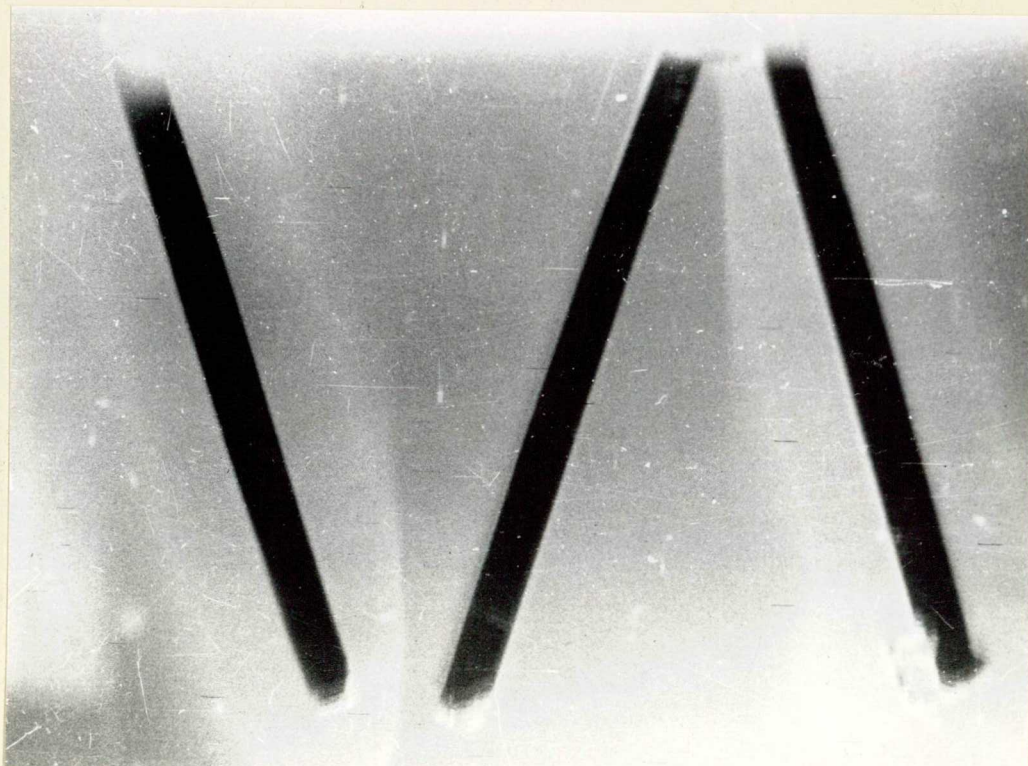
Az első kísérletsorozatban a csikok párhuzamosak voltak, egymástól kb. 3,5 cm távolságban. A vályukba ^f felváltva 1 ml 10 µg/ml koncentrációju B₁₂-vitamin-oldatot, illetőleg 1 ml különböző koncentrációju kobalaminmonokarbonsav-oldatot mértünk be /300, 400, 500, 600 ill. 700 µg/ml/, majd az agarlemezeket inkubáltuk. A B₁₂-vitamint tartalmazó vályuk körül növekedési zónák keletkeztek. A lemez szélén levő

csik mentén - ahol nem volt a B_{12} -vitamint tartalmazó vályuval szemben kobalaminmonokarbonsavat tartalmazó csik, elmosódott szélű, kb. 3,2-3,3 cm széles növekedési zóna keletkezett /elmosódottsága miatt nem volt egész pontosan leolvasható/. Ott ellenben, ahol kobalaminmonokarbonsavat tartalmazó vályu volt a B_{12} -vitamint tartalmazó csatornával szemben, feltűnően élesszélű és sokkal keskenyebb növekedési zóna alakult ki. Szélessége a koncentráció-arányokkal kissé változott. A növekedési zóna szélessége abban az esetben volt pontosan a fele a két csik közötti távolságnak /függetlenül a két csik egymástól való távolságától/, amikor a kobalaminmonokarbonsav koncentrációja 50-szerese volt a B_{12} -vitamin koncentrációjának, vagyis 500 $\mu\text{g/ml}$. - Miután a két vegyület diffúziós állandója közel azonos /1. a metodikai részt, 23.o./, ezt az eredményt úgy értelmezhetjük, hogy az adott kísérlet szerint a kobalaminmonokarbonsav B_{12} -vitaminra vonatkoztatott inhibíciós indexe e szerint a teszt szerint 50. Ez az érték közel egyezik az 1. kísérletben kapott 40-es értékkel. Meg kell azonban jegyezni, hogy E.L. Smith és munkatársai ennél nagyobb inhibíciós indexekről számolnak be /77, 78, 79, 80, 81/.

A második kísérletsorozatban nem párhuzamos, hanem egymással bizonyos szöget bezáró csikokat vágtunk ki az agarlamazból. Minden második csikba 1 ml 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációju B_{12} -vitamin-oldatot töltöttünk, a közbülső csikokba pedig részben kobalaminmonokarbonsav-oldatokat, részben 1%-os vi-

4. ábra.

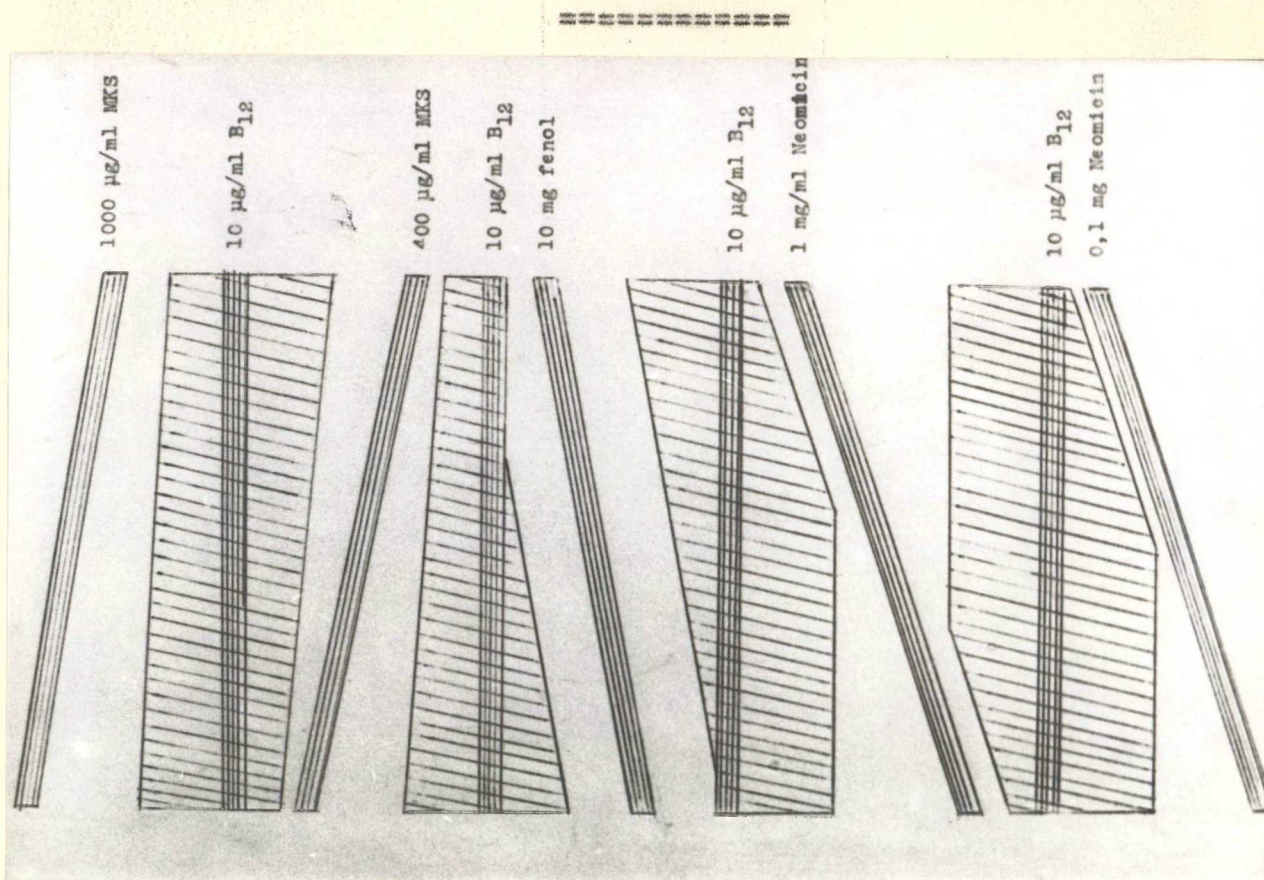
=====



A B₁₂-vitamin és a kobalaminmonokarbonsav antago-
nizmusa kompetitív voltának demonstrálása
agarlemezen.

A két csik széle és a gátlási vonal jó közelítéssel
sugárnyalábot alkot.

5. ábra.



Kompetitív gátlás

Nem kompetitív gátlás

A kompetitív antagonizmus demonstrálása. Szchematikus rajz.

A függőleges csikozás a csatornákat, a vízszintes a növekedési zónákat jelzi.- MKS = kobalaminmonokarbonsav.

Kompetitív gátlásnál a gátlási vonal a két szomszédos csik szélével sugárnyalábot alkot /vagyis a három egyenes egy pontban metszi egymást/.

Nem kompetitív gátlásnál a gátlási vonal párhuzamos a gátló anyagot tartalmazó vályuval és független a B₁₂-vitamint tartalmazó vályu helyzetétől.

zes fenol-oldatot, részben pedig 1000 ill. 100 E/ml koncentrációju neomicin-oldatot - minden esetben 1 ml mennyiségben.

18 órai inkubálás után vizsgáltuk a kifejlődött növekedési zónákat / 1. a 4. és 5. ábrát, 37.-38. o./ .Az 5. ábrán bemutatott fénykép technikai okokból halvány és az agarlemeznek csak egy kis részét mutatja. Ez a fénykép inkább csak a kísérlet dokumentálására szolgál, míg a 4. ábra szkematikus rajzon mutatja be az eredményt.

Az ábra baloldalán láthatjuk a kobalaminmonokarbonsav két különböző koncentrációju oldatának hatását a növekedési zónára. Ezekben az esetekben olyan növekedési zóna alakult ki, amelynek a széle éles és egyenes volt, de sem a B_{12} -vitamint, sem a kobalaminmonokarbonsavat tartalmazó csikkel nem párhuzamos, hanem a két csik képzeletbeli metszéspontjából kiinduló egyenes.

Ez az eredmény érthető is. A két antagonista egyenlő sebességgel diffundál és a zóna széle kompetitív antagonizmus esetén ott alakul ki, ahol a koncentrációk aránya állandó érték. Az ilyen pontok mértani helye olyan egyenes, amelyre nézve érvényes az a feltétel, hogy a két csiktól való távolságok aránya minden rajta levő pontra nézve állandó, vagyis a két csik szélével sugárnyalábot alkot.

Egészen más képet adnak a növekedési zónák ott, ahol a B_{12} -

vitaminnal átellenes csikba antiszeptikumot vagy antibiotikumot /vagyis nem kompetitív antagonistát/ töltöttünk. Itt a növekedési zóna széle egyrészt nem volt éles, másfelől pedig tört vonal határolta. A gátló anyag ugyanis a növekedési zónától teljesen függetlenül gátlást hoz létre és a gátlási zóna széle a gátló anyagot tartalmazó csikkal párhuzamos. Ott viszont, ahol a gátlás már nem érvényesül, kifejlődik a növekedési zóna: ennek széle viszont a B₁₂-vitamint tartalmazó vályuval párhuzamos.

A leírt módszer, úgy gondoljuk, nemcsak a B₁₂-vitamin és antagonistái esetében alkalmazható, hanem minden olyan növekedési faktor és antagonistáinak vizsgálata esetén, ahol a növekedés agardiffúziós módszerrel kimutatható. A vázolt eljárás igen egyszerű és meggyőző.

7/. A B₁₂-vitamin hatásának teljes gátlása kobalaminmonokarbonsavval folyékony táptalajon.

Az E.coli 113-3 tenyésztésére szolgáló folyékony táptalajhoz 0,02 µg/ml-nyi B₁₂-vitamint és 2% glukózt adtunk, majd 250 ml így előkészített táptalajt beoltottunk 1 kacsnyi 24 órás folyékony E.coli 113-3-tenyészettel. Ebből az oldatból kobalaminmonokarbonsavval olyan hígítási sorozatot készítettünk, amelynek egyes tagjai 0,01 µg/ml B₁₂-vitamint és változó mennyiségű kobalaminmonokarbonsavat tartalmaztak, kétszeres hígítási sorozatban. A kémcsöveket 26 °C-on inkub-

báltuk és 24 ill. 120 óra múlva olvastuk le az eredményeket, amelyeket a 4.táblázatban tüntetünk fel.

4.táblázat.
=====

A kobalaminmonokarbonsav B₁₂-vitaminra vonatkoztatott
inhibíciós indexének meghatározása folyékony táp-
talajon E.coli 113-3, mal, mint teszt-
organizmussal

Kobalaminmonokar- bonsav/B ₁₂ -vitamin koncentrációarány	A baktériumtenyészet fejlődése	
	24 órai inkubáció után	120 órai
32.000	-	-
16.000	-	-
8.000	-	-
4.000	-	-
2.000	-	-
1.000	-	- /fert./
500	-	-
250	-	-
125	-	+
62	+	+
31	+	+
15	+	+

Megjegyzés: a B₁₂-vitamin konc.minden esetben 0,01 µg/ml volt.
=====

A táblázat azt mutatja, hogy a 24 órás leolvasás szerint a kobalaminmonokarbonsav kb. 85-szörös koncentrációban antagónizálja a B₁₂-vitamint /ez az érték a legkisebb teljesen gátló és a legnagyobb részben gátló koncentráció mértani középárányosa/. Ez az inhibíciós index kissé magasabb az 1/. kísérletben agarlemezen kapott inhibíciós indexnél, amely 40 volt.

Miután azonban 24 órán túl még újabb cső is zavarossá vált, a módszer értékét relatívnak kell tekinteni. Nem lehet tudni, hogy végeredményben 85 vagy 160 e a helyes inhibíciós index.- Ezért célszerűnek látszott a bizonytalan végpontot mutató teljes inhibíció helyett az 50%-os inhibíciót vizsgálni és az 50%-os inhibíciós indexet meghatározni. Ez a módszer elsősorban az enzim-inhibitoroknál használatos, de bevezették a B₁₂-vitamin-antagonisták vizsgálatánál is /33,39,40,41,42/. A kompetitív antagonizmus enzimreakcióknál szokásos grafikus analízise /17,61/ azonban itt nem alkalmazható célszerűen.

8/. Az E.coli 113-3 fejlődésének 50%-os gátlása kobalaminmonokarbonsavval.

Az E.coli 113-3 fejlődésének 50%-os gátlását kiváltó kobalaminmonokarbonsav-koncentrációt a következőképpen határoztuk meg:

200 ml E.coli 113-3 tenyésztésére szolgáló szintetikus folyékony táptalajt beoltottunk 1 kacsnyi 24 órás folyékony

baktériumtenyésztéssel, majd kétfelé osztottuk. Az egyik feléhez $0,055 \mu\text{g}$, másik feléhez $0,22 \mu\text{g}$ B_{12} -vitamint adtunk. Az oldatokat 9 ml -enként steril kémcsövekbe fejtettük és a térfogatokat úgy egészítettük ki 10 ml -re, hogy az egyes kémcsövek az 5. táblázatban megadott mennyiségű adalékokat tartalmazták.

20°C -on való inkubálás után Unicam spektrofotométeren, 1 cm -es küvettákban mértük a fényabszorpciót 600 nm -en /tekintetbe véve, hogy 550 nm -nél a B_{12} -vitaminnak és rokonvegyületeinek abszorpciós maximumuk van, amelyet el akartunk kerülni a turbidimetriás mérésnél/. A meghatározásoknál összehasonlító oldatként mindig az azonos összetételű, azonos adalékokkal ellátott steril táptalajokat használtuk.

A kobalaminmonokarbonsavat nem tartalmazó kontroll-tenyészetet leolvasás után a megfelelő steril táptalajjal a kétszeresére hígítottuk és így is leolvastuk az abszorpciót. Az így kapott érték az 50% -os növekedésnek felel meg, míg az előbbi a 100% -os növekedésnek. A leolvasott abszorpciós értékek ugyancsak az 5. táblázatban vannak feltüntetve.

A táblázatban összeállított mérési adatokból a szemléletesség kedvéért a 6. ábrán bemutatott grafikont szerkesztettük meg. / l. 45. o. /.

5. táblázat.
=====

Az E.coli 113-3 fejlődésének 50%-os gátlása kobalaminmonokarbonsavval két különböző B₁₂-vitaminkoncentráció esetén.

B ₁₂ -vitamin- koncentráció	Kobalaminmonokarbonsav/B ₁₂ koncentráció-arány	Fényabszorpció 600 nm-en
5.10 ⁻⁴ µg/ml	128	0,090
	64	0,085
	32	0,143
	16	0,239
	4	0,234
	0	0,233
	50%-os növekedés	0,127

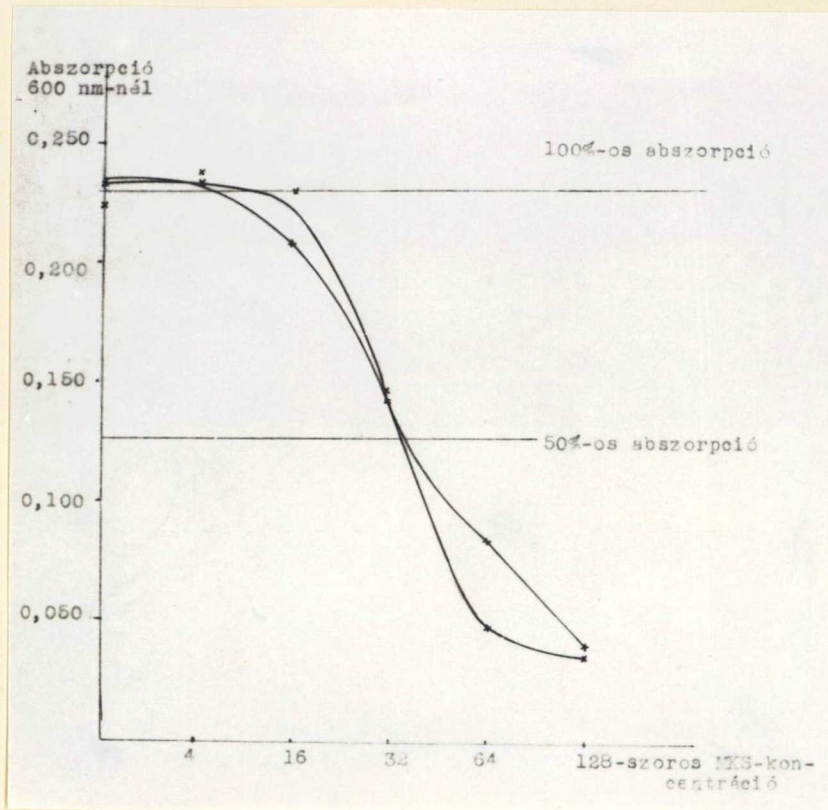
2.10 ⁻³ µg/ml	128	0,036
	64	0,047
	32	0,146
	16	0,209
	8	0,239
	0	0,224
	50%-os növekedés	0,122

Megjegyzés: az 50%-os növekedés a kontroll tenyészeteket /100%-os növekedés/ azonos térfogatu steril táptalajjal higitva jelenti. Ezekben ugyanis fele annyi baktérium van, mint a higitatlan tenyészetben.

=====

6. ábra.

=====



A kobalaminmonokarbonsav 50%-os gátlása turbidimet-
riás mérés alapján két különböző B₁₂-vitamin-kon-
centrációnál.

36-38-szoros kobalaminmonokarbonsav-koncentrációnál
találunk 50%-os gátlást.

A 6. ábrán a két kísérletsorozatnak megfelelő görbék közel egybeesnek és az 50%-os gátlásnak megfelelő egyenest mindkettő egy pontban, kb. a 35-szörös kobalamínmonokarbonsav-koncentrációnak megfelelő helyen metszi. A két görbe egybeesése az antagonizmus kompetitív volta mellett szól.

9/. A B₁₂-vitamin - kobalamínmonokarbonsav antagonista pár egymásra való hatásának függősége a beadás viszonylagos időpontjától - szilárd táptalajon vizsgálva.

A /14/ szerinti agarlemezek oltására szolgáló folyékony E.coli 113-3 tenyészetet steril desztillált vízzel a 10-szeresére hígítottuk és az így kapott folyadék 2-2 ml-éhez 0,5 µg B₁₂-vitamint adtunk. Ezzel az oltóanyaggal

5, 10, 20, 40 ill. 80 percnyi

szobahőmérsékleten való állás után beoltottuk az olvadt agar 20 ml-ét, 60 µg kobalamínmonokarbonsavat adtunk hozzá és Petri csészékbe agarlemezt öntöttünk vele. A lemezeket 16 órai 26 °C-on való inkubálás után vizsgáltuk és valamennyin intenzív baktériumnövekedést találtunk.

Egy másik kísérletsorozatban az agarlemezek oltására szolgáló E.coli 113-3 tenyészetet desztillált vízzel a 10-szeresére hígítottuk és az így kapott folyadék 2-2 ml-éhez 60 µg kobalamínmonokarbonsavat adtunk. Ezzel az oltóanyaggal

5, 10, 20, 40 ill. 80 percnyi

szobahőmérsékleten való állás után beoltottunk 20 ml megolvasztott agart, 3 µg B₁₂-vitamint adtunk hozzá és Petri-

csészékbe agarlemezeket öntöttünk vele.- A lemezeket 16 órán át 26 C⁰-on inkubáltuk.Egyiken sem észleltünk baktériumnövekedést.

A kísérlet értékelésénél figyelembe kell venni,hogy a fentebb ismertetett adatok értelmében,egyidejű beadás esetén 40-50-szeres kobalaminmonokarbonsav-koncentráció esetén agarlemezen teljessé válik a gátlás.

Az első kísérletben,ahol az E.coli 113-3 baktériumok előbb a B₁₂-vitaminnal kerültek érintkezésbe,a kobalaminmonokarbonsav/B₁₂-vitamin-arány 120 volt.Egyidejű beadás esetén teljes gátlás következett volna be.Ezzel szemben a kobalaminmonokarbonsavnak csak 5 perccel később való beadása is azzal az eredménnyel járt,hogy a baktériumok szaporodásának gátlása elmaradt.

A második kísérletsorozatban a kobalaminmonokarbonsav/B₁₂-vitamin arány 20 volt,tehát egyidejű beadás esetén nem várhattunk volna teljes gátlást.Mégis,a kobalaminmonokarbonsavnak csak 5 perccel korábban történt beadása is elég volt ahhoz,hogy a teljes gátlás létrejöjjön.

A kísérlet tehát azt mutatja,hogy az antagonizmus intenzitását nagy mértékben befolyásolja az a körülmény,hogy az antagonista-pár két tagja közül melyik kerül előbb kapcsolatba a baktériumsejtekkel.Igy kiderül,hogy az agaron mért 40-szeres inhibíciós index nem abszolút érvényességű,hanem csak arra az esetre vonatkozik,amikor a vitaminnak és anta-

gonistájának beadása egyidejűleg történik /ami legbiztosabban úgy érhető el, hogy a két anyag oldatának keverékét alkalmazzuk a kívánt arányban.

A fenti kísérlet azt mutatja, hogy a B_{12} -vitamin és a kobalaminmonokarbonsav antagonizmusa nem a klasszikus értelemben vett kompetitív antagonizmus.- Ez utóbbi esetben ugyanis teljesen mindegy, hogy időben megelőzi-e az antagonista hatása a metabolitét vagy fordítva. Mindenkor a pillanatnyi koncentrációarány számít: a rendszer aktivitását gyorsan beállító kémiai egyensúly határozza meg.

Mint láttuk, a B_{12} -vitamin és a kobalaminmonokarbonsav egymásra való hatása esetén nem ez a helyzet. Ezzel kapcsolatban Woolleyre /93/ hivatkozunk, aki számos példát ír le erre a jelenségre emlőszöveten és madarakon, sőt megemlíti, hogy hasonló jelenség alacsonyrendű biológiai objektumokon /élesztősejteken/ is előfordul. Ennek ellenére ez a szerző az ilyen típusú antagonizmust is a kompetitív antagonizmus kategóriájába sorozza, mert az antimetabolit azonos körülmények közt való alkalmazása esetén mindenek ellenére állandó jellegű inhibíciós indexet kapunk.

Azt látjuk tehát végeredményben, hogy az antagonista-pár közül az a vegyület hat erősebben, amelyet előbb adunk be. Ez azzal magyarázható, hogy az előbb ható vegyület akadálytalanul behatol a sejtbe, elfoglalja a megfelelő receptorhelyeket és oda elég szilárdan beépül. A később ható anta-

gonistának már nemcsak egyszerűen be kell épülnie a sejtbe, hanem bonyolultabb mechanizmus szerint kell hatnia. Ezzel a kérdéssel az eredmények megbeszélése kapcsán foglalkozunk.

A mi esetünkben az a tény, hogy az inhibíciós index eltolódásához már néhány perc is elegendő, azt mutatja, hogy a két vegyület beépülése igen gyorsan megy végbe. Egyebek mellett ez is egy bizonyítéka annak, hogy a viszonylag nagy B_{12} -vitamin-molekula /molekulasúlya kb. 1500/ igen simán és gyorsan keresztüljut a sejthártyán.

10/. A B_{12} -vitamin-kobalaminmonokarbonsav antagonistá pár egymásra való hatásának függése a beadás viszonylagos időpontjától, folyékony táptalajon.

100 ml E.coli 113-3 tenyésztésére szolgáló folyékony táptalajt 0,3 ml 24 órás tenyészettel oltottunk be, 0,011 $\mu\text{g/ml}$ mennyiségű B_{12} -vitamint adtunk hozzá és 9 ml-enként szétosztottuk steril kémcsövekbe. E kémcsövekbe 10 perccel a B_{12} -vitamin beadása után különböző mennyiségű kobalaminmonokarbonsavat adtunk úgy, hogy az oldat térfogatát egyben 10 ml-re egészítettük ki. 16 órai 26°C -on való inkubálás után nefelometriás feltétellel ellátott Pulfrich-fotométeren vizsgáltuk a tenyészetek zavarosságát desztillált vízzel való 5-szörös hígítás után.

Másik 100 ml folyékony táptalajt hasonló módon oltottunk be E.coli 113-3-mal és e táptalajhoz 0,11 $\mu\text{g/ml}$ kobalaminmonokarbonsavat adtunk, majd ezt is 9 ml-enként osztottuk



szét kémcsövekbe. A kémcsövekbe 10 perccel a kobalaminmonokarbonsav beadása után 1 ml térfogatu oldatban különböző B₁₂-vitamin-mennyiségeket adtunk. Ellenőrzésképen egyes kémcsövekbe csak B₁₂-vitamint, más kémcsövekbe csak kobalaminmonokarbonsavat adtunk. A továbbiakban ezt a kémcsősorozatot is ugyanugy kezeltük, mint az elsőt.

Az eredményeket a 6. táblázatban mutatjuk be:

6. táblázat.
=====

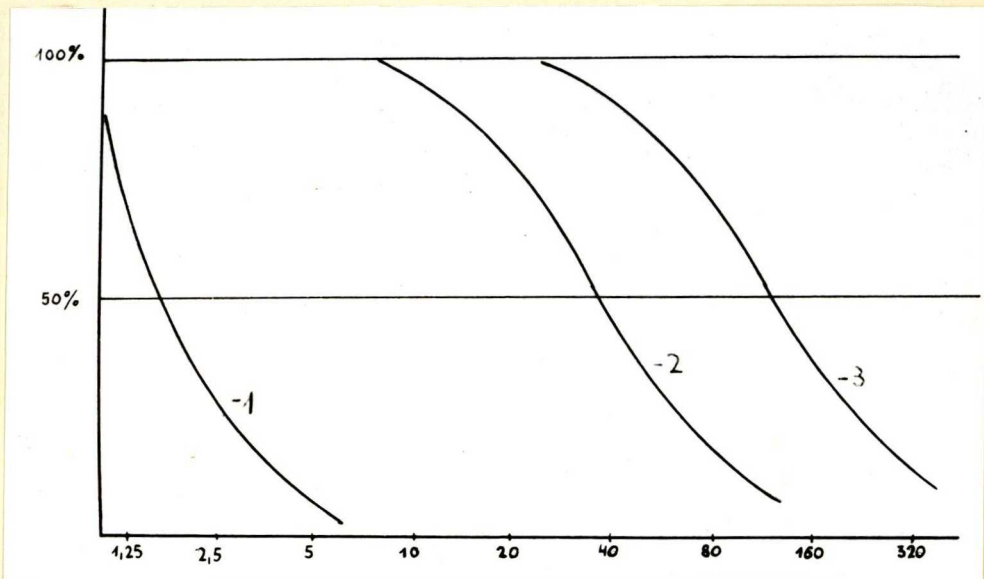
A kobalaminmonokarbonsav gátló hatása E.coli 113-3-ra folyékony táptalajon a B₁₂-vitamin és az antimetabolit különböző időpontokban való beadása esetén.

Kobalaminmono- karbonsa/B ₁₂ -vi- tamin arány	Nefelométerrel mért zavarosság 5-szörös higitásban	A kobalaminmonokarbon- sav beadásának időpont- ja a B ₁₂ -höz képest.
Csak B ₁₂ vitamin	45	-
Csak kobalaminmonokar- bonsav	15	-
20-szoros "	48	10 perccel később
40-szeres "	41	"
160-szoros "	27	"
320-szoros "	20	"

2,5-szörös "	20	10 perccel előbb
1,25-szörös "	30	"
=====		

7. ábra.

=====



-szoros kobalaminmonokarbonsav-konc.
a B₁₂-vitamin-konc.-hoz képest.

A kobalaminmonokarbonsav gátlási görbéi a B₁₂-vitamin
és az antagonista különböző időpontokban
való beadása esetén.

1.görbe: A kobalaminmonokarbonsavat adtuk be 10 perccel előbb.

2.görbe: A B₁₂-vitamint és a kobalaminmonokarbonsavat egyszerre adtuk be.

3.görbe: A B₁₂-vitamint adtuk be 10 perccel előbb.

Ha a 6.táblázatot úgy dolgozzuk át,hogy a maximális növekedésnek megfelelő zavarosságot /45/ 100-nak vesszük,a minimális - B_{12} -vitamin hiányában mért zavarosságot /15/ pedig 0-nak és a többi értéket interpoláljuk,a 7.ábrán /51.oldal/ látható görbét szerkeszthetjük meg.Összehasonlításképen ugyanezen az ábrán feltüntetjük azt a görbét is,amelyet a B_{12} -vitamin és a kobalaminmonokarbonsav egyidejű beadása esetén kaptunk /vesd össze a 6.ábrával/.

Az eredmények azt mutatják,hogy ha a B_{12} -vitamint adjuk be hamarabb,20-szoros mennyiségű kobalaminmonokarbonsav még semmi gátlást sem mutat,40-szeres mennyiségű csak igen csekély gátlást /12%/ és még 320-szoros mennyiségű antimetabolit is csak 83%-os gátlást ad.

Ha a kobalaminmonokarbonsavat adjuk be hamarabb,mint a B_{12} -vitamint,a 2,5-szörös kobalaminmonokarbonsav-mennyiség - amely egyidejű beadás esetén még semmiféle kimutatható gátlást sem eredményez - több,mint 80%-os gátlást hoz létre;épp annyit,mint utólagos kobalaminmonokarbonsav-beadás esetén a 320-szoros koncentráció.Még az 1,25-szörös kobalaminmonokarbonsav-mennyiség is kb. 50%-os gátló hatást fejt ki - mint egyidejű beadás esetén a 35-szörös mennyiség.

Ezek a számok magukért beszélnek.Bizonyítják,hogy a kobalaminmonokarbonsav inhibíciós indexe relativ fogalom;értéke nagy mértékben függ a meghatározás módjától.

II.A kobalaminmonokarbonsav antagonistája hatásának és képződésének törzsspecifitása.

1/.Miután a kobalaminmonokarbonsav antagonistának bizonyult a B₁₂-vitamin-dependens E.coli 113-3 törzsszel szemben, megvizsgáltuk egyes más törzsekkel kapcsolatban, van-e antagónista hatása.- E törzseket három csoportba oszthatjuk: 1. B₁₂-vitamin-dependens törzsek, 2.Gyenge B₁₂-vitamintermelő mikroorganizmusok és 3.Sok B₁₂-vitamint termelő mikroorganizmusok.

a/.Az 1.csoportba tartozó mikroorganizmusokra való hatást számos szerző vizsgálta, de az eredmények nem egész egyértelműek.

Lactobacillus leichmanii-val szemben a kobalaminmonokarbonsav aktiv növesztő hatásu, aktivitása azonban sokkal gyengébb, mint a B₁₂-vitaminé /81/. Feltételezik, hogy a kérdéses mikroorganizmus B₁₂-vitamint szintetizál a monokarbonsavból.

Euglena gracilis-szal szemben a kobalaminmonokarbonsav B₁₂-vitamin-hatást mutat fel, gátló hatása még nagy koncentrációban sincs /41/.

Ochromonas malhamensis-szel szemben a kobalaminmonokarbonsav antagonistája hatásu 350-450 közti inhibíciós indexszel. /27,38/. Mi a saját vizsgálatainkban azt találtuk, hogy a kobalaminmonokarbonsav még 1000 µg/ml koncentrációban sem

gátolta ennek az organizmusnak a fejlődését,holott minden B_{12} -vitamin-molekulára 10^5 kobalaminmonokarbonsav-molekula esett.

Prymnesium parvum esetében a kobalaminmonokarbonsav vitamin-hatásu /67/.

b/.Kipróbáltuk a kobalaminmonokarbonsavat számos,nem identifikált,különböző forrásból származó baktériummal és a törzstenyészetünkől való B.subtilis-szel szemben.- Ezek nem voltak B_{12} -vitamin-dependens baktériumok,mégis felmerült az a lehetőség,hogy bizonyos nagy kobalaminmonokarbonsav-dózisok esetleg gátló hatással vannak rájuk.- A kísérletek azonban azt mutatták,hogy szintetikus vagy félszintetikus táptalajokon,amelyek B_{12} -vitamint nem tartalmaztak,e baktériumok fejlődését egy esetben sem gátolta a kobalaminmonokarbonsav 200-400 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban.

c/.Végül megvizsgáltuk a kobalaminmonokarbonsav hatását egyes,sok B_{12} -vitamint szintetizáló mikroorganizmusok esetében is.Igy néhány sugárgomba-törzsnél és olyan Propionibacteriumoknál amelyek kobalaminmonokarbonsavat nem termelnek.Ez utóbbi esetben a tenyészetek katalázaktivitását mértük /71/ szerint és ennek intenzitását tekintettük a fejlődés mércéjének.Azt találtuk,hogy 1000 $\mu\text{g/ml}$ kobalaminmonokarbonsav sem csökkentette e tenyészetek katalázaktivitását a kontrol-tenyészetekéhez képest.

Végül megvizsgáltuk a kobalaminmonokarbonsav hatását egy másik B_{12} -vitamin-dependens E.coli-törzsrre. Ezt a törzset Kétyi és Szendrey /58/ írta le és e szerzők voltak szivek rendelkezésemre bocsátani,amiért e helyen fejezem ki köszönetemet.

A kérdéses törzs B_{12} -vitamin és prolin-deficiens,ezért az E.coli 113-3 számára használt,de prolinnal dúsított folyékony táptalajon tenyésztettük.Ilyen körülmények közt,26 C°-on a törzs lassan fejlődött,csak 48 óra múlva mutatott erős zavarosodást a táptalaj.Ilyen tenyésztés mellett akkor sem észleltünk gátló hatást a kobalaminmonokarbonsavtól,ha koncentrációja 1000-szeresen felülmulta a jelenlevő B_{12} -vitaminét.

E kísérleteket összegezve azt mondhatjuk,hogy a kobalaminmonokarbonsav rendkívül specifikus antagonistája az E.coli 113-3-törzsnek.Természetesen nem állithatjuk,hogy ez az egyetlen törzs,amellyel szemben aktiv,de mindenesetre mondhatjuk,hogy számos különféle típusu mikroorganizmuson ki próbálva,az E.coli 113-3 törzsön kívül csak az O.malhamensis-nél találtak jóval gyengébb hatást,amellyel szemben még bizonyos fenntartással is lehet élni.

2/.A kobalaminmonokarbonsav hatása az E.coli 113 életképességére.

Miután a fentiek alapján kiderült,hogy a kobalaminmonokar-

bonsav specifikus, az E.coli 113-3 törzsszel szemben aktív antibiotikumnak tekinthető /57/, felmerült a kérdés, hogy bakteriosztatikus vagy baktericid hatása van-e?

Ennek eldöntése végett az E.coli 113-3 tenyésztésére szolgáló folyékony táptalajt beoltottuk 1 kacsnyi 24 órás tenyészettel és annyi steril kobalaminmonokarbonsav-oldatot adtunk hozzá, hogy koncentrációja a táptalajban 320 µg/ml legyen /a jelenlevő B₁₂-vitamin mennyiségének 32.000-szerese/. A folyadékot 26 °C-on inkubáltuk és különböző idők elteltével leoltottunk belőle a /14/ szerinti, de B₁₂-vitaminnal kiegészített táptalajra, Petri-csészékben. A folyékony táptalajon nyoma sem volt a baktériumok fejlődésének, viszont az összes Petri-csészén kinőttek az átoltott baktériumok, mégpedig hozzávetőlegesen azonos számú telep képződött valamennyin /Petri-csészénként 100 és 200 között/. A kísérletet a 7. táblázatban mutatjuk be.

Eszerint megállapítható, hogy a kobalaminmonokarbonsavnak csak bakteriosztatikus hatása van. Mint kompetitív antagónista, belép a B₁₂-vitamin helyébe, kötődik annak receptoraihoz, átmenetileg megállítja a sejt élettevékenységét. A kötődés azonban reverzibilisnek látszik.

Az a tény, hogy a különböző hosszú ideig tartó kobalaminmonokarbonsavval való kezelés után mindig nagyjából ugyanannyi telep nőtt ki átoltás után az agarlemezekre, arra vall, hogy a kobalaminmonokarbonsavval való kezelés folya-

7.táblázat.

=====

E.coli 113-3 baktériumok életképessége gátló mennyiségű
kobalaminmonokarbonsavval való kezelés után.

A kobalaminmonokarbonsavval való keze-							
lés tartama							
	0'	2'	8'	30'	90'	16 ^h	48 ^h
A baktériumok fejlődése fo- lyékony tápta- lajon	-	-	-	-	-	-	-

A baktériumok fejlődése szí- lárd táptala- jon /életké- pesség/	+	+	+	+	+	+	+
=====							

mán nemcsak a baktériumok egy /egyre csökkenő/ hányada tartja meg életképességét, hanem nagyjából véve az egész populáció.

Az a tény viszont, hogy a kobalaminmonokarbonsavat tartal-
mazó táptalajon fejlődés nem észlelhető azt mutatja, hogy
nem keletkeznek olyan mutánsok, amelyek rezisztensek lenné-
nek ezzel a B₁₂-vitamin-antagonistával szemben.

III.A kobalaminmonokarbonsav hatása egyes B₁₂-vitamin-faktorokkal szemben.

Ezzel a kérdéssel egy sajtó alatt levő közleményem foglalkozik /75/.A benne foglaltak azonban újabb problémákat vetettek fel,ugy,hogy az alábbiakban bővebben tárgyalom ezt a kérdéskomplexumot.

1/.B₁₂-vitamin és kobalaminmonokarbonsav keveréke által agarlemezen létrehozott "négyyszögletes" növekedési zónák.

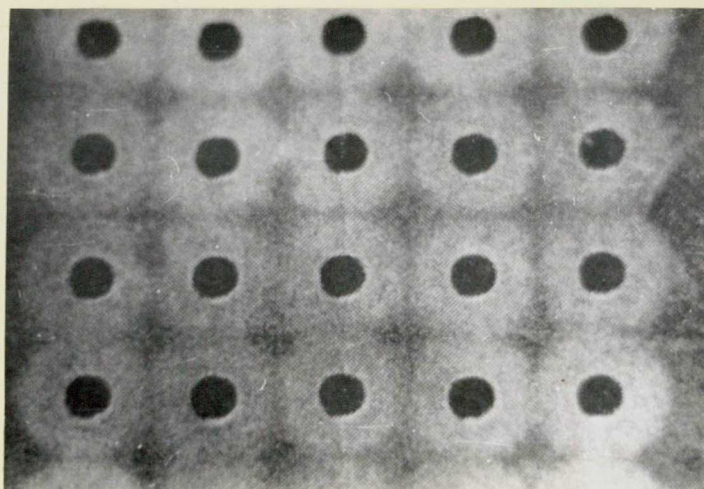
A szokásos 2,5 cm-es lyuktávolság helyett 2 cm távolságban furtunk lyukakat a /14/ szerinti agarlemezbe /Lyuktávolságon két lyuk középpontja közti távolságot értjük/.

Ha az ilyen agarlemezen 0,1 µg/ml koncentrációju B₁₂-vitamin-oldatokat töltöttünk az egyes lyukakba,összefolyó növekedési zónákat kaptunk.Ha azonban olyan oldatot mértünk be a lyukakba,amely 0,1 µg/ml B₁₂-vitamin mellett 0,5 - 1,5 µg/ml kobalaminmonokarbonsavat is tartalmazott,olyan növekedési zónák keletkeztek,amelyeket keskeny,baktériummal be nem nőtt sávok választottak el egymástól,ami a zónákat sajátságos "szögletes" alakuvá tette /lásd a 8.ábrát,59. oldalon/.

Ezt a jelenséget annakidején ugy magyaráztuk /56/,hogy a kobalaminmonokarbonsav jelenléte azért akadályozza meg a zónák összefolyását,mert - mint feltételeztük - gyengébben kötődik a baktériumokhoz,mint a B₁₂-vitamin és ezért

8. ábra.

=====



B₁₂-vitamin és kobalaminmonokarbonsav keverékével
előidézett "négyyszögletesre" torzult növekedési
zónák.

0,1 µg/ml B₁₂-vitamin és 0,75 µg/ml kobalaminmono-
karbonsav keverékét vittük fel egymástól 2 cm tá-
volságban levő lyukakba /a távolságot a lyukak közép-
pontjai közt mérve/.

a zóna szélén viszonylagosan feldusul. Ez azonban csak feltételezés volt és ennek bizonyítása érdekében tovább vizsgáltuk a kérdést.

2/.A kobalaminmonokarbonsav antagonista hatása kobinamiddal és III.faktorral szemben.

/14/ szerinti agarlemezekbe lyukakat furtunk és ezekbe olyan oldatok azonos mennyiségét töltöttük, amelyek 0,1 $\mu\text{g/ml}$ kobinamidot /agarlemezen mért látszólagos aktivitás - kb megfelel 0,02 $\mu\text{g/ml}$ súlyszerinti mennyiségnek/, illetőleg III.faktort és a megadott mennyiségű kobalaminmonokarbonsavat tartalmazták. Inkubálás után leolvastuk az eredményeket, amelyeket a 8.táblázatban foglalunk össze.

A táblázatban feltüntetett kísérleti adatokból a következő következtetések vonhatók le:

a/.A kobalaminmonokarbonsav nemcsak a B_{12} -vitaminnak, hanem a két megvizsgált B_{12} -vitamin-faktornak is antagonistája.

A fenti módszerrel vizsgálva, 60-szoros kobalaminmonokarbonsav-koncentrációnál teljes gátlást kapunk, vagyis ugyanabban a tartományban, mint B_{12} -vitamin alkalmazása esetén. Megjegyzendő azonban, hogy a kobinamid esetében látszólagos, agardiffúziós módszerrel mért koncentrációról van szó, amely a súly szerint vett koncentrációnak kb. az ötszöröse /26/.

b/.A kobalaminmonokarbonsav és a B_{12} -vitamin antagonizmusa

8.táblázat.
=====

Kobalaminmonokarbonsav és kobinamid ill. III.faktor keve-
réke által létrehozott növekedési zónák leírása.

A kobalaminmonokarbon-
sav és kobinamid kon-
centrációjának aránya

A zóna leírása

0,0	25,5 mm átmérőjű homogén zóna
3,75	25,5 mm " " "
7,5	26,5 mm " " "
15,0	27,0 mm átmérőjű gyűrűalaku növeke- dési zóna, belül gátlási zónával
30,0	Elmosódott gyűrűalaku növekedési zóna, a határa leolvashatatlan.
60,0	Nincs növekedés

A kobalaminmonokarbon-
sav és a III.faktor kon-
centrációjának aránya

0,0	25,5 mm átmérőjű homogén zóna
3,75	25,5 mm átmérőjű homályos szélű zóna
7,5	27,0 mm átmérőjű gyűrűalaku növe- kedési zóna belül gátlási zónával
15,0	Elmosódott gyűrűs zóna
30,0	" " "
60,0	Nincs növekedés

közt egyfelől, ill. a kobalaminmonokarbonsav és a kísérletben felhasznált faktorok közt közt másfelől, minőségi különbség van. Míg ugyanis a B₁₂-vitamin esetében a kobalaminmonokarbonsav-koncentráció fokozatos növelése az egész zóna fokozatos elmosódását, majd eltűnését vonja maga után, a vizsgált faktorok esetében a kobalaminmonokarbonsav bizonyos koncentrációarányon felül centrális gátlási zónát hoz létre egy gyűrűalakú növekedési zóna belsőjében.

3/. Kobalaminmonokarbonsav, B₁₂-vitamin és kobinamid ill. III. faktor agarlemezre való együttes felvitele estén képződő hármas gyűrűszerű növekedési zónák.

Az előzőleg leírt kísérletek arra látszottak utalni, amint már említettük, hogy a B₁₂-vitamin erősebben kötődik az E.coli 113-3 baktériumokhoz, mint a kobalaminmonokarbonsav és ezért ez utóbbi a zóna szélén viszonylagosan feldusulva alkalmas viszonyok közt létrehozza a "szögletes" zónákat. Ugyanezen okfejtés alapján az utóbbi kísérlet arra vall, hogy a kobalaminmonokarbonsav viszonylag erősebben kötődik a baktériumokhoz, mint a kobinamid vagy a III. faktor és így ez utóbbiak dusulnak fel viszonylagosan a zóna perifériáján.- Felmerült tehát a kérdés: mi történik, ha egyszerre visszük fel a /14/ szerinti agarlemezre a háromféle anyag keverékét?

E kérdés megválaszolása céljából olyan oldatot készítettünk, amely ml-enként

0,5 μ g B₁₂-vitamint,

10,0 " kobalaminmonokarbonsavat és

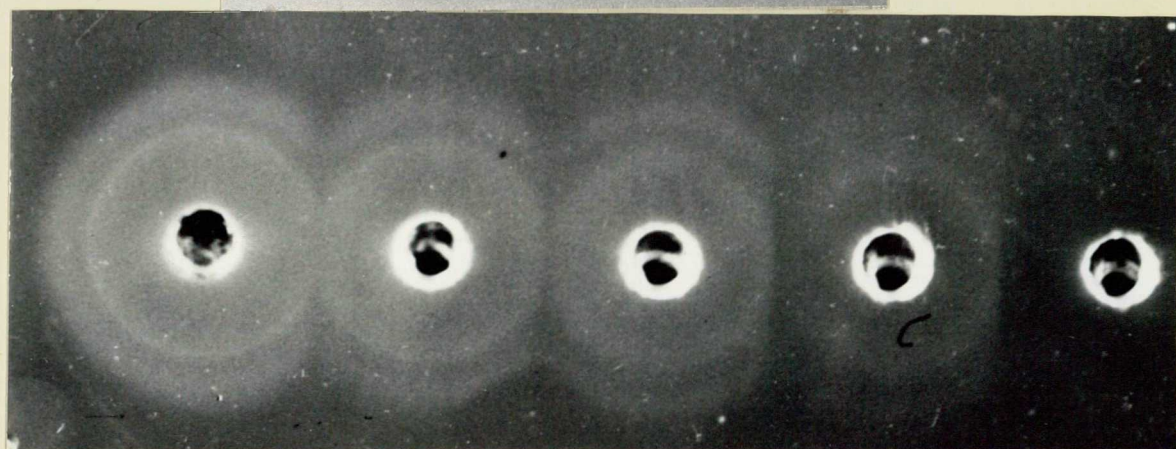
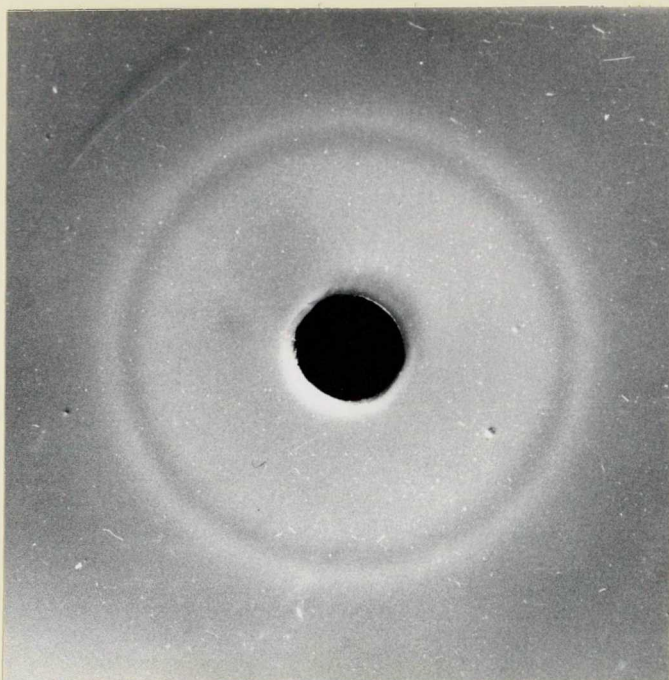
0,5 " Kobinamidot /látszólagos aktivitás/

tartalmazott. Ezt az oldatot vittük fel a megfelelően előkészített agarlemezre. Az inkubálás után észlelt növekedési zónák fényképe a 9. ábrán /64. oldal/ látható.

Amint az előzmények után várható is volt, ebben az esetben egy centrális növekedési zóna alakul ki, amelyet egy gátlási gyűrű övez, ez utóbbit pedig ismét egy növekedési gyűrű veszi körül.

Ezt a kísérletet különböző variációkban, sok esetben megismételtük és az eredmény lényegében véve mindig azonos volt. Kitűnt, hogy ez a hármas gyűrűszerű jelenség igen jól reprodukálható, elég széles koncentrációhatárok között. Ha a kísérletet úgy végezzük, hogy egy B₁₂-vitamin-oldathoz 15-20-szoros koncentrációban adunk hozzá kobalaminmonokarbonsavat, homogén növekedési zóna képződése faktorok hiányára, gyűrűk megjelenése pedig faktorok jelenlétére vall.

Az a tény, hogy a jelen pontban leírt kísérlet a várakozásnak megfelelő eredményt adott, megerősítette az egyes faktoroknak az E.coli 113-3-hoz való különböző intenzitású kötődésére vonatkozó feltételezéseinket, mégis szükségesnek látszott, hogy a kötődési viszonyokra vonatkozóan direkt adatokat is szerezzünk rádióaktív izotópokkal jelzett anyagokkal végzett kísérletekben, másrészt, hogy a diffúzió körülményeit is tisztázzuk.



B₁₂-faktorok "biokromatográfiája".

Felül: B₁₂-vitamin, kobalaminmonokarbonsav és III.faktor keveréke által létrehozott gyűrűszerű jelenség /kb. 2-szeres nagyítás/.

Alul: Egy tisztítatlan /"faktoros"/ B₁₂-vitamin-készítmény vizsgálata, balról jobbra emelkedő koncentrációju kobalaminmonokarbonsavval. A jobb szélén teljes gátlás. /1 µg B₁₂-vitamin + 5, 10, 20, 40 ill. 80 µg kobalaminmonokarbonsav/.

Az utóbbi célból megmértük a felhasznált faktorok, a B₁₂-vitamin és a kobalaminmonokarbonsav diffúziós együtthatóját 26 C°-on /a kísérletek leírását lásd a függelék 1. pontjában/. Kiderült, hogy a B₁₂-vitamin, a kobalaminmonokarbonsav és a III. faktor gyakorlatilag egyenlő sebességgel diffundál, a kobinamid pedig lényegesen gyorsabban. Ezért, ha a kísérleteket III. faktorral végezzük, nem lehet a gyűrűk képződését a diffúziós sebesség különbözőségével - tehát pusztán fizikai tényezőkkel megmagyarázni, hanem csakis biológiai tényezők bevonásával. Ami a rádióaktív izotópokkal jelzett anyagokkal végzett kísérleteket illeti, azokra részletesen kitérünk.

IV. A B₁₂-vitamin és egyes faktorok kötődése az E.coli 113-3 baktériumokhoz rádióaktív izotópokkal jelzett B₁₂-vitaminnal ill. kobinamiddal végzett kísérletek alapján.

Módszer: /14/ szerinti agartáptalajt felolvasztottunk, megfertőztük E.coli 113-3-mal és hozzáadtuk az egyes kísérleteknél feltüntetett adalékokat. Utána Petri-csészékbe agarlemezeket öntöttünk, ezeket 26 C°-on inkubáltuk 16 órán át, majd 2 cm átmérőjű dugófuróval kivágtuk az egyes kísérleteknél megadott számú agarkorongot /az agarlemez előzetes, külön feltüntetett kezelésével, vagy anélkül/. A kivágott agarkorongokat kémcsövekbe vittük át, összeolvasztottuk és az így előkészített minták rádióaktivitását

mértük a metodikai részben leírt módon.

1/.^A B₁₂-vitamin és a kobinamid kötődése a steril agar-
lemezhez.

20 ml steril /14/ szerinti agarhoz 0,08 μg $^{58}\text{CoB}_{12}$ -vitamin adtunk és Petri-csészébe agarlemezre öntöttünk. Az agarlemezről 10 korongot vágunk ki, ezeket vízzel, gyakori kevergetés közben 6 óra hosszat mostuk, majd a kimosott korongok rádióaktivitását mértük. - Ez nem különbözött szignifikánsan a háttértől, vagyis nullával volt egyenlő. Így arra az eredményre jutottunk, hogy a steril agar - a /14/ szerinti összetételben - nem köt meg számottevő mennyiségű B₁₂-vitamint, továbbá, hogy 6 órai mosás elegendő az eltávolításához.

Ugyanezt a kísérletet elvégeztük úgy is, hogy 2 μg biológiai aktivitást mutató ^{60}Co -kobinamidot adtunk 20 ml agartáptalajhoz. Kimosás után ebben az esetben sem találtunk mérhető mennyiségű rádióaktivitást az agarmintában, ami azt bizonyítja, hogy a steril agartáptalaj a kobinamidot sem köti meg.

2/.A B₁₂-vitamin megkötődése az E.coli 113-3-mal benőtt
agarlemezen.

Az 1/.pont alatt leírt módszert alkalmazva, de fertőzött agarlemezekkel dolgozva és azokat 16 órán át 26 C^o-on in-

kubálva, a 9. táblázatban összefoglalt eredményeket kaptuk.

9. táblázat.
=====

A B₁₂-vitamin kötődése az E.coli 113-3-mal benőtt agarle-
mezhez./20 ml agar egy 10 cm átmérőjű Petri-csészébe ki-
öntve - 16 órás inkubáció 26 C°-on /.

Adalék a fertőzött agarhoz	Kivágott korongok száma	Háttér imp./perc	Impulzus/perc a háttér le- vonása után
0,08 µg ⁵⁸ CoB ₁₂ -vitamin	10	137	1670

Ugyanaz, 6 óráig vízzel mosva	10	137	1697

2,0 µg ⁶⁰ CoB ₁₂ -vitamin	6	97	361

Ugyanaz, 6 óráig vízzel mosva	6	97	204

Ugyanaz 24 óráig vízzel mosva	6	97	198
=====			

A kísérlet azt mutatja, hogy a 0,08 µg B₁₂-vitamin, amelyet az agarlemezhez hozzáadtunk, teljes egészében megkötődik egy Petri-csészényi E.coli 113-3 agartenyészetben. Az a tény, hogy az egész rádióaktivitás az agarkorongokban marad, egy-

ben azt is bizonyítja, hogy a rádióaktivitást hordozó baktériumoknak legfeljebb elenyészően kis hányada mosódik ki az agar-állományból.

2 μg ^{60}Co -tal jelzett B_{12} -vitamint adva az 1 Petri-csészényi agarhoz, a tenyészet 1,13 μg B_{12} -vitamint kötött meg.

Ugyanezt a kísérletet elvégeztük úgy is, hogy 20 μg jelzett B_{12} -vitamint adtunk egy Petri-csészényi agartáptalajhoz. Ekkor a megkötött B_{12} -vitamin mennyisége 1,16 μg volt, olyan mennyiség, amely az előbbi kísérlet eredményével igen jól egyezett.

Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a megkötött B_{12} -vitamin-mennyiség azonos kísérleti körülmények között tág határok között független a jelenlevő vitamin-mennyiségtől, ellenben az agarban kifejlődött biomassza függvénye.

Ez a kísérlet is mutatja azonkívül, hogy a meg nem kötött B_{12} -vitamin 6 órai mosással csaknem kvantitatíve eltávolítható.

3/. ^{60}Co -tal jelzett kobinamid kötődése az E.coli 113-3-mal benőtt agarlemezen.

Az előző pontban leírt módszert alkalmazva a 10. táblázat-ban összefoglalt eredményeket kaptuk:

10.táblázat.

=====

A kobinamid kötődése az E.coli 113-3-mal benőtt agarlemez-
hez. /20 ml agar egy 10 cm átmérőjű Petri-csészébe kiönt-
ve, 16 órás inkubáció 26 C^o-on.

Adalék a fertőzött agarhoz	Kivágott Háttér korongok imp/perc száma	Impulzus/perc a háttér le- vonása után
-------------------------------	---	--

2 ug ⁶⁰ Co-kobinamid /látszólagos akti- vitás/	6	97	446
---	---	----	-----

Ugyanaz 6 óráig viz- zél mosva	6	97	76
-----------------------------------	---	----	----

Ugyanaz, 24 óráig viz- zél mosva	6	97	66
-------------------------------------	---	----	----

A kísérlet azt mutatja, hogy a kobinamid kimosódása itt is
6 óra alatt jórészt befejeződött.

24 órai mosás után 2 x 66/446 µg látszólagos biológiai akti-
bitásu kobinamid maradt vissza az E.coli 113-3 sejtekhez
kötve. Miután azonban /26/ szerint a látszólagos - agardiffu-
ziós módszerrel mért - aktivitás mintegy ötszöröse a súly
szerinti mennyiségnek, megállapíthatjuk, hogy súly szerint

számolva az egy Petri-csészényi E.coli 113-3 tenyészet ke-
reken 0,06 μ g kobinamidot köt meg, vagyis a hasonló körülmények közt megkötött B_{12} -vitamin mennyiségének körülbelül 1/20 részét.

4/.A kobinamid és a III.faktor hatása a rádióaktív izotóppal jelzett B_{12} -vitaminnak az E.coli 113-3-sejtekhez való kötődésére.

Az előző két pontban leírt módszert alkalmazva, a 11. táblázatban összefoglalt eredményeket kaptuk.

A táblázatban megadott eredményekből két következtetést vonhatunk le:

a/.A táblázat első négy sora azt mutatja, hogy 400-szoros mennyiségű látszólagos aktivitásu /súly szerint 80-szoros mennyiségű/ kobinamid jelenléte csak kb. 1/3 résszel csökkenti a megkötődő B_{12} -vitamin mennyiségét: ennyit szorít ki a sejtekből. Ebből az következik, hogy a B_{12} -vitamin sokkal intenzívebben kötődik a baktériumokhoz, mint a kobinamid.

b/.A táblázat 5-7. sora azt mutatja, hogy ha a rádióaktív izotóppal jelzett B_{12} -vitamint nem rádióaktív B_{12} -vitaminnal hígítjuk, a mosás után a sejtekben visszamaradó rádióaktivitás kisebb, mint ha azonos mennyiségű rádióaktív izotóppal jelzett B_{12} -vitamint ugyanolyan arányban egészítünk ki III.faktoral és ez hat a baktériumokra.

11. táblázat.

=====

A kobinamid és a III.faktor hatása a rádióaktív izotóppal
jelzett B₁₂-vitaminnak az E.coli 113-3 sejtekhez
való kötődésére.

Adalék a fertőzött agarhoz	Kivágott korongok száma	Háttér imp/perc	Impulzus/perc a hát- tér levonása után
20 µg B ₁₂ -vitamin + 0,05 µg <u>⁵⁸CoB₁₂-vitamin</u>	2	138	620
Ugyanaz, 6 órai mosás után	2	138	36
20 µg kobinamid /látszóla- gos aktivitás/ + 0,05µg <u>⁵⁸CoB₁₂-vitamin</u>	2	138	666
Ugyanaz, 6 órai mosás után	2	138	434
0,08 µg ⁵⁸ CoB ₁₂ -vitamin 6 órai mosás után	10	137	1697
0,08 µg ⁵⁸ CoB ₁₂ -vitamin + + 0,5 µg B ₁₂ -vitamin 6órai mosás után	10	152	1277
0,08 µg ⁵⁸ CoB ₁₂ -vitamin + + 0,5 µg III.faktor 6 órai mosás után	10	152	1446

=====

Az első esetben 25%-os a csökkenés, a másodikban csak 15%-os. Ez a kísérlet azt bizonyítja, hogy a III. faktor gyengébben kötődik a baktériumsejtekhez, mint a B_{12} -vitamin, vagyis az utóbbi nem teljesen úgy viselkedik ebben a kísérletben, mint a III. faktor.

Ez a kísérlet most már direkt bizonyítokat szolgáltat arra az agrdiffúziós kísérletekre alapozott feltevésre, hogy a kobinamid és a III. faktor gyengébben kötődik a baktériumokhoz, mint a B_{12} -vitamin.

5/. A kobalaminmonokarbonsav 50%-os gátlást előidéző koncentrációjának /50%-os inhibíciós indexének/ meghatározása rádióaktív izotóppal jelzett B_{12} -vitamin segítségével.

Az előző kísérletekben leírt technika alkalmasnak bizonyult arra is, hogy a kobalaminmonokarbonsav 50%-os gátlást előidéző inhibíciós indexét megállapítsuk a segítségével és ezzel az I/8 kísérlet eredményét ellenőrizzük.

Abból indultunk ki, hogy az agartáptalajon kifejlődő *E. coli* 113-3 tenyészet a biomasszájával arányos mennyiségű B_{12} -vitamint köt meg. Ha már most az egyes kísérletekben mindig azonos mennyiségű B_{12} -vitamint használunk fel, kobalaminmonokarbonsav alkalmazása nélkül, a megkötött rádióaktivitás arányos lesz a 100%-os növekedéssel, a fele pedig az 50%-os növekedéssel. Ha kobalaminmonokarbonsavat is adunk a táptalajhoz, a baktériumnövekedés és a megkötött rádióak-

tivitas csökken. Ha megszerkesztjük azt a görbét, amely a megkötött rádióaktivitást az alkalmazott kobalaminmonokarbonsav mennyiségének függvényében ábrázolja, e görbe és az 50%-os növekedésnek megfelelő megkötött rádióaktivitást ábrázoló egyenes /visszintes vonal/ metszéspontja adja azt a kobalaminmonokarbonsav mennyiséget, amely az adott B_{12} -vitamin-koncentráció mellett 50%-os gátlást eredményez.

Ennek az okfejtésnek a helyessége mellett szól Heinrich és munkatársai /40/ megállapítása, amely szerint a B_{12} -vitamin antagonistái nem a vitamin felvételét gátolják, hanem /ha nem igen nagy koncentrációkról van szó/ csak a metionin-szintézis egy lépését. - Igaz viszont, ezzel szemben, hogy Eridani és munkatársai /23/ szerint az antagonisták gátolják a B_{12} -vitamin felvételét a sejtekbe.

A vázolt kísérletet végrehajtottuk és az eredményeket a 11. táblázatban illetőleg 10. ábrán /74. oldal/ mutatjuk be.

A B_{12} -vitamin koncentrációjához viszonyított 6-szoros kobalaminmonokarbonsav-koncentráció mintegy 25%-kal, a 60-szoros koncentráció pedig kb. 60%-kal csökkenti a B_{12} -vitamin megkötését. A grafikon szerint az 50%-os gátlást a 36-szoros kobalaminmonokarbonsav-koncentráció idézi elő. Ez az érték meglepően jól egyezik az I/8. kísérletben kapott 35-ös inhibíciós indexszel, ami egyben arra mutat, hogy a kísérlet alapjául szolgáló feltételezés helyes volt.

12.táblázat.

=====

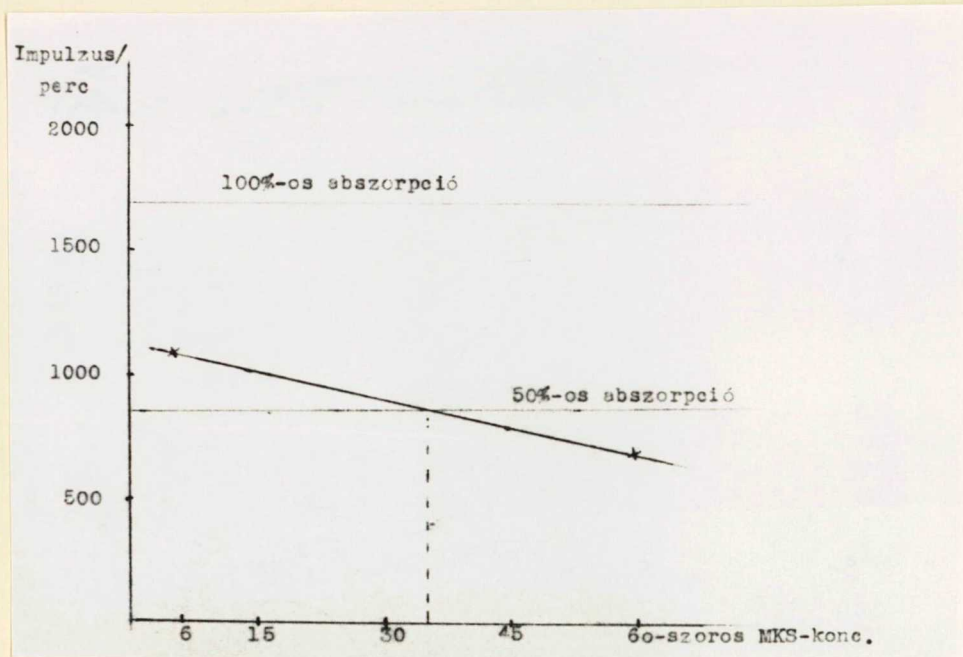
Az 50%-os gátlást kiváltó kobalaminmonokarbonsav-koncent-
ráció meghatározása rádióaktív izotóp technika alkalmazásával.

Adalék a fertőzött agarhoz	Kivágott korongok száma	Háttér imp/perc	Impulzus/perc a háttér le- vonása után
0,08 μg $^{58}\text{CoB}_{12}$ -vitamin 6 órai mosás után	10	137	1697
0,08 μg $^{58}\text{CoB}_{12}$ -vitamin + 0,5 μg kobalaminmono- karbonsav	10	137	1093
0,08 μg $^{58}\text{CoB}_{12}$ -vitamin + 5,0 μg kobalaminmono- karbonsav	10	137	698

=====

10. ábra.

=====



A kobalaminmonokarbonsav 50%-os gátlási indexének meghatározása agarlemezen, izotóp-technikával.

A grafikon szerint kb. 36-szoros kobalaminmonokarbonsav-koncentrációnál kapunk 50%-os gátlást.

6/. Az E.coli 113-3 által megkötött jelzett B₁₂-vitamin kicserélődése B₁₂-vitaminra, III.faktorra ill.kobalamin-monokarbonsavra.

A kérdés vizsgálatára ugyanazt a módszert alkalmaztuk, mint az előző kísérletekben.- Agarlemezt öntöttünk /14/ szerint, amelyhez előzőleg 2 µg ⁶⁰CoB₁₂-vitamint adtunk. A lemezt 16 órán át inkubáltuk 26 C°-on, majd nagyszámu korongot vágunk ki belőle. A korongokat az egyenletes elosztás biztosítása végett összekevertük, majd hatos csoportokba osztottuk. Az egyes csoportokat különböző kezelésnek vettük alá, majd megmértük a rádióaktivitásukat. A kísérlet részleteit a 13. táblázatban foglaltuk össze.

A táblázatból az olvasható ki, hogy a vízzel, III.faktorrall ill.kobalaminmonokarbonsavval való kimosás után visszamaradó rádióaktivitás, vagyis B₁₂-vitaminmennyiség azonos. A B₁₂-vitaminnal való mosás esetén a visszamaradt rádióaktivitás mintegy 5-6%-kal alacsonyabb ugyan, ez azonban az adott körülmények közt nem tekinthető szignifikáns eltérésnek.

Azt a következtetést vonhatjuk le a kísérletből, hogy az E.coli 113-3 baktériumok által megkötött B₁₂-vitamin-molekulák nem cserélődnek ki számottevő mértékben sem III.-faktor-, sem kobalaminmonokarbonsav-molekulákkal, talán csekély mértékben kicserélődnek B₁₂-vitamin-molekulákkal.

13.táblázat.

=====

Az E.coli 113-3 által megkötött jelzett B₁₂-vitamin ki-
cserélődése B₁₂-vitaminra, III.faktorra ill.kobal-
aminmonokarbonsavra.

Adalék a megfertőzött Kivágott Háttér agarhoz korongok imp/perc száma	Impulzus/perc a háttér le- vonása után
---	--

2 µg ⁶⁰CoB₁₂-vitamin

kimosás nélkül	6	97	661
----------------	---	----	-----

Ugyanaz 6 órai mosás
után

6	97	320
---	----	-----

Ugyanaz 6 óráig mosva
2 µg/ml-es B₁₂-vita-
min-oldattal

6	97	304
---	----	-----

Ugyanaz 6 óráig mosva
2 µg/ml-es III.faktor-
oldattal

6	97	324
---	----	-----

Ugyanaz 6 óráig mosva
2 µg/ml-es kobalamin-
monokarbonsav-oldattal

6	97	325
---	----	-----

=====

Ez összhangban van azzal az ismert ténnyel, hogy a B_{12} -vitamin erősen kötődik a mikroorganizmusokhoz. Vizzel egyáltalában nem mosható ki belőlük és oldatba vitele olyan erélyes beavatkozásokat igényel, mint pl. a főzés, alkoholos, acetonos kezelés stb., amely a sejteket előli /99, 101/.

V.A kobalaminmonokarbonsav inhibíciós indexe kobinamidra és III.faktorra vonatkoztatva E.L.Smith módszere szerint vizsgálva.

A III.fejezet 2.pontjában leírtuk a kobalaminmonokarbonsavnak kobinamidra ill. III.faktorra vonatkoztatott inhibíciós indexének a meghatározását. E szerint a kísérlet szerint a teljes inhibíció indexe mindkét esetben 60-nak adódott.

A későbbi vizsgálatok azonban kimutatták, hogy e faktorok gyengébben kötődnek az E.coli 113-3 sejtekhez, mint a B_{12} -vitamin, másrészt a kobinamid esetében az is bebizonyosodott, hogy gyorsabban diffundál, mint a kobalaminmonokarbonsav és ezért alapos kételyeink támadtak a módszer helyesége, illetőleg a 60-as inhibíciós index realitása iránt.

Ennélfogva szükségesnek látszott az inhibíciós indexek más módszerrel való ellenőrzése. A lehetőségeket és nehézségeket mérlegelve E.L.Smith módszerére /77, 78/ esett a választásunk, bizonyos számításokkal kiegészítve, amelyeket Vesterdal /89/ ill. Humphrey és Lightbown /45/ képletei

szerint végeztünk.

1/.A kobalaminmonokarbonsav III.faktorra vonatkoztatott
inhibíciós indexe.

E.L.Smith módszerét az I.fejezet 5.pontjában ismertettük és a 2.ábrán /33.oldal/ mutattuk be.Ez a módszer alapjában véve kvalitatív: próbálgatás révén kvantitatívvá tehető,ha az aktív anyagból ill. az antagonistájából különböző mennyiségeket viszünk fel az agarlemezre és próbálgatás útján találunk egy olyan koncentrációrányt,amely mellett a gátlási vonal pontosan a két lyukat összekötő távolság felezőpontjára esik: ez lesz az inhibíciós indexnek megfelelő arány.- Ennek azonban még az is előfeltétele,hogy a két anyag egyenlő sebességgel diffundáljon, vagyis diffúziós állandójuk azonos körülmények közt egyenlő legyen.Ez a követelmény a III.faktor-kobalaminmonokarbonsav viszonylatban ki van elégítve /lásd a metodikai részt - 23.oldalon/.

A feladat tehát az volt,hogy a próbálgatások kiküszöbölésével,számítás útján állapítsuk meg az inhibíciós indexet.

Két párhuzamos kísérletet végeztünk.Mindkettőben 62,5 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációju kobalaminmonokarbonsav-oldatot ill. 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációju III.faktor-oldatot használtunk.A gátlási vonal távolsága a két lyuk középpontjától mérve a következő volt:

$$\begin{array}{ll} R_{\text{MKS}} = 1,15 \text{ cm} & R_{\text{IIIF}} = 0,91 \text{ cm} \\ & 0,97 \text{ cm} \quad \quad \quad 0,71 \text{ cm} \end{array}$$

ahol

R_{MKS} jelenti a kobalaminmonokarbonsavat tartalmazó lyuk középpontjától mért távolságot

R_{IIIF} jelenti a III.faktort tartalmazó lyuk középpontjától mért távolságot.

A számítást,miután kissé hosszadalmas,nem itt,hanem a függelék 2.pontjában ismertetjük,hogy ne zavarja előadásunk folyamatosságát.Itt csak a végeredményt közöljük.

A kobalaminmonokarbonsav inhibíciós indexe a III.faktorra vonatkoztatva egyik kísérletben 8,1,a másikban 12,0,középérték: 10,0.

Meg kell jegyezni,hogy a számítás természetéből következően a zóna szélének leolvasásánál elkövetett 0,1 mm-es hiba is lényeges eltérést okoz az eredményben.Innen származik a két párhuzamos mérés eredménye közti elég nagy eltérés.

Emlékeztetni kell itt arra,hogy a kobalaminmonokarbonsav B_{12} -vitaminra vonatkoztatott inhibíciós indexét ugyancsak E.L.Smith /próbálgatásos/ eljárása alapján kb.50-nek találtuk,tehát ötször nagyobbak.Emellett a két párhuzamos mérésünk közti eltérés eltörpül.

2/.A kobalaminmonokarbonsav kobinamidra vonatkoztatott
inhibíciós indexe.

Míg az előző pontban, a kobalaminmonokarbonsav és III.faktor antagonizmusának vizsgálatánál a próbálgatásnak számítás-
sal való helyettesítése csak arra való, hogy a metodikát
szilárdabb alapokra helyezzük, a kobalaminmonokarbonsav és
kobinamid viszonylatában a számítás bevezetése okvetlenül
szükséges. Ez a két vegyület ugyanis különböző sebességgel
diffundál és ezért E.L.Smith próbálgatásos módszere szük-
séggépen hibás eredményt adna. Itt számítással kell meg-
határozni, hogy a gátlási vonal mentén milyen koncentráció-
arányok alakulnak ki.

Ebben az esetben, épp úgy, mint az előző pontban, a kísér-
leti adatok és a végeredmény megadására szorítkozunk e
helyen, míg a számítást a függelékben ismertetjük.

/14/ szerinti agarlemezekben, egymás közelében két lyukat
fúrtunk és ezek egyikébe 0,136 µg/ml /agarlemezen mért
látszólagos aktivitásu/ kobinamid-oldatot, a másikba pedig
ugyanolyan térfogatu, különböző koncentrációju kobalamin-
monokarbonsav-oldatokat mértünk be. Tipikus torzult növe-
kedési zónákat kaptunk, feltűnően éles határral a torzult
részen. A számszerű adatokat a 14.táblázat tartalmazza.

14.táblázat.

A gátlási vonal távolsága a felviteli lyukak középpontjából E.L.Smith nyomán végzett kísérletben, 0,136 µg/ml agarlemezen mért látszólagos aktivitásu kobinamid-oldat és különböző koncentrációju kobalaminmonokarbon-sav-oldatok felvitele esetén.

Kobalaminmonokarbon-sav-koncentráció, µg/ml	Kobalaminmonokarbon-sav/kobinamid-konc.	R _{Kob.}	R _{MKS.}
1,0	7,4	0,83	0,875
4,0	29,6	0,75	0,910
16,0	114,2	0,72	0,910
64,0	457,0	0,69	0,940

Jelmagyarázat:

R_{Kob.} = a gátlási vonal távolsága a kobinamidot tartalmazó lyuk középpontjától.

R_{MKS.} = a gátlási vonal távolsága a kobalaminmonokarbon-savat tartalmazó lyuk középpontjától.

A számítást,épp úgy,mint az előző pontban,itt is mellőzzük és a függelékben ismertetjük.Csupán a végeredményt közöljük e helyen,amely szerint:

A kobalaminmonokarbon-sav kobinamidra vonatkoztatott 100%-os inhibíciós indexe a 14.táblázat legfelső sora alapján

/ahol a higitási viszonyok a legkedvezőbbeknek bizonyultak a számításához/: 4,0.

Ez az inhibíciós index a biológiai /agarlemezen mért/ aktivitásra vonatkozik. Miután a súly szerint számított inhibíciós érték kb. 5-ször nagyobb, kereken 20,0-nak vehető.

A számítás ellenőrzésére 2 µg kobinamidot /agarlemezen mért biológiai aktivitás alapján/ és 20, 10, 5 ill. 2,5 µg kobalaminmonokarbonsavat kevertünk 20 ml /14/ szerinti agarhoz és Petri-csészékbe lemezeket öntöttünk.- Csak a 2,5 µg kobalaminmonokarbonsavat tartalmazó lemezen volt kifejezett növekedés észlelhető inkubálás után. Az 5 µg kobalaminmonokarbonsavat tartalmazó lemezen gyenge fátyolszerű növekedést észleltünk, míg a magasabb kobalaminmonokarbonsav-koncentrációknál / 5, ill. 10-szeres a jelenlevő kobinamidhoz képest/ semmivéle növekedés sem látszott.

VI.A kobalaminmonokarbonsav gyakorlati alkalmazásának néhány lehetősége.

1/.A kobalaminmonokarbonsav farmakológiai és klinikai vizsgálatai azt mutatták, hogy ez a vegyület állatkísérletekben lassítja a vörös vörsejtek képzését, klinikai kísérletekben pedig átmeneti remissziókat vált ki mieloid leukémiánál és viszonylag tartós vörösvérsejt-szám csökkenést polycitaemia vera esetén /15,16,53/. A farmakológiai és klinikai vizsgálatokra nem térek ki részletesen, mert nem tartoznak szorosan dolgozatom tárgyához.

2/.A kobalaminmonokarbonsav kiindulási anyagként szolgál különböző B₁₂-antagonista hatású származékok előállításához. - Ilyenek a metilamid, etilamid, anilid stb., amelyekről E.L.Smith ad részletes áttekintést /81/. Ezekkel szintén nem kívánok külön foglalkozni, csak annyit szeretnék megjegyezni, hogy az ilyen és hasonló származékok kutatásának előfeltétele kellő mennyiségű és tisztaságú kobalaminmonokarbonsav előállítása.

Ezzel szemben kissé részletesebben ki szeretnék térni azokra az alkalmazási lehetőségekre, amelyek a jelen dolgozatban foglalt kísérletekkel kapcsolatosak, illetőleg azokból következnek. Ilyenek:

3/.Metionin kimutatása B₁₂-vitamin jelenlétében.

A metionin mikrobiológiai meghatározására számos módszert javasoltak különböző teszt-organizmusok felhasználásával. Így pl Lactobacillus arabinosus 17-5-tel /68/, Lactobacillus delbrueckii-vel /35/, Lactobacillus fermentum-mal /5/, Leuconostoc citrovorummal /83/, Leuconostoc mesenteroides-szel /5,68,62,83/, Streptococcus faecalis-szal /62,68/ és Clostridium perfringens-szel /7/.

Az említett módszerek mind nehézkesek annyiban, hogy igen bonyolult összetételű táptalajokra van szükség: legalább 25-féle, ~~de~~^{sok} esetekben több, mint 30-féle komponensből kell a táptalajt összeállítani, mikor is sok nehezen beszerezhető aminosavra, vitaminra stb. van szükség.

Ezzel szemben a kobalaminmonokarbonsav felhasználása, mint alább látni fogjuk, lehetővé teszi a metionin gyors és egyszerű kimutatását ill. meghatározását E.coli 113-3-mal, mint teszt-organizmussal, akár agardiffúziós, akár turbidimetriás módszerrel olyan egyszerű táptalajon, amelyben maga a kobalaminmonokarbonsav az egyetlen nehezen hozzáférhető alkatrész.

Már előzőleg kimutatták, hogy a B₁₂-vitamin-antagonisták az E.coli 113-3-nál gátolják a metionin szintézisét és az is megállapítást nyert, hogy a B₁₂-vitamin alkanolaminanalógjai erősen antagonizálják ugyan a B₁₂-vitamint, de

nem gátolják az E.coli 113-3 fejlődését metionin jelenlétében /40/.

Mi is azt találtuk vizsgálataink során, hogy a kobalaminmonokarbonsav nem antagonizálja a metionin növesztő hatását az E.coli 113-3 tenyészetekben.

Petri-csészékbe 20-20 ml /14/ szerinti agart mértünk, amelyet előzőleg megfertőztünk E.coli 113-3-mal és különböző mennyiségű metionint adtunk hozzá.

A megdermedt agarlemezekbe 4-4 lyukat fúrtunk és ezekbe különböző koncentrációju kobalaminmonokarbonsav-oldatokat töltöttünk: 640, 160, 40 ill 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációju oldatokat.

Ellenőrzésképen standard lemezeket is készítettünk /14/ szerint, ezeket leöntöttük 0,001 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációju B_{12} -vitamin-oldattal, az oldatot 30 másodperc múlva leöntöttük és a lemezeket a továbbiakban ugyanugy kezeltük, mint a metioninos agarlemezeket. Ezzel a kezeléssel elértük, hogy ezek a lemezek B_{12} -vitamin-nyomokat tartalmaztak.

A kobalaminmonokarbonsav oldatok bemérése után az agarlemezeket 26°C -on inkubáltuk, majd az eredményt 16 óra múlva leolvastuk. Az eredményeket a 15. táblázatban foglaljuk össze.

15.táblázat.

Kobalaminmonokarbonsav-oldatok által kiváltott gátlás
dl-metionint ill. B₁₂-vitamint tartalmazó, E.coli 113-3-
mal beoltott agarlemezeken.

Kobalaminmonokar-	Adalék az agarlemez állományában						
bonsav-oldat kon-	dl-metionin /µg/ml						B ₁₂ -vitamin-
centrációja, µg/ml	500	100	25	5	1	0,2	nyomok
640	---- gátlás nincs ----						22 mm-es gátlási zóna
160			"	"			20 " "
40			"	"			18,5" "
10			"	"			17 " "

A kísérlet azt mutatja, hogy a kobalaminmonokarbonsav nem gátolja a metionin növesztő hatását az E.coli 113-3 törzsrre. Ebben a tekintetben tehát különbség van a B₁₂-vitamin és a metionin növesztő hatása közt és ez a különbség analitikai célokra is felhasználható. Lehetővé teszi ugyanis metionin kimutatását B₁₂-vitamin mellett igen kis mennyiségekben /kísérletünkben 0,2 µg/ml dl metionin = 0,1 µg/ml l-metionin még kimutatható volt./

A metioninnak ezt a kimutatási lehetőségét B₁₂-vitamin mellett egyebek közt sikerrel használtam fel a következő probléma megoldására:

Egy régebbi közleményemben /73/ a B₁₂-vitaminnal kiváltott növekedési zónák mechanizmusának kérdésével foglalkoztam.- Megállapítást nyert ezzel kapcsolatban, hogy nagyobb vitaminkoncentrációknak az agarlemezre való felvitele esetén kialakul egy elsődleges növekedési zóna, majd ekörül egy ugynevezett "másodlagos" zóna.- Felvetődött a kérdés, hogy ezt a másodlagos zónát a továbbdiffundáló B₁₂-vitamin hozza-e létre, vagy esetleg a baktériumokból felszabaduló metionin?

A kérdés megválaszolása végett folyékony táptalajon, főlős B₁₂-vitamin jelenlétében tenyésztettünk E.coli 113-3 baktériumokat. A tenyészet szűrletét különböző inkubációs idők után /14/ szerinti agarlemezre vittük, amely olyan mennyiségű kobalaminmonokarbonsavat tartalmazott, amely a jelenlevő B₁₂-vitamin hatását biztosan gátolta.- Egy esetben sem észleltünk növekedést. Ugyanezt a baktériumszűrletet metionin-nyomokkal kiegészítve növekedést figyeltünk meg.- Így igen egyszerű módszerrel sikerült választ kapni erre a problémára, amelynek eldöntése más eszközökkel lényegesen bonyolultabb lett volna: a másodlagos növekedési zónákat nem metionin okozza.

4/.A B₁₂-vitamin-faktorok "biokromatográfiája".

A III/3.kísérletben láttuk, hogy ha B₁₂-vitamint, kb. 20 vagy 10-szeres mennyiségű kobalaminmonokarbonsavat és bizonyos

mennyiségű III.faktort vagy kobinamidot összekeverünk és a keveréket visszük fel a /14/ szerinti agarlemezre, hármas gyűrű keletkezik, amely egy központi növekedési zónából, egy gátlási gyűrűből és egy külső növekedési gyűrűből áll.

Miután a gátlási gyűrű csakis a kobalaminmonokarbonsavtól származhat, csak azt kellett eldönteni, hogy melyik anyagtól származik a belső és melyiktől a külső növekedési zóna.

Erre a kérdésre a III.pontban leírt kísérletek egyértelmű választ adtak: a belső zóna a B₁₂-vitaminnak, a külső pedig a III.faktornak ill. a kobinamidnak tulajdonítható. E kísérleteket megerősítették a rádióaktív izotóppal jelzett B₁₂-vitaminnal ill. kobinamiddal végzett kísérletek, amelyek azt mutatták, hogy a B₁₂-vitamin sokkal erősebben kötődik a baktériumokhoz, mint a vizsgált faktorok.

Felmerült olyan ellenvetés is, amely szerint a gyűrűszerű jelenség az egyes anyagok különböző diffúziós viszonyainak a következménye. - Nos, vizsgálataink azt mutatták, hogy - legalábbis a III.faktor esetén - nincs különbség a három összekevert anyag diffúziós állandója közt, vagyis egyformán diffundálnak a steril agarban. Ha már most nem egyformán diffundálnak a megfertőzött agaron, ez csak azzal magyarázható, hogy nem egyformán viselkednek az E.coli 113-3 baktériumokkal szemben. A baktériumok szelektíven kötik meg a három anyagot, legmohóbban a B₁₂-vitamint abszorbeálják, kevésbé intenzíven a kobalaminmonokarbonsavat és még ke-

vésbé intenzíven a vizsgált faktorokat.

A gyűrűszerű jelenség kifejlődése a három anyag szelektív szétválasztását jelenti. A szétválasztásnak ez a módja nagyon hasonlít az adszorpciós kromatográfiához, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben a megkötődés nem élettelen molekulákon, hanem élő baktériumokon történik és nem egyszerű adszorpcióról, hanem abszorpcióról - felzivódásról van szó.

Miután itt a baktériumok aktiv élettevékenysége áll előtérben, ezt a folyamatot a már említett dolgozatban /75/, ahol e jelenséget először leírtam, "biokromatográfiának" neveztem.

Ez a "biokromatográfia" a gyakorlatban felhasználható a B₁₂-vitamin-készítményekben jelenlevő esetleges faktor-szennyeződések kimutatására. - Nem kell egyebet tenni, mint a vizsgálandó anyag oldatához a becsült B₁₂-vitamin-mennyiség 15-20-szorosának megfelelő kobalaminmonokarbonsav-mennyiséget hozzátenni és a keveréket megfelelő hígításban a /14/ szerinti agarlemezre felvinni. Gyűrűk jelenléte faktorokra vall - homogén zóna a készítmény tisztaságára utal.

Ez a módszer a szokásos vizsgálati eljárásokkal összehasonlítva - gondolok a papirkromatográfiára, papirlelektroforézisre stb. - sokkal egyszerűbb, legalábbis olyan labo-

ratóriumban, amely mikrobiológiai munkára van berendezve, mert minden különösebb laboratóriumi felszerelés nélkül elvégezhető.

Amikor ennek a módszernek analitikai célokra való felhasználását javasoljuk, nem a gyógyszerkönyvi tisztaságu B₁₂-vitamin-készítményekre gondolunk, hiszen ezeket a gyógyszerkönyvek előírásai szerint, spektrofotométerrel kell vizsgálni /8/.

A javasolt vizsgálat elsősorban az állattakarmányozási célokat szolgáló B₁₂-vitamin-készítmények ellenőrzésére alkalmas. ⁴Udvalevő ugyanis, hogy erre a célra igen gyakran faktorokkal szennyezett, esetleg tisztán faktorokból álló készítményeket hoznak forgalomba. Ezeknek az E.coli 113-3, esetleg a Lactobacillus leichmanii törzsszel végzett szokványos biológiai tesztekben erős növesztő hatásuk lehet, a háziállatokra való kedvező hatásuk azonban legalábbis kétséges /9,10/. A javasolt módszer lehetővé teszi, hogy olyan nagyobb felhasználók, mint az állami gazdaságok, vagy a megyei mezőgazdasági felügyelőségek stb. - vagyis olyan szervek, amelyek laboratóriummal rendelkeznek, de spektrofotométerrel nem, maguk megvizsgálhassák a B₁₂-vitamin-tartalmu adalékanyagokat és leleplezhessék az esetleges hamisításokat. Ilyen értelemben a javasolt módszernek igen nagy jelentősége lehet.

5/.A B₁₂-vitamin-faktorok biológiai értékének vizsgálata.

A természetes B₁₂-vitamin-faktorok biológiai vizsgálata azért bir nagy jelentőséggel, mert e faktorok tekintélyes mennyiségben keletkeznek melléktermékként a B₁₂-vitamin nagyüzemi gyártása során. A faktorok többségéről bebizonyosodott, hogy csak igen kis mértékben, vagy csak bizonyos organizmusokban képesek helyettesíteni a valódi B₁₂-vitamint. Kivételt képez pl. a III. faktor, amely igen tekintélyes mennyiségben termelődik a B₁₂-vitamin mellett a metanobakteres fermentációnál és ezért értékesítéséhez is komoly anyagi érdekek fűződnek.

Német szerzők /29,30,31/ tisztázták a III. faktor szerkezetét és ugyanakkor megállapították, hogy ez a vegyület, amely kémialilag rendkívül közel áll a B₁₂-vitaminhoz, annak biológiailag teljes értékű helyettesítője. E közlemények alapján a III. faktor Magyarországon is forgalomba került, mint embergyógyászati készítmény is, Trifavit néven, annak ellenére, hogy megjelent az irodalomban néhány olyan közlemény is, amely ezt a biológiai egyenértékűséget kétségbe vonta. Kimutatták például /10,28/, hogy a III. faktor hatása csirkékre sokkal kisebb, mint azonos dózis B₁₂-vitaminé. - E. L. Smith /81/ a /2/ közlemény nyomán arról számol be, hogy a III. faktor Ochromonas malhamensis-re gyakorolt növesztő hatása ugyan 50%-a a B₁₂-vitamin hasonló hatásának, de csak az utóbbi vegyület hatásának 4%-át éri el a III. faktor hatása az O. malhamensis propionát-

oxidációs képességére.

Most a kobalaminmonokarbonsav vizsgálata során sikerült kimutatni, hogy ez utóbbi sokkal erősebben antagonizálja a III.faktort, mint a B_{12} -vitamint és ezzel kapcsolatban azt is, hogy a III.faktor gyengébben kötődik az E.coli 113-3 sejtekhez, mint a B_{12} -vitamin.

A csirkék súlynövekedését célzó kísérleteknél igen nagy a hibahatár, eredményüket tehát esetleg kétkedéssel lehet fogadni. Az O.malhamensis vizsgálatával kapcsolatban lehet arra hivatkozni, hogy a növekedést serkentő hatás az elsődleges és azzal a III.faktor is rendelkezik, míg a propionát-oxidáció csak másodlagos jelentőségű funkció.

Természetesen a kobalaminmonokarbonsavval szembeni eltérő viselkedés, valamint az E.coli 113-3 baktériumokhoz való gyengébb kötődés erőssége sem döntő jelentőségű, de mindenestre objektíven megállapítható és elég pontosan mérhető biológiai funkciók, amelyekben a III.faktor kétségtelenül nagy hátrányban van a B_{12} -vitaminnal szemben. Két olyan funkció, ahol a III.faktor nem teljes értékű helyettesítője a B_{12} -vitaminnak.

A természetes B_{12} -vitamin-faktorok mellett egész sor mesterséges B_{12} -vitamin-származékot is előállítottak szintetikus vagy bioszintetikus úton, abban a reményben, hogy a természetes B_{12} -vitaminnál hatásosabb vegyületet sikerül

köztük találni.- Talán ezeknél a vegyületeknél is érdemes volna megvizsgálni a kobalaminmonokarbonsav antagonistahatását, mert ez a teszt is hozzájárul ahhoz, hogy teljes képet kapjunk a kérdéses vegyület biológiai aktivitásáról.

VII. Az eredmények megbeszélése.

A kísérleti részben az egyes kísérletek leírása után többnyire mindjárt kommentárokat is fűztünk az ismertetett tényekhez. Ezért ebben a fejezetben csak néhány olyan általánosabb jellegű kérdéssel foglalkozunk, amelyeket ott nem érintettünk.

1/. A kobalaminmonokarbonsav, mint természetes antimetabolit.

A bevezetésben idézett dolgozatokban /54, 55/, amelyekben a kobalaminmonokarbonsavnak, mint természetesen képződő antimetabolitnak a felfedezését leírtuk, elkövettük azt a hibát, hogy tévesen általánosítottunk. Miután akkor más Propionibacteriummal még nem volt dolgunk és az egyetlen birtokomban levő törzs antagonistafaktort termelt, arra a téves álláspontra helyezkedtem, hogy a kobalaminmonokarbonsav termelése a Propionibacterium shermanii egy jellemző tulajdonsága.

Azóta sok különféle Propionibacterium-törzsszel volt dolgom /P. shermanii, P. freudenreichii, P. rubrum, P. petersenii, P. technicum stb./ de ezeknél egy esetben sem sikerült számottevő kobalaminmonokarbonsav-termelést kimutatni. Antago-

nista jellegű faktort a fermentlében ill. a vitamin-koncentrátumokban legfeljebb halvány nyomokban lehetett találni és feltehető, hogy ezek a nyomok bomlástermékek voltak.

Részben természetes szelekcióval, részben UV-besugárzással való kezelés után több ezer izolált Propionibacterium-telepet vizsgáltam meg B₁₂-vitamintermelés szempontjából és azt találtam, hogy a kobalaminmonokarbonsav-termelő törzs utódai minden esetben termeltek kobalaminmonokarbonsavat, a kobalaminmonokarbonsavat nem termelő többi törzs utódai pedig egy esetben sem termelték ezt az antagonista jellegű vegyületet.

Ugy látszik tehát, hogy a kobalaminmonokarbonsav-termelés stabil tulajdonsága egyes adott törzseknek - olyan tulajdonság, amelyet egy esetben sem sikerült kiküszöbölni, sem más törzseknél, mint új tulajdonságokat felfedezni. Az a tény, hogy a külföldi irodalom csak egy helyen tesz említést számottevő mennyiségű természetesen előforduló kobalaminmonokarbonsavról /6/, ugyancsak azt látszik bizonyítani, hogy itt egyes adott, de ritkán előforduló törzsek kivételes sajátosságáról van szó.

Lehet, hogy genetikai módszerekkel /DNS-átvitel/ sikerülne ezt a tulajdonságot egyik törzsről a másikra átvinni, ilyen kísérleteket azonban nem végeztem és elvégzésükre nincsenek is meg az objektív adottságaim.

Sok száz sugárgomba-törzset is megvizsgáltam B₁₂-vitamin-termelés szempontjából, de számottevő kobalaminmonokarbonsav-termelést ezeknél sem észleltem.

Ha tehát felvetődik a kérdés, hogy milyen helyet is foglal el a kobalaminmonokarbonsav a B₁₂-vitamin bioszintézisének a láncolatában, mai ismereteink szerint azt válaszolhatjuk, hogy nem a B₁₂-vitamin hidrolizis-terméke - hiszen ezt bebizonyítottuk régebbi kísérleteinkben /55/. Az sem valószínű, hogy a B₁₂-vitamin bioszintézisének közbülső terméke, mint ahogy Juillard feltételezi /50/, mert hiszen akkor feltehetően nemcsak egyes kivételes törzseknél volna megtalálható, hanem minden B₁₂-vitamint termelő törzsnél. - Ha azonban mégis a B₁₂-vitamin bioszintézisének közbülső terméke a kobalaminmonokarbonsav, nyitva marad a kérdés, miért van, hogy a szóbjövő organizmusok döntő többségénél gyorsan átalakul B₁₂-vitaminná, egyes kivételes esetekben viszont tekintélyes - kb 20%-ot kitevő - mennyiségben felhalmozódik a B₁₂-vitamin mellett.

A legvalószínűbb, hogy a kobalaminmonokarbonsav felhalmozódása a mi Propionibacterium shermanii-törzsünkénél a B₁₂-vitamin bioszintézisének egy abnormális mellékhatása: hibás szintézis eredménye.

2/.Az inhibíciós index fogalmának szabatos meghatározása.

A kísérleti rész I.fejezetében a kobalaminmonokarbonsav inhibíciós indexének különböző meghatározási módjait ismertettük és erre a problémára később is visszatértünk. Az inhibíciós index meghatározható szilárd és folyékony táptalajon, beszélhetünk 100%-os illetőleg 50%-os gátlásnak megfelelő inhibíciós indexről stb. Függ az inhibíciós index értéke a kobalaminmonokarbonsav és a B₁₂-vitamin alkalmazásának relatív elsőbbségétől is és ennek megfelelően a különböző kísérletekben más és más eredményeket kaptunk.

Emellett az is feltűnő, hogy a leírt kísérletekben az inhibíciós index /agartáptalajon, 100%-os gátlásra vonatkoztatva/ 40 körül van - ugyanakkor pedig E.L.Smith 60-80-100-szoros inhibíciós indexről ír /81/, Ford /27/ 330-as 50%-os, Heinrich és Gabbe /41/ pedig 110-es 50%-os gátlási indexről ad számot.

Ezeket a különbségeket - és főleg azt, hogy mi találtuk a legkisebb gátlási indexet - eleinte azzal magyaráztuk, hogy az általunk előállított antagonisták természetes eredetű és ennél fogva talán tisztább, mint a mesterségesen előállított készítmények. Később azonban, amikor mi magunk is hidrolízis révén előállított kobalaminmonokarbonsav-készítménnyel kezdtünk dolgozni és változatlanul 40-es

inhibíciós indexet kaptunk, ez az ellenvetés esete. Felmerülhetett elméletileg az a lehetőség, hogy a külföldi szerzők kevésbé tiszta anyaggal dolgoztak, mint mi; ez a feltételezés azonban szerfölött valószínűtlenül hangzik azok számára, akik ismerik E.L. Smith és a többi idézett szerző munkásságát.

A kérdés hosszú ideig megválaszolatlanul maradt tehát és csak az a felismerés vetett rá ismét új világot, hogy a B_{12} -vitamin és a kobalaminmonokarbonsav hatása nagyban függ a beadás elsőbbségétől. Figyelembe kell ugyanis venni, hogy a teszt-organizmusok, amelyeket az inhibíciós index meghatározására használunk, szükségképpen tartalmazznak valamennyi B_{12} -vitamint, mert különben nem lennének tenyésztethetők. Már most a bennük levő B_{12} -vitamin mennyisége is nagy mértékben befolyásolhatja az inhibíciós indexet. A teszt-organizmus tenyésztése pl. az inhibíciós index meghatározási metodikájának olyan jelentéktelennek látszó részletkérdése, amelyre a szerzők általában nem térnek ki dolgozataikban, holott - mint kiderült - lényeges hatással lehet az eredményre.

Éppen ezért felvetődik a kérdés: nem volna-e helyes az inhibíciós index fogalmát szabatosan körülhatárolni, a mérési módszert /vagy módszereket/ standardizálni és közben figyelemmel lenni még az olyan jelentéktelennek látszó részletkérdésekre is, mint amilyen a teszt-organizmusok

előzetes elszaporítása.

Az inhibíciós index fogalma elvileg teljesen világos, egyértelmű. A nem egységes metodika azonban eltérésekre vezet az eredményekben. - Arra, hogy ezek az eltérések milyen mérvűek lehetnek, a kobalaminmonokarbonsavnak az Ochromonas malhamensis-re gyakorolt antagonistá hatásával kapcsolatos vizsgálatokra hivatkozunk.

Egyes szerzők szerint a kobalaminmonokarbonsavnak növekedést serkentő hatása van az O. malhamensis-re /3/, mások szerint gátolja a fejlődést /27, 38/. Mi a magunk részéről nem észleltünk gátló hatást. Itt is feltehető, hogy a fent vázolt hibaforrások vezettek az eltérő eredményekre.

Mindez arra mutat, hogy célszerű lenne, ha egy kellő tekintéllyel rendelkező nemzetközi szerv /kongresszus vagy speciális symposion/ ebben a kérdésben is - mint pl. a nomenklaturával kapcsolatban stb. - állást foglalna és rendet teremtené.

E. L. Smith /82/ találóan jegyezte meg, hogy B₁₂-vitamin-antagonizmusról általában beszélni értelmetlen, ha nem adjuk meg, hogy milyen teszt-organizmusról van szó. Ehhez most hozzátehetjük: inhibíciós indexről beszélni csak akkor érdemes, ha a vitamin és az antagonista beadásának körülményeit pontosan körvonalazzuk. Célszerű volna a célra olyan standard módszert kidolgozni, amelynél a vitamint és az

antagonistát egyidejűleg alkalmazzuk, azzal a kiegészítéssel, hogy az alkalmazott B₁₂-vitamin mennyisége 10³-10⁴-szerese legyen annak a mennyiségnek, amelyet a teszt-organizmusok már eleve tartalmaznak.

3/.Az inhibíciós index függősége a két versengő komponens beadásának időpontjától, és ennek elvi jelentősége.

Ez a kérdés az előző pontban is ismételten szóba került, itt azonban más értelemben kívánunk vele foglalkozni.

Az I/9 és I/10 pont alatt leírt kísérletek azt mutatják, hogy az inhibíciós index nagy mértékben függ attól, hogy a kobalaminmonokarbonsav előbb, egyidejűleg vagy utóbb hat-e a baktériumokra, mint a B₁₂-vitamin. Ez a tény arra mutat, hogy mind a B₁₂-vitamin, mind a kobalaminmonokarbonsav szilárdan kötődik a megfelelő sejt-receptorokhoz és onnan nem egykönnyen válnak le. Erre utalnak a rádióaktív izotóppal jelzett B₁₂-vitaminnal végzett kísérletek is / IV/6 kísérlet/, amely szerint a jelzett és nem jelzett B₁₂-vitamin-molekulák kicserélődése az élő baktériumban igen lassan megy végbe /ha ugyan végbemegy/.

Hasonló jelenség más kompetitív antagonisták esetén is található az irodalomban.

A béta-acetilpiridin egéren és kutyán a nikotinsavhiány tüneteit váltja ki és az állat pusztulását okozhatja. Az előzőleg beadott nikotinsav megvédi az állatot a toxikus

hatástól, az utólag beadott nikotinsav azonban már nem /94/.

A p-aminofenilarzinsav toxikus hatása kivédhető előzőleg beadott p-oxi-benzoessavval, de a már egyszer megmérgezett állaton a vitamin hatástalan /69/.

A desoxipiridoxin-piridoxin viszonylatban hasonló a helyzet patkány /84/ illetőleg csirke /88/ esetében.

A 4-aminopteroilglutaminsav csirkén és más állatokon csak akkor váltja ki a fólsav-hiány tüneteit, ha fólsavban szegény étrenden tartjuk őket. Az egyszer beállott hatást azonban utólag csak sok fólsav beadásával lehet kivédeni. /43/.

Pihenő élesztősejtekben a fluorecetsav specifikusan gátolja az ecetsav oxidációját. Itt is nagy mértékben függ a gátlás attól, hogy a metabolitot vagy az antimetabolitot adjuk-e előbb a sejtekhez /51/.

Az a tény, hogy az inhibíciós index megváltozik aszerint, hogy a B₁₂-vitamin és a kobalaminmonokarbonsav közül melyik hat előbb a teszt-organizmusokra, arra is választ ad, hogy miért olyan feltűnően éles a gátlási vonalon a növekedési zóna határa E.L. Smith többször idézett kísérletében. - Ennél a kísérletnél a B₁₂-vitamin illetőleg az antagonista faktor két ellentétes irányból diffundál a később kialakuló növekedési zóna-határ felé. A határ ott alakul ki, ahol egyszerre jelenik meg a két vegyület az inhibíciós

indexnek megfelelő koncentrációarányban. A növekedési zóna területén a vitamin előbb éri el ilyen koncentrációban a baktériumokat és növekedésre serkenti őket. Ezzel egyben relatív védelmet nyújt nekik az antimetabolit hatása ellen. Mint láttuk, már 5 percnyi időkülönbség is sokat számít ezen a téren, a diffúzió pedig lassu folyamat. Így a gátlási vonaltól már akár csak egy tized mm-nyire a növekedési zóna belseje felé a gátlás gyakorlatilag nem érvényesül, viszont 0,1 mm-nyire a gátlási zónától elfelé a gátlás teljes mértékben érvényesül.

Az éles szél különösen akkor szembetűnő, ha összehasonlítjuk azzal a kísérlettel, amelyben a B_{12} -vitamin és az antagónista keverékét visszük fel az agarlemez egy pontjára. / I/1 kísérlet/. - Ez utóbbi esetben a zóna széle feltűnően elmosódottá válik, ha a két vegyület aránya alulról megközelíti az inhibíciós indexet /ha meghaladja, a zóna teljesen eltűnik/. Ebben az esetben a zóna széle feltehetően azért elmosódott, mert a két antagónista verseng a baktériumokon található receptorokért. Részleges gátlás következik be, a baktériumok lassabban fejlődnek, kevesebb B_{12} -vitamin kötnek meg, mint normálisan, a B_{12} -vitamin ennél fogva messzebbre diffundál: a zóna nagyobb és elmosódottabb lesz.

Az a tény, hogy a kobalaminmonokarbonsav antagónista hatása gyenge, ha olyan sejtekkel kerül érintkezésbe, amelyek

már tartalmaznak B₁₂-vitamint, talán arra is magyarázatot ad, hogy miért nem adja meg ez a vegyület azt a gyógyszerhatást, amelyet elméleti megfontolások alapján egy időben joggal vártak tőle - pl. olyan esetekben, mint polycitæmia vera-nál, ahol kívánatos volna mesterséges B₁₂-vitaminhiányt előidézni.

Azok a szerzők, akiknek a vázolt nehézség ellenére sikerült apró laboratóriumi állatokon mesterséges B₁₂-vitaminhiányt előidézni kobalaminmonokarbonsav adagolásával /18, 59, 87/, igen nagy adagokat alkalmaztak /0,5-1,0 mg/kg/, míg emberen 1 mg-os - tehát kb. 60-szor kisebb adagokkal kísérleteztek, testsúly-kg-ra számítva őket. /19/.

A hatásnak az alkalmazás időrendi sorrendjétől való függése arra is magyarázatot ad, hogy a B₁₂-vitamint tartalmazó /14/ szerinti agarlemezen miért kaptunk sokkal kisebb gátlási zónákat kobalaminmonokarbonsavval, mint ahogy a 40-es inhibíciós index alapján várható volna /I./4.-kísérlet/. Ebben a kísérletben azt találtuk, hogy a kapott gátlási zónák mintegy tízszer nagyobb inhibíciós indexnek feleltek meg.

4/.A kobalaminmonokarbonsav mint antibiotikum.

A kobalaminmonokarbonsav kellő koncentrációban /amely a jelenlevő B₁₂-vitamin mennyiségtől függ/, sokszor 1 µg nagyságrendű mennyiségekben, gátolja az E.coli 113-3 növekedé-

sét. Miután ezt a vegyületet először egy baktérium tenyészetéből nyertük, vagyis természetes eredetű, joggal tekinthetjük antibiotikumnak /57/. A legkisebb gátló koncentrációja is megfelel a leghatékonyabb antibiotikumok gátló koncentrációjának.

Amint a kísérleti részben már rámutattunk, a kobalaminmonokarbonsav megfelelő körülmények közt szabályos gátlási zónákat képez agarlemezen és ebben a tekintetben sem különbözik más antibiotikumoktól. Hasonlóképpen kimutatható a jelenléte autobiográfiával is, mint más antibiotikumoké.

Van azonban a kobalaminmonokarbonsavnak egy igen sajátos tulajdonsága más antibiotikumokkal szemben: a rendkívül éles hatás-specifititás. Eddigi ismereteink szerint egyetlen baktériumtörzs érzékeny vele szemben: az E.coli 113-3 /és talán az Ochromonas malhamensis protozoon/.

Tudomásom szerint nincs még egy olyan leírt antibiotikum, amely ilyen rendkívül szűk spektrumu volna.

Az a körülmény, hogy a kobalaminmonokarbonsav vitamin-antimetabolit, nem mond ellent annak, hogy antibiotikumnak tekintsük. Több antibiotikumról kiderült a hatásmechanizmusuk vizsgálata során, hogy antagonistája a baktériumsejt valamelyik enzimrendszerének.

Igy például kitűnt, hogy a cikloszerin /oxamicin/ kompetitíve gátolja az alanin beépülését az uridin-nukleotidákba /85/. E.colinál az azaszerin és a fenilalanin kompeti-

tiv antagonisták /102/, ami nem akadályozza annak, hogy az azaszerint általánosan, mint antibiotikumot tartsák számon.

Ezzel szemben számos olyan antimetabolitot irtak le, amely a kobalaminmonokarbonsavhoz hasonlóan gátolja bizonyos organizmusok fejlődését. Ha e vegyületek kimerítik az antibiotikum fogalmát /természetes eredet, kis koncentrációban való gátlás/, helyes lenne őket számon tartani az antibiotikumok sorában is - még akkor is, ha gyakorlatilag nem jönnek számba, mint gyógyszerek. Köztudomású ugyanis, hogy az ismert és számontartott antibiotikumoknak is csak egy elenyészően kis hányada nyer alkalmazást az orvosi gyakorlatban.

5/.A kobalaminmonokarbonsav antagonizmusának hatásmechanizmusa.

Amint az irodalmi adatokból /41/ és a fentebb ismertetett kísérletekből is kiderül, a kobalaminmonokarbonsav antagonizálja a B₁₂-vitamin növesztő hatását az E.coli 113-3 baktériumokra, de ugyanakkor nincs hatással a metionin növekedést serkentő hatására, ugyanezzel a teszt-organizmussal szemben. /Az E.coli 113-3 törzs ugyanis B₁₂-vitamin ill. metionin-dependens és deficiens táptalajon mindkét vegyület külön-külön is képes a mikroorganizmus fejlődését biztosítani/.

Miután azonban ismeretes, hogy a B₁₂-vitamin fontos szerepet játszik különböző metilezési folyamatokban, így a metionin bioszintézisében is, nyilvánvaló, hogy a B₁₂-vitamin szerepe az E.coli 113-3 törzsnél a metionin szintézisének lehetővé-tétele /37/. Az is nyilvánvaló, hogy a kobalaminmonokarbonsav ezt a metilezési folyamatot gátolja és ezen keresztül az adott mikroorganizmus egész élettevékenységét is, de kizárólag csak metionin-mentes táptalajon. A kobalaminmonokarbonsavon kívül az alkanolamin-típusu B₁₂-vitamin antagonisták is ugyanígy hatnak /41/.

Ismeretes azonban az is, hogy a B₁₂-vitaminnak sok egyéb funkciója is van a metionin-szintézisen kívül, amelyeket a kobalaminmonokarbonsav, úgy látszik, nem minden esetben képes antagonizálni. Innen van az, hogy más B₁₂-vitamin dependens organizmusoknál /Lactobacillusok, Euglena gracilis stb./, ahol a B₁₂-vitamin hiánya metioninnal nem pótolható, a kobalaminmonokarbonsav nem antagonizálja a B₁₂-vitamin növesztő hatását, bár fennáll az a lehetőség is, hogy ezek az organizmusok kobalaminmonokarbonsavból B₁₂-vitamint képesek szintetizálni.

Másfelől viszont a kobalaminmonokarbonsavval végzett farmakológiai és klinikai kísérletek azt mutatják, hogy ennek a vegyületnek az emberre és emlősökre is van bizonyos hatása.- Ezek a szervezetek pedig, mint ismeretes, B₁₂-vitamin jelenlétében sem képesek metionint szintetizálni, vagy legalábbis nem elegendő mennyiségben: a metionin

esszenciális aminosav mind az ember, mind pedig a majom és a patkány számára /többnyire ezekkel a fajokkal folytak a kísérletek/.

Ebből viszont az következik, hogy a kobalaminmonokarbonsav nem kizárólag a metionin bioszintézisének folyamatában antagonizálja a B₁₂-vitamin hatását, hanem más funkciókban is, amelyek eddig még nincsenek tisztázva.

Ezek alapján arra az álláspontra helyezkedhetünk, hogy a kobalaminmonokarbonsav egyes funkciókban kompetitíve gátolja a B₁₂-vitamin hatását, más funkcióiban azonban nem.

Feltehető volna az is, hogy a kobalaminmonokarbonsav hatása emlősökre független a B₁₂-vitaminnal való kompetitív antagonizmustól. Woolley a tiouracilt hozza fel példának, amely egyes baktériumoknál az uracil kompetitív antagonistája, emberen viszont nagyhatású tireotróp gyógyszer /81/. Ezt a felfogást látszik alátámasztani az az észlelet, hogy patkányokon a kobalaminmonokarbonsav granulocita-szám csökkentő hatását egyidejűleg beadott B₁₂-vitaminnal vagy metioninnal nem sikerült ellensúlyozni /16/. Ellene szól viszont, hogy tengeri-malacon a kobalaminmonokarbonsavval kiváltott B₁₂-vitaminhiány-tüneteket B₁₂-vitaminnal vagy metioninnal simán meg lehetett szüntetni /59/.

Ugyanezekben a kísérletekben fel lehetett függeszteni a kobalaminmonokarbonsav antivitamin-hatását B₁₅-vitaminnal /pangámsavval/ is. Miután pedig a pangám-savak erőlyes me-

tilező szerek, ez az adat is amellett szól, hogy az antagónizmus alapja a metilezési folyamatok gátlása - a metionin szintézisen kívüli metilezési folyamatokat beleértve.

Arra az esetre, hogy valamely antagónista emlősökön egy metabolitnak csak egyes funkcióit antagónizálja és nem az összeset, Woölley /92/ két példát is említ:

a/.A piribenzamin emlősökön antagónizálja a hisztamin sokkeltő hatását, de ugyanakkor hatástalan a hisztaminnak a gyomornedv-elválasztásra gyakorolt hatására.

b/.A glukoaszkorbinsav csak bizonyos területeken antagónizálja az aszkorbinsav hatását.

Az a tény, hogy az E.coli 113-3 sejtekhez kötött rádióaktívan jelzett B₁₂-vitamin nem cserélődik ki sem B₁₂-vitaminra, sem faktorokra - illetőleg, hogy ez a kicserélődés legfeljebb igen csekély mértékű - arra vall, hogy a B₁₂-vitamin ill. a faktorok és a kobalaminmonokarbonsav közt elsősorban az E.coli 113-3 szaporodása közben kifejlődő új szabad receptorokért folyik a versengés.

Ha a gátlás teljes, új szabad receptorok nem képződnek és a gátlás teljes is marad. Ha a gátlás csak részleges, fokozatosan új receptorok keletkeznek és akkor a további fejlődés már független attól, hogy a vitamin vagy az antagónista hatott-e előbb a baktériumokra, hogy az elsődleges receptorok melyik vegyülettel voltak tulnyomóan telítve. Ekkor már szabadon érvényesülhet a kompetitív hatás.

Függelék.

1/.A B₁₂-vitamin,a kobinamid,a III.faktor és a kobalamin-monokarbonsav diffúziós állandójának meghatározása.

Metodika: A meghatározást /86/ szerint végeztük.Nem tiszta agargelt használtunk,hanem /14/ szerinti összetételű steril táptalajt,mert bennünket az érdekelt,hogy a kérdéses vegyületek ebben a közegben hogyan diffundálnak,hiszen kísérleteinket ebben végeztük.- Másfelől a 26 C⁰-ra vonatkozó diffúziós állandókat határoztuk meg,miután agartenyészeinket ezen a hőfokon inkubáltuk.Abban az egy esetben,amikor technikai hiba miatt a diffúziós meghatározás hőmérséklete eltért a 26 C⁰-tól,számítással kaptuk meg a kívánt hőmérsékletre korrigált állandót.

A meghatározás kiviteli módja:

A /14/ szerinti steril agartáptalajt megolvasztottuk, ismert mennyiségű vizsgálandó anyagot kevertünk hozzá és egy 4,20 mm belső átmérőjű üvegcsőbe szívtuk fel /az átmérőt 0,01 mm pontosságu kaliberrel mértük és olyan csődarabot választottunk ki,amelynél a cső két végén mért átmérők különbsége 0,01 mm-nél kisebb volt/.A megdermedt agarhengert kifújtuk a csőből,hosszát 0,1 mm pontossággal lemértük és így ki tudtuk számítani az agarhenger térfogatát.A 10-12 cm hosszú hengert egy 100 ml-es Erlenmeyer-lombikban,az E.coli 113-3 tenyésztésére szolgáló folyékony

táptalaj 20 ml-ében áztattuk, pontosan 30 percig, majd a folyadék leöntése és ujjal való pótlása után további 30 percig, 26 °C-os termosztátban. Egy óra elteltével az áztatófolyadékokat egyesítettük és a bennük levő, az agarhengerből kidiffundált anyag mennyiségét meghatároztuk. A meghatározást B₁₂-vitamin, III. faktor és kobinamid esetében biológiai úton, agar diffúziós módszerrel végeztük /14/ szerint, a kobalaminmonokarbonsav esetében pedig spektrofotometriásan, 361 nm hullámhosszon mért abszorpció révén.

A kapott adatok alapján a diffúziós állandót a /86/ szerinti

$$D = \frac{r^2 / \log c_0 - \log c_1}{2,51 t}$$

képlet alapján számítottuk ki, ahol

D = diffúziós együttható

r = az agarhenger sugara /a mi esetünkben 0,21 cm/

c₀ = a vizsgálati anyag koncentrációja az agarhengerben a kísérlet kezdetén

c₁ = a vizsgálati anyag koncentrációja az agarhengerben a diffúziós kísérlet végén. Ezt az értéket a kidiffundált anyag meghatározása révén indirekte kapjuk c₀, az agarhenger térfogata és a belediffundált anyag mennyiségének ismeretében.

t = diffúziós idő /a mi esetünkben 3.600 sec./.

A kísérleteket 3 párhuzamos meghatározásban végeztük. Átlagos eredmények:

B₁₂-vitamin esetében:

$$c_0 = 10,9 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$c_1 = 2,88 \text{ "}$$

$$D_{260} = 2,85 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$$

Ez az eredmény jól egyezik Jeselkis adatával /49/: $2,9 \cdot 10^{-6}$.

III.faktor esetében:

$$c_0 = 8,77 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$c_1 = 2,22 \text{ "}$$

$$D_{260} = 2,91 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$$

Miután a III.faktor molekulaszúlya gyakorlatilag azonos a B₁₂-vitamin molekulaszúlyával, ez az eredmény megfelel a várakozásnak.

Kobinamid esetében:

$$c_0 = 1,95 \text{ } \mu\text{g/ml} \quad \text{/látszólagos, agardiffúzióval mért} \\ \text{biológiai aktivitás/}$$

$$c_1 = 0,37 \text{ "}$$

$$D_{260} = 3,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$$

Graham törvénye szerint /44/ a diffúziós állandók megközelítőleg fordítva arányosak a molekulaszúlyok négyzetgyökével. Miután a B₁₂-vitamin molekulaszúlya kb. 1500, a kobinamidé pedig kb. 1080, a B₁₂-vitamin fent meghatározott dif-

fúziós állandójából / $2,85 \cdot 10^{-6}$ / Graham törvénye alapján számított diffúziós állandó a kobinamid esetében $3,36 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$. Ez az érték mindössze 4%-kal tér el a talált értéktől, ami jó egyezésnek mondható, ha tekintetbe vesszük a módszer pontosságát és azt, hogy Graham törvénye is csak megközelítő érvényességű.

Kobalaminmonokarbonsav esetén:

A meghatározás technikai hiba folytán 24°C -on történt.

$$c_0 = 500 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$c_1 = 264,4 \text{ "}$$

$$D_{24^\circ} = 2,78 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$$

Ezt az értéket 26°C -ra a

$$D = k \cdot \frac{T}{\eta}$$

képlet alapján számítottuk át /22/, ahol:

T = abszolút hőmérséklet

η = viszkozitás az adott hőmérsékleten

A víz viszkozitásának értékeit /60/-ból véve és a megfelelő értékeket behelyettesítve:

$$D_{26^\circ} = 2,9 \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$$

vagyis a kobalaminmonokarbonsav diffúziós állandója is gyakorlatilag megegyezik a B_{12} -vitamin diffúziós állandójával, ami szintén megfelel a várakozásnak.

2/.A kobalaminmonokarbonsav III.faktorra ill. kobinamidra vonatkoztatott inhibíciós indexének számítása E.L.Smith módszerének felhasználásával.

a/.A számítás elve.

Abból a feltevésből indultunk ki, hogy a gátlási vonal ott alakul ki, ahol a növekedési zóna kialakulása idején az antagonistá, illetőleg a vitamin-jellegű anyag koncentrációjának hányadosa egyenlő az inhibíciós indexszel. Így a két koncentráció ismerete lehetővé teszi az inhibíciós index kiszámítását.

Feltételezve, hogy mindkét anyag szabadon diffundál az agarlemezben, ezek a koncentrációk meghatározhatók Vesterdal /89/ vagy Humphrey és Lightbown /45/ képletével. Mi ez utóbbival számolunk.

Megjegyzendő, hogy a kobalaminmonokarbonsav szabadon diffundál az agarlemezben, mint antibiotikum-jellegű anyag. A vitaminszerű anyagok /B₁₂-vitamin és faktorok/ szabad diffúzióját illetően egyes szerzők kétségeket támasztottak /65,72,73/. Ez azonban nem jelent lényeges hibát és ezért elhanyagoljuk az alábbi számításnál.

/45/ szerint:

$$r^2 = 9,21 \cdot Dt. / \log M - \log 4\pi \cdot h Dtc /$$

ahol:

D = a diffúziós együttható /a megfelelő hőmérsékleten/

t = a diffúzió ideje → a mi esetünkben a zóna kialakulásának ideje

M = az agarlemezre felvitt diffundáló anyag mennyisége

h = az agarlemez vastagsága /réteg-magassága/

c = a keresett koncentráció r távolságban a diffúzió kiindulási pontjától

r = a gátlási vonal távolsága a diffundáló anyag felvitelére szolgáló lyuk középpontjától

Az összes adatokat cgs-egységben adjuk meg, mert ilyenben adtuk meg a diffúziós állandók értékét is.

Humphrey és Lightbown /45/ képletéből a többi adat ismeretében kiszámítható c értéke.

b/.A számítás kivitelezése.

Legyen a fenti jelek mellé irt indexek jelentése:

K = kobinamid

$IIIF$ = III.faktor

MKS = kobalaminmonokarbonsav.

A /45/ képletben szereplő betűjelek helyébe a következő értékeket írhatjuk:

$$D_K = 3,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$$

$$D_{IIIF} = D_{MKS} = 2,9 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$$

A fenti értékeket saját mérésünk alapján vesszük /1. a Függelék 1. pontját/.

$$t = 19.200 \text{ sec.}$$

t értékét úgy határoztuk meg, hogy /14/ szerinti agarlemezre B₁₂-vitamint vittünk fel és 26 C°-on inkubáltuk őket. Azt az időt mértük, amelynek elteltével a növekedési zóna első halvány nyomai megjelentek. Ez az idő kobinamid esetében valamivel hosszabb, mint pl. B₁₂-vitamin esetében /74/, ez a különbség azonban elhanyagolható.

$h = 0,25 \text{ cm}$ /az agar térfogata és a lemez felülete alapján számítva/.

$M_K = 6,8 \cdot 10^{-9} \text{ g}$ /agarlemezen mért biológiai aktivitás alapján számítva/

$$M_{IIIF} = 5 \cdot 10^{-8} \text{ g}$$

$M_{MKS} = 5 \cdot 10^{-8} \text{ g}$ a kobinamid inhibíciós indexének meghatározásánál

$M_{MKS} = 3,13 \cdot 10^{-6} \text{ g}$ a III. faktor inhibíciós indexének meghatározásánál

Az M-értékek kiszámításánál figyelembe kell venni a koncentrációkon kívül azt is, hogy minden esetben 0,05 ml oldatot vittünk fel az agarlemezre.

A III.faktor inhibíciós indexének meghatározásánál:

$$r_{\text{IIIF}} = 0,75 \text{ cm ill. } 0,91 \text{ cm}$$

$$r_{\text{MKS}} = 0,97 \text{ cm ill. } 1,15 \text{ cm}$$

A kobinamid inhibíciós indexének meghatározásánál:

$$r_K = 0,83 \text{ cm}$$

$$r_{\text{MKS}} = 0,875 \text{ cm}$$

/lásd a kísérleti részben a megfelelő kísérleti eredményeket/.

Ha ezeket az értékeket behelyettesítjük a /45/-ben megadott egyenletbe és azt rendezzük:

III.faktor esetén:

$$-\log c_{\text{MKS}} = \frac{r^2}{0,504} + 4,75$$

és

$$-\log c_{\text{IIIF}} = \frac{r^2}{0,504} + 6,55$$

A két párhuzamos kísérletnek megfelelő r-értékeket behelyettesítve:

$$c_{\text{MKS}} = 4,3 \cdot 10^{-8} \text{ illetve } 2,4 \cdot 10^{-7}$$

$$c_{\text{IIIF}} = 5,3 \cdot 10^{-9} \quad " \quad 2,2 \cdot 10^{-8}$$

Az inhibíciós index

$$I = \frac{c_{\text{MKS}}}{c_{\text{IIIF}}}$$

$$I_1 = 8,1, \quad I_2 = 12,0$$

A kobinamid esetén:

$$c_{\text{MKS}} = 8,9 \cdot 10^{-9}$$

$$c_{\text{K}} = 2,2 \cdot 10^{-9}$$

Az inhibíciós index:

$$I_{\text{K}} = 4,0 \quad \text{/a biológiai aktivitás alapján számolva/}.$$

Összefoglalás.

Miközben kísérleteket végeztünk B_{12} -vitamin ipari előállítására, felfedeztük, hogy egy P.shermanii törzs B_{12} -vitamin mellett egy antagonistá természetű anyagot is termel.

A további vizsgálat során kiderült, hogy ez az antagonistá faktor azonos az akkor már ismert B_{12} -vitamin-antagonistával, a kobalaminmonokarbonsavval. - Ezt az anyagot részletes mikrobiológiai vizsgálatnak vetettük alá. A vizsgálat a következőkre terjedt ki:

1/. Különböző módszerekkel meghatároztuk a kobalaminmonokarbonsav inhibíciós indexét. A 100%-os gátlásra 40 és 160 közt ingadozó értékeket kaptunk az alkalmazott módszer szerint, mikor is a valószínű helyes érték 40-50. - Az 50%-os gátlásra egyértelműen 35-ös értéket kaptunk két különböző módszerrel. Mindez arra az esetre áll, ha a B_{12} -vitamin és a kobalaminmonokarbonsav egyidejűen hat a baktériumokra. /E.coli 113-3/.

2/. Kiderült, hogy az inhibíciós index lényegesen megváltozik, ha a két vegyület nem egyszerre, hanem egymás után hat a mikroorganizmusokra. Ha a B_{12} -vitamin hat előbb, az inhibíciós index lényegesen megnő, ha a kobalaminmonokarbonsav hat előbb, az inhibíciós index lényegesen csökken.

3/.Kiderült,hogy a két vegyület antagonizmusa kompetitív jellegű.A kompetitív jelleget mutatja,hogy különböző B_{12} -vitamin-koncentrációk mellett az inhibíciós index,egyéb-ként azonos körülmények közt,változatlan marad.- Uj módszerrel ismertettünk a kompetitív antagonizmus agarlemezen való demonstrálására - olyan módszert,amely nemcsak a B_{12} -vitamin és antagonistái esetében,hanem általánosabban is alkalmazható,feltéve,hogy az adott antagonizmus agarlemezen,alkalmas teszt-organizmusok segítségével növekedés-gátlás formájában kimutatható.

4/.Megvizsgáltuk a kobalaminmonokarbonsav bioszintézisének törzs-specifitását és kitünt,hogy a természetes B_{12} -vitamin-antagonistát igen sok megvizsgált fajta ill. törzs közül csak egyetlen egy termelte.

5/.Megvizsgáltuk a kobalaminmonokarbonsav hatás-specifitását és kitünt,hogy csak az E.coli 113-3 törzs esetében antagonizálta ez a vegyület a B_{12} -vitamin hatását.Ezzel a baktériumtörzsszel szemben a kobalaminmonokarbonsav antibiotikumként viselkedik,amelynek azonban csak bakteriosztatikus és nem bakteriocid hatása van.

6/.Megvizsgáltuk a kobalaminmonokarbonsav hatását két B_{12} -vitamin-faktorra: a III.faktorra és a kobinamidra.Azt találtuk,hogy az E.coli 113-3 teszt-organizmust használva a kobalaminmonokarbonsav e két faktornak is kompetitív antagonistája.Megállapítottuk,hogy a kobalaminmonokarbon-

sav III.faktorra vonatkoztatott inhibíciós indexe 10, a kobinamidra vonatkoztatott inhibíciós indexe pedig 4 /a látszólagos agarlemezen mért aktivitás alapján számolva/, vagyis sokkal alacsonyabb, mint a B₁₂-vitaminnal szemben mért inhibíciós index.

7/.Megállapítottuk, hogy a B₁₂-vitamin, a kobalaminmonokarbonsav, valamint a vizsgált faktorok különböző intenzitással kötődnek a teszt-organizmusokhoz. Az agardiffúziós módszerrel végzett kísérletek eredményét megerősítette a vizsgált anyagok diffúziós együtthatóinak meghatározása, valamint a rádióaktív izotóppal jelzett B₁₂-vitaminnal és kobinamiddal végzett kísérletek.

8/.A különböző kötődési intenzitás lehetővé teszi a B₁₂-vitaminnak a faktoroktól való elválasztását kobalaminmonokarbonsav segítségével. Miután az elválasztást a teszt-organizmusok élettevékenysége, differenciált abszorpciós képessége segíti elő, a módszer a "biokromatográfia" nevet kapta.

9/.Az E.coli 113-3 baktériumok által megkötött B₁₂-vitamin legfeljebb minimális mértékben cserélődik ki a vizsgált faktorokra vagy kobalaminmonokarbonsavra.

10/.A dolgozat a már ismert farmakológiai és klinikai felhasználások mellett a kobalaminmonokarbonsav következő új felhasználási lehetőségeit ismerteti:

a/.Metionin kis mennyiségeinek meghatározása B_{12} -vitamin mellett azon az alapon,hogy a kobalaminmonokarbonsav gátolja a B_{12} -vitamin növesztő hatását az E.coli 113-3 törzsre,de nem gátolja a metionin hasonló hatását ugyanerre a mikroorganizmusra.

b/. B_{12} -vitamin-készítmények tisztaságának /faktortartalmának/ vizsgálata a 8/.pontban ismertetett "biokromatográfia" segítségével.Ennek a módszernek különösen takarmánykeverékek,u.n. premixek vizsgálatánál lehet jelentősége.

c/. B_{12} -vitamin-analógok biológiai értékének megítélése a kobalaminmonokarbonsavval szembeni viselkedésük alapján.Valószínű,^{hog}két kvalitative hasonló hatásu B_{12} -vitamin-analóg közül az a biológiailag magasabb értékű,amelyre nézve a kobalaminmonokarbonsav inhibíciós indexe nagyobb,mert a nagyobb inhibíciós index az erősebb kötődéssel függ össze.

Ábrák jegyzéke.

1/.Az antagonista faktort tartalmazó B ₁₂ -vitamin-koncentrá- tium autobiogrammja.....	30.o.
2/.Az antagonizmus kimutatása E.L.Smith szerint különböző koncentráció-arányok mellett.....	33.
3/.E.L.Smith módszerének módosítása Wolters nyomán.....	34.
4/.A kompetitív antagonizmus demonstrálása agarlemezen.....	37.
5/.A kompetitív antagonizmus demonstrálása /szkematikus rajz/.....	38.
6/.A kobalaminmonokarbonsav gátlása folyékony táptalajon különböző koncentrációarányok mel- lett.Az 50%-os inhibíciós index meghatározása....	45.
7/.A kobalaminmonokarbonsav gátlási görbéi a B ₁₂ -vitamin és az antagonista különböző idő- pontokban való beadása esetén.....	51.
8/.B ₁₂ -vitamin és kobalaminmonokarbonsav keve- rékeivel előidézett "négyyszögletesre torzult" növekedési zónák.....	59.

- 9/.Gyűrűszerű növekedési zónák B_{12} -vitamin,
III.faktor és kobalamínmonokarbonsav keveréké-
nek felvitele esetén /"biokromatográfia"/..... 64.o.
- 10/.A kobalamínmonokarbonsav 50%-os gátlási
indexének meghatározása izotóp-technikával..... 74.

Táblázatok jegyzéke.

1/.A kobalaminmonokarbonsav gátló hatásának kvantitativ vizsgálata agarlemezen.....	25.o.
2/.Összefüggés kobalaminmonokarbonsav-olda- tok koncentrációja és az általuk kiváltott gátlási zónák mérete közt.....	28.
3/.A kobalaminmonokarbonsavval kiváltott gát- lási zónák méretének függése az agarlemez B ₁₂ -vitamin-tartalmától.....	31.
4/.A kobalaminmonokarbonsav B ₁₂ -vitaminra vonatkoztatott inhibíciós indexének meghatá- rozása folyékony táptalajon.....	41.
5/.Az <u>E.coli 113-3</u> fejlődésének 50%-os gát- lása kobalaminmonokarbonsavval,két külön- böző B ₁₂ -vitamin-koncentráció mellett.....	44.
6/.A kobalaminmonokarbonsav gátló hatása <u>E.co- li 113-3</u> -ra folyékony táptalajon,a B ₁₂ -vitamin és az antimetabolit különböző időpontokban való beadása esetén.....	50.
7/. <u>E.coli 113-3</u> baktériumok életképessége gát- ló mennyiségű kobalaminmonokarbonsavval való kezelés után.....	57.

8/.Kobalaminmonokarbonsav és kobinamid ill. III.faktor keveréke által létrehozott növeke- dési zónák leírása.....	61.o.
9/.B ₁₂ -vitamin kötődése az <u>E.coli 113-3</u> -mal benőtt agarlemezhez.....	66.
10/.A kobinamid kötődése az <u>E.coli 113-3</u> -mal benőtt agarlemezhez.....	68.
11/.A kobinamid és a III.faktor hatása a rá- dióaktív izotóppal jelzett B ₁₂ -vitaminnak az <u>E.coli 113-3</u> sejtekhez való kötődésére.....	70.
12/.Az 50%-os gátlást kiváltó kobalaminmonokar- bonsav-koncentráció meghatározása rádióaktív izotóp technika alkalmazásával.....	73.
13/.Az <u>E.coli 113-3</u> által megkötött jelzett B ₁₂ -vitamin kicserélődése B ₁₂ -vitaminra, III.- faktorra ill. kobalaminmonokarbonsavra.....	76.
14/.A gátlási vonal távolsága a felviteli lyu- kak középpontjától az E.L.Smith nyomán végzett kísérletben 0,136 µg/ml kobinamid-oldat és kü- lönbözőkoncentrációju kobalaminmonokarbonsav- oldatok felvitele esetén.....	81.

15/.Kobalaminmonokarbonsav által kiváltott
gátlás dl-metionint ill. B₁₂-vitamint tar-
talmazó, E.coli 113-3-mal beoltott agarleme-
zen..... 86.o.

Köszönetnyilvánítás.

E dolgozat megírásával kapcsolatban köszönetemet fejezem ki:

Straub Bruno akadémikusnak, aki tanácsaival, észrevételeivel, bírálatával segítette munkámat.

dr. Kelemen Ágnes kandidátusnak, aki kísérleteim során a preparatív kémiai munkákban nyújtott segítséget.

Ádám Lászlónak, Tari Lászlónak és a Bányászati Kutatóintézet Izotóp Laboratóriuma munkatársainak, akik az ott végzett, jelzett B₁₂-vitaminnal folytatott kísérleteknél voltak a segítségemre.

Milch Györgynek /Chinoi/ a műszeres analitikai vizsgálatoknál nyújtott segítségért.

Branyicki Jánosnének és Kasza Istvánnének, közvetlen munkatársaimnak a technikai segítségért.

Irodalomjegyzék.

=====

1. Armitage J.B., Cannon J.R., Johnson A.W., Parker L.F.J.
Smith E.L., Stafford W.H., Todd A.R. - J.Chem.Soc.
London 3849 /1953/.
2. Arnstein H.V.R., White A.M. - Biochem.J. 79. 3P. /1961/.
3. Baker H., Frank O., Pasher I., Hutner S.H., Sobotka H. -
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 104. 33 /1960/.
4. Barton-Wright E.C., Curtis N.S. - Analyst 73. 330 /1940/
5. Barton-Wright E.C., Emery W.B., Robinson F.A. - Nature
157. 628 /1946/.
6. Bernhauer K., Becher E., Gross G., Wilharm G. - Biochem Z.
332. 562 /1960/.
7. Boyd M.J., Logan M.A., Tytell A.A. - J.Biol.Chem. 174.
1013 /1948/.
8. British Pharmacopoeia, 1953, 173-174.o.
9. Coates M.E., Davis M.K., Harrison G.F. - Arch.Biochem.
Biophys. 67. 93 /1960/.
10. Coates M.E., Ford J.E., Harrison G.F. - B₁₂-Vitamin u.
Intrinsic Factor, II. Europ. Symp. - F.Enke, Stuttgart, 276.
o. /1962/.
11. Cooper K.E., Woodman D. - J.Path.Bact. 58. 75 /1946/.
12. Cooper K.E., Rowley D. - Nature 163. 480 /1949/.
13. Cooper K.E. illetve Kavanagh F.: Analytical Microbiology
c.könyvében - Acad.Press, New York-London /1963/ 1.o.
14. Csajkovszkaja Sz.M., Druzzsinina E.N. - Mikrobiologija
26. 609 /1957/.

- 15.Csányi E.,Kelemen Á.,Borsy J. - Nature 194. 689 /1962/.
- 16.Csányi E.,Kelemen Á.,Borsy J. - Acta Physiol.Acd.Sci.
Hung. 23. 211 /1963/.
- 17.Dixon M. - Biochem.J. 55. 170 /1953/.
- 18.Dzselieva Z.N.,Kjuljan G.M.,Trufanov A.V. - Vopr. Med.
Himii 10. 386 /1964/.
- 19.Eckhardt S.,Sellei C. - Nature 194. 386 /1962/.
- 20.Epstein S.S. - Nature 188. 143 /1960/.
- 21.Epstein S.S.,Timmis G.M. - Biochem.Pharmac. 2.743
/1962/.
- 22.Erdey-Gruz T.,Schay G.: Elméleti Fizikai Kémia,II.kö-
tet, 219-221.o.
- 23.Eridani S.,Silvestrini R.,Taglioretti D. - Atti Acad.
Med.Lombard. 16. 95 /1961/.
- 24.Eridani S.,Taglioretti D.,Carrera P.M.,Pizzi F. - Acta
Hematol. 25. 35 /1961/.
- 25.Fantes K.H.,Page J.E.,Parker L.F.J.,Smith E.L. - Proc.
Roy.Soc. /London/,Sec.B. 136. 592 /1950/.
- 26.Ford J.E. - Brit.J. of Nutrition 7. 299 /1953/.
- 27.Ford J.E. - J.Gen.Microbiol. 21. 693 /1959/.
- 28.Fox M.R.S.,Briggs G.M.,Ortiz L.O. - Proc.Soc.Exptl.
Biol.Med. 95. 498 /1957/.
- 29.Friedrich W.,Bernhauer K. - Angew.Chem. 65. 627 /1953/.
- 30.Friedrich W.,Bernhauer K. - Chem.Ber. 89. 2030 /1956/.
- 31.Friedrich W.,Bernhauer K. - B₁₂-Vitamin u.Intrinsic
Factor,I.Europ.Symp./1956/,F.Enke Verlag,Stuttgart,
40.o.

32. Friedrich W., Heinrich H.C. - Biochem.Z. 333. 550 /1961/.
33. Friedrich W., Heinrich H.C. - Biochem.Z. 333. 554 /1961/.
34. Funk H.B., Nathan H.A. - Proc.Soc.Exptl.Biol.Med 99.
394 /1958/.
35. Gunnes M., Dwyer J.M., Stokes J.L. - J.Biol.Chem. 163.
159 /1946/.
36. Harrison E., Lees K.A., Wood F. - Analyst 76. 696 /1951/.
37. Hatch F.T., Takeyama S., Cathou R.E., Larrabee A.R., Buchanan J.M. - J.Am.Chem.Soc. 81. 6525 /1959/.
38. Heinrich H.C., Friedrich W., Gabbe E.E., Manjrahar S.P., Staak M. - 5th Internac.Congr.Nutrition, Washington D.C.
/1960/ No 284.
39. Heinrich H.C., Friedrich W., Riedel P. - Biochem Z. 334.
279 /1961/.
40. Heinrich H.C., Friedrich W., Riedel P. - Vitamin B₁₂ u.
Intrinsic Factor, 2.Europ.Symp. - F.Enke Verlag, Stuttgart, 244.o.
41. Heinrich H.C., Gabbe E.E. - Vitamin B₁₂ u. Intrinsic
Factor, 2.Europ.Symp. - F.Enke Verlag, Stuttgart, 252.o.
42. Heinrich H.C., Gabbe E.E. - Klin Wochenschr. 43. 196
/1965/.
43. Hertz R., Tullner W.W. - Ann. N.Y.Acad.Sci. 52. 1260
/1950/.
44. Höber R. - Physical Chemistry of Cells and Tissues,
Churchill Ed., London, 1947.

45. Humphrey J.H., Lightbown J.W. - J.Gen.Microbiol. 7.
129 /1952/.
46. Hutner I.R. - Nature /London/ 183. 1283 /1959/.
47. Janicki J., Pawelkiewicz J. - Acta Biol.Polon. 1.
308 /1954/.
48. Jeruszałimskij N.D., Konova I.V., Neronova N.M., An-
csurova A.I. - Vitaminnie Reszurszi i ih Iszpolzova-
nie, No 5. 119 /1961/.
49. Jeselkis B., Foster J.F., Dichl H. - Jowa State Coll.
J.Sci. 31. 1 /1956/.
50. Juillard M. - Zbl. Bakt, Abt. II. Orig. 110. 701 /1957/.
51. Kalnitsky G., Barron E.S. J. Biol. Chem. 170. 83
/1947/.
52. Kelemen Á. - Acta Pharm. Hung. 31/B Suppl. 118 /1961/.
53. Kelemen Á., Csányi E., Simon Á., Eckhardt S. - Vitamin
B₁₂ u. Intrinsic Factor, 2. Europ. Symp. - F. Enke Ver-
lag, Stuttgart /1962/ 241.o.
54. Kelemen Á., Simon Á. - Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.
8. 223 /1961/.
55. Kelemen Á., Simon Á. - Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.
8. 231 /1961/.
56. Kelemen Á., Simon Á. - Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.
8. 237 /1961/.
57. Kelemen Á., Simon Á. - Antibiot. Congr. 1964. Praga,
Abstracts of papers.

58. Kátyi L., Szendrey L. - A Magyar Mikrobiológiai Társ. 1966. évi Debreceni Vándorgyűlésén tartott előadás.
59. Kjuljan G.M., Trufonov A.V. - Vitamin B₁₅ - Pangamovaja Kiszlota, Szbornik - Izd. Nauka, 1965, 44.o.
60. Lange: Handbook of Chemistry - Handbook Publ. Inc. Sandusky, Ohio - 1952.
61. Lineweaver H., Burk D. - J. Am. Chem. Soc. 56. 658 /1934/.
62. Lyman C.M., Moseley O., Butler B., Wood S., Hale F. - J. Biol. Chem. 166. 161 /1946/.
63. McNair D.B., Rogers M.L., Rose C. - J. Am. Chem. Soc. 80. 2165 /1958/.
64. Molnár B. - Magyar Kém. Lapja 14. 141 /1959/.
65. Oberzill W. - Sci. Pharmac. 31. 26 /1963/.
66. Perlman D., Tookey J.I. - Nature /London/ 212. 300 /1966/.
67. Rahat M., Reich K. - J. Gen. Microbiol. 31. 195 /1963/.
68. Riesen W.H., Schweigert B.S., Elrehjem C.A. - J. Biol. Chem. 165. 347 /1946/.
69. Sandground J.H. - J. Pharmacol Exptl. Therap. 78. 209 /1943/.
70. Shapiro S.L., Freedman L. - Arch. Internat. Pharmacodyn. 120. 25 /1959/.
71. Scott D., Hammer F.E. - Enzymologia 22. 194 /1960/.
72. Simon Á. - Antibiotiki 4. No 1. 108 /1959/.
73. Simon Á. - Zbl. Bakt. II. Abt. Orig. 120. 10 /1966/.

- 74.Simon Á. - Mikrobiologija 35. 732 /1966/.
- 75.Simon Á. - Zbl.Bakt.II.Abt.Orig. - sajtó alatt.
- 76.Simpson J.S. - Kavanagh F.:Analytical Microbiology
c.könyvében - Acad.Press,NewYork-London,1963 - 111.o.
- 77.Smith E.L. - Vitamin B₁₂ u.Intrinsic Factor, 1.Europ.
Symp.1956,F.Enke Verlag,Stuttgart, 6.o.
- 78.Smith E.L. - Vitamin B₁₂ /orosz kiadás,Medgiz/
100. o.
- 79.Smith E.L. - Acta Haematol. 24. 9 /1960/.
- 80.Smith E.L. - Internat.Z.Vitaminforsch. 31. 367
/1961/.
- 81.Smith E.L. - Vitamin B₁₂ u.Intrinsic Factor,2.Europ.
Symp. - F.Enke Verlag,Stuttgart,1962, 224.o.
- 82.Smith E.L. - Biochem.J. 89. 5P /1963/.
- 83.Steele B.F.,Sauberlich H.E.,Reynolds M.S.,Baumann
C.A. - J.Biol.Chem. 177. 533 /1949/.
- 84.Stoerk H.C. - Ann.N.Y.Acad.Sci. 52. 1302 /1950/.
- 85.Stominger J.L.,Throm R.H.,Scott Sh.S. - J.Am.Chem.
Soc. 81. 3803 /1959/.
- 86.Tamás Gy.,Rontó Gy. - Magy.Fiz.Folyóirat 11. 513
/1963/.
- 87.Trufanov A.V.,Kjuljan G.M. - Mikrobiologija 25. 753
/1963/.
- 88.Umbreit W.W.,Weddel J.G. - Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.
70. 293 /1949/.

- 89.Vesterdal J. - Acta Path.Microbiol.Scand. 24. 272
/1947/.
- 90.Wolters B. - Planta Med. 11. 183 /1963/.
- 91.Woolley D.W. - A Study of Antimetabolites,1952,
orosz kiadás,77.o.
- 92.Woolley D.W. - idézett mű 95-96. o.
- 93.Woolley D.W. - idézett mű 87-89. o.
- 94.Woolley D.W. - J:Biol.Chem. 157. 455 /1945/.
- 95.- 963.373 számú angol szabadalom.
- 96.- 72.783 számú holland szabadalom.
- 97.- 149.538 számú magyar szabadalom.
- 98.- 151019 számú magyar szabadalom.
- 99.- 151.223 számú magyar szabadalom.
- 100.- 152.001 számú magyar szabadalom.
- 101.- 2.576.932 számú USA.szabadalom.
- 102.Pitillo R.F.,Quinally B.G. - Antimicrobial Agents
and Chemotherapy /Ed. Finland M.,Savage G.M/ című
könyvben. - Am.Soc.for Microbiol.,1961, 245. o.

A kobalaminmonokarbonsavval kapcsolatos közleményeim
jegyzéke:

1. Kelemen Á., Simon Á. - A vitamin B₁₂-antagonist isolated from Propionibacterium shermanii - I. Isolation, structure and microbiological examinations.-
Acta Microbiol. Hung. 8. 223 /1961/.
2. Kelemen Á., Simon Á. - A vitamin B₁₂-antagonist isolated from Propionibacterium shermanii - II. Investigations on the origin of factor X.
Acta Microbiol. Hung. 8. 231 /1961/.
3. Kelemen Á., Simon Á. - Microbiological examination of a natural vitamin B₁₂-antagonist.
Acta Microbiol. Hung. 8. 237 /1961/.
4. Kelemen Á., Csányi E., Simon Á., Eckhardt S. - Untersuchungen über die Monokarbonsäure-Derivate des Vitamin B₁₂.
Vitamin B₁₂ und Intrinsic Factor.- 2 Europ. Symp.
F. Enke Verlag, Stuttgart /1962/, 241.o.
5. Kelemen Á., Csányi E., Simon Á. - Microbiological and haematological actions of cyanocobalamin-monocarboxylic acid isomers.
Acta Physiologica Hung. 21. 177 /1962/.

6. Kelemen Á., Simon Á. - Cyanocobalamine-monocarboxylic acid as a narrow spectrum antibiotic.

Antibiotic Congressus, Praga, 1964, Abstracts of Papers.

7. Simon Á. - Über den Character des Antagonismus der Cobalaminmonokarbonsäure gegenüber einigen Analogen des Cobalamins.

Zbl.für Bakt., II. Abt., Orig. - sajtó alatt.

8. Eljárás cianokobalaminmonokarbonsav előállítására

/Simon Á., Kelemen Á., Csányi E., Borsy J./:

Magyar szabadalom /1960/, 149.538 sz.

Ez az eljárás kb. 15 külföldi szabadalmat is kapott.

- o - o - o -

