

HATÁSMÓDVIZSGÁLATOK SZELEKTIV ANTIFUNGÁLIS AKTIVITÁSÚ

SZTEROIDGLIKOZIDOKKAL

Doktori értekezés

Készítette és a József Attila Tudományegyetem

Természettudományi Karához benyújtja:

Kevei Ferenc

Készült:

a JATE Növényélettani és Mikrobiológiai Intézetében

1967



Diss. B 267



## Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS . . . . .	3
2. ANYAGOK, MÓDSZEREK, KISÉRLETI ELŐZMÉNYEK, SZÜRŐVIZSGÁLATOK	
2.1.1. A vizsgált anyagok és azok legfontosabb fizikai, kémiai állandói. . . . .	6
2.1.2. Az alkalmazott legfontosabb táptalajok és pufferek .	18
2.2.1. Vizsgálataimhoz használt tesztorganizmusok kiválasz- tása, szűrővizsgálat. . . . .	21
2.2.2. Vizsgálataimhoz alkalmazott mikroorganizmusok előne- velése. . . . .	28
2.3.1. Rétegekromatográfiás elválasztási eljárások . . . . .	29
2.3.2.1. A <i>Solanum laciniatum</i> glikoalkaloidáinak kinyerése.	33
2.3.2.2. A <i>Solanum lycopersicum</i> szteroidglikozidjának kinye- rése. . . . .	35
2.4.1.1. In vitro komplexképzési vizsgálatok módszere . . .	36
2.4.1.2. Hatásmódvizsgálatok általános menete . . . . .	37
2.4.2.1. A szteroidglikozidok gombák által történő felvéte- lének, megkötésének meghatározása . . . . .	38
2.4.2.2. Aminósavkiáramlás mennyiségi, minőségi meghatáro- zása. . . . .	40
2.4.2.3. Kálium kiáramlás mennyiségi meghatározása. . . . .	41
2.4.2.4. Élősejtszám alakulásának vizsgálata szteroidgliko- zid kezelés hatására. . . . .	41
2.4.2.5. Az ergoszterin mennyiségi meghatározása. . . . .	43
2.4.2.6. Szteroidglikozidok mennyiségi meghatározása komp- lexképzés során . . . . .	44
3. A KISÉRLETEK RÉSZLETES ISMERTETÉSE, A RÉSZEREDMÉNYEK ÉRTÉKE- LÉSE ÉS MEGVITATÁSA	
3.1. Azonos alapvázu, különböző számú cukormolekulát tar- talmazó szteroidglikozidok aktivitásának meghatározása. . .	46

3.2.1. In vitro komplexképzési vizsgálatok. . . . .	52
3.2.2. A komplexképzés körülményei . . . . .	59
3.3. A szteroidglikozidok élő sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata. . . . .	64
3.3.1. Szteroid megkötés. . . . .	64
3.3.2. Aminósav kiáramlás . . . . .	75
3.3.3. Kálium kiáramlás . . . . .	85
3.4.1. A szteroidglikozidok élő sejtekre vonatkozó hatásvizsgálatai adatainak értékelése /rezisztencia okának vizsgálata/. . . . .	87
3.5. Élősejtszám alakulása szteroidglikozid kezelés hatására . . . . .	92
4. ÖSSZEFOGLALÁS . . . . .	97
5. IRODALOM. . . . .	101

1.

Bevezetés

Az irodalomból már korábban ismert, hogy különböző szteroidglikozidok - szteroidszaponinok, szteroidalkaloidok - mikrobaellenes, antifungális aktivitásúak (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20). Ezek közül néhány szteroidról közöltek szűkebb kvantitatív hatásspektrum adatokat is. Az eddig vizsgált és hatásukban összehasonlított vegyületek különböző aglikonúak voltak. Nem végeztek széles hatásspektrum felvételi vizsgálatokat azonos aglikonú származéksoron belül. Igen kevés adat utal a szteroidglikozidák feltételezett hatásmódjára elsődleges támadási pontjára.

A fentiek alapján vizsgálataim célja: antifungális aktivitású szteroidglikozidok. hatásmódjának tisztázása, ezen belül főként az elsődleges támadási pont meghatározása volt.

Vizsgálataimat a *Solanum laciniatum* AIT. /Orvosi csucsor/ (18, 21, 22, 23) szteroidglikozid származéksorával végeztem. A növény glikoalkaloidáiról ismert volt, hogy antifungális aktivitásúak (18), az egyes származékok széleskörű kvantitatív hatásspektrum felvétele azonban csak részben történt meg. Ismert volt az is, hogy a növényben előforduló glikozidok gyakorlatilag egységes aglikonúak (18, 40) /illetve az azonos aglikonú származéksor könnyen tisztítható a növényből/ és ezekből parciális hidrolizissal más, kevesebb cukrot tartalmazó származékok elkészíthetők (24, 25, 26).

A *Solanum laciniatum*ot vizsgálataimhoz azért választottam mert:

- 1/ Azonos aglikonú származéksor hatását vethettem össze.
- 2/ Az elméleti jellegű kérdések tisztázásán túlmenően a vizsgált anyagok gyógyászati fontosságúak lehetnek, mint antifungális antibiotikumok (27), esetleg mint tumor ellenes hatóanyagok (28), vagy a gyógyászat egyéb területein, mint újabban kimutatták az arterio-sclerosis gyógyításában is felhasználhatók (31, 32). Jelenleg a szolaszodin aglikonú glikozidok mint szteroid-hormongyártási alapanyagok hasznosulnak a gyógyszer-gyártásban (18, 29, 33). /Európában jelenleg európai nyersanyagra támaszkodva gyakorlatilag ez az egyetlen vegyületcsoport a szteroid-hormongyártás számára/. Mikrobiológiai tapasztalatok további segítséget nyújthatnak, mint ahogy nyújtottak eddig is a hormonalapanyag termelés fokozásában.

Jelen vizsgálataim elsősorban elméleti jellegűek.

Kísérleti munkám során a következő célkitűzéseim voltak:

- 1/ Azonos aglikonú különböző cukormolekulákat tartalmazó szteroidglikozidok szerkezet és aktivitásbeli különbségeinek összehasonlítása.  
Ennek érdekében az eddigieknél szélesebb kvantitativ hatásspektrum felvétele más szteroidokra érzékeny mikroorganizmusokkal. A vizsgálat során a rezisztens mikroorganizmusok megkeresése.
- 2/ Aktivitásukban különbséget mutató azonos aglikonú szteroidglikozidok esetében a különbség okának vizsgálata.

3/ Rezisztens mikroorganizmusokkal a rezisztencia okának felderítése.

A fenti hármaskérdés körnek megfelelően, irodalmi adatok alapján az alábbi munkahipotézisek állíthatók fel:

A/ Az első tisztázandó kérdéssel kapcsolatosan az irodalomból ismert, hogy különböző aglikonú szteroidok aktivitása között különbség van (2, 15, 17), feltehetően különbség fog mutatkozni az azonos aglikonú de különböző cukorszámú szteroidglikozidok között is.

TSCHESCHE és munkatársa (30) szerint azonos aglikonú származéksoron belül jelentős aktivitásbeli különbségek mutatkoztak a hemolízist illetően.

B/ Feltételezhető, hogy a szteroidglikozidok hatásának oka a szterinekkal történő komplexképzés. Várható korreláció a komplexképzés és az antifungális aktivitás között /hemolízis vonatkozásában ismertek ilyen adatok (30)/.

C/ Rezisztencia esetén kétféle ok lehetséges az eddigi tapasztalatok alapján:

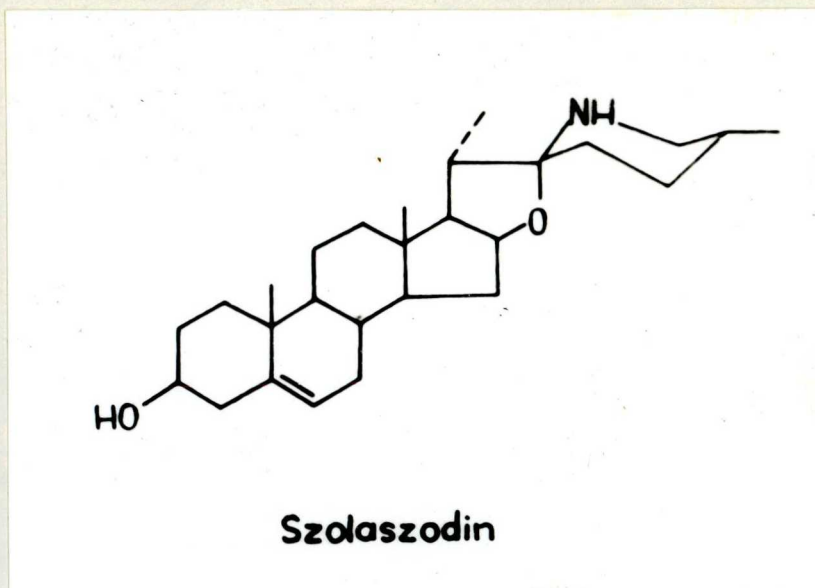
a/ A hatóanyag enzimátikus inaktiválása, ami sok baktériumellenes antibiotikum esetén a vegyület enzim hatására történő lebomlását jelenti pl. a penicillin (34), kanamycin (35), kloromycetin (37) esetében, vagy pedig a hatóanyag enzimátikus blokkolását pl. a paramomycin, kanamycin (36) esetében.

b/ A mikroorganizmus a hatóanyagot nem veszi fel /a hatóanyag nem jut a sejtbe/ pl. az aktidion (38) és a griseofulvin (39, 57, 66) esetében.

2.

2.1.1. A vizsgált anyagok és azok legfontosabb fizikai kémiai állandói

S z o l a s z o d i n : A Solanum laciniatum Ait. alkaloid jellegű szteroid-glikozidjainak aglikonja. Szintelen, kristályos anyag, vízben gyakorlatilag nem, számos szerves oldószerben jól oldódik. Op.:  $200^{\circ}\text{C}$ , fajlagos forgatóképessége  $(\alpha)_{\text{D}}^{20} = 103-104^{\circ}$  /kloroformban/. Összegképlete:  $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{O}_2\text{N}$ , molsúlya: 413,622. A vegyület a növényben található glikozidok hidrolitikus bomlástermékeként keletkezik. Szerkezete, pontos sztereokémiai felderítése SCHREIBER K. és munkatársai (41, 42, 43, 44, 45) nevéhez fűződik. (1. ábra).

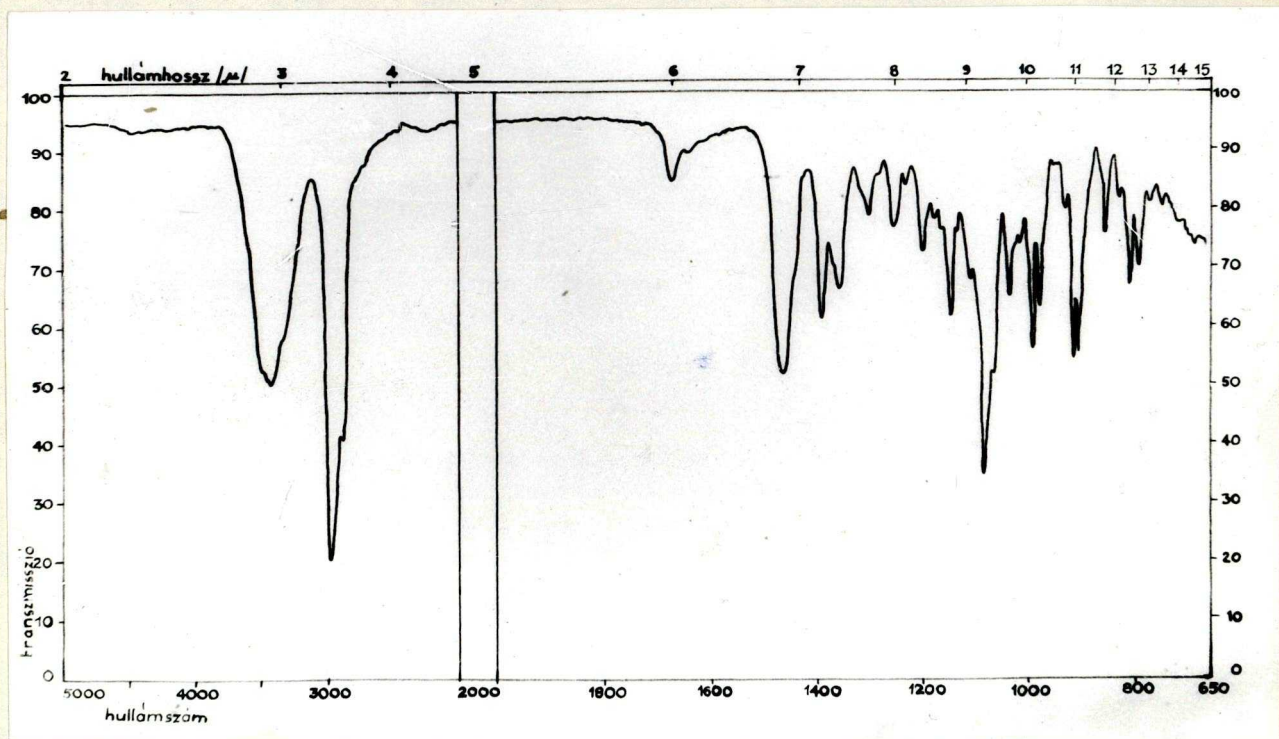


1. ábra

$\Delta^5$  telitetlen kötést tartalmaz, spiroaminoketál típusú aglikon, a 22-es spiroszénatom pördülete jellemzi. Előállítható



savas hidrolizissal /ebben az esetben mellékreakcióként lejátszódhat a diénképződés (26) is, új telítetlen kötés kialakulása  $\Delta^3$ -as helyzetben/, illetve mikrobiológiai lebontással. Infravörös szinképe KBr-ban lett felvéve (2. ábra).



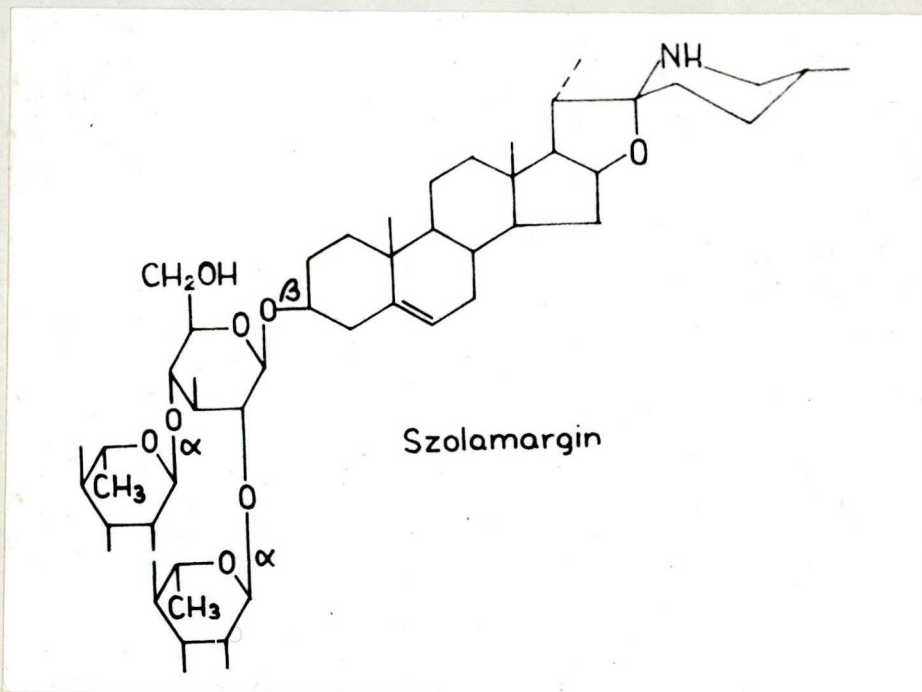
2. ábra

Vizsgálataimhoz használt solasodin a Kőbányai Gyógyszerárúgyár /Richter/ terméke, p.a. minőségű.

A következő három anyag a *Solanum laciniatum* glikoalkaloidjai. A növény minden részében megtalálhatók, de eltérő mennyiségekben (18). A levél, illetve fiatal hajtásvégek tartalmazzák legnagyobb mennyiségben a szteroidokat, kinyerésük is ebből a részből történt. Mindhárom anyagot magam vontam ki a növényből és tisztítottam az irodalomban eddig le nem irt új eljárással.

Kinyerésük módszerének részletes leírását lásd 33. oldal.

**S z o l a m a r g i n** : szintelen, kristályos anyag, savas közegben jól, neutrális semleges közegben rosszul, alacsony szénatomszámú alkoholokban, glicerinben, dioxánban jól, egyéb szerves oldószerekben rosszul oldódik. Op.:  $301-303^{\circ}\text{C}$  /dekomp./, fajlagos forgatási értéke  $(\alpha)_{\text{D}}^{20} = -110^{\circ}$  /piridinben/. Összegképlete:  $\text{C}_{45}\text{H}_{73}\text{O}_{15}\text{N}$ , molsúlya: 868,042. Szerkezetét KUHN R. és munkatársai tisztázták (46, 47) (3. ábra).

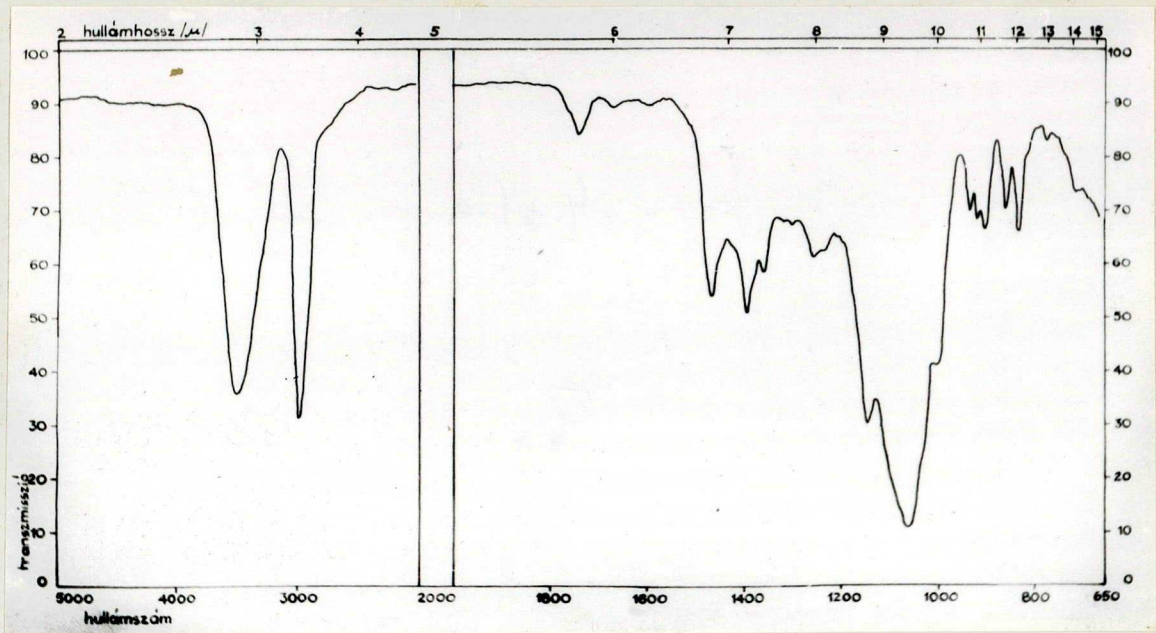


3. ábra

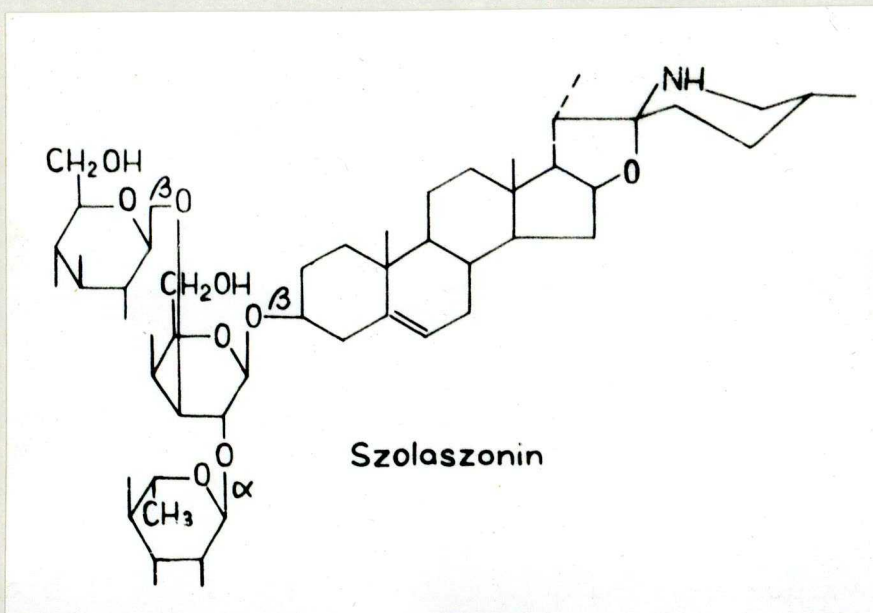
U.V.-ben nincs jellemző abszorpciós spektruma. Infravörös színképe KBr-ban lett felvéve (4. ábra).

**S z o l a s z o n i n** : szintelen, kristályos anyag, oldékonysága hasonló a szolamarginéhoz. Op.:  $292-294^{\circ}\text{C}$  /dekomp./, fajlagos forgatási értéke  $(\alpha)_{\text{D}}^{20} = -75^{\circ}$  /piridinben/. Összegképlete:

$C_{45}H_{73}O_{16}N$ , molsúlya: 884,042. Szerkezetét BRIGGS L. H.,  
CAMBIE R. C. és HOARE J. L. tisztázták (48). (5. ábra).

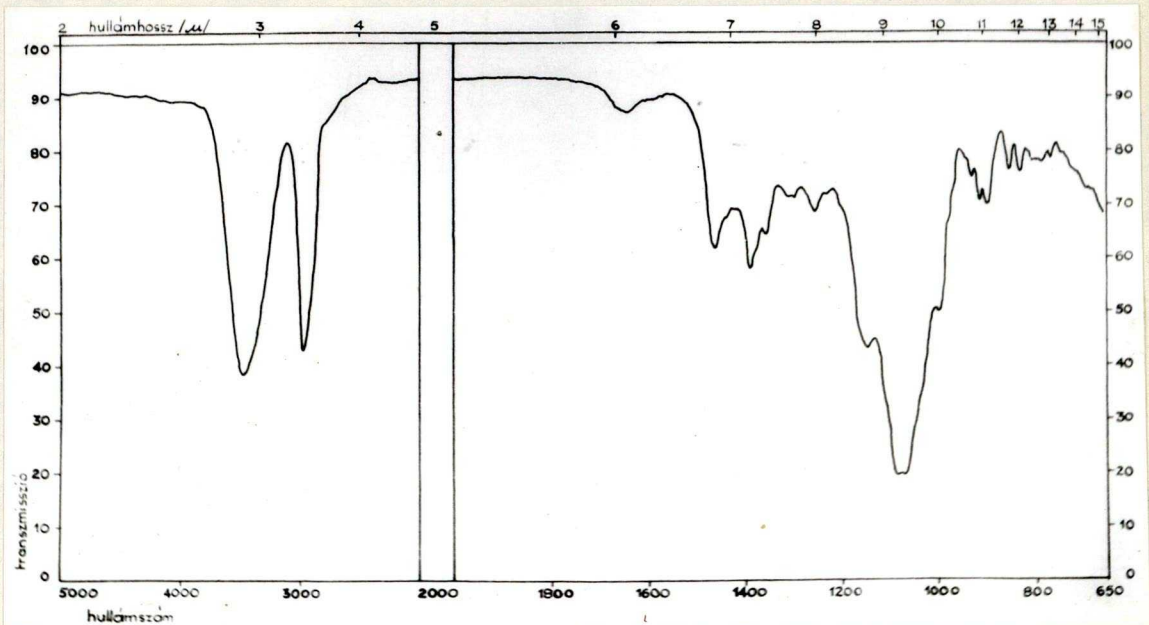


4. ábra



5. ábra

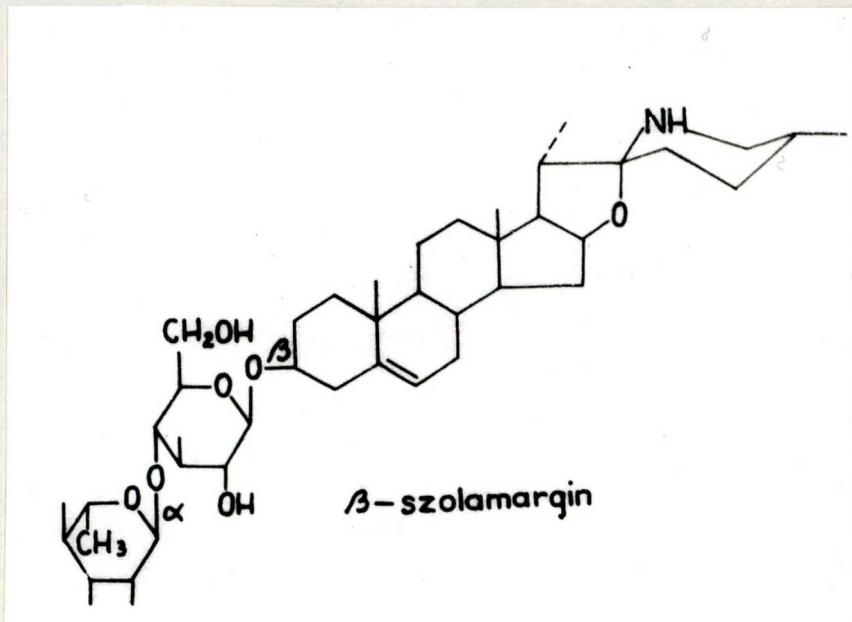
U.V.-ben nincs jellemző abszorpciós görbéje, infravörös színképe KBr-ban lett felvéve (6. ábra).



6. ábra

$\beta$  - s z o l a m a r g i n : szintelen, kristályos anyag. Oldékonysági viszonyai azonosak a szolamarginéval. Op.: 225-226°C /dekomp./, fajlagos forgatóképessége  $(\alpha)_D^{20} = -105^\circ$  /piridinben/.  
Összegképlete:  $C_{39}H_{63}O_{11}N$ , molsúlya: 721,902. A szolamargin hidrolízis termékének tekinthető./Vizsgálataim szerint a friss növényből etanollal extrahálva nem mutatható ki, csak enyhe savas extrakció alkalmával keletkezik, vagy lassú szárítás után. Irodalmi adatok is amellet szólnak, hogy a  $\beta$ -szolamargin feldúsulása enzimátikus vagy kémiai hidrolitikus folyamat<sup>következménye.</sup> (18, 50)/. A szolamargintól csak egy rhamnóz hiányában tér el. SCHREIBER és munkatársai (49) foglalkoztak a szerkezet megállapításával. Nem tisztázott, hogy az aglikonhoz kapcsolódó

glükózon 2-es vagy 4-es helyzetben egyaránt kötődhet-e az egy rhamnóz molekula. A savas hidrolizissal nyert termék mindig egységesnek bizonyult, itt 4-es helyzetű a rhamnóz kapcsolódása (7. ábra).

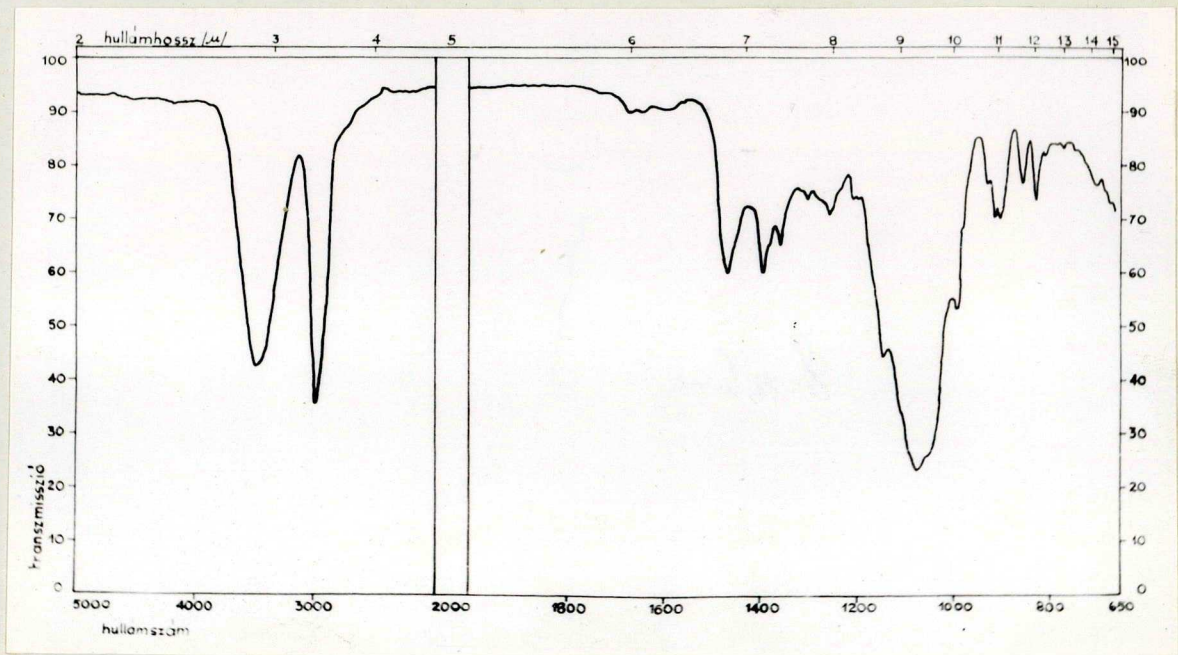


7. ábra

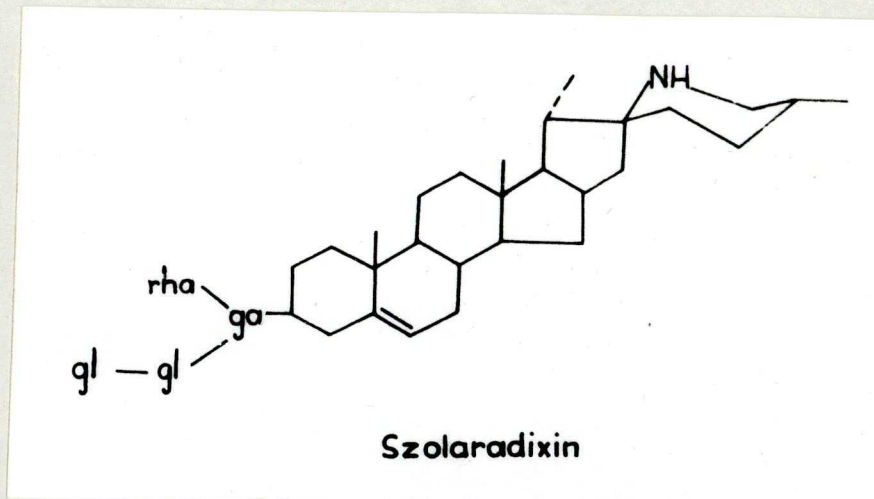
/Mikrobiológiai lebontások során egyes esetekben a  $\beta$ -szolamargin mellett finom elválasztást alkalmazva igen kis  $R_f$  eltéréssel kis mennyiségben keletkezett azonban más, hidrolitikus termék is. A szerkezetet figyelembe véve elvileg két  $\beta$ -szolamargin izomér lehetséges (51). Jellemző U.V. szinképe nincs, infravörös spektrum felvétele KBr-os közegben történt (8. ábra).

S z o l a r a d i x i n : szintén a *Solanum laciniatum* szteroid-glikoalkaloidája, a gyökérben fordul elő nagyobb mennyiségben. Szemben az eddig ismertetett szteroidokkal vízben jól oldódik, oldékonysága egyébként egyezik az eddig felsorolt anyagokéval. Szintelen, kristályos vegyület. Összegképlete:  $C_{51}H_{83}O_{21}N$  ,

molsúlya: 1046,182. Szerkezete sematikususan a 9. ábrán látható.



8. ábra



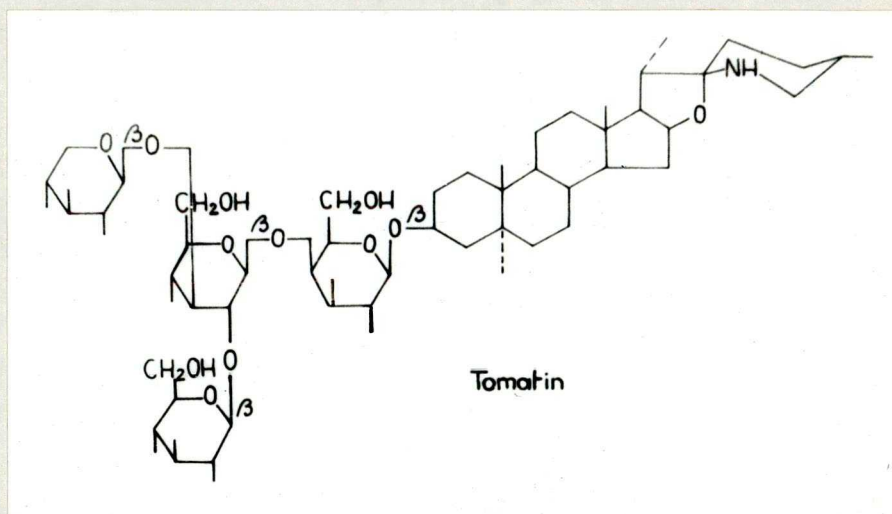
9. ábra

A pontos szerkezet, a cukrok kapcsolódása még nem ismert.

**γ - s z o l a m a r g i n** : a szolamargin hidrolitikus műterméke, egyike a szintetikusan is előállított szolaszodin aglikonú glikozidoknak (24, 25). Parciális hidrolízis alkalmával keletkezik. Összegképlete:  $C_{33}H_{53}O_7N$ , molsúlya: 573,762.

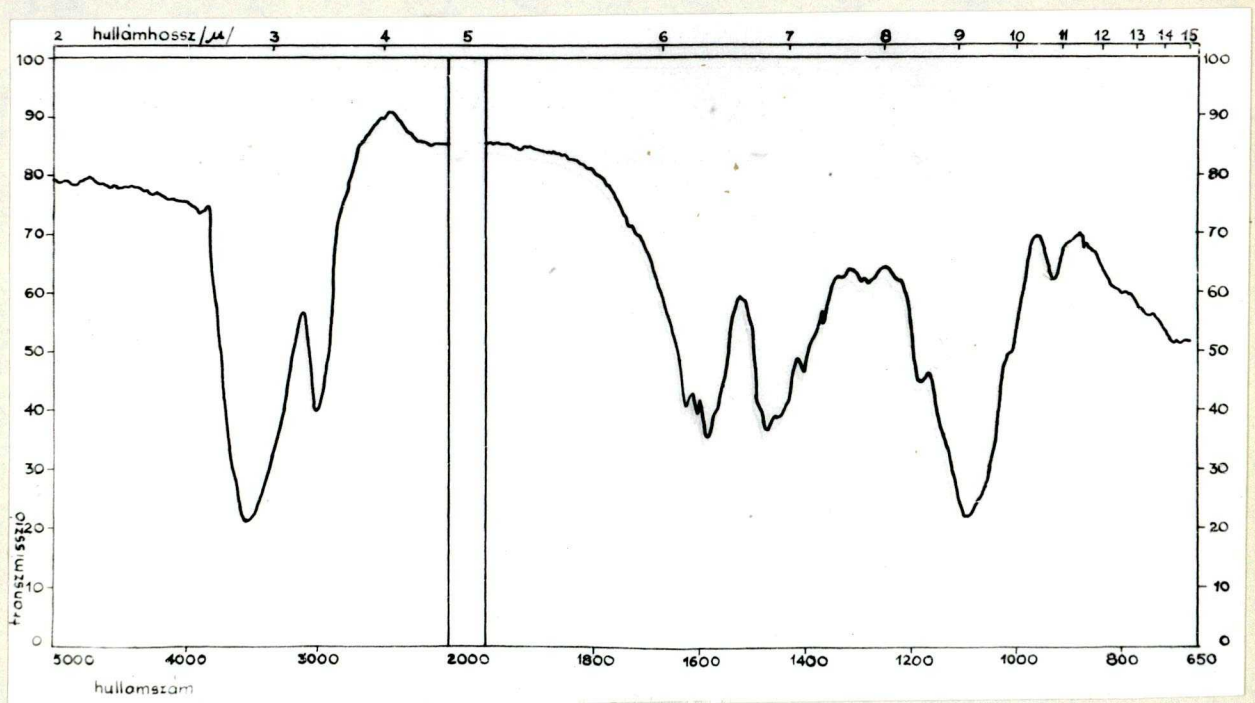
Szolaszodin aglikonú egy glükózt tartalmazó szteroidglikozid. Felhasználása, alkalmazása vizsgálataink során viszonylag kis területen történt, így egyéb paramétereinek leírását mellőzöm. A fenti két anyag a Gyógyszerkutató Intézet Növénykémiai Osztályáról (Dr. Bite Pál/ származik.

**T o m a t i n** : a *Solanum lycopersium* L. szteroid glikoalkaloidja (55, 56). Szintelen, kristályos anyag. Op.:  $272-274^{\circ}C$  /dekomp./, fajlagos forgatóképessége:  $(\alpha)_D^{20} = -19^{\circ}$  /piridinben/. Összegképlete:  $C_{50}H_{83}O_{21}N$ , molsúlya: 1034,222. Szerkezetét KUHN R., LÖW I. és TRISCHMANN H. tisztázták (53) (10. ábra).



10. ábra

Aglikonja nem tartalmaz telitetlen kötést és az F-gyűrű tér-állásában ellentétes az *S. laciniatum* glikozidjainál tapasztaltaknál, a 22-es spiro-szénatom ellentétes pördületű (51, 54). Jellemző tulajdonsága a szterinekkal történő/koleszterin, ergoszterin/ intenzív molekula-komplex képzés (59), amely kvanti lejátszódik és így pl. koleszterin mennyiségi meghatározására alkalmas (60, 61). U.V.-ben nincs jellemző abszorpciós maximuma. Infravörös képe KBr-ban lett felvéve (11. ábra).



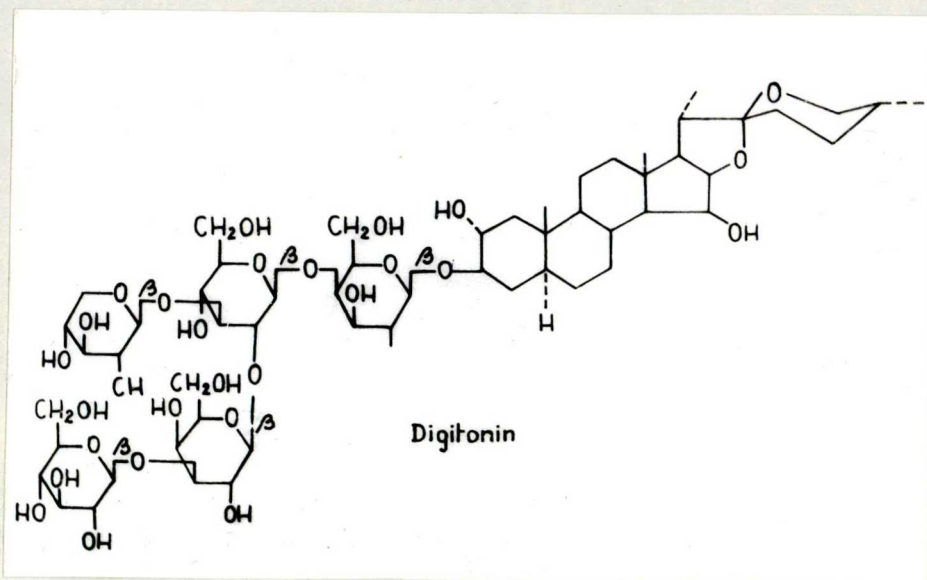
11. ábra

Az anyagot munkám során magam izoláltam és tisztítottam (35. oldalon ismertetett módon) új, eddig le nem irt eljárással.

**D i g i t o n i n** : szaponin típusú szteroidglikozid. A *Digitalis purpurea*-ban fordul elő. Szintelen, kristályos



anyag. Oldószerekben viselkedése eltér az alkaloid típusú anyagoktól, kis molekulájú alkoholokban, dioxánban, vízben egyaránt jól oldódik. Összegképlete:  $C_{56}H_{92}O_{29}$ , molsúlya: 1229,353. Szerkezetét véglegesen TSCHESCHE R. és WULF G. 1963-ban tisztázták (62) (12. ábra).

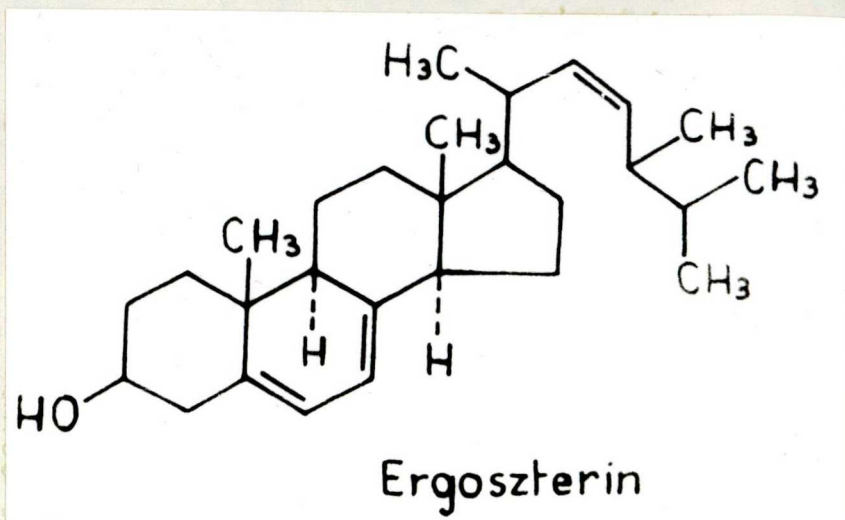


12. ábra

Szterinekkel intenzíven molekula-komplexet képez, (63, 64, 58, 68) amely reakció pl. koleszterin meghatározásra alkalmas (65). U.V.-ben jellemző abszorpciós maximuma nincs. Vizsgálataimhoz modell-anyagként használtam fel. Az alkalmazott digitonin Merck illetve Reanal kiszerezésű purum minőségű gyári készítmény volt.

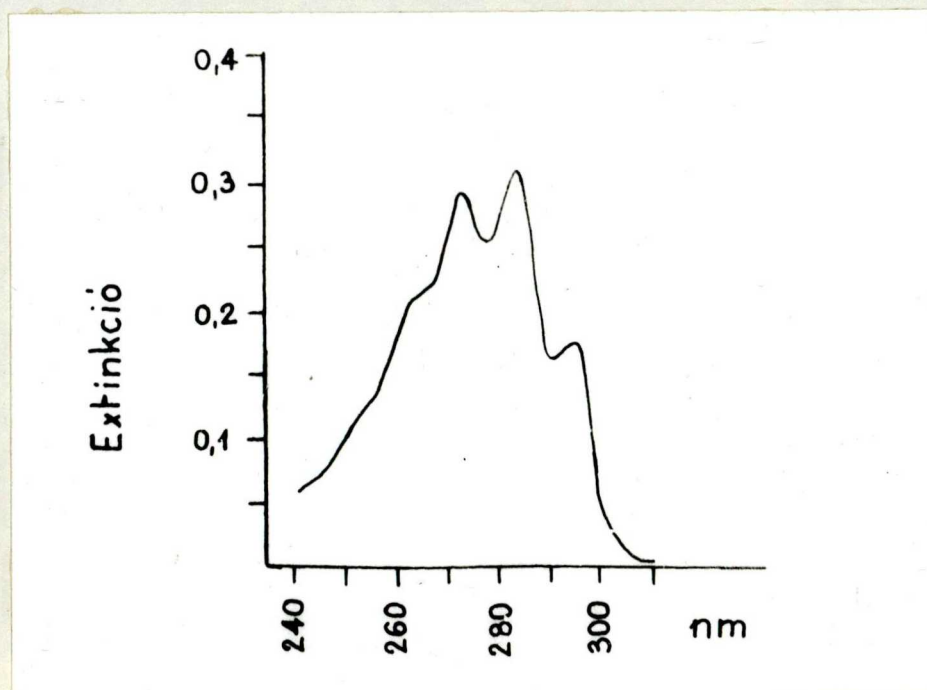
**E r g o s z t e r i n :** Szintelen, kristályos vegyület. Fényen, oldatban vagy kristályos állapotban egyaránt bomlékony. A legnagyobb mennyiségben előforduló mikoszterin, a sejtmembrána fontos alkotója a gombák jelentős részénél. Szerves oldósze-

rekben nagyobb részben jól, a vízben igen kis mértékben oldódó vegyület. Op.: 160-163°C, fajlagos forgatóképessége:  $(\alpha)_D^{20} = -132^\circ$  /kloroformban/. Összegképlete:  $C_{28}H_{44}O$ , molekulásúlya: 396,632. Szerkezete a 13. ábrán látható.



13. ábra

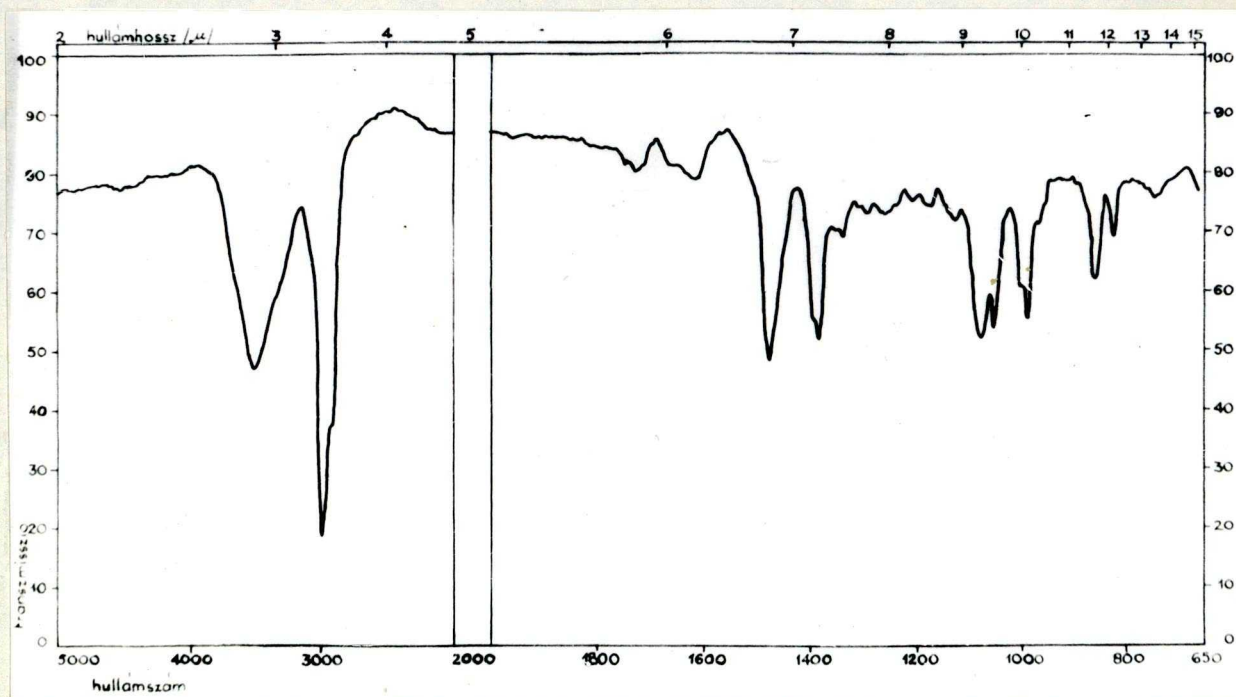
Jellemző abszorpciós görbéje van ultraibolya tartományban.



14. ábra

/Maximumok: 271 illetve 282 nm-nél/

Ez a tulajdonsága mennyiségi meghatározás céljára jól felhasználható (lásd 43. oldal). Infravörös szinképét KBr-ban vettem fel (15. ábra).



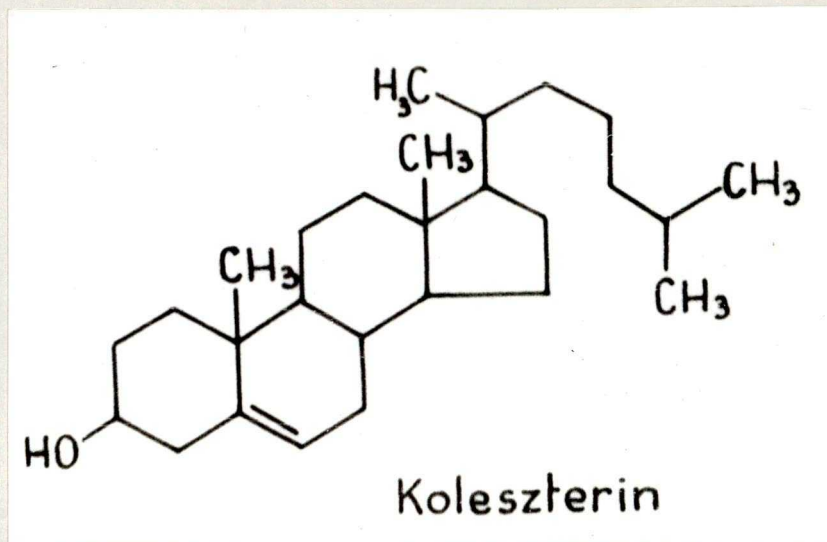
15. ábra

**K o l e s z t e r i n** : Szintelen, kristályos anyag. A legkorábban ismert zooszterin. Oldódási viszonyai megegyeznek az ergoszterinével, az ergoszterinnél jóval stabilabb vegyület. Összegképlete:  $C_{27}H_{46}O$ , molekulásúlya: 386,665. Szerkezete látható a 16. ábrán.

U.V-ben az ergoszterinhez hasonlóan jellegzetes abszorpciós maximumokkal bír. A vizsgálataimhoz felhasznált koleszterin Reanal kiszerezésű p.a. minőségű gyári készítmény.

Az egyes vizsgálatok során felhasznált anyagok mért fizikai állandói igen jól egyeznek a legutóbbi időszakban közölt

irodalmi adatokkal /a felsorolt vegyületek irodalmi adatai,  
Op., forgatóképesség, szerzőnként igen nagy eltérést mutatnak/.



16. ábra

### 2.1.2. Az alkalmazott legfontosabb táptalajok és pufferek

Bouillon táptalaj kiegészítve cukorral ill. élesztő ki-  
vonattal:

Összetétele: 2 db Yestor kocka

4 g pepton

10 g glükóz

10 ml élesztőfőzet

1000 ml csapvizre

3%-nyi agar-aggarral kiegészítve

Az élesztőfőzetet 10 g élesztő/100 ml víz felfőzött, majd 10 perc  
5000 ford./perc lecentrifugált anyag felülúszójaként nyerhető.

A táptalajt főleg mikroorganizmusok előnevelésére ill. kvali-

tativ szűrővizsgálatok végzésére használtam. A táptalajt pH 7-re állítva 5%-os HCl-lel /természetes állapotban gyengén lúgos puffereltségű/ alkalmaztam leggyakrabban, így baktériumok gombák tenyésztésére egyaránt felhasználható. Savas ill. lúgos pH beállítás 5%-os HCl- ill. 5%-os NaOH-val történt.

Szintetikus táptalaj:

Összetétele: 5 g  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$

1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,5 g  $\text{MgSO}_4$

0,5 g  $\text{CaCl}_2$

20 g glükóz

10 ml élesztőfőzet

1000 ml desztillált vízre

3%-nyi agar-aggarral kiegészítve.

Felhasználása azonos az előző táptalajnál felsoroltakkal. Különböző pH értékeknél alkalmaztam.

Szintetikus táptalaj fonalgombák fermentálásához:

Összetétele: megegyezik a szintetikus táptalajjal, csak szilárdító anyag nélkül. Alkalmazható élesztőgombák ill. baktériumok szaporításához is. pH 6 körül, mesterségesen nem befolyásolom.

Táptalaj növénykórokozó Pythium és Phytophthora fajok fermentálásához:

Összetétele: egyezik a szintetikus táptalaj folyékony változatával kiegészítve 5 g casein hidrolizátummal. pH 6 körül, mesterségesen nem állítom.

Táptalaj élesztőgombák lemezöntéses számolásához:

Összetétele: 1 db Yestor kocka

10 g glükóz

5 g  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$

1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,5 g  $\text{MgSO}_4$

10 ml élesztőfőzet

1000 ml viz

1%-nyi agar-agar

Maláta táptalaj:

Összetétele: 1000 ml csapvizre

5 vagy 10%-nyi malátakivonat %-os beállítás refraktométerrel/

3-4%-nyi agar-agar

Felhasználása gombák előnevelésére összehasonlító vizsgálatokhoz. pH 5,5 körül, mesterséges beállítás csak speciális esetekben szükséges. Ritkábban alkalmaztam a táptalaj szilárdító közeg nélküli változatát.

pH 7 foszfátpuffer M/15:

Összetétele: 1000 ml desztillált vizre

3,449 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

7,362 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /Sörensen/x  $2\text{H}_2\text{O}$

Felhasználása: mikroorganizmusok átmosására, hatásmódvizsgálatoknál, élősejtszám változás vizsgálatoknál inkubációs közegként.

pH 7 Mc Ilvain pufferoldat:

Törzsoldat összetétele: 0,2 m  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  oldat  
0,2 m citromsav oldat

pH 7 oldat 1000 ml-hez 823 ml foszfát

177 ml citromsav oldat szükséges

Felhasználása: mikroorganizmusok átmosása, hatásmódvizsgálatoknál K ion effúzió meghatározásakor.

Pufferelt tápleves:

Összetétele: 1000 ml pH 7-es foszfát-pufferbe

5 g  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$

0,5 g  $\text{MgSO}_4$

10 g glükóz

+ 2 ml szintetikus vitamin oldat (összetétele:

0,2 mg biotin

0,2 " fólsav

40,0 " Ca-pantotenát

200 " mezo-inozitol

40 " niacin

20 " p.-amino-benzoésav

40 " piridoxinhidroklorid

40 " thiamin - " -

20 " riboflavin

200 ml víz

Felhasználása: élősejtszám változás vizsgálatoknál inkubációs közegként.

2.2.1. Vizsgálataimhoz használt tesztorganizmusok kiválasztása

Hatásmódvizsgálatokhoz, szelektív antifungális anyagokról

lévén szó, a megfelelő mikroorganizmusok kiválasztását érzékenységi próba alapján végeztem el. Intézetünkben folyó korábbi munkák során ilyen irányú tájékoztató jellegű vizsgálatok már voltak (71, 67).

pH 7-es glükózos bouillon táptalajon sűrű szuszpenzióval, illetve konidiumsuszpenzióval történő leoltás után lyukteszt-módszerrel /9 mm-es hengereket vágok ki a táptalajból/ 1 mg/ml koncentrációjú tisztított glikozidkeverék antifungális aktivitását mértem a teljes gátlózóna átmérő alapján. Lyukanként 0,1 ml 50%-os etanolban oldott anyagot vittem be. 24 órás 30°C-os inkubálás után értékeltem az eredményeket. Összehasonlításképpen tiszta szolamargin, illetve szolaszonin, valamint vizsgálataim során modellvegyületként alkalmazott tomatin és digitonin azonos töménységű oldatának gátlózóna átmérőjét is felvettem /I. táblázat/.

Az I. táblázatból kitűnik, hogy a glikozidkeverék s a szolamargin gyakorlatilag azonos nagyságú gátlózónát eredményezett. A keverék rétegekromatográfiásan igen kevés, alig 10%  $\beta$ -szolamargin tartalmat tartalmaz. A szolamargin szolaszonin 50-40% arányban fordul elő benne. Intézetünkben folyó korábbi vizsgálatok, valamint saját méréseim alapján megállapítást nyert, hogy a szolamargin, szolaszonin megközelítőleg egy-egy arányú keveréke úgy hat, mintha tiszta szolamargin lenne, erre utalnak ALKIEWITZ J. és munkatársai újabb vizsgálatai is (27) /nem additív hatásról van szó/. A két glikozid között synergista kölcsönhatás van /lásd 1. kép/. Más antibiotikus anyagok esetén is ismert a synergizmus jelensége (69, 70).



I. táblázat

Fajnevek	Gátlózóna Ø mm-ben					Növekedés mértéke
	glikozid keverék	szolamargin	szolaszonin	tomatin	digitonin	
<b>Saccharomycetaceae</b>						
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	12	12	⊠	21	24	+
<i>Saccharomyces diastaticus</i>	16	16	13	23	29	++
<i>Saccharomyces pretoriensis</i>	17	17	11	24	28	+
<i>Saccharomyces steineri</i>	19	19	14	24	30	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> R.XII	12 <sup>x</sup>	11	-	19	25	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> /Pék/	⊠	11	-	21	25	+++
<i>Saccharomyces rouxi</i>	16 <sup>x</sup>	16 <sup>x</sup>	⊠	28 <sup>x</sup>	24	igen lassu
<i>Debaryomyces globosus</i>	11	11	-	15	21	+++
<b>Hansenulaceae</b>						
<i>Hansenula anomala</i>	16	16	11	24	26	+++
<i>Pichia saitoi</i>	17	17	12	23	26	+++
<b>Fabosporaceae</b>						
<i>Kluyveromyces polysporus</i>	⊠	⊠	-	11	13	++
<b>Cryptococcaceae</b>						
<i>Candida pulcherrima</i>	15 <sup>x</sup>	15 <sup>x</sup>	-	24 <sup>x</sup>	28	igen lassu
<i>Candida utilis</i>	11	11	-	11	13	+++
<i>Candida solani</i>	-	-	-	-	⊠	+++
<i>Torulopsis stellata</i>	16	17	12	24	28	+++
<i>Torulopsis vanzylii</i>	19	18	13	23	26	++
<i>Rhodotorula rubra</i>	⊠	⊠	-	19 <sup>x</sup>	12	igen lassu
<i>Prototheca ubrizsyi</i> <sup>o</sup>	14 <sup>x</sup>	14 <sup>x</sup>	-	30 <sup>x</sup>	22 <sup>x</sup>	++
<b>Mucorales</b>						
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	22	22	16	27	26	+++
<i>Mucor hiemalis</i>	⊠	⊠	-	18 <sup>x</sup>	20 <sup>x</sup>	++
<i>Mucor racemosus</i>	12 <sup>x</sup>	12 <sup>x</sup>	-	18 <sup>x</sup>	21 <sup>x</sup>	++
<b>Fungi imperfekti</b>						
<i>Aspergillus foetidus</i>	-	-	-	12	⊠	++
<i>Aspergillus amstelodami</i>	-	⊠	-	⊠	11	+++
<i>Aspergillus japonicus</i>	-	-	-	11	⊠	+++
<i>Aspergillus versicolor</i>	-	⊠	-	18	17	+
<i>Fusarium poae</i>	-	-	-	26	28	++

- = nincs gátlás      ⊠ = minimális gátlás, a zóna még nem mérhető

<sup>x</sup> = a zónahatár nehezen mérhető, nem ad megbízható adatokat, tesztorganizmusként nem alkalmas

<sup>o</sup> = *P. ubrizsyi* fajleírás kéziratban Novák B.K. és Zsolt J.



1. kép

Kölcsönhatást egyéb szteroidglikozid származékok között is vizsgáltam.

Az érzékenységi próba, valamint az egyes gombák növekedési intenzitásának alapján vizsgálataimhoz kiválasztottam két érzékeny: *Pichia saitoi* élesztő (2. kép) és *Syncephalastrum racemosum* (3. kép) fonalagombát, valamint két rezisztens: *Candida solani* (4. kép) élesztő és *Aspergillus japonicus* (5. kép) fonalagombát.

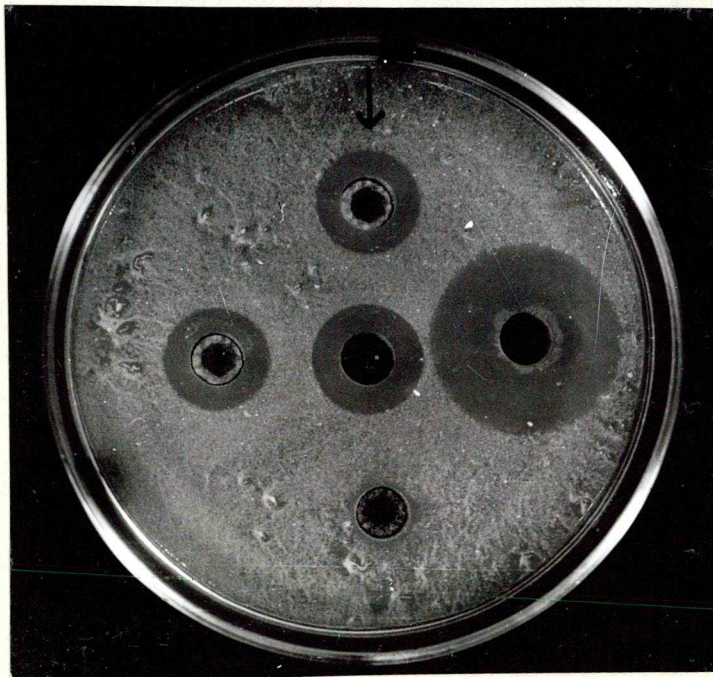
A képeken a vizsgált vegyületek hatása látható, a jelzett részről kiindulva az óramutató járásával ellenkező irányba haladva az anyagok sorrendje a következő: keverék, szolamargin, szolaszonin, digitonin, tomatin.

*Pichia saitoi* /KODOMA KYONO et KODOMA/

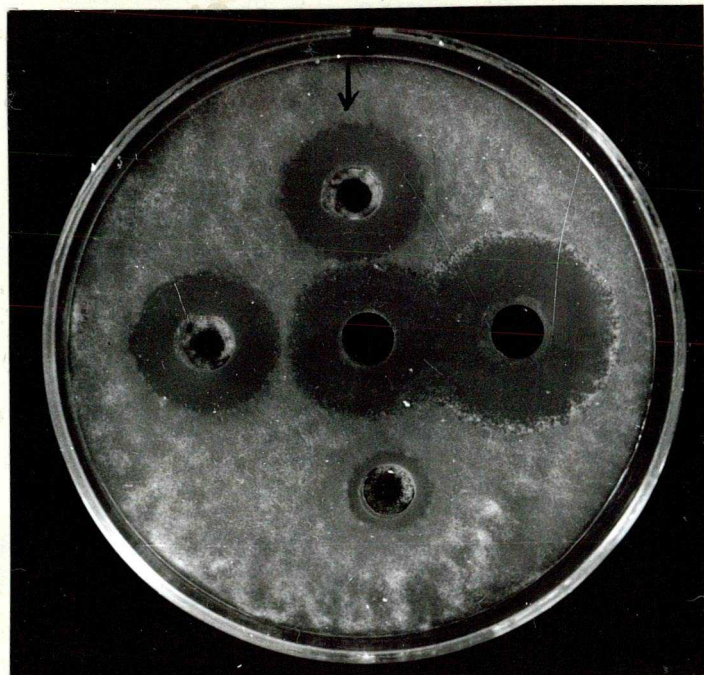
*Syncephalastrum racemosum* /CHON SCHROET/ JATE Növényélettani és Mikrobiológiai Intézet gyűjteményéből, a

*Candida solani* /LODDER et VAN RIJ/ az OKI Mykológiai laboratóriumának gyűjteményéből, az

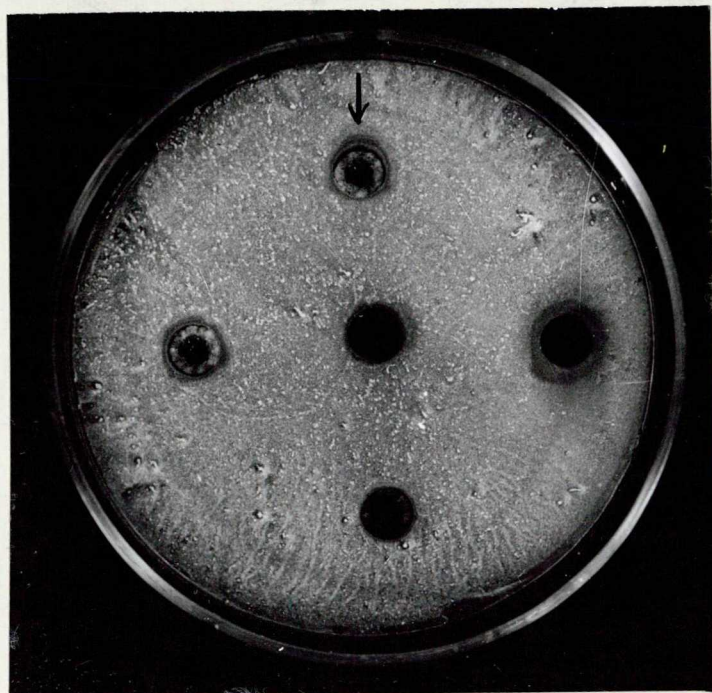
*Aspergillus japonicus* 46 /SAITO/ a Szőlészeti és Borászati Kutató Intézet gyűjteményéből származik.



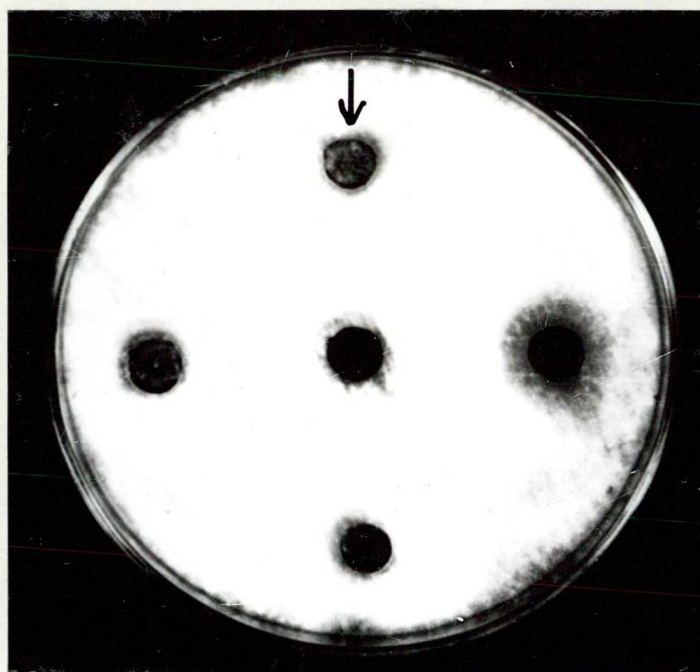
2. kép



3. kép



4. kép



5. kép

A két érzékeny mikroorganizmus esetén a további vizsgálatok során alkalmazandó hatóanyagkoncentráció megállapítása céljából meghatároztam a teljes gátlást előidéző szolamargin

mennyiséget. Két tápközeg esetén vizsgáltam; 3%-os szilárd glükózos bouillonon, illetve szintetikus táptalajon pH 7-en. A *Pichia saitoi* esetében tömény szuszpenzióból oltottam a felületre, és a növekedés megindulását figyeltem a *Syncephalastrum racemosum* esetében pedig konidium szuszpenzióból egy pontban oltottam, illetve 24 órás tenyészidejű telep pereméről 2 mm átmérőjű hengert "ültetek" át micéliumostól a táptalajra és a telepátmérőt mértem. 24 órás 30°C-os inkubálás után mértem. A hatóanyagot a táptalajba etanolban oldva vittem be különböző hígításban /a táptalaj maximum 2%-nyi etanolt tartalmazott/. A vizsgálati adatok a II. táblázatban vannak feltüntetve.

II. táblázat

Szola- margin µg/ml	bouillon pH 7			szintetikus pH 7		
	S.racem. ø mm-ben		P. saitoi	S.racem. ø mm-ben		P. saitoi
	micélium	konidium		micélium	konidium	
200	-	-	-	-	-	-
100	3,5	-	-	-	-	-
50	12	-	-	9	-	-
25	13	3	+	11	5	-
12,5	16	7	+	13	6,5	+
6,25	16,5	8,5	+	14	7,5	+
Kontroll	16	12	+	18	9	+

- = nincs növekedés ill. szaporodás

+ = élesztő szaporodásnak indult

A táblázatban foglalt adatok alapján megállapítható, hogy a 200 µg/ml az a hatóanyag mennyiség, amely tápanyagtól függetlenül gátolja mindkét mikroorganizmust, független az illető

mikroorganizmus fejlettségi állapotától.

A fentiekhez hasonlóan *Phytophthora* és *Pythium* fajokkal vizsgáltam a szolamargin hatását, amelyet táptalajban oldva koncentráció sorozat formájában alkalmaztam. A táptalaj pH 7-es 10%-os maláta, ferdeagar. 200 µg/ml mennyiség, sőt ennél nagyobb dózisok /1000 µg/ml / sem gátolták növekedésüket. Ellenállóképességük megegyezett, így növekedésgyorsaságuk alapján későbbi vizsgálataimhoz *Pythium ultimum* No 23 /TROW/ és másodszorban a *Phytophthora drechsleri* No 3 /TUCKER/ törzseket használtam, amelyek a Növényvédelmi Kutató Intézet /Dr. Vörös József/ gyűjteményéből származnak.

A vizsgált hatóanyagokat antifungális hatásuk ellenére, bizonyos összehasonlító vizsgálatok esetén baktériumokkal szemben alkalmaztam. Ezekhez a vizsgálatokhoz több Gram -, illetve több Gram + baktériumot választottam ki. pH 7-es bouillon táptalajon, mind a lyukteszt módszert, mind pedig a táptalajba oldott állapotban bevitt hatóanyag koncentráció-sorozat elvét alkalmazva, ellenőriztem, hogy a mikroorganizmusok növekedésére nincsenek hatással az alkalmazott szteroidok. A vizsgált baktériumok közül az *Escherichia coli* o 111-es és a *Bacillus subtilis* ATCC 6633-as törzsek viselkedését vizsgáltam részletesen. A fenti törzsek a Szegedi Orvostudományi Egyetem Mikrobiológiai Intézetének, illetve a Debreceni Orvostudományi Egyetem Gyógyszertani Intézetének gyűjteményéből származtak.

Vizsgálataim során különböző *Dermatophytonok* érzékenységi próbáját is elvégeztem, pH 7-es 10%-os malátatáptalajban oldot-

tam a szolamargint, felező higitású koncentrációsorozatot alkalmazva. 100 µg/ml még teljesen gátolta a gombák növekedését, 50 µg-nál esetenként gyenge növekedés már észlelhető volt. A vizsgált mikroorganizmusok:

*Kaufmannwolfia interdigitalis*

*Trichophyton terrestre*

*Trichophyton megninii*

*Microsporon canis*

*Microsporon gypseum*

*Microsporon vanbreuseghemi*

*Keratinomyces ajelloi*

az OKI Mykológiai Laboratóriumának gyűjteményéből származtak. In vitro bőrgombák ellen a szolamargin tehát hatásos /a bevezetőben említett esetleges közvetlen gyógyászati felhasználására ezen a területen nyílna lehetőség/.

### 2.2.2. Vizsgálataimhoz alkalmazott mikroorganizmusok előnevelése

Fonalasgombák tenyésztése: folyékony táptalajon fermentorban /táptalaj összetétele 19. oldal/ történt. Sterilvizés konidium szuszpenzióval oltottam be a táptalajt /masszív oltás egy kémcső tenyészettel/. A keverést és oxigénszükségletet 20 liter/perc steril levegő átfúvatásával biztosítottam. A fermentálás 30°C-on történt a *Syncephalastrum racemosum* esetén 12-14, az *Aspergillus japonicus* esetén 16-18 órán keresztül. A növénypatogén *Phytophthora* és *Pythium* fajok tenyésztésekor

a fermentálást más /összetétel 19. oldal/ kiegészített táptalajban történt és 48 óráig tartott. A tenyésztési idő végén a fermentléből a mikroorganizmusokat centrifugálással /4-6000 fordulat/perc, 10 percen keresztül/ különítettem el, majd megfelelően pufferelt közegben, centrifugálással történő mosást alkalmaztam.

Élesztőgombák, baktériumok tenyésztése: általában szilárd táptalajon tenyésztettem, Roux palackban. Sterilvizés szuszpenzióval inkubáltam /masszív oltás egy kémcsőtenyészetnyi sejt mennyiséggel/. Tenyésztési körülmények  $30^{\circ}\text{C}$ , 12-14 óra táptalaj. /Lásd 20. oldal./ A tenyészidő végén a vizsgálat jellegének megfelelő pufferrel sterilen lemostam a tenyészetet, majd centrifugáltam. Élesztők esetén 4-6000 fordulat/perc, 10 percig, baktériumok esetében 8000 fordulat/perc, 20 percig, a lemosásnál használt pufferoldatban. Élesztőgombákat és baktériumokat egyes esetekben fermentorban is tenyésztettem. A tenyésztési körülmények táptalaj, hőfok egyezik a fonalasoknál alkalmazottakkal, tenyésztési idő 12-14 óra volt.

### 2.3.1. Rétegekromatográfiás elválasztási eljárások

A kromatográfiás elválasztásokat korábbi tapasztalatok alapján (30, 50, 72, 73, 74) az alábbi módszer szerint végeztem.

Az alkalmazott adszorbens szilikagél /Kieselgel G. Merck nach Stahl/ amelyet 1:2 arányban desztillált vízzel szuszpendáltam és  $10 \text{ mg/cm}^2$  vastagságban kentem fel üveglemezre. 24 órás szobahőn való állás után a lemezek aktiválás nélkül felhasználhatók /az esetleges aktiválás 2 órás  $110^{\circ}\text{C}$ -os melegítéssel érhető el/.

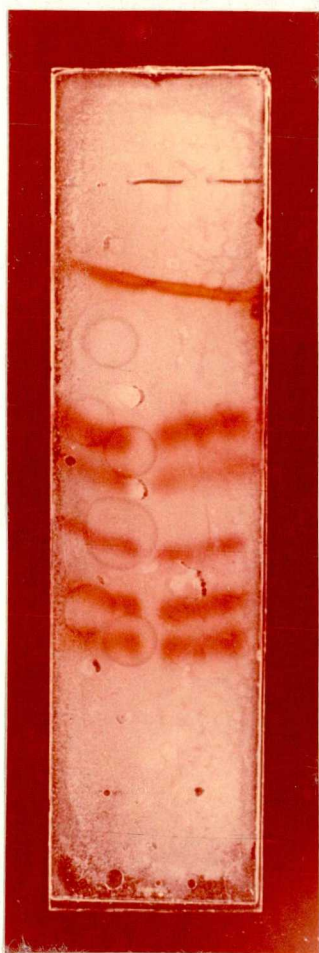


Szteroidglikozidok, szteroidglikoalkaloidák, szteroidszaponinok elválasztására általában 96%-os vagy abszolút etanol, benzol,  $\text{NH}_3$  /kb. 25%-os  $\text{NH}_3$ -mal telített vizes oldat/ és víz különböző arányú elegyét alkalmaztam. /Speciális elválasztási eljárások során más egyéb szerves oldószereket is felhasználtam futtatóelegy-komponensként, alkalmazható savas karakterű futtatók is./ A leggyakrabban alkalmazott oldószer arányok a vizsgált szteroidglikozidok szétválasztására:

etanol : benzol :  $\text{NH}_3$  = 10 : 5 : 0,5

etanol : benzol :  $\text{NH}_3$  : víz = 10 : 5 : 0,5 : 0,5

etanol : benzol :  $\text{NH}_3$  : víz = 10 : 10 : 1 : 1



6. kép

A 6. képen a *Solanum laciniatum* szolaszodin aglikonú szteroidglikozid származéksora látható 10 : 10 : 1 : 1 -ben futtatva. Anyagok sorrendje felülről lefelé: szolaszodin,  $\gamma$ -szolamargin,  $\beta$ -szolamargin, szolamargin, solasozonin, solaradixin.

A kromatogramok előhívását a módosított Hansen-Dam reagenssel végeztem (75).

Az előhívó a  $\Delta^5$  telítetlen szteroidokra specifikus színreakciója ezekkel az anyagokkal pillanatszerű, narancsvörösből lilásvörösbe átmenő, amely szín

tartós. A reagens összetétele: 100 ml jégecethe 100 mg  $\text{FeCl}_3$ -ot oldva, plusz 100 ml cc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -gyel kiegészítve. Az előhívás történhet lepermetezéssel, illetve leborítással /a kromatogrammal egyező nagyságú üveglapon a reagens néhány ml-ét szétkenem, majd a kifejlesztett kromatogramra boritom/. A reagens a fentiekől eltérő szerkezetű szteroidok előhívására is alkalmas, de színreakciója eltér, színkifejlődési idő megnő.

A szterinek futtatását az előbbieknél lényegesen apolárosabb rendszerekben végeztem. Általában benzol : etanol, illetve benzol : aceton különböző arányú elegyében futtattam. A leggyakrabban alkalmazott oldószer arány 10 : 2. A kromatogramok előhívása történhet a módosított Hansen-Dam reagenssel, itt is stabil színek jelennek meg, az ergoszterinél kékesszürke, a koleszterinnél barnásvörös, vagy barnászürke /koncentrációtól függően/.

Mind a szterinek, mind a szteroidglikozidok előhívása elvégezhető jégecet : klórszulfonsav = 4 : 1 arányú keverékével (76). A kromatogramm lepermetezését ebben az esetben 2 perces  $105^\circ\text{C}$ -os melegítés követi, majd U.V.-ben vizsgálható. A különböző anyagoknak jellegzetes fluoreszcenciájuk van. A reakció igen érzékeny 1-2  $\mu\text{g}$ /folt esetén is határozott színreakció mutatkozik.

A mikrobiológiailag aktív szteroidok /más aktív anyagok is/ rétegekromatográfiás szétválasztás után biológiailag tesztelhetők (77, 78). A mikrobiológiai előhívás munkám során a következő módon történt. A kifejlesztett, jól ki-

száritott kromatogrammot 1,5% ágár tartalmú pH 7-es bouillon táptalajjal leöntöttem, majd a teszt mikroorganizmus szuszpenziójával, vagy konidium szuszpenziójával a réteget leoltottam /a leoltás a szuszpenzió ecsettel történő egyenletes szétkenésével történt/. A lemez felületének beszárítása után 12 illetve 24 órás 30°C-os nedves kamrás inkubálás után értékeltem. Az alkalmazott mikroorganizmus gombaellenes anyagok teszteléséről lévén szó, az igen érzékeny *Syncephalastrum racemosum* /Zygomycetes/ volt. A konidiumszuszpenzióból a felkenés előtt OTC-t és streptomycint vittem 20-20 µg/ml mennyiségben, a levegőből történő baktériumos fertőzés teljes visszaszorítása céljából. Korábbi vizsgálatokkal tisztáztuk, hogy az alkalmazott baktériumellenes antibiotikumok a tesztorganizmus fejlődését nem befolyásolják, a vizsgált anyagokkal kölcsönhatásba nem lépnek.

Mivel a vegyületek aktivitása függ a közeg pH-jától, (17) olyan párhuzamosokat is beállítottam, amikor a táptalajban indikátort /bromkrezol-purpur, vagy bromtimolkék/ kevertem.

A kromatogrammok véres-ágáros leöntésével lehetőség nyílik a hemolizáló anyagok előhívására is (78), 1,5%-os ágárba kevertem a vérsejteket, kb, 2%-nyi mennyiségben /marhavért a szérumtól centrifugálással leválasztottam - 4-6000 fordulat/perc 20 percig - majd fiziológias NaCl oldatban centrifugálással többször átmostam/ majd ezzel öntöttem le a jól kiszáritott, kifejlesztett kromatogrammot. A jelenlévő hatóanyag koncentrációjától 0,5-5 órán belül megfigyelhető /a hőmérséklettől viszonylag függetlenül

lejátszódó folyamat termosztálásra nincs itt szükség/.  
A hemolizis és a gombagátlás vizsgálata összekapcsolható.  
Ilyenkor a vérsejteket 1,5%-os ágár tartalmú bouillon táptalajba kevertem és a leöntés után a felületre a teszt-organizmust leoltottam.

#### 2.3.2.1. A *Solanum laciniatum* glikoalkaloidáinak kinyerése

A növény un. "ipari hajtását" /kb. 20-25 cm-es hajtás-vég/ infraszárítóval szárítottam, majd késes növényörlővel porrá őröltem. A növényőrlemény 1000 g-hoz 5000 ml 0,1 n HCl-t adva /pH-t cc. HCl-lel 2-re állítottam be/ 1 órán keresztül 50°C-on extraháltam. Az extrakció után sűrű szövésű préskendőn keresztül a folyadékot átpréseltem. A visszamaradt növényi őrleménnyel az extrakciót még egyszer elvégeztem a fentiekkel megegyező módon. A két préslevet összeöntöttem és 20%-os KOH-dal pH 10-ig lúgosítottam. Ekkor csapadék válik le. Kb. 6 óra múlva a kiülepedett csapadék felületéről leszivattam a csapadékot, majd a csapadék tömörítését centrifugálással gyorsítottam /10 perc 5-6000 fordulat/perc /. Az így nyert csapadékot 1 n HCl-ben oldottam. A sósavat a csapadék oldódásáig adagoltam. Az esetleges mechanikai szennyeződések eltávolítása céljából laza vatta rétegen megsűrtem az oldatot. 20%-os KOH-val ismét pH 10-ig lúgosítottam. A leváló csapadékot 12 órán át ülepitettem, majd centrifugálással egybekötött csapadék átmosást, dekantálást alkalmaztam. Az át-

mosást desztillált vízzel végeztem, háromszor megismételve. A tisztított csapadékot szobahőn légszárazra szárítottam. A csapadék kis mennyiségét 10 x-es mennyiségű 96%-os etanolban oldottam, aztán rétegekromatográfiásan analizáltam, etanol : benzol :  $\text{NH}_3$  = 10 : 5 : 0,5 elegyben futtatva. Az extraktumban három szteroidglikoalkaloid volt. A szolaszonin, szolamargin és a  $\beta$ -szolamargin.

A nyers extraktumból a szteroidglikozidok kinyerését és az egyes vegyületek elkülönítését egy lépésben, oszlopkromatográfiás elválasztással végeztem /előzetes telített réteges rétegekromatográfiás tapasztalatok alapján/. Adsorbens:  $\text{Al}_2\text{O}_3$  Brockmann, melyet használat előtt 4 óráig  $350^\circ\text{C}$ -os aktiválásnak vetettem alá. Kifejlesztő elegyként iso-propanol : benzol : víz = 5 : 1 : 1 arányú oldószer keveréket alkalmaztam. Az oszlopot futtatóelegyben szuszpendálva készítettem 250 x 26 mm méretben. 20 mm kifejlesztő elegyben 10 g extraktumot oldottam forrón, 2 x laza vattán szűrtem, majd felvittem az oszlopra. A  $\beta$ -szolamargin és a szolamargin kinyerése után az oszlopot 50%-os etanollal átmostam, a szolaszonin ezzel az eljárással gyorsan lemosható az oszlopról. A frakciók /kb. 280 esetenként 3 ml-es mennyiségű frakció/ tisztaságát rétegekromatográfiásan ellenőriztem. Az azonos vegyületeket tartalmazó frakciókat összeöntve vízfürdőn bepároltam a kristályosodás megindulásáig, majd jégszekrényben hűtve kristályosítottam tovább. Az anyagokat 96%-os etanol : aceton = 2 : 1 arányú keverékben átkristályosítottam. A kapott szteroidok szintelen, jól kristályosodó vegyületek.

### 2.3.2.2. A *Solanum lycopersicum* szteroidglikozidjának kinyerése

A nyers extraktum elkészítéséig a folyamat lényegében egyezik a *S. laciniatum*-nál leírtakkal, így pusztán az eltérésekre utalok. Csak a növény leveléből készítettem az örleményt. Az extrahálást kétszer végeztem el HCl-lel pH 3-ra beállított vízzel /a pH-t extrahálás közben állandóan ellenőriztem, és eltolódás esetén újra beállítottam/. Az extraháló folyadék mennyisége mindkét alkalommal 10-10-szerese volt a növényi örleménynek. Kétszer 1 órán keresztül 50°C-on történt az extrakció, majd az extraktumot préskendőn átpréseltem. KOH-dal lúgosítottam pH 10-ig, a levált csapadékot lecentrifugáltam. A nyers extraktum 10 g-hoz 100 ml abszolút etanolt adtam, majd forralásig melegítettem. Forralás után vattán szűrtem és 10 ml 200 mg koleszterin tartalmú abszolút etanolt adtam hozzá forrón. Az oldat lehülésekor tomatin-koleszterin komplex kristályok váltak le. 12 óra szobahőn, vagy jégszekrényben való állás után a kristályokat szűrve, szárítás nélkül 10-szeres mennyiségű piridinben, forrón feloldottam. /A piridinben a komplexkristályok összetevőikre esnek szét./ A forró piridines oldathoz a piridin mennyiségéhez viszonyított ötszörös mennyiségű 50%-os etanolt adtam forrón, majd a piridinnel egyező mennyiségben széntetrakloridot. Alapos kirázást alkalmaztam. Az alsó széntetrakloridos fázis /ez tartalmazza a koleszterint/ eltávolítása után, ismételten az elsővel megegyező mennyiségű széntetrakloridot adtam a rendszerhez, ismételt kirázás következett. A kirázást 3-4-szer

ismételtem, addig, míg az alsó széntetrakloridos fázisból rétegekromatográfiásan /futtatóelegy: benzol : aceton = 10 : 2, előhívó módosított Hansen-Dam reagens/ koleszterint kimutatni nem tudtam. Ezután a felső fázist leszűrtem /zavarosodást okozó  $\text{CCl}_4$ -tól/ majd melegen bepároltam. A bepárlás során hirtelen indul meg a kristály leválás.

#### 2.4.1.1. In vitro komplekxképzési vizsgálatok módszere

A komplekxképzési vizsgálatokat alkoholos közegben végeztem. Előkísérletek alapján úgy látszott célszerűnek, hogy 96%-os etanolos közeggel végezzem vizsgálataimat, mivel itt a szterinek és a glikozidok jól oldódnak és a komplex képződése is jó hatásfokú, a létrejövő komplexek etanolban igen rosszul oldódnak. 5 ml etanolban oldottam a szteroidglikozidokat molsúly arányaiknak megfelelően /a grammolekulasúlyok 0,00001 részét/ szintén 5 ml etanolban oldottam az ergoszterint/ a grammolekulasúly 0,00002 részét/. Oldás után a két oldatot forrón összeöntöttem, majd lassan lehűlni hagytam. A komplexleválás a glikoalkaloidtól függően történhet percekben belül, de tarthat több napon át is. Ezért a komplekxképzésre beállított oldatokat háromszor 24 órán át tartottam szobahőmérsékleten és csak aztán készítettem elő további vizsgálatra.

Részben ergoszterin fogyás meghatározása alapján /kromatográfiával egybekötött spektrofotometriás mérés, lásd 43. oldal/, részben szteroidglikozid fogyás /indikátoros közegben tör-

ténő fotometriás meghatározás, lásd 44. oldal/ alapjén mérhető a komplexképzés intenzitása.

#### 2.4.1.2. Hatásmód vizsgálatok általános menete

Az előnevelt mikroorganizmus átmosott sejt, illetve mycélium mennyiségét lemértem. A nedvesség 100 mg-jához 1 ml inkubációs elegyet adtam. Az inkubációs elegy alapoldata valamely puffer /lásd 20. oldal./. A pufferbe maximumán 2%-os etanolkoncentráció mellett oldathá vittem az egyes szteroidglikozidokat, 200 µg/ml mennyiségben. A vizsgálatok során, a megfelelő szteroidglikozidok hatásának kitett gombamennyiség mellett egy másik, hatóanyag nélküli pufferben lévő sejttömeget is inkubáltam kontrollként. A pufferközeg pH-ja meghatározott, általában 7-es, de egyes esetekben /pl. amikor a különböző pH értékek melletti folyamatokat vizsgáltam/ ettől természetesen eltért. Az alkalmazott puffer leggyakrabban foszfátpuffer szteroidglikozid kezelés hatására kilépő kálium meghatározás esetén citrátpuffert alkalmaztam /lásd 24. oldal/.

A pufferoldatokat minden vizsgálat előtt frissen készítettem, a hatóanyagokat forró 96%-os etanolban oldottam és forrón, keveréssel, illetve rázással hoztam össze a pufferrel.

A gomba és az inkubációs elegy összehozása után megfelelő időközönként időmintákat vettem. Időmintákat 0 ; 1 ; 2 ; 4 ; 6 óránként, vagy 0 ; 1 ; 3 ; 6 óránként vettem /egyes esetekben 0,5 órakor is/.



Vizsgáltam az inkubációs elegyből:

- 1/ a megfelelő szteroidglikozid gombák által történő felvételt vagy megkötését;
- 2/ a hatóanyag károsító hatására bekövetkező aminosav kiáramlást;
- 3/ a hatóanyag károsító hatására bekövetkező kálium ion kivándorlást.

A hat órás inkubálás során a mikroorganizmusok szuszpenzióban voltak az inkubációs elegyben, időminták vétele alkalmával lecentrifugáltam a sejteket, hogy a mintavétel a tiszta inkubációs elegyből történjen. A mintavétel után a mikroorganizmusokat ismét reszuszpendáltam. A vizsgálatot nyugvófelszines, illetve rázatott inkubációs elegyvel egyaránt elvégeztem, körkörös rázást alkalmazva /60 fordulat/perc /.

#### 2.3.2.1. A szteroidglikozidok gombák által történő felvételének, megkötésének meghatározása

Az inkubációs időmintákból 0,1 ml-es mennyiségeket szilikagéses vékonyrétegre vittem fel és felező higitású koncentrációsorozat mellett megfuttattam etanol : benzol : viz :  $\text{NH}_3$  = 10 : 10 : 1 : 1 arányú elegyében, előhívás módosított Hansen-Dam reagenssel. Az összehasonlító koncentráció sorozatot mindig a vizsgált szteroidból készítettem, így a színintenzitás alapján történő mennyiségi összevetés mellett megfigyelhettem az Rf értékek összehason-

litásából, hogy a szteroidglikozidokból történt-e enzimikus cukorlehasítás, vagy valamilyen más mikroorganizmusok okozta változás. A mennyiségi meghatározás az összehasonlító hígítási sorozat egy-egy meghatározott mennyiséget tartalmazó tagjának szinintenzitásához való hasonlítással történt. /A foltok nagysága kevésbé játszik szerepet, mert mennyiségtől független, nagyjából állandó, az alkalmazott futtató rendszer jól tömörít./ A 0 órás minták a pufferbe bemért szteroid mennyiség alapján 20 µg/folt, így az összehasonlító hígítási sorozat 40-20-10-5-2,5 µg/folt tagokból áll. /Az 1,25 µg/folt a kimutatási határ./

Pontosabb kvantitatív meghatározás szükségtelen, hisz a felvételt - bár folyamatában vizsgáltam - az inkubációs idő végén, amennyiben felvétel történt, a teljes hatóanyag mennyiség oldatból történő eltűnésével kellett számolni. A felezőhígítású tagok közé az ismeretlenek besorolása, összehasonlítása pedig kontroll-vizsgálatok szerint kielégítő pontosságú volt. Tévedési lehetőség  $\pm 15\%$ . A mennyiségi meghatározás összehasonlító jellege miatt az adatok felvételénél, értékelésénél nem mennyiséget, hanem megbízhatósági intervallumot adtam meg. Felvétel esetén a sejtek által megkötött glikozid mennyiséget metanolos, vagy etanolos extrakcióval, pufferes atmoszféra után /100 mg nedves sejt/1 ml oldószer/ kvantitatíve visszanyertem, s rétegekromatográfián bizonyítottam.

#### 2.4.2.2. Aminósav kibocsátás mennyiségi, minőségi meghatározása

Mennyiségi meghatározás: az inkubációs elegyből /kontrollból, hatóanyag kezeltből egyaránt/ időmintánként 0,1 ml-t Whatman No 1-es papírra  $7 \text{ cm}^2 / \pm 1 \text{ cm}^2 /$  nagyságú területre vittem, beszárítás után 200 mg/100 ml aceton ninhidrines oldattal reagáltattam, oly módon, hogy a papírt reagens oldatába mártottam.  $85^\circ\text{C}$ -on 20 percig tartott a szín kifejtés. Előhívás után azonnal, fixálás nélkül kvantitativ eluáltam. Az eluálás 90%-os etanollal történt, oly módon, hogy a mintákat a színes foltok nagyságában kivágtam, majd összedarabolva 5 ml 90%-os etanollal 10 percig  $50^\circ\text{C}$ -os vízfürdőn extraháltam. A szintetizálást fotométerrel /Spektromom 400/ 520 nm-nél határoztam meg. Az összaminósav mennyiséget alaninra vonatkoztattam. Az alanin hígítási sorozat extinkció értékeinek felvétele a fentiekhez hasonlóan, papírra felvive, ott előhiva, majd eluálva történt.

Aminósav kromatografálás: a mennyiségi aminósav meghatározás mellett szükséges volt annak vizsgálata is, hogy a szteroidglikozid kezelés hatására kiáramló aminósav mennyiségben az egyes aminósavkomponensek egymáshoz való mennyiségi viszonya milyen, a kezeletlen, ép sejtekből kis mértékben kiáramlott aminósav összetételéhez képest. A minőségi analízist papirkromatográfiás eljárással végeztem. Az inkubációs elegy 0,1 ml-ét kromatografáltam, minden esetben a kezelt és kontroll mellett egy standardot futtatva. Alkalma-

zott papír a Schleier-Schüll 2043 b, a szolvens butanol :  
: jégecet : viz = 2 : 1 : 1 arányú elegye. Előhívóként a  
fenti ninhidrin reagenst alkalmaztam, fixálóként pedig  
0,5 n  $\text{NiSO}_4$  oldatot. A kromatogramm futási ideje 24 óra,  
amelyből az első 12 órát jégszekrényben hűtve  $+2^\circ\text{C}$ / fut-  
tattam (79). Bizonyos esetekben alkalmaztam a két-dimenziós  
kromatográfiás elválasztást is, egyes nehezen elváló aminó-  
savak biztos elkülönítésére. Ekkor a fenti szolvenst al-  
kalmaztam első kifejlesztőként, majd második irányban 10%-os  
fenollal futtattam.

#### 2.4.2.3. A kálium kibocsátás mennyiségi meghatározása

A kálium effúzió mérésekor mindig kálium nélküli  
Mc Ilvain puffert alkalmaztam. A mikroorganizmusok elő-  
nevelése ilyenkor káliumdús táptalajban /0,5%/ történt.  
Az inkubációs elegyből időmintánként 0,5 ml-es mennyisége-  
ket vettem ki, amelyet 2,5 ml desztillált vízzel egészítet-  
tem ki. Ezt a mennyiséget mértem lángfotométerrel /Zeiss/  
25-ös blende nyílás mellett összehasonlítóként ismert kálium  
tartalmú oldathól koncentrációsorozatot készítettem.

#### 2.4.2.4. Élősejtszám alakulásának vizsgálata szteroid- glikozid kezelés hatására

A vizsgálathoz a mikroorganizmus előnevelése teljesen  
azonos, a hatásmód vizsgálatoknál alkalmazott előneveléssel.

Itt is pufferes atmoszfért alkalmaztam. A tenyészet lemosása centrifugálás, atmoszféra, steril körülmények között történt. A nedves gomba 1 mg/ml mennyiségbe kerül az inkubációs közegbe. Az inkubációs elegy 200 µg/ml mennyiségű szteroidot tartalmazott. Az inkubációs közeg különböző lehet, attól függően, hogy tápanyag jelenlétében vizsgáltam a szteroidglikozidok hatását, vagy anélkül, egyidejűleg alkalmazott kontrollokkal, hatóanyag nélküli szuszpenziót is vizsgáltam mindig. A vizsgálatot elvégeztem nyugvó felszínes körülmények között és T csövekben billegtető rázatással /percenként 50 mozgatás/.

A vizsgálat 24 óráig tartott. Mintákat 0 ; 0,5 ; 3 ; 6 ; 12 ; 24 órákor vettem. Időmintánként 1 ml homogén szuszpenziót vettem ki, ezt  $3 \times 10^6$ -szorosra hígítottam ki steril csapvizben. Ebből a 3 milliószoros hígításból öt paralellbe 1 ml-ként lemezt öntöttem. A lemezöntéshez használt táptalaj összetételét lásd 20. oldalon. 15-20 ml-ként kémcsőbe fejtve sterilizáltam a táptalajt, majd 40-42°C-os vízfürdőn tartottam felhasználásig. A szuszpenzióval kevert táptalajt steril csészébe öntöttem. Értékelés, sejtszámolás 24 órás, 30°C-os inkubálás után. A vizsgálatokhoz rövid 12-14 órás tenyészidejű gombát használtam. Egyes esetekben, amikor a hatás és a sejtek életkorának összefüggését vizsgáltam, természetesen idősebb tenyészetekkel is dolgoztam.

#### 2.4.2.5. Ergoszterin mennyiségi meghatározás

Ergoszterin mennyiségi meghatározás kromatográfiával egybekötött spektrofotometriás mérés. A mérések Beckman, illetve Spektromom 202 /hálózati/ U.V. spektrofotométerrel történtek. 282 nm-nél /ergoszterin U.V. szinképének maximuma, lásd 14. ábra/ határoztam meg az ismeretlen rétegről eluált minták ergoszterin tartalmát. Ismert mennyiségű ergoszterint tartalmazó higitási sorozattal összehasonlító egyenest vettem fel. Az összehasonlító egyenest korrigáltam a rétegről történő eluálás során fellépő standard veszteség számértékével. /Standard veszteség bemérése és kiszámolása úgy történt, hogy ugyanazon mennyiségeket, amelyeket az összehasonlító egyenes felvételekor közvetlen kromatografálás nélkül mértem, először kromatografáltam, és az eluálás után mértem fotometriásan. Ily módon nyertem a kromatografálás után használható korrigált összehasonlító egyenest /lásd 17. ábra/.

A felvett ergoszterin összehasonlító segítségével mind az in vitro komplexképzési vizsgálatok során visszamaradt ergoszterin, mind pedig élősejtben lévő szabad ergoszterin tartalom meghatározható. A meghatározandó minta megfelelő térfogat mennyiségét preparatív vékonyrétegre felcseppentettem, etilacetátos futtatás után a fronttól számított 2-2,5 cm-es sávban a szilikagélt lekapartam /ergoszterin ebben a fendszerben front közelben fut/. A lekapart szilikagélt kihúzott végű üvegcsőbe vattára rétegeztem és ismert mennyiségű 96%-osetanollal eluáltam. /Mikro-oszlop kromatográfiás

kvantitatív elució./ Az így nyert mintát mértem 282 nm-nél, a kapott extinkció segítségével az összehasonlító egyenes alapján meghatároztam a tényleges ergoszterin tartalmat, és visszaszoroztam az eluálás, mérés során alkalmazott hígítás számértékével. /Az ergoszterin meghatározását nem zavarják az esetleg jelen lévő szteroidglikozidok, pl. komplexképző vizsgálatoknál, még akkor sem, ha nem kromatografáljuk szét a két anyagot, mert U.V. tartományukban jellemző spektrumuk nincs./

#### 2.4.2.6. Szteroidglikozidok mennyiségi meghatározása komplexképzés során

Ez a meghatározási mód komplexképzés során alkalmazható ergoszterin jelenlétében is, mert ergoszterinre nézve a reakció nem érzékeny. A meghatározandó minta /96%-os etanolban oldott szteroidglikozid, vagy szteroidglikozid + ergoszterin/ 1 ml-éhez 3 ml abszolút etanolt és 1 ml pH 5,7-es, 100 ml-ként 10 mg bromkrezolpurpur indikátort tartalmazó desztillált vizet adtam. Pontos mennyiségi meghatározás céljából ismert töménységű szteroidglikozid oldatokkal, az előbbi indikátor és oldószer keverés után összehasonlító egyenest vettem fel. A mérést Spektromom 360 spektrofotométerrel végeztem, 596 nm-nél. A komplexképzésre beállított oldatokból bemérve meg tudtam állapítani, hogy mennyi szteroidglikozid marad tisztán, meg nem kötött be nem komplexelt állapotban. Össze tudtam vetni /mint az ergoszterin meghatározásnál/ a különböző glikozidok komplexképző aktivitását.

A szteroidglikozidok és az alkalmazott indikátorfesték /más hasonló indikátorfestékek is, éles színváltozást előidéző pH tartományukban alkalmazva őket/ feltehetően adduktum képzésre hajlamosak egymással (80), ez magyarázza a színintenzitás és az egyes glikozid mennyiségek szigorú korrelációját. Ezt a mérő módszert csak a *Solanum laciniatum* glikoalkaloidának mennyiségi meghatározására alkalmaztam a komplexképzés során, más vonatkozásban nem igazolt új mérési módszer.



3.

A kísérletek részletes ismertetése, a részeredmények  
értékelése és megvitatása

3.3. Azonos alapvázú, különböző számú cukormolekulát  
tartalmazó szteroidglikozidok aktivitásának  
meghatározása

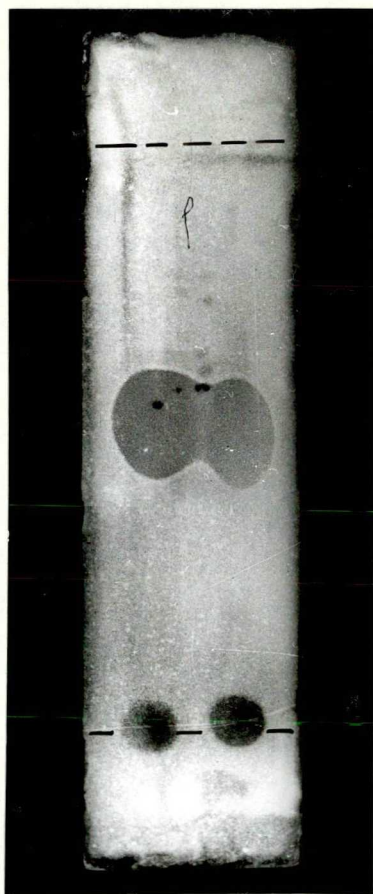
A munkámban tisztázandó kérdések között elsőként szerepel "az azonos alapvázú, de különböző cukrokat tartalmazó szteroidglikozidok szerkezet és aktivitásbeli különbségének" vizsgálata. Erre vonatkozóan egy összehasonlítást már az előzőekben /vizsgálataimhoz felhasznált tesztorganizmusok kiválasztása szűrővizsgálat során/ az I. táblázat tartalmazott. Itt csak a szolaszonin és a szolamargin aktivitására vonatkozó adatok voltak feltüntetve, a más, nem szolaszodin aglikonú, nagy antifungális aktivitású szteroidglikozidokon kívül. A hatás, aktivitás összevetésénél egyéb szolaszodin aglikonú szteroidokat is teszteltem. Így az előbbi két glikozidon kívül a négy cukrot tartalmazó szolaradixin, a két cukros  $\beta$ -szolamargin, az egy cukros  $\gamma$ -szolamargin, valamint az aglikon hatásosságát vizsgáltam, ágárdiffúziós lyukteszt módszerrel.

A vizsgálati adatok egyértelműen bizonyították, hogy a szolaszoninra, szolamarginra érzékeny, sőt legérzékenyebb mikroorganizmusok is a többi - nem három cukormolekulát tartalmazó szolaszodin aglikonú - szteroidokkal szemben ellenállóak. A szolaszodinszármazékok közül a három cukrosok kivételével

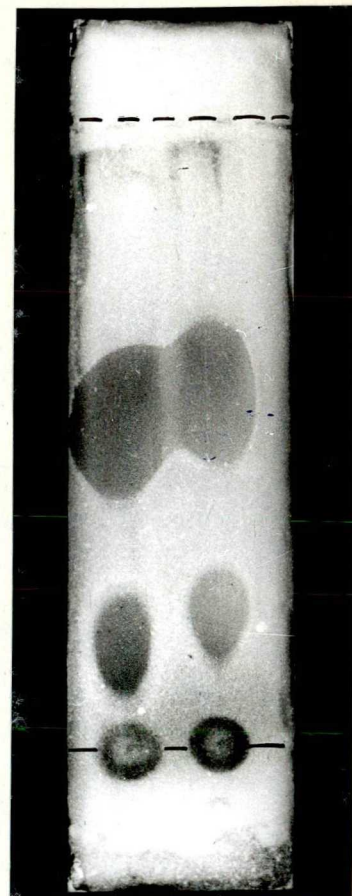
antifungális aktivitást, tehát egyik anyag sem mutatott. Mikrobiológiailag aktívnak a három cukrot tartalmazó glikozidok mutatkoztak. Nagy különbség volt azonban a szolamargin és a szolaszonin aktivitása között. A nyers növényi extraktumból rétegkromatográfián a szolamargin, szolaszonin 2 : 1 arányban mutatható ki /lás 7. kép 10x-es növényi extraktum 0,05 ml-e megfuttatva etanol : benzol :  $\text{NH}_3$  = 10 : 5 : 0,5 -ben, kémiai előhívás, felső folt szolamargin, alsó folt szolaszonin/. Ugyanezen oldat 0,1 ml-ét mikrobiológiailag tesztelve csak a szolamargin mutatható ki (8. kép), bár a 7. képen látható, hogy a szolaszonin mennyisége is jelentős. Csak 0,2 ml-t futtatva okoz a szolamargin mellett a szolaszonin is gátlást (9. kép).



7. kép



8. kép



9. kép

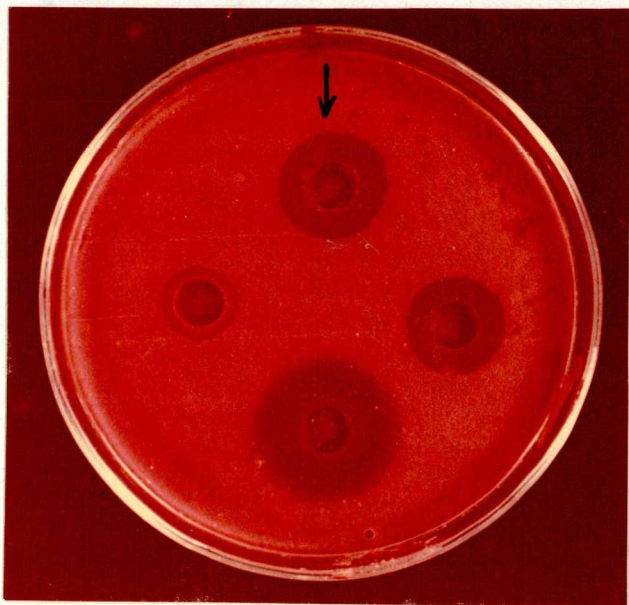
A hatásosság szigorúan a szerkezet függvénye.

Megjegyzendő, hogy a modellként összehasonlított tomatin, digitonin cukorszámára négy, illetve öt, de itt más aglikon tomatidin, illetve digitogenin fordul elő. A hatás itt is az adott aglikonhoz kapcsolódó megfelelő számú cukormolekula függvénye. Intézetünkben folyó korábbi vizsgálatok eredményeként (81) ismert, hogy a tomatin hidrolízis termékeinek, pl. a tomatidin szolatrióz származékának már jelentősen lecsökken - bár teljesen el nem tűnik - a mikrobiológiai aktivitása. A digitonin négy cukrot tartalmazó hidrolízis termékéről hemolízis vonatkozásában szintén ismert az aktivitásvesztés (30).

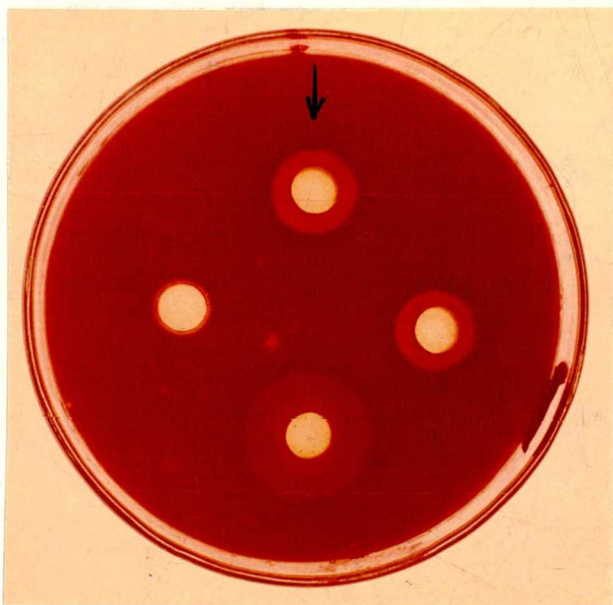
A bevezetőben felvetett első kérdés megválaszolást nyert. A különböző alapvázú szteroidglikozidokhoz hasonlóan az azonos aglikonú, de eltérő cukorszámú glikozidok aktivitásában is különbségek mutatkoztak. A hatásért feltehetően tehát adott aglikon és a hozzákapcsolódó meghatározott cukormolekulák száma, milyensége az egymáshoz való kapcsolódás sorrendje, helyzete együttesen felelős.

Az antifungális aktivitásban tapasztalt különbségek megegyeznek a hemolitikus hatásban leírt (30) és általam is vizsgált eltérésekkel (lásd 10 és 11. kép).

A 10. kép a gombagátló zónákat, a 11. kép ugyanazon anyagok hemolíziszónáit mutatja. Véreságáros csészék *Syncephalastrum racemosum*-mal leoltva, a lyukakban az óramutató járásával ellenkező irányban szolamargin, szolaszonin, digitonin, tomatin etanolos oldata, lyukanként 1 mg/0,1 ml. /A lemez készítésének módja két 1-2 mm vastagságú bouillon közé véres ágárt rétegeztem 1-2 mm vastagságban./



10. kép



11. kép

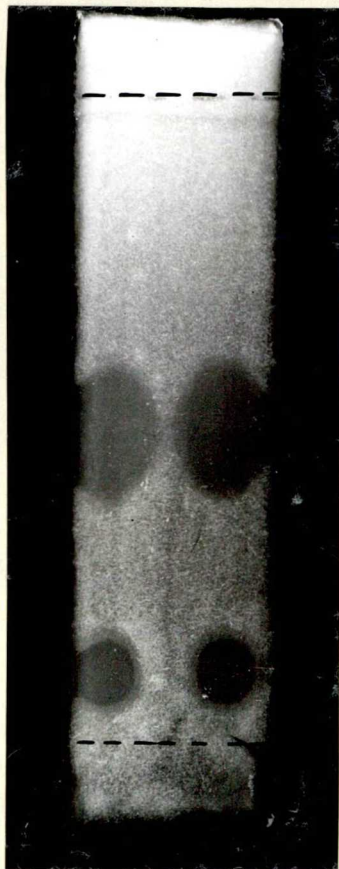
Az a feltételezés, miszerint: "a származékok hemolizis aktivitásában különbségek vannak, feltehetően a gombagátló aktivitásban is különbségek fognak mutatkozni" az azonos aglikonú



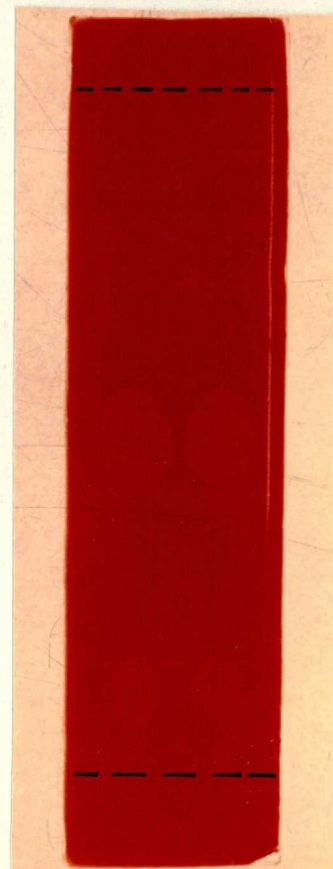
származéksoron belül, beigazolódott. A háromtól eltérő számban cukrot tartalmazó glikozidok sem hemolitikus, sem gombagátló aktivitással sem bírtak (lásd 12., 13., 14. kép).



12. kép



13. kép



14. kép

A képeken etanol : benzol :  $\text{NH}_3$  = 10 : 5 : 0,5 futtató elegyben kifejlesztett kromatogramok láthatók. A 12. kép kémiai előhívás, az anyagok sorrendje alulról: szolardixin, szolaszonin, szolamargin,  $\beta$ -szolamargin, szolaszodin 50-50  $\mu\text{g}$ /folt mennyiségekkel. A 13. kép az előbbi anyagok mikrobiológiai előhívása, foltonként 150  $\mu\text{g}$  anyaggal. A 14. kép a hemolízis kimutatás, anyagonként 100  $\mu\text{g}$  mennyiségekkel. A szolamargin mellett csak a szolaszonin mutat kisebb mértékben gombagátló, illetve hemolitikus aktivitást.

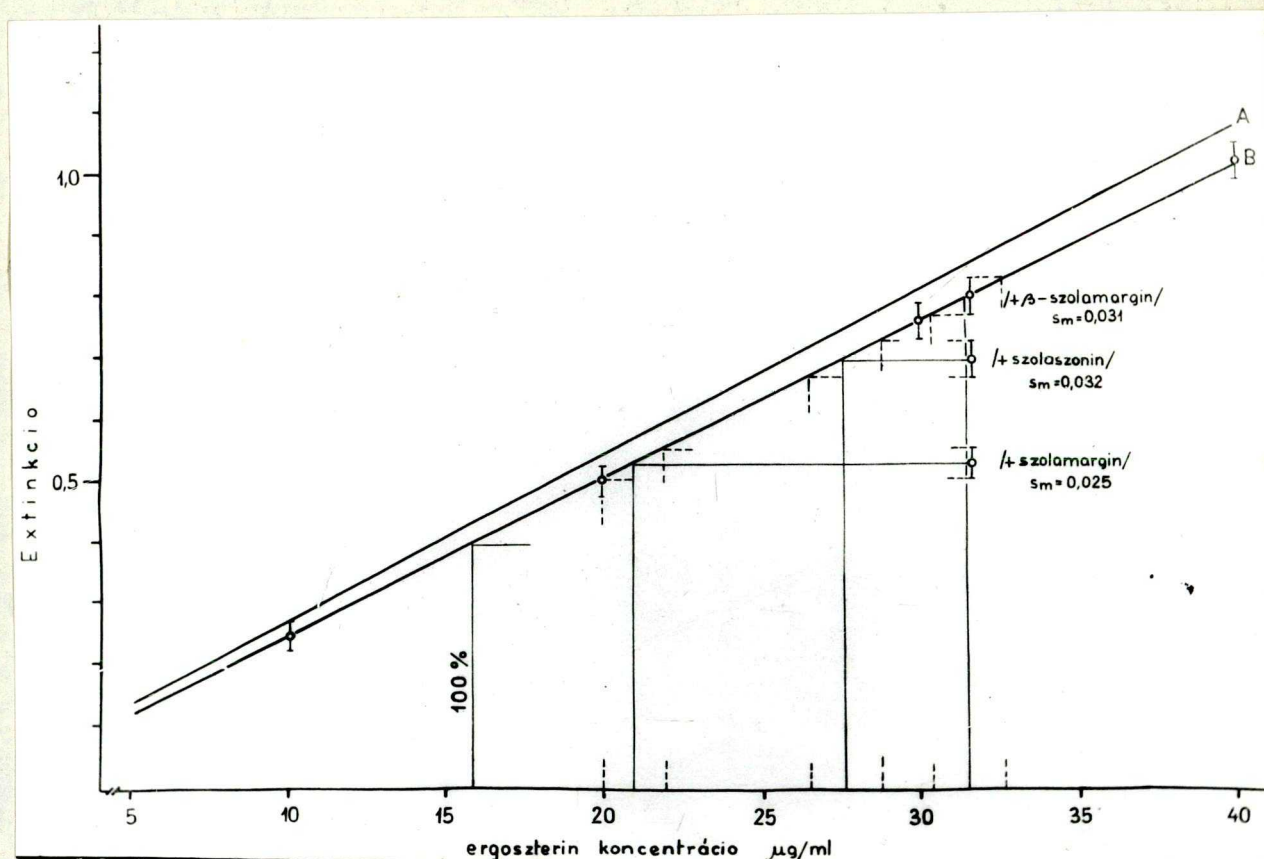
A szűrővizsgálatok egy másik problémát is felvetnek, hogy a vizsgált mikróbák egy részével szemben hatás nem mutatkozott. Egyes mikroorganizmusok, rezisztensek a vizsgált származékokkal szemben /vagy legalább is nagymértékben ellenálló, legfeljebb a nagyhatású modell-anyagok okoztak kis mértékű gátlást/. Ez a tény a rezisztencia okának vizsgálatát is megkívánja, amire munkám során a későbbiekben térek ki.

Az érzékeny mikroorganizmusoknál a különböző származékok esetében tapasztalt eltérő aktivitásra a bevezetőben felállított munkahipotézis bizonyítása ad megfelelő magyarázatot. A hipotézis feltételezi, hogy a mikrobiológiai aktivitás, illetve a szteroidglikozid származékok és a szterinek komplexképző aktivitása között korreláció van. A bizonyítást a komplexképzési vizsgálatot először in vitro szerves oldószeres közegben végeztem el.

### 3.2.1. In vitro komplexképzési vizsgálatok

Komplexképzési vizsgálatra a szolaszodin glikozidszárma-  
zéksonon kívül modellként a tomatint és digitonint is fel-  
használtam. Az utóbbi két anyagról az irodalomból antifun-  
gális aktivitásán kívül a szterinekkal történő intenzív mole-  
kula komplexképzés ismert (58, 59, 63, 64, 68). A komplex  
leválása az oldószerből pillanatszerű és megfelelő mennyiségű  
szterinnel kvantitatíve "kicsapható" az oldatból /lásd to-  
matin előállítás/.

A vizsgált száramzékson három leglényegesebb tagjának  
mérési adatai a 17. ábrán láthatók.



17. ábra

Az ábrán a szolamargin, szolaszonin két különböző antifungális aktivitású glikozid és a  $\beta$ -szolamargin mikrobiológiailag inaktív glikozid komplexképző aktivitására vonatkozó adatok vannak feltüntetve, az egyes anyagok által a komplexképzés során megkötött ergoszterin mennyiségének tükrében.

Az ábrán látható "A" egyenes a mért ergoszterin összehasonlító, a "B" egyenes a rétegről történt eluálás során fellépő standard veszteséggel korrigált ergoszterin összehasonlító. Mivel a komplexképzésre beállított oldatokban az ergoszterin 2x-es mennyiséggel szerepelt, a glikozid 100%-os komplexbe történő kötése esetén az ábrán látható 100%-os jelzésnek megfelelő ergoszterin mennyiségnek kellett volna az oldatban maradnia. A grafikonon feltüntetett adatok a három szteroid-glikozid komplexben megkötött ergoszterin mennyiségét mutatják ug-ban a megfelelő átlagszórást feltüntetve. A mérési adatok alapján százalékos értékelést adva

a szolamargin	78,8%-ban	( $\pm$ 6,25)
szolaszonin	25,0%-ban	( $\pm$ 6,9)
$\beta$ -szolamargin	1,8%-ban	( $\pm$ 6,8) képzett

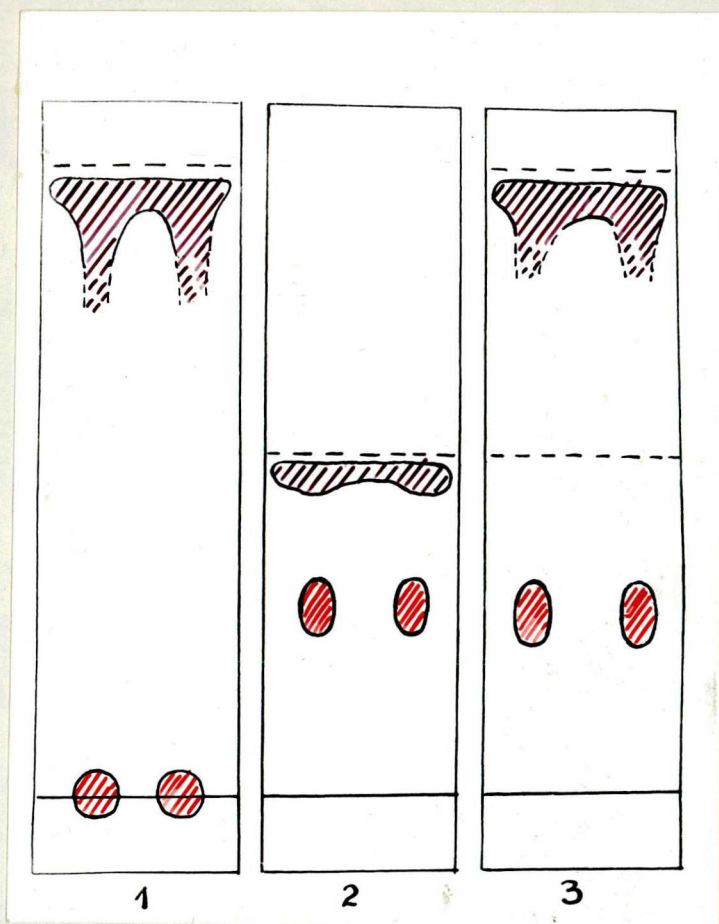
komplexet. /A zárójelben feltüntetett értékek az átlagérték közül ingadozó szórás 95%-os megbízhatósági szinten számolt határait jelölik./

Az ábrán fel nem tüntetett szolaradixin,  $\gamma$ -szolamargin, illetve szolaszodin aglikon mérési adatai a  $\beta$ -szolamargin szórási intervallumán belül vannak, gyakorlatilag a  $\beta$ -szolamargin is beleértve, egyik sem képez molekulakomplexet az ergoszterinnel vagy koleszterinnel.

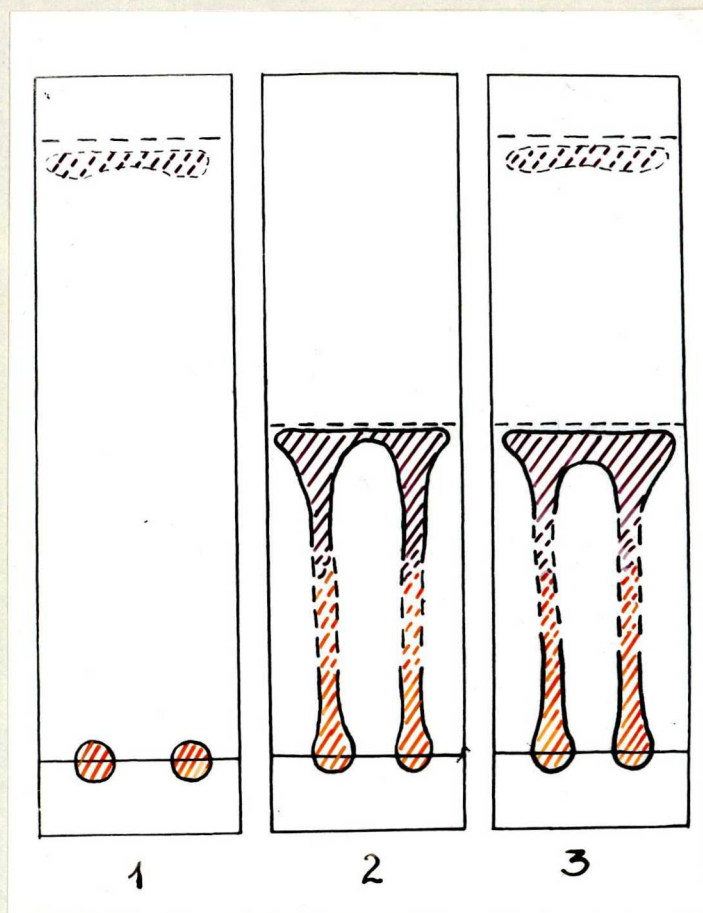


A digitonin, tomatin komplexképzése gyors, a kristály leválás pillanatszerű. A szolamargin, ergoszterin komplexe kristályosan, lassan válik le, 48 óra alatt jelennek meg a komplexkristályok. A szolaszonin esetében már kristály kiválás nincs, feltehetően oldatban van az a komplex mennyiség, amit vizsgálataim során kimutattam.

A komplexek stabilitási "sora" megegyezik a leválásuk gyorsaságával. Szembetűnő a stabilitásbeli különbség, ha különböző futtatórendszerekben hasonlítjuk össze a szolamargin-ergoszterin komplexét a modell-anyag /tomatin/ komplexeivel.



15. kép



16. kép

Mindkét esetben az egyes lemezt etilacetátban, a kettős lemezt etanol : benzol :  $\text{NH}_3 = 10 : 5 : 0,5$ , a hármas lemezt először etilacetátban, majd kiszáritás után etanol : benzol :  $\text{NH}_3 = 10 : 5 : 0,5$  arányú elegyében kromatografáltam. Előhívás jégecet : klórszulfonsav = 4 : 1 keverékben, értékelés U.V.-ben történt.

15. képen a szolamargin-ergoszterin, 16. képen tomatin-ergoszterin komplexének változása látható. A szolamargin komplexe már etilacetát hatására bomlik, lúgos futtatóban szintén szétesik komponenseire. A kettős futtatás azt mutatja, hogy az etilacetát hatására a komplex bomlása tökéletes, mert a második frontban ergoszterin már nem jelenik meg.

A tomatin komplexe etilacetátban nem bomlik (16. kép). A front-

ban megjelenő folt, szabad állapotban lévő - be nem komplexelt - kismennyiségű ergoszterin szennyezésre utal. Az etanol : benzol :  $\text{NH}_3$  futtatórendszerben a komplex bomlása megindul a starton ragadó tomatintól kiindulva a frontban futó ergoszterinig egy elmosódó csík jelent meg előhívás után, ami arra utal, hogy az oldószerfront emelkedésével a felvitt komplex mennyiségből az ergoszterin fokozatosan hasadt ki. /Megjegyzendő más irányú vizsgálatok alapján, hogy ezen futtatórendszer komplexbontó sajátosságát nem a pH, hanem a benzol tartalom okozza/. Értelemszerűen a kettős futtatásnál a második front itt ergoszterint bőven tartalmaz, az első pedig csak nyomokban.

A fenti vizsgálat alapján érthető, hogy rétegekromatográfiásan szolamargin-ergoszterin komplexet a legkülönbözőbb futtatórendszerekkel sem sikerült kimutatni, hisz a komplex kis oldószer feleslegben már szétesik, mielőtt a vékonyrétegre felvinnénk. A rendkívüli instabil volta arra enged következtetni, hogy vagy hidrogénhid, vagy van der Waals erők biztosítják a kapcsolatot a molekulapárok között.

A szolamargin-ergoszterin komplex létrejöttének és annak, hogy a reagáló partnerek valóban 1 : 1 arányban hoznak létre molekulakomplexeket, az oldószerből történő kristályos leválás, valamint más szteroidglikozidokra /tomatin, digitonin/ vonatkozó ilyen irányú vizsgálatok pozitív eredményén (58, 59, 82) túlmenően egyéb bizonyítékai is vannak. Bár a molekulakomplex teljes analizise nem történt meg a reagáló partnerek fizikai, kémiai állandóinak változása a kapcsolódás után kétségtelenné teszi, hogy valóban 1 : 1 arányú molekulakomplex jött létre. Ezt a változást legszemléletesebben a forgatási

eredmények igazolják. A forgatási értékeket összevetve kitűnik, hogy szűk  $\pm 3^\circ$ -os szórásintervallumon belül a komplexek forgatási adatai a glikozidok és ergoszterin forgatásának számtani közepe

$(\alpha)_D^{20}$	szolamargin ergoszterin	$-110^\circ$ $-132^\circ$	komplex	$-118^\circ$ /mért $-121^\circ$ /számított/
$(\alpha)_D^{20}$	tomatin ergoszterin	$-19^\circ$ $-132^\circ$	komplex	$-77^\circ$ /mért $-75,5^\circ$ /számított/

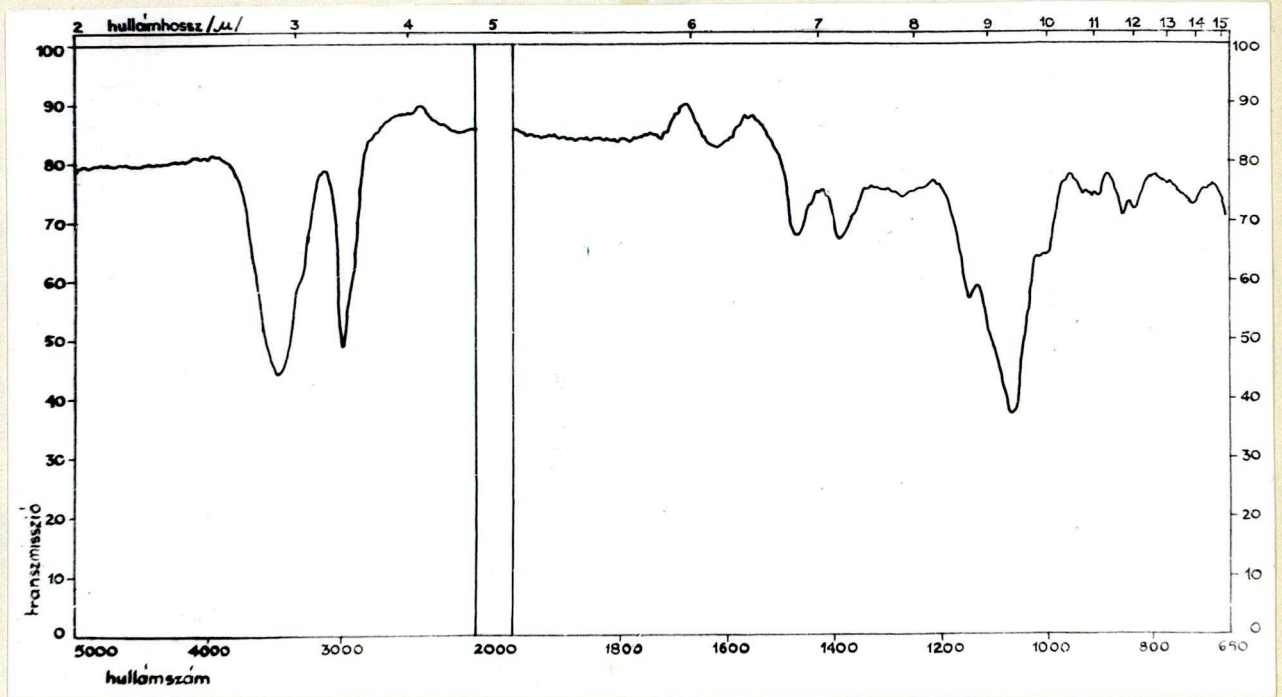
Ezek az adatok az 1 : 1 arányú komplex jelenlétéről tanúskodnak. Az Op. adatok mindkét komponens Op.-től természetesen eltérnek.

szolamargin            op 301-303 $^\circ$             komplex    op 255-257 $^\circ$   
ergoszterin            op 160-163 $^\circ$

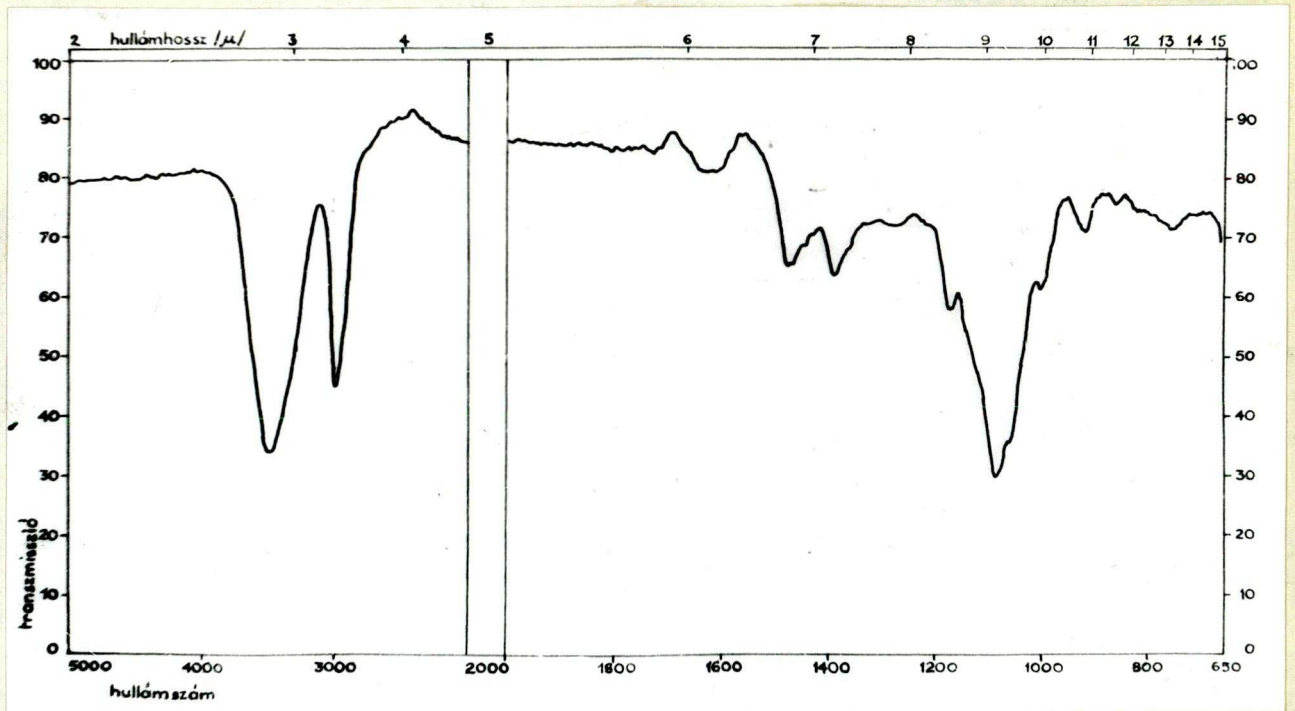
tomatin                op 272-274 $^\circ$             komplex    op 246-247 $^\circ$   
ergoszterin            op 160-163

Az infravörös spektrumban jelentkező maximum eltolódások /18., 19. ábra összevetve a 4. illetve 11. ábrákkal/ is a megváltozott tényleges kapcsolódásról tanúskodnak.

Az elvégzett analízis adatai pl. a nitrogén szám meghatározási adatok valószínűsítik, a megengedett szórásstartományon belül, hogy a keletkezett kristályosan levált anyag 1 : 1 arányú molekulakomplex.



18. ábra Szolamargin-ergoszterin komplex  
infravörös szinképe



19. ábra Tomatin-ergoszterin komplex  
infravörös szinképe

### 3.2.2. Komplexképzés körülményei

A szolamarginon kívül a tomatinnal és a nem alkaloid jellegű glikoziddal, a digitoninnal végeztem el a vizsgálatokat.

#### 3.2.2.1.

Először különböző pH érték mellett állítottam be az oldatokat komplexképzésre.

A bemért glikozid és ergoszterin mennyisége azonos az egyébként alkalmazott mennyiségekkel. Az anyagokat abszolút közegben oldottam fel /abszolút etanol/ és ehhez olyan mennyiségű és olyan savas vagy lúgos kémhatású vizet adtam, hogy a közeg etanol tartalma 96%-os legyen és a kívánt pH értéket biztosítsa. A beállított pH értékek a semlegesén kívül pH 3, pH 5; illetve pH 8. /A savas kémhatást HCl-lel, a lúgost NaOH-val állítottam be./ Semleges pH-n a szolamargin komplexe 24 óra alatt kristályosodott, a tomatin, illetve digitonin esetében a kristály leválás prompt történt.

Savas pH értéknél az alkaloid jellegű glikozidok esetében komplex kristály leválás, sem azonnal, sem több napos állás után nem következik be, még a tomatinnál sem. A digitonin szaponin jellegű szteroidglikozid pH-tól gyakorlatilag független, pillanatszerűen komplexet képez az ergoszterinnel, melyet a kristály leválás jelez pH 3; illetve pH 5-nél. egyaránt.

Enyhén lúgos közegben /pH 8/ a tomatin és szolamargin gyengülő komplexképző aktivitást mutat, pH emelésével a komplexképzés tovább csökken. A digitoninnal beállított kísérletek nem jártak sikerrel, mert az alkalmazott digitonin mennyiség lúgos körülmények között nem oldódott fel.

A fenti vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az alkaloid típusú glikozidok intenzív komplexképző aktivitással, csak semleges és ényhén lúgos kémhatású közegben bírnak. A komplexképzés intenzitása pH függvénye /digitonin esetében nem/.

### 3.2.2.2.

A komplexképzéssel kapcsolatban a vizsgált másik befolyásoló tényező az volt, hogy a szerves oldószer százalékos víztartalmával hogyan változik a reakció aktivitása. Megállapítást nyert, hogy abszolút szerves oldószeres közegben a komplexképzés kismértékű. 96%, 90%, 80%-os etanolban a komplexképzés egyező aktivitást mutat. Annak eldöntésére, hogy vizes közegben - azaz a mikrobiológiai vizsgálatok környezeti viszonyait legmegfelelőbben reprezentáló körülmények között - képződik-e a komplex in vitro, az egyébként alkalmazott vizsgálati módszerrel nem dönthető el. /A tomatin, szolamargin csökkentett alkohol tartalom mellett nem vihető oldatba./ Éppen ezért vízben jól oldódó digitoninnal végeztem el a komplexképzési vizsgálatokat. A reagáló partner koleszterin volt. A digitonin alkalmazása mellett szól az a tény is, hogy a koleszterin mennyiségi meghatározását a digitonin nem zavarja/az itt általam alkalmazott mérési módszer esetében/.

Koleszterin ergoszterin helyett, modellként való felhasználására pedig a kémiai meghatározásban mutatkozó nagyobb fokú érzékenység miatt került sor (81).

A digitoninból 1 ezrelékes oldatot készítettem különböző alkohol tartalmú vizes oldatban. Ezek 25 ml-éhez 0,5 ml 1%-os

koleszterin oldatot adtam /a koleszterin 96%-os etanolban volt oldva/. Ily módon abszolút 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 és 2% alkohol tartalmú /vizes/ közegben figyeltem a komplex leválását. Kontrollként különböző alkohol tartalmú, digitonin nélküli közegbe bemértem a vizsgálat során alkalmazott 1%-os koleszterin oldatból 0,5 ml-nyi mennyiségeket.

Vizsgálati eredmények az alábbiak voltak:

abszolút etanolban kristály levelés nincs, gyenge opaleszkálás jelentkezik csak 90%-os etanoltól lefelé haladva a csapadék gyorsasága, erőssége nő. 50% alatt nehéz, gyorsan ülepedő csapadék válik le.

A kontroll esetében csak 10%-os etanolban jelentkezik gyenge opaleszkálás /a koleszterin már nem képes oldatba maradni/ 2%-nál kis csapadék képződik, ez azonban szemben a komplex-csapadékkal, melegítésre feloldódik. Összevetve a komplexképzésre beállított mintával nagy az eltérés, kétségtelen tehát, hogy ott vizes közegben levált nagymennyiségű csapadék digitonin-koleszterin molekula komplexe.

A mólusúlyok alapján számolt komplex mennyiségből feltételezve az 1 : 1 arányú kapcsolódást, a kiszámolt koleszterin mennyiséget kaptuk meg mérési értéként. Mérés, mennyiségi meghatározás a módosított Hansen-Dam reagens felhasználásával történt (81). A vizsgált mintát a reagensbe oldottam, majd 20 perces 50°C-on szinkifejlődés után Spektromom 400-al 520 nm-nél koleszterin összehasonlító mellett meghatároztam a koleszterin tartalmat.

Ez a mérési adat is bizonyíték a létrejött molekulakomplex 1 : 1 aránya mellett.



Vizes közegben lejátszódó komplexképzési folyamatok hasonlóak a szerves közegben végbemenő reakciókkal. Ez a vizsgálatsorozat bizonyíték arra vonatkozóan, hogy az élő rendszerekkel lejátszódó folyamatokat jól tudjuk követni modell-vizsgálatokban szerves oldószeres közegben is.

### 3.2.3.

Az in vitro komplexképzési vizsgálatok feleletet adtak a bevezetőben felvetett második kérdésre, igazolták azt a munkahipotézist, hogy a korreláció van az egyes szteroid-glikozidok komplexképző aktivitása és gombagátló aktivitása között.

A mikrobiológiai hatás /antifungális aktivitás/ és a hemolizáló képesség vonatkozásában a származéksor egyes anyagai hasonlóképpen viselkedtek.

A hemolizist okozó szteroidokról ismert, hogy a vérsejtoldás az által következik be, hogy a sejtmembrána szterinjéhez /koleszterin/ kapcsolódik a szteroidglikozid (30) komplexképzés jön létre, ezáltal a membrán strukturája megváltozik dezorganizálódik /eltér a mechanizmus a hemolizinek hatás módjától (83)/. A szteroidokhoz hasonlóan hemolizál a filippin polién antibiotikum is (87). A polién antifungális antibiotikumok esetében a gombaellenes hatásmód az elsődleges támadási pont szintén a sejtmembrána szterinje /ergoszterin/ (39, 84, 85, 86). A hatás mértéke, azaz a membrán destrukció nagysága az illető vegyület függvénye.

Ezen tények, valamint az in vitro vizsgálatok alapján feltételezhető az érzékeny mikroorganizmusok szteroidglikozidák hatására bekövetkező károsodása.

A gombák membránjában lévő ergoszterin kötést létesít a jelenlévő szteroidokkal, dezorganizálódik a sejthártya; megváltoznak az élefontosságú permeációs felvételi folyamatok, a sejttartalom egy része kiürül, hasonlóan egyéb antifungális anyagok esetében tápasztaltakkal (39, 85, 86, 88).

Az élő sejtekkel történő hatásvizsgálatok az élő sejtek ergoszterinjével történő komplexkötés módját a következőkben vettem vizsgálat alá.

### 3.3. A szteroidglikozidok élő sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata

A kísérleteket különböző körülmények között végeztem el:

a/ Vizsgáltam nyugvófelszines, illetve levegőztetett /rázatott/ kultúrában;

b/ különböző pH értékek hatását mértem a gombagátló aktivitásra;

c/ inkubáltam azonos körülmények között, különböző életkorú tenyészeteket;

d/ figyeltem a szteroidok hatását tápanyagtartalmú közegben és tápanyagot nem tartalmazó pufferelegyekben;

e/ azonos tenyészeteket különböző hőfokon inkubáltam.

A vizsgálatok nagy részében a szűrés során kiválasztott mikroorganizmusok mindegyikével a szolamargin, szolaszonin,  $\beta$ -szolamargin hatását összevetve vizsgáltam. A kísérletek során három tényező változását figyeltem:

1/ szteroid felvételt, illetve megkötést, valamint a hatóanyagok esetleges szerkezeti módosulását;

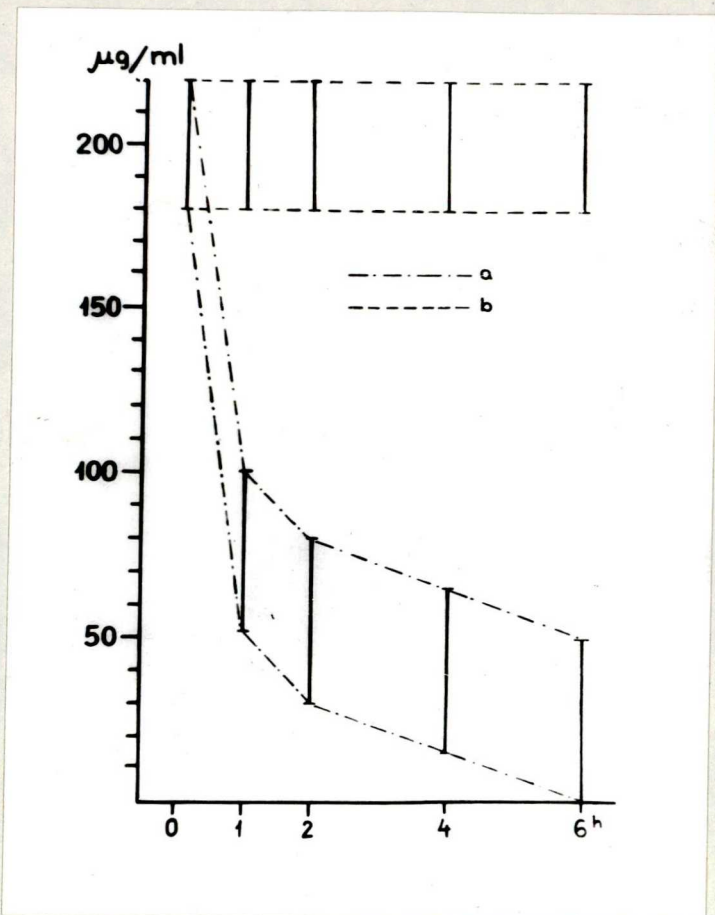
2/ aminosav kiáramlást;

3/ kálium ion kiáramlást.

#### 3.3.1. Szteroid megkötés

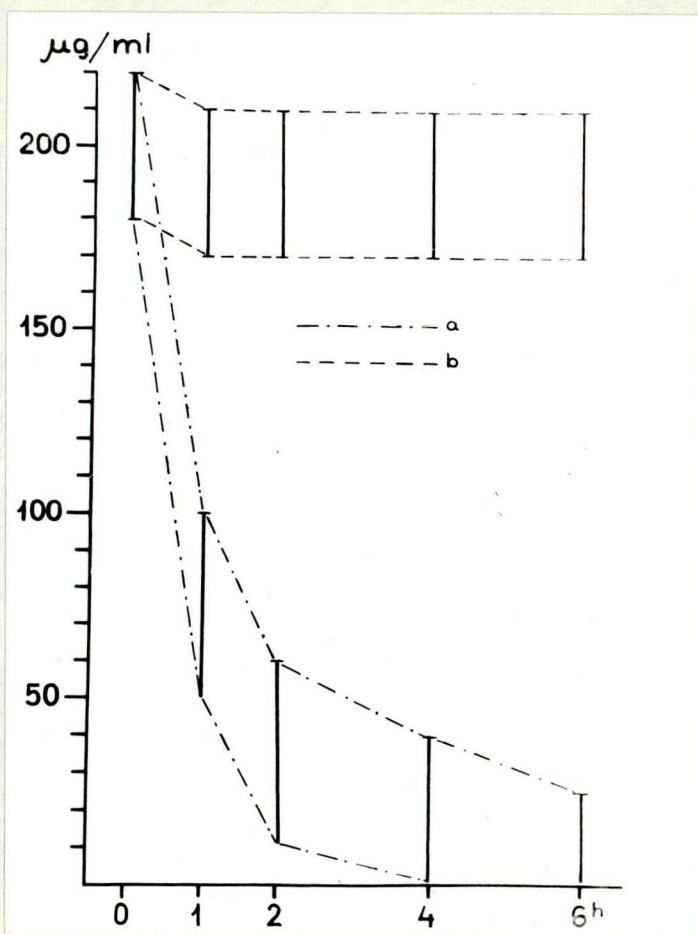
##### 3.3.1.1.1.

Az alkalmazott tesztorganizmusok közül az érzékeny *Pichia saitoi* és *Syncephalastrum racemosum* szteroid felvételét a 20. illetve 21. ábra mutatja az inkubációs idő függvényében, nyugvófelszines körülmények között, pH 7-en, 12-14 órás fiatal tenyészetekkel, tápanyagokat nem tartalmazó pufferközegben, szobahőmérsékleten.



20. ábra  
*Pichia saitoi*  
szteroid megkötése

a = szolamargin  
b = szolaszonin  
b = β-szolamargin

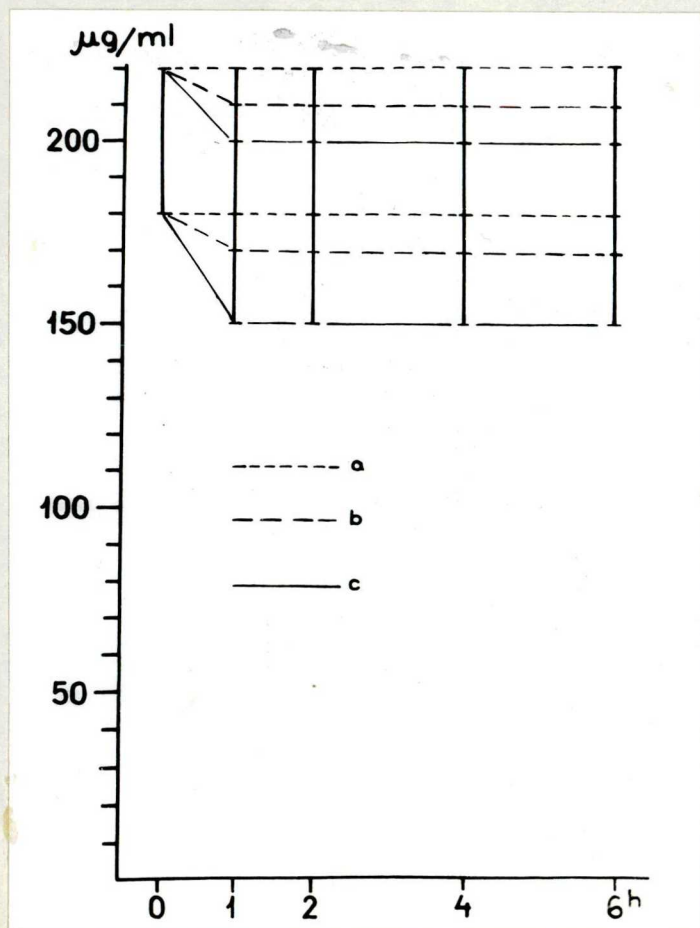


21. ábra  
*Syncephalastrum*  
*racemosum*  
steroid megkötése

Az ábráról leolvasható, hogy a nagyobb antifungális aktivitású szolamargin az inkubációs idő 6 órája alatt gyakorlatilag teljesen megkötődik mindkét gombán. A megkötődés mértéke *Syncephalastrum racemosum* esetén valamivel gyorsabb, hamarabb eléri a teljes megkötés állapotát. A szolaszonin nem, vagy alig, míg a mikrobiológiailag inaktív  $\beta$ -szolamargin egyáltalán nem kapcsolódik a sejtekhez. Megjegyzendő, hogy az inkubációs idő után a megkötött szteroid nem mosható ki a pufferrel /hosszabb idő után is kötött állapotban marad/, etanolos vagy más szerves oldószerek extrakcióval azonban kvantitatíve visszanyerhető.

### 3.3.1.1.2.

A két ellenálló tesztorganizmus a *Candida solani* és az *Aspergillus japonicus* szteroid megkötési viszonyait az előzőekkel hasonló paraméterek mellett a 22. ábra mutatja.



22. ábra

*Candida solani*

*Aspergillus japonicus*  
szteroid megkötése

a = szolaszonin,  $\beta$ -szolamargin megkötése  
mindkét gombafaj esetén

b = *Candida solani*  
szolamargin megkötése

c = *Aspergillus japonicus*  
szolamargin megkötése

Összehasonlítva az érzékeny mikroorganizmusok diagramjaival azt tapasztaljuk, hogy legfeljebb a szolamargin esetében tapasztalható minimális kapcsolódás. /Az *A. japonicus*-nál feltehetően a hiphák között adszorbeálódott az anyag, pufferes átmosás után az extraktumból nem mutatható ki szteroid./

#### 3.3.1.1.3.

A szteroidmegkötési vizsgálatokat elvégeztem baktériumokkal is. Sem a Gram + *Bacillus subtilis*, sem a Gram - *Escherichia coli* nem mutatott szteroid megkötést, még az inkubációs idő megnyújtásával sem.

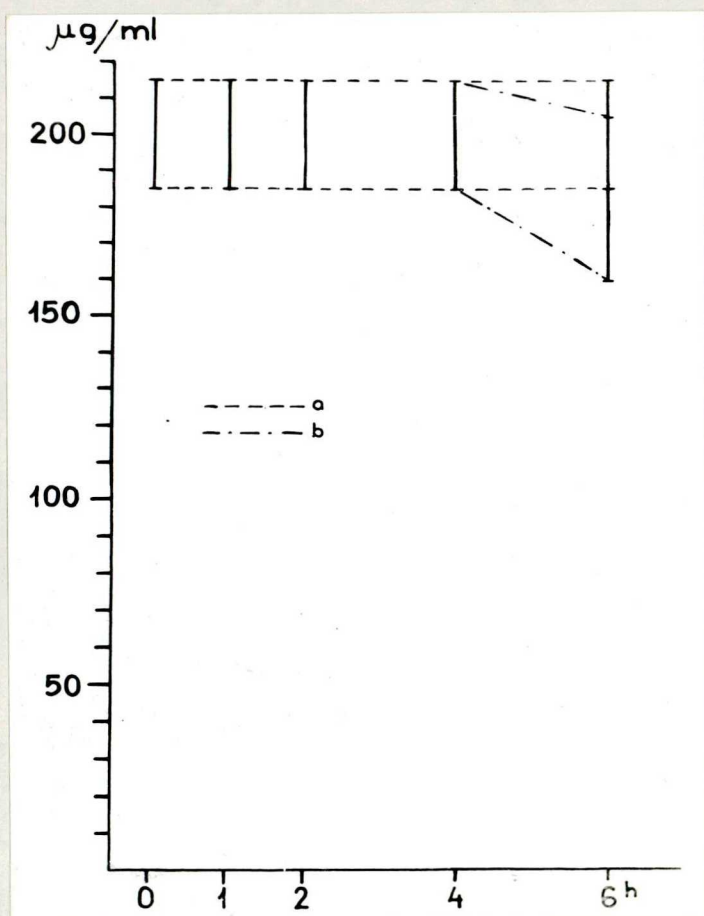
#### 3.3.1.1.4.

Ergoszterint membránjukban nem tartalmazó gombák (89, 93) - *Phytophthora dechsleri*, *Pythium ultimum* - esetében hasonló a kép (lásd 23. ábra/a), szteroid megkötés nem mutatkozott. A gombák lassú növekedése miatt itt 48-72 órás tenyészeteket használtam a vizsgálatokhoz. Az ergoszterint akkumulált *Pythium ultimum* /a fermentorban előnevelés során a táptalaj 0,5%-os ergoszterint tartalmazott, ennek az ergoszterinnek egy részét a gomba beépíti, akkumulálja membránjába (90)/ a rendelkezésre álló szolamarginből egy kis mennyiséget megköt 23. ábra/b.

#### 3.3.1.2.1.

Az előző vizsgálatokat az egyes körülmények megváltoztatásával is elvégeztem a négy ergoszterint tartalmazó gombával.

Rázatot tenyészetek esetében az állófázisú rendszereknél leírt megkötési, illetve felvételi viszonyok voltak jellemzők. A kép talán csak annyiban módosult, hogy az érzékeny fajok esetén a megkötés meggyorsult.



a = *Pythium ultimum*  
szolamargin megkötése

b = ergoszterint akkumu-  
lált *Pythium ultimum*  
szolamargin megkötése

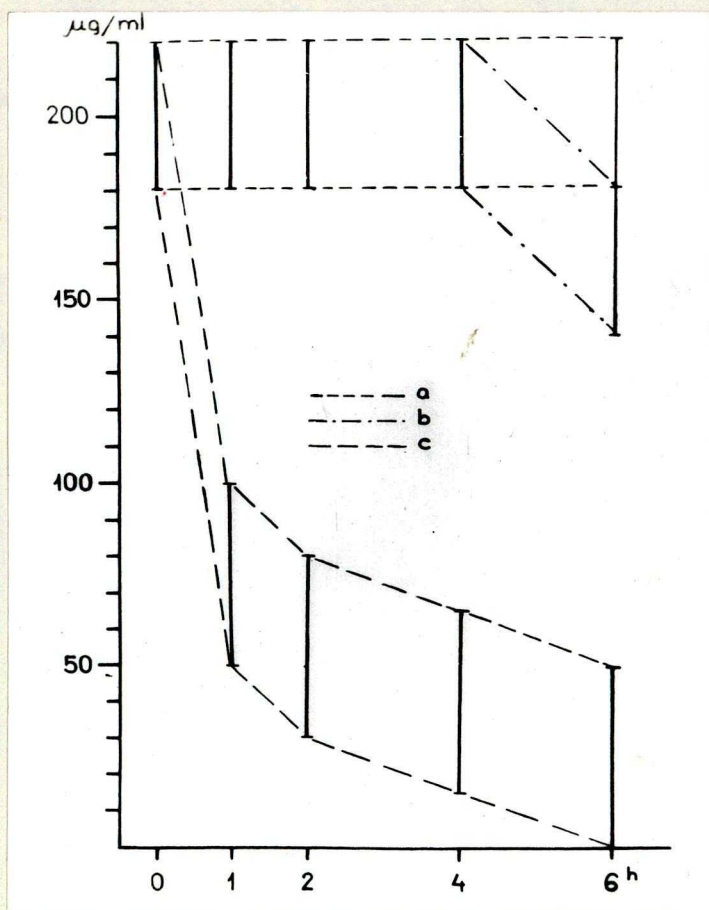
23. ábra

### 3.3.1.2.2.

Különböző pH értékeknél vizsgálva a szteroidok sejtekhez történő kapcsolódását, eltérések mutatkoznak. Míg pH 7-nél az érzékeny mikroorganizmusok teljesen megkötik a nagyobb hatású szolamargin, a kisebb hatású szolaszonint részlegesen, addig pH 5-nél, illetve pH 3-nál a nagymértékű megkötés lecsökken (24. ábra/b), illetve megszűnik (24. ábra/a).

### 3.3.1.2.3.

A különböző életkorú tenyészetek megkötési viszonyaiban is eltérés tapasztalható. Az érzékeny mikroorganizmusok öreg tenyészetei /18 óránál idősebb tenyészetek/ úgy viselkedtek a szteroidglikozidokkal szemben, mintha ellenállóak lennének. A 24 órás tenyészetek még részleges szolamargin megkötést



*Pichia saitoi*  
szolamargin megkötése  
különböző pH-n

a = pH 3;

b = pH 5;

c = pH 7.

24. ábra

A 24 órás tenyészetek még részleges szolamargin megkötést mutattak, a 48 órás tenyészetek egyáltalán nem vettek fel szteroidot. A kapott kép egyezik a 24. ábrán látottakkal /a = 48; b = 24; c = 12 órás tenyészetket jelenti/ a *Pichia saitoi* esetében.

#### 3.3.1.2.4.

A szteroid megkötési vizsgálatokat tápanyag tartalmú közeg esetében is megismételtem. Eltérést nem tapasztaltam a sima pufferközegű inkubálással szemben. A szteroidglikozidok megkötésének képe azonos a 20-22. ábrákon látottakkal.

#### 3.3.1.2.5.

Az egyébként szobahőmérsékletű inkubáláson kívül megvizsgáltam, hogy mennyiben módosul a szteroid megkötés érzékeny mikroorga-



nizmusoknál a hőmérséklet változtatásával. *Pichia saitoi* tenyészeteket inkubáltam 30°, 20°, 10°, 5° és 0°C-on. Megállapítást nyert, hogy a 20-30°C között a szteroid kötődés azonos intenzitású. 5°C-ig a megkötött szteroid mennyisége fokozatosan csökken, 5°C-0°C között szteroid felvétel gyakorlatilag nincs.

#### 3.3.1.3.

A kísérleti munka során egyetlen mikroorganizmus, egyetlen szteroidglikozid esetében sem jelentkezett enzimatis cukorlehasítás, vagy más szteroidok szerkezetében történő változás, ami "méregtelenítést" feltételezne a mikroorganizmus részéről. A megkötött szteroidok is eredeti állapotban visszanyerhetők voltak alkoholos extrakcióval.

#### 3.3.1.4.

A szolamargin felvételi próbáját az élő sejteken kívül különböző módon előlt sejtek frakcióival is elvégeztem a kötődés helyének meghatározása céljából.

Igy: 1/ hőkezelt sejtekkel;

2/ etanollal extrahált sejtekkel;

3/ homogenizálással dezintegrált sejtekkel;

4/ *Helix pomatia* sejttal emésztő enzimeket tartalmazó bélnedvével kezelt sejtekkel;

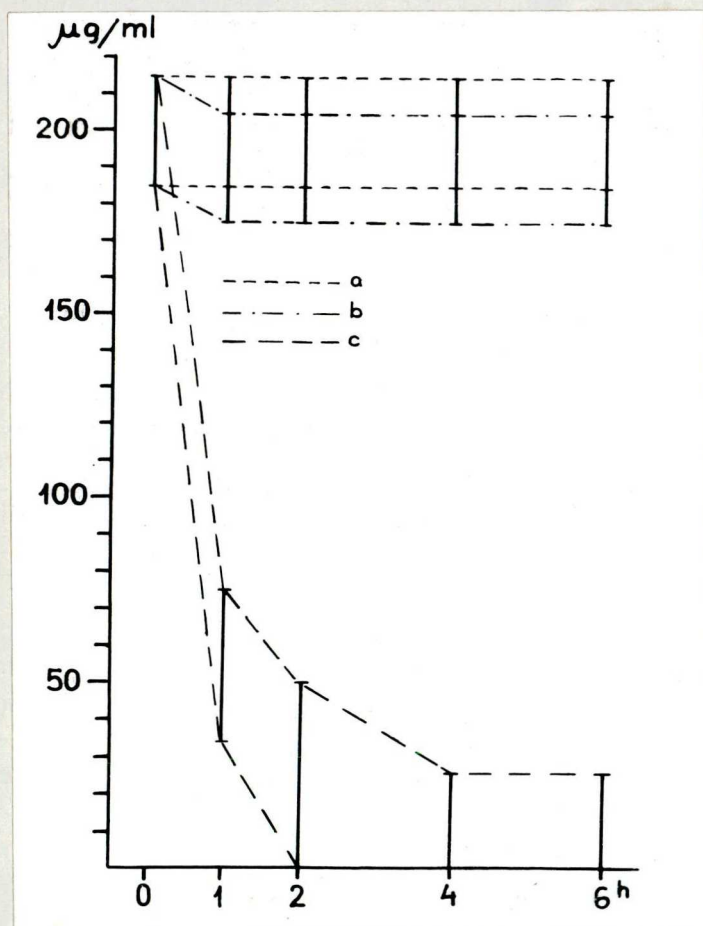
5/ más erősebb aktivitású szteroidokat megkötött sejtekkel végeztem szolamargin megkötési próbákat.

#### 3.3.1.4.1.

A hőkezelés 5 perces pufferközegben történő forralással történt.

A hőkezelt *Pichia saitoi*, *Candida solani*, *Syncephalastrum racemosum*, *Aspergillus japonicus* tenyészetei megkötik a szola-

margint 25. ábra/c. A szteroid megkötés gyorsabb mint az érzékeny mikroorganizmusoknál élő állapotban történő szteroid kötődés. A kezeletlen *Pythium ultimum* sejtek hővel történő előlése után sem képesek szolamargint megkötni 25. ábra/a. Az ergoszterines környezetben nevelt *Pythium ultimum* tenyészet kismértékű szolaszonin kötést mutat 25. ábra/b. A baktériumok hőkezelt állapotban szintén nem kötnek meg szteroidot.



Hőkezelt mikroorganizmusok szteroid megkötése

a = *Pyth. ultimum*

b = ergoszterin akkumulált *Pyth. ultimum*

c = *P. saitoi*, *C. solani*, *A. japonicus*, *Syn. racemosum*

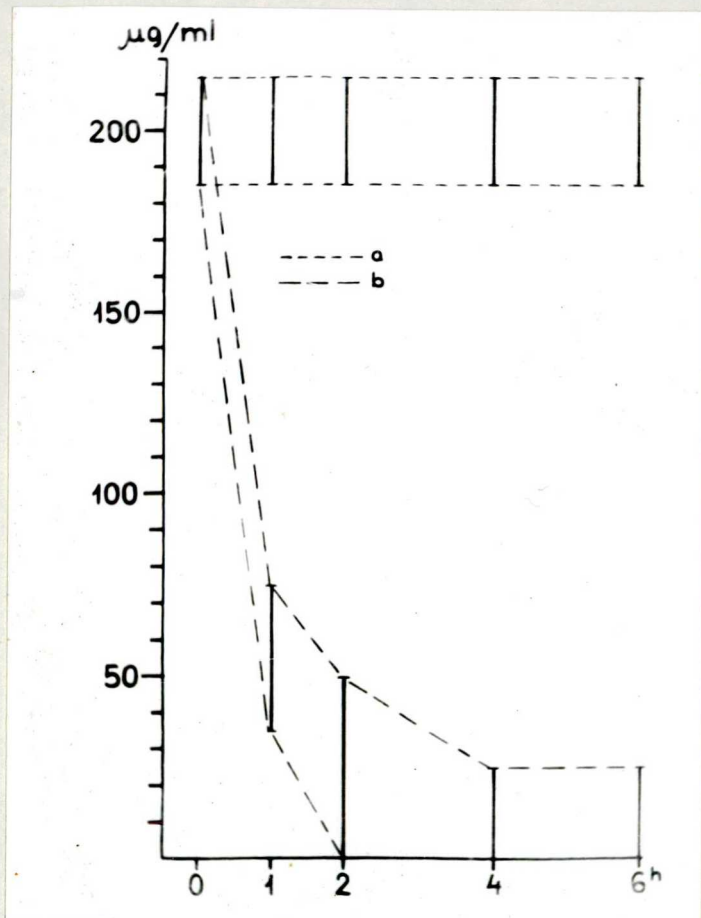
25. ábra

3.3.1.4.2.

Extrahálás 10 perces, 96%-os etanolos főzéssel történt.

Az extrahált gomba mennyiséggel elvégezve a szteroid kötési próbát egy esetben sem történt szteroid kapcsolódás az el-

ült sejtekhez. A 26. ábrán a hőkezelt sejtek szteroid kötése mellett igen szemléletes, hogy ergoszterinjétől elválasztott /extrahált/ sejtek szteroidot megkötni nem képesek.

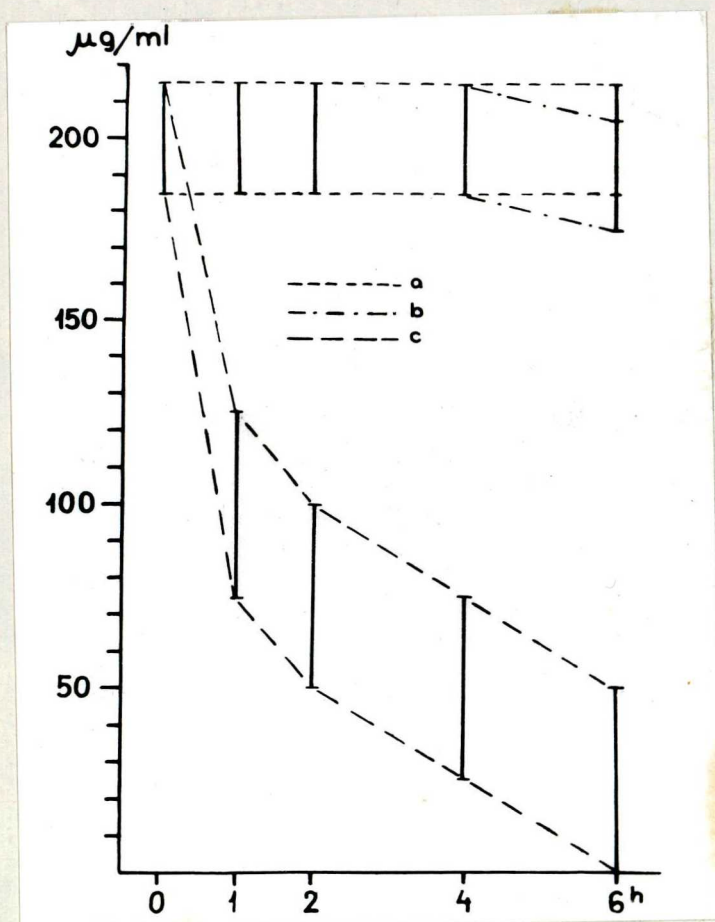


Hőkezelt, illetve extrahált *P. saitoi* és *C. solani* sejtek szolamargin felvétele  
a = extrahált sejtek  
b = hőkezelt sejtek

26. ábra

### 3.3.1.4.3.

A homogenizálást 20 perces kvarchomokkal történő dörzsöléssel, vagy ultrahang dezintegrátorral /M.S.E. No 3000/ 60 Wx cm<sup>2</sup> intenzitás mellett 20-25 percig végeztem. A sejtek elpusztulását tenyésztési próbával ellenőriztem /1-7%-os volt a telepképző egységek száma/. A hőkezeléshez hasonló kép látható a dezintegrált sejtek szolamargin kötése esetén is, csak nem olyan gyors a felvétel (lásd 27. ábra).



Homogenizálással dezintegrált sejtek szolamargin megkötése

a = *Pyth. ultimum*, *B. subtilis*

b = ergoszterinnel érzékenyített *Pyth. ultimum*

c = *P. saitoi*, *C. solani*, *A. japonicus*, *Syn. racemosum*

27. ábra

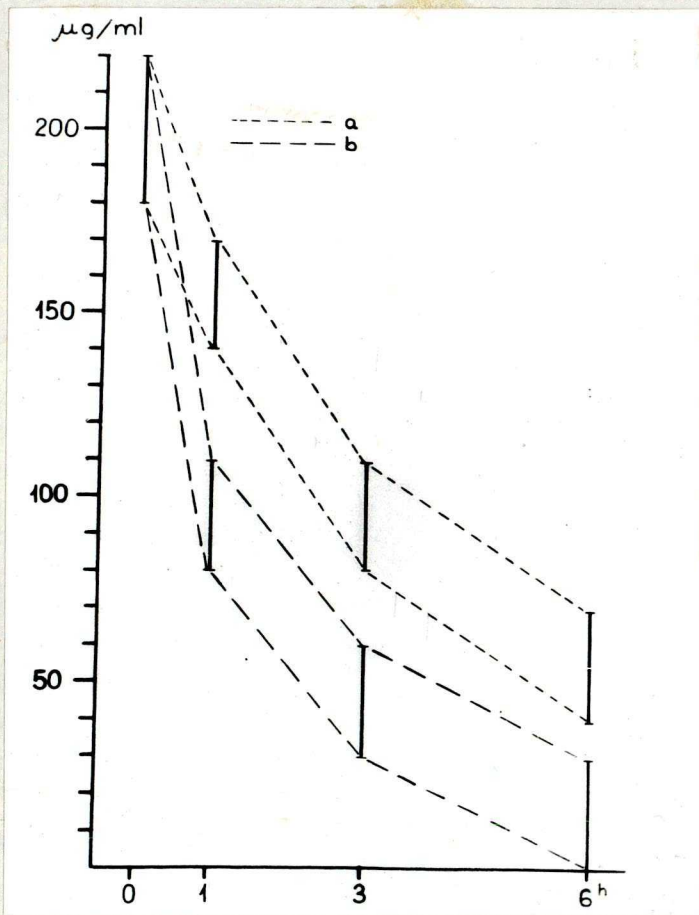
#### 3.3.1.4.4.

A *Helix pomatia* sejtfaloldó enzimeivel a *Pichia saitoi* és *Candida solani* sejteket kezeltem. Az enzimekről ismert a sejtfaloldó hatásuk, amely következtében protoplasztképzés áll elő (91), ez nem általános, vannak jól, kevésbé és ilyen módszerrel egyáltalán nem protoplasztható gombafajok.

A kezelés módja: a sejtek 3 órán keresztül - 100 mg nedves-sejt/1 ml 0,6 n KCl tartalmú pufferrel felére hígított bélnedv - mennyiségi arányoknak megfelelően inkubálódtak.

/1 ml bélnedv kb 100 mg enzimfehérjét tartalmaz./ A kezelés után elvégeztem a szolamargin megkötési próbát. A vizsgált

két mikroorganizmus rendkívül rosszul, a *Pichia saitoi* 1-6%-ban, a *Candida solani* gyakorlatilag nem képzett protoplasztot. Ennek ellenére a szteroidkötésben változás állt elő az élő, kezeletlen sejtekhez képest. Bár a *Candida solani* sejtjei mikroszkóposan nem változtak, egyéb tulajdonságaikban mint normális sejtek viselkedtek, a szolamargin jelentős részét az inkubálás végére megkötötték (28. ábra/a).



*Helix pomatia* sejt-faloldó enzimkirovonával kezelt sejtek szolamargin megkötése  
a = *Candida solani*  
b = *Pichia saitoi*

28. ábra

#### 3.3.1.4.5.

Szenzitiv mikroorganizmusokat - *Pichia saitoi*, *Syncephalastrum racemosum* - tomatin, illetve digitonin tartalmú közegben inkubáltam. 6 órás inkubálás után a két mikroorganizmus az alkalmazott szteroidokat az inkubációs elegyből 100%-osan meg-

kötötte. Pufferes atmoszféra után szolamargin jelenlétében inkubáltam a tenyészeteket. A szolamargin kötés ezután már nem következett be.

Ha élő sejtekkel az előbbi szteroidkötési próbát fordítva végeztem el, abban az esetben a tomatin, illetve a digitonin kötését létesít a sejtekkel, de az előzőleg megkötött szolamargin a kötéspontokról leszorul. Irodalomból ismert jelenséggel állunk szemben (92), amikor is a digitonin a membránon megkötött nystatint képes volt leszorítani. A kötéspontok tehát azonosak.

### 3.3.2. Aminósav kiáramlás

Az aminósav kiáramlás mértéke különböző volt, attól függően, hogy érzékeny, vagy ellenálló mikroorganizmust vizsgáltam.

#### 3.3.2.1.1.

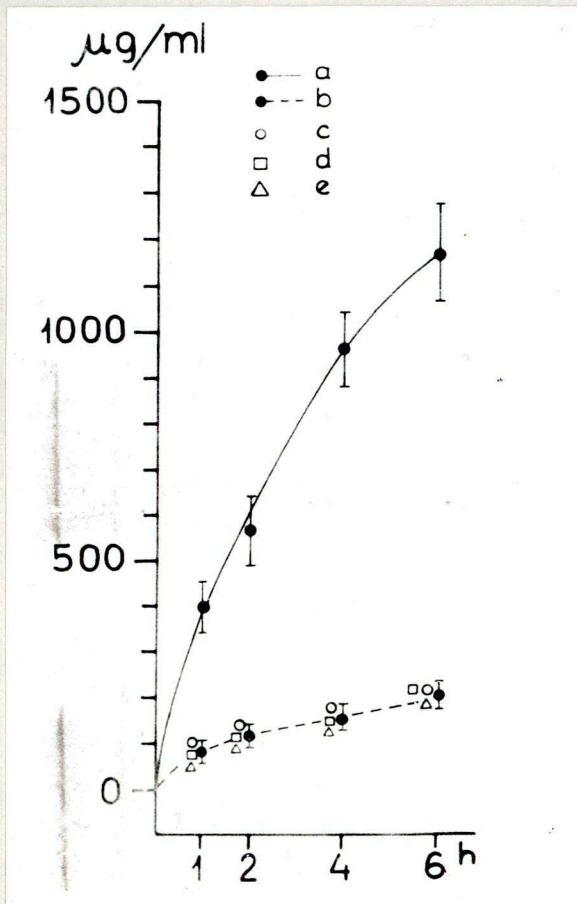
Érzékeny mikroorganizmusok esetén a szolamargin kezelés hatására nagy az aminósav effúzió a kontrollhoz viszonyítva (29., 30. ábra) állófázisú rendszerben pH 7-en, fiatal, 12-14 órás tenyészetekkel, tápanyagot nem tartalmazó pufferközegben, szobahőmérsékleten.

Az ábrán jól látható, hogy a szolaszonin,  $\beta$ -szolamargin nem idézett elő komoly aminósav kiáramlást. Mindkét esetben az átlagértékek a kontroll szórásintervallumán belül helyezkedtek el.

#### 3.3.2.1.2.

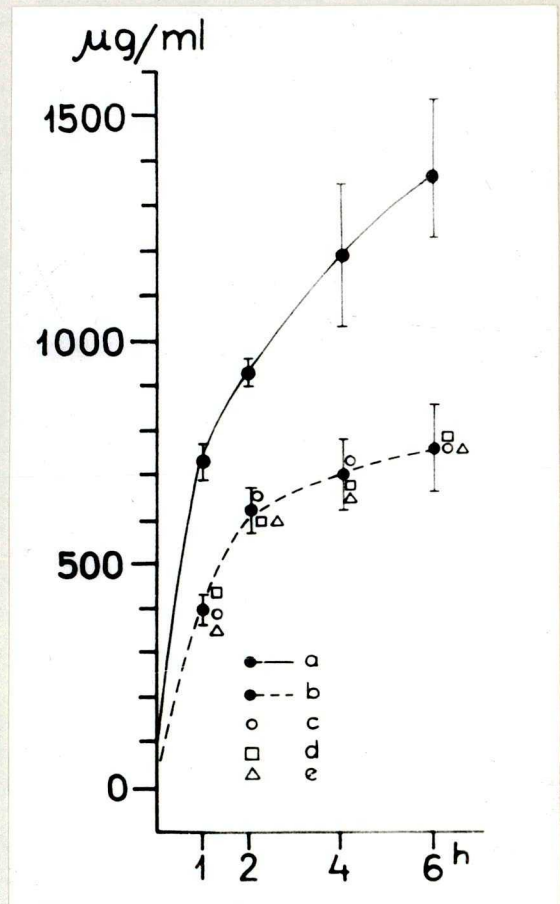
Az ellenálló mikroorganizmusok szolamargin hatására fellépő aminósav effúziója nem olyan nagymérvű, mint az érzékenyeknél

(31., 32. ábra), a paraméterek azonosak a szenzitív fajoknál leirtaknál.



29. ábra

*Pichia saitoi* aminosav kibocsátása szteroid kezelés hatására



30. ábra

*Syncephalastrum racemosum* aminosav kibocsátása szteroid kezelés hatására

a = szolamargin kezelt átlaga;

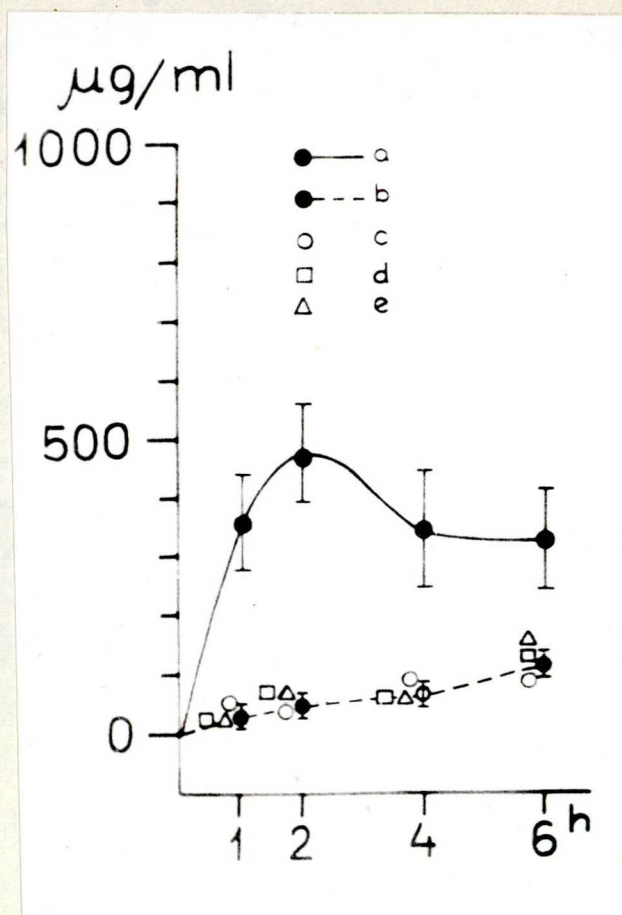
b = kontroll, illetve szolaszonin,  $\beta$ -szolamargin kezelt összesített átlaga;

c = kontroll átlaga;

d = szolaszodin kezelt átlaga;

e =  $\beta$ -szolamargin kezelt átlaga

Az ábrán feltüntetett mennyiségi intervallumok az átlagérték megbízhatósági intervallumai 95%-os szinten.



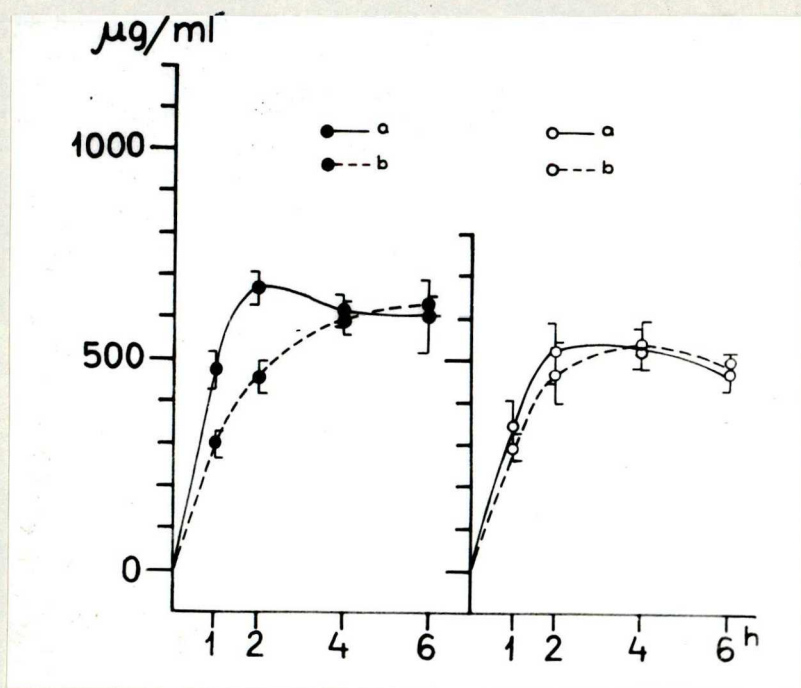
31. ábra

Candida solani aminosav kiáramlása szteroid hatásra

Jelölések azonosak a 29., 30. ábráknál leirtakkal

Szolamargin kezelés hatására az inkubáció megkezdésekor a kontrollhoz viszonyítva az aminosav kiáramlás jelentős. Ez a szint azonban hamar állandósul és a 6. órában a kontroll jól közelíti ezt az értéket. A Candida solani esetében a kiáramlott aminosav mennyiség egy részét a sejtek ismét felveszik, az inkubációs közeg aminosav szintje kontroll közelébe kerül a 6. órában. /A jelenség oka egy átmeneti károsodás lehet, amelyet az élő sejtek kiküszöbölnek./





*Aspergillus japonicus*  
aminósav effúziója  
szteroid hatásra

Bal oldali:

a = szolamargin kezelt  
átlagérték

b = kontroll átlagérték

Jobb oldali:

a = szolaszonin kezelt  
átlagérték

b =  $\beta$ -szolamargin ke-  
zelt átlagérték

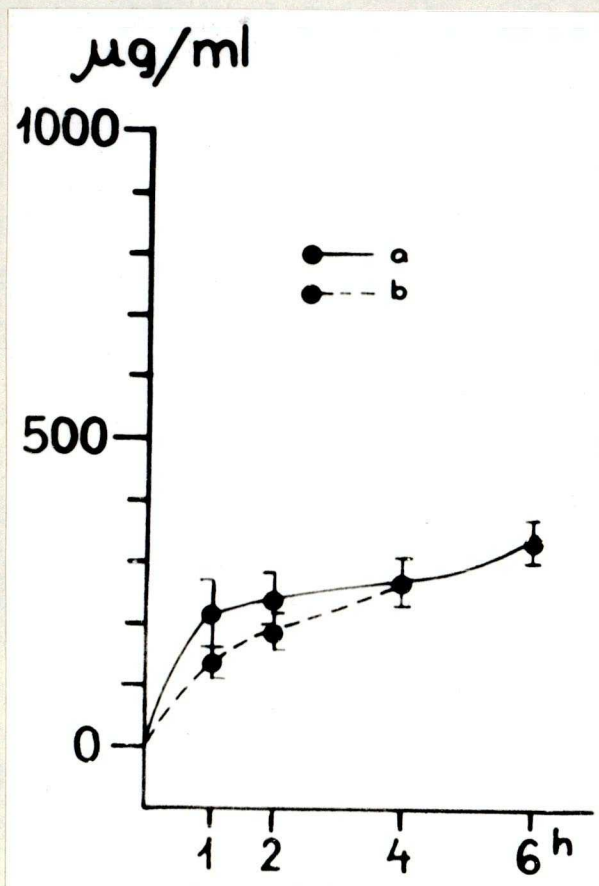
32. ábra

### 3.3.2.1.3.

*Pythium ultimum* esetében a szolamargin kezelés hatására bekövetkezett aminósav kiáramlás átlagértékei a kontroll szórási intervallumán belül ingadoznak kis eltéréssel (33. ábra). A membránjukba ergoszterint akkumulált *Pythium* sejtek aminósav effúziójukban eltérést mutatnak szolamargin kezelés hatására (34. ábra). Az ábrán látható különbség a kontrollhoz viszonyítva számítások szerint szignifikáns.

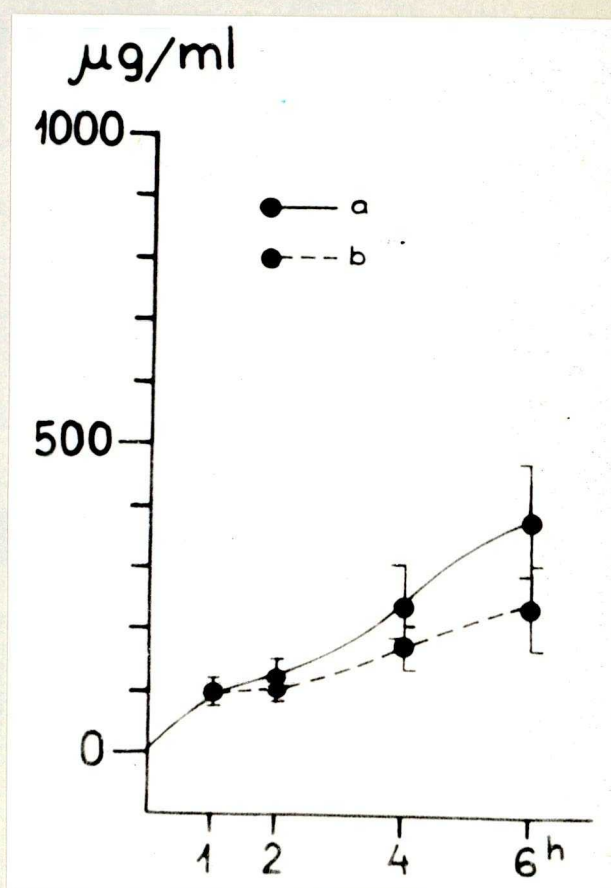
### 3.3.2.2.

A vizsgálati paraméterek változtatásával eltérések tapasztalhatók az aminósav effúzióban. Ilyen irányú vizsgálatok az érzékeny *Pichia saitoi* tenyészetekkel történtek, szolamargin kezelés hatására bekövetkező változásokat figyelemmel kísérve.



33. ábra

*P. ultimum* aminosav effúziója



34. ábra

Ergoszterint akkumulált *P. ultimum* aminosav effúziója

a = szolamargin kezelt átlagértékei

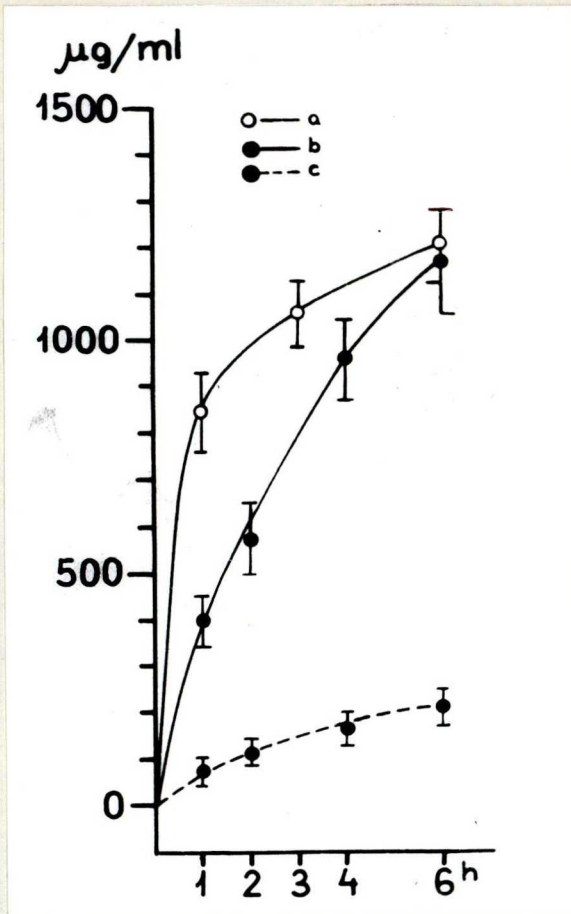
b = kontroll kezelt átlagértékei

### 3.3.2.2.1.

Rázott körülmények között a szteroid felvételhez hasonlóan az aminosav kilépés is meggyorsul (35. ábra). Az inkubációs idő végére kiáramlott összaminósav mennyiségben eltérés gyakorlatilag nem tapasztalható, csak rázatás hatására a folyamatgörbe meredekebbé válik.

### 3.3.2.2.2.

Különböző pH-n az aminosav effúzióban lényeges különbségek adódtak (36. ábra).



35. ábra

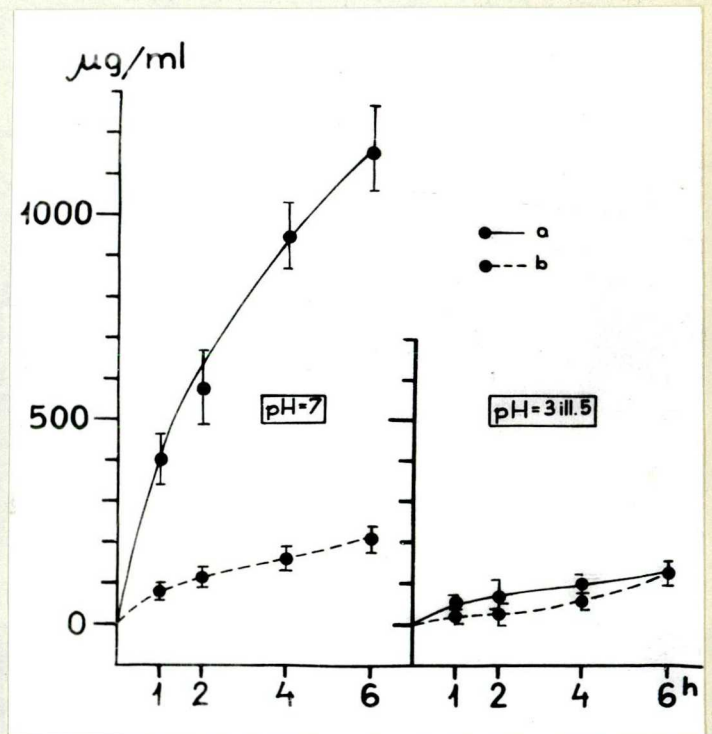
*Pichia saitoi* aminosav effúziója

a = szolamargin hatásra rázatott körülmények között

b = szolamargin hatásra nyugvófelszínes körülmények között

c = kontroll

*Pichia saitoi* aminosav effúziója szolamargin kezelés hatására, különböző pH-n

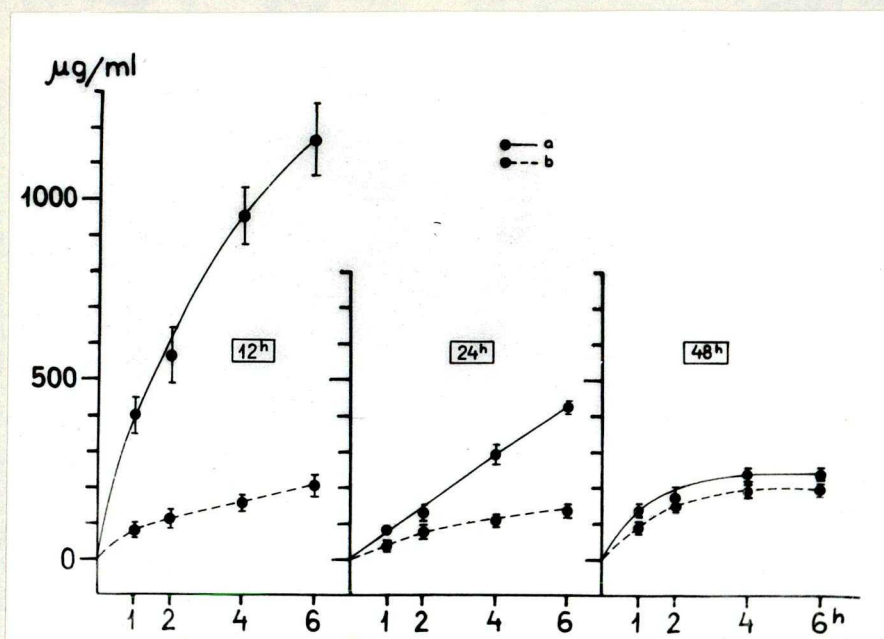


36. ábra

Az ábrán látható, hogy a semlegestől eltérő pH-n az aminosav kiáramlás alig tér el a kontrolltól /a kontrollhoz viszonyítva kisebb a kiáramlás mértéke, mint a nem érzékeny fajoknál pH 7-en tapasztalt eltérés/. A pH 5, illetve pH 3-nál mért értékek egy görbén vannak ábrázolva, mivel eltérésük nem haladja meg szórás-intervallumuk határértékeit.

### 3.3.2.2.3.

Különböző tenyésztési idejű *Pichia saitoi* tenyészeteket inkubálva is jelentős különbségek adódtak az aminosav kiáramlásban (37. ábra).



37. ábra

Különböző tenyésztési idejű *Pichia saitoi* tenyészetek aminosav kiáramlása

Jól látható az összefüggés, amely a szteroid felvételben /lásd 3.3.1.2.3./ is jelentkezett. Míg a 12 órás tenyészetek maximális érzékenységet mutatnak, a 24 órás tenyészetekre már csak kevésbé hat a szolamargin, a 48 óráskok pedig teljesen ellenállóknak mutatkoztak.

#### 3.3.2.2.4.

<sup>A</sup> tápanyag jelenlétében történő inkubálás a szolamargin kezelésre bekövetkező aminosav kilépés szintjét, a kiáramlott összaminósav mennyiségét nem befolyásolja. A görbék lefutása mindenben egyezett a 29. ábrán látottakkal.

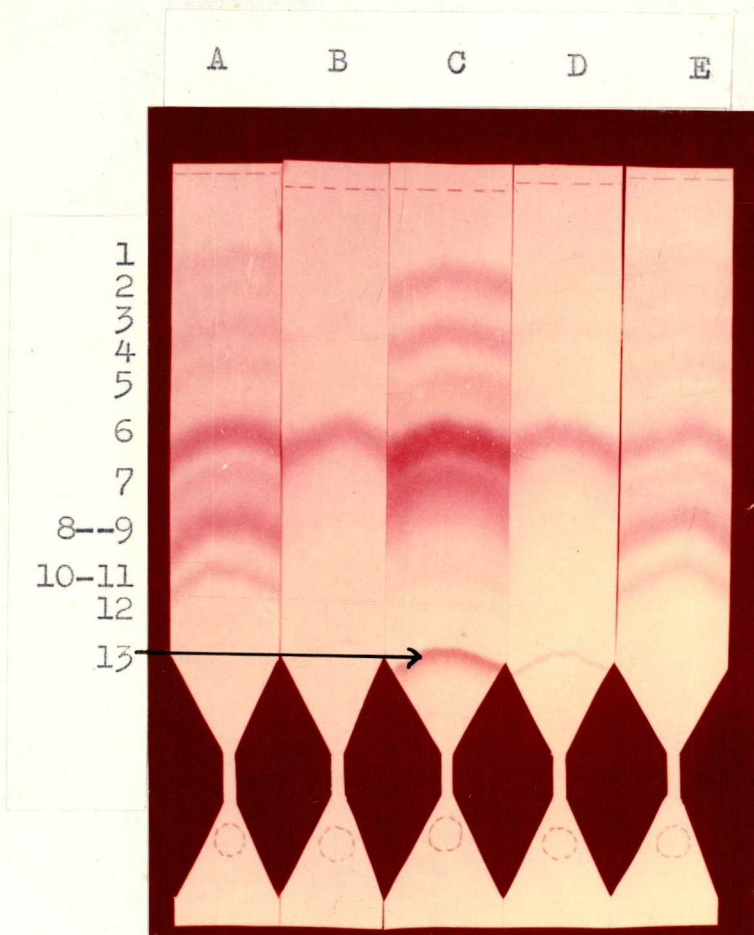
#### 3.3.2.2.5.

Különböző hőmérsékleten vizsgálva a szolamargin kezelés hatására kilépő aminosav mennyiséget, azt tapasztaljuk, hogy szigorú összefüggés mutatkozik a felvett szteroid /lásd 3.3.1.2.5./ mennyiség és a kibocsátott aminosav mennyiség között. 20-30°C között gyakorlatilag azonos az aminosav kiáramlás - nagy mértékű a kontrollhoz viszonyítva - 0-5°C között pedig az abszolút mennyiségben igen csekély kontroll értékekkel egyező a kiáramlás.

#### 3.3.2.3.

A szteroid kezelés hatására kilépő aminosav mennyiségből a papirkromatográfiás, minőségi meghatározásokat is elvégeztem (17. kép).

A képről leolvasható, hogy óriási a mennyiségi differencia a szolamargin kezelés javára, de az egyes kiáramlott aminosavak egymáshoz viszonyított mennyiségében eltolódás nem tapasztalható. A kezelés hatására kilépő aminosavak a sejten belül a természetesen meglévő arányaiknak megfelelően mutathatók ki az inkubációs elegyből. Igen szemléletes, hogy a  $\beta$ -szolamargin kezelés és a kontroll közt gyakorlatilag nincs különbség.



17. kép

*Pichia saitoi* aminosav kromatogramja

- A/ E/ Az összehasonlító standard 0,1 ml-e
- B/ Kontroll inkubációs elegyének 0,1 ml-e
- C/ Szolamargin kezelt inkubációs elegyének 0,1 ml-e
- D/  $\beta$ -szolamargin kezelt inkubációs elegyének 0,1 ml-e

A standard 0,1 ml-ének összaminósav tartalma 50 ug. Az egyes komponensek a kromatogramon felülről lefelé az alábbi mennyiségekkel szerepelnek:

1/ Leu	1,5 ug	7/ Glu + Ser	6,0 ug
2/ Phe	3,0 "	8/ Gly + Glu-NH <sub>2</sub>	3,5 "
3/ Val	1,5 "	9/ Asp	10,0 "
4/ γ-Amb	1,5 "	10/ Asp-NH <sub>2</sub>	8,0 "
5/ Pro	5,0 "	11/ Lys	1,0 "
6/ Ala	5,0 "	12/ Cys	4,0 "

A szolamargin kezelt mintánál megjelenő plusz folt /13-as jelzésű/ már nem egyszerű aminosav, hanem kisebb peptidok összessége. A papírról történő elúcióval ezt a peptid mennyiséget feldásítottam, majd 6 n HCl-lal ampullázva 1 atmoszféra túlnyomáson két órán keresztül autoklávozva hidrolizáltam. A hidrolizátumot összehasonlító mellett futtatva, megállapítottam, hogy a peptidok felépítésében nagyobb mennyiségben az alábbi aminosavak vettek részt:

alanin

szerin vagy glicin

glutaminsav vagy treonin

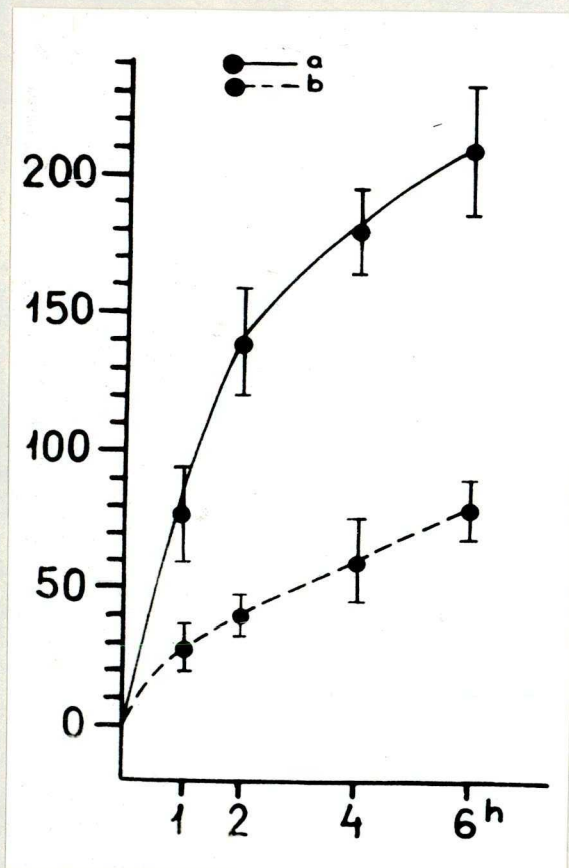
glutamin vagy aszparaginsav

aszparagin

lizin

### 3.3.3. Kálium kiáramlás

A kálium effúzió mérése előtt a mikroorganizmusok előnevelése káliumban dúsított /0,5% KCl tartalmú/ táptalajon történt. Munkám során pontos mérési adatokat a *Pichia saitoi* (38. ábra) és a *Candida solani* (39. ábra) kálium kiáramlásáról adok meg, megjegyezvén, hogy a *Syncephalastrum racemosum* a *P. saitoi*hoz az *Aspergillus japonicus* pedig a *C. solani*hoz hasonló kálium kibocsátást mutatott szolamargin kezelés hatására.



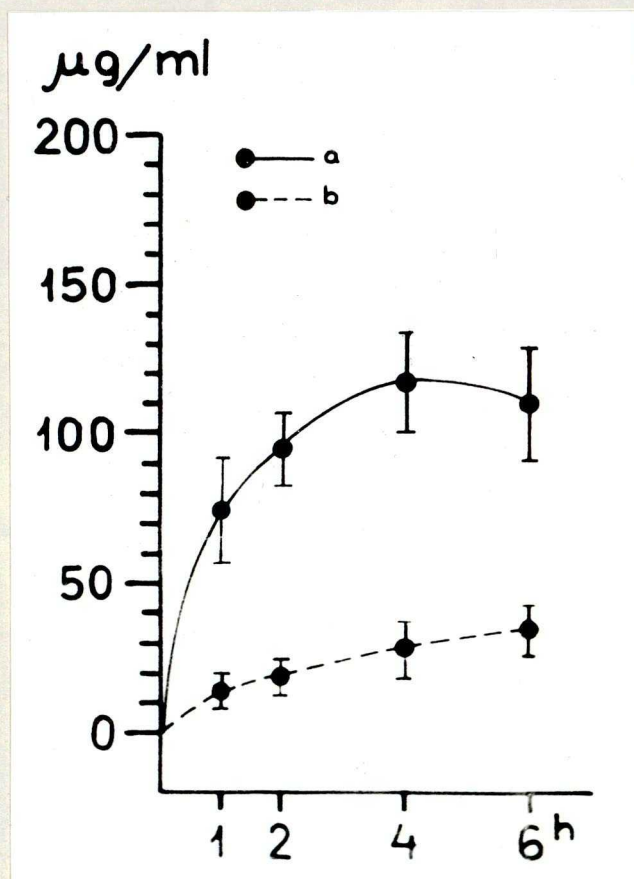
*Pichia saitoi*  
kálium effúziója  
a = szolamargin kezelt  
b = kontroll

38. ábra

A 38. ábrán a szenzitív *Pichia saitoi* kálium kiáramlási diagrammja nagy hasonlóságot mutat az aminósav effúzióval (29. ábra), ugyan-ez a hasonlóság érvényes a *Candida solani* esetében is 39., illet-



ve 30. ábrák között. A szolaszonin  $\beta$ -szolamargin hatására történő kálium kilépés középértéke a kontroll megbízhatósági intervallumán belül esett minden alkalommal, így külön azt nem tüntettem fel az ábrákon.



*Candida solani*  
kálium effúziója  
a = szolamargin kezelt  
b = kontroll

39. ábra

A kálium ion kivándorlási adatokból ugyanazok a következtetések vonhatók le, mint az aminosav effúzióra vonatkozó mérésekből. Megjegyzendő, hogy a mérési metodikák közelítőleg azonos munkaigényűek, de több gyakorlati indok miatt célszerűbb volt a szteroid hatásra bekövetkező változásokat aminosav kiáramlás mennyiségi mérésével követni, mert pl. ilyen esetben nem kellett káliumdús táptalajon előnevelni, vagy az inkubáció során kálium mentesíteni az inkubációs elegyet.

### 3.4. A szteroidglikozidok élő sejtekre gyakorolt hatásvizsgálati adatainak értékelése

A vizsgálati adatok sorából - összevetve az *in vitro* vizsgálatokkal, valamint egyéb, főként polién antibiotikumokra vonatkozó adatokkal és a szteroidok hemolízisével kapcsolatos korábbi megállapításokkal - az alábbi következtetések vonhatók le.

#### 3.4.1.

Az érzékeny mikroorganizmusok esetében a hatásos szolamargin a sejteken megkötődik. A kötődés velejárója a nagymérvű sejtkárosodás, amelyet kálium ion kivándorlásokon túlmenően aminosav effúzióval tudtam figyelemmel kísérni /sőt a membrán destrukció oly nagymérvű volt, hogy a sejtből aminosavak mellett kisebb peptidek is kiáramlottak az inkubációs elegybe/.

A szteroidglikozidok kötéspontjai feltehetően a membrán szterinjén vannak. *In vitro* vizsgálatok kimutatták, hogy a szteroidglikozidok a szterinekkel 1 : 1 arányú molekulakompleket hoznak létre /a sejtfa, illetve a membrána egyéb anyagairól ez nem igazolható, ha az ergoszterint kiextraháltam a sejtekből, a kapcsolódás elmaradt/.

Igazoltam, hogy vizes közegben, a sejtek életkörülményeinek megfelelő feltételek között is lejátszódik a komplexképzés.

A hemolízis vonatkozásában igazolt tény, hogy ugyanezen szteroidglikozidok hatásukat a vérsejtmembrána koleszterin részéhez történő kapcsolódással fejtik ki, membrándestrukciót idéznek elő (30). A polién antibiotikumok hemolízise is ezzel a hatással magyarázható (87). A polién antibiotikumok antifungális hatása is a sejtmembrán ergoszterinjéhez történő kapcsolódáson alapul

(39, 85, 86, 88). A dezorganizált sejthártya áteresztővé válik, életfontosságú anyagok - anorganikus foszfát, kálium, aminosavak - vándorolnak ki. A membrán szerkezetében és funkciójában a szterineknek kulcs szerepe van, ezt az is bizonyítja, hogy a hatás ellensúlyozható szterin túladagolással, abban az esetben, ha a membrán destrukció nem nagymérvű (87, 94, 95). Egyes poliéneknél kimutatták, hogy a kálium és ammónium ionok túladagolásával is visszaszorítható a károsodás, bizonyítván azt, hogy tulajdonképpen ezen anyagok hiányában következik be a sejt pusztulása (96, 97). Vizsgálataim esetében a membránkárosodás annál nagyobb mértékű volt, mintsem azt szterinek, ionok, illetve aminosavak túladagolásával ellensúlyozni lehetett volna.

A szteroidok hatásának molekuláris szintű vizsgálataival bizonyították, hogy a membránban lamellárisan elrendeződött szterinmolekulákkal az alkalmazott szteroidglikozidok 1 : 1 arányban molekulapárokat képezve egy gyűrűt alkotnak, pórusokat építve ki a membránon. Egy gyűrű, mintegy 20 molekulapárból áll, ezt a jelenséget a vérsejt membrán és a Rous-szarkoma vírus membrán vonatkozásában egyaránt kimutatták (98, 99, 100). Ugyanez az elektronmikroszkópos struktúra keletkezett, ha filippinnel kezelték a membránt, illetve mesterséges hárttyát /koleszterin + lecitin/, vagy koleszterin diszpenziót kezelték az előbbi hatóanyagokkal.

Az elvégzett vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy a gombák membránja áteresztővé, hasonló módon válik. Irodalmi adatokkal összevetve az általam vizsgált, hatásosnak bizonyult szolamargin okozta membrán destrukció nagymérvű, nemcsak speci-

fikus változásokat idéz elő, hanem mint a kis szénatomszámú poliének általában, igen intenzív sejtből történő anyag kiáramlást eredményez (39).

Azok a szteroidglikozidok, amelyek komplexképző aktivitással nem bírtak, / $\beta$ -szolamargin/ vagy igen gyenge aktivitást mutattak, /szolaszonin/ a gombákon nem tudtak megkötődni.

A szteroidok membránhoz történő kapcsolódásának kétség kívül az az egyszerű reakciókészség az oka, amely az ergoszterinnel történő molekulakomplex-képzésben nyilvánul meg. Az antibiotikus hatáshoz vezető reakciót azonban egyéb strukturális és biokémiai tényezők is befolyásolják. Ha összevetjük pl. a hővel előlt, vagy homogenizálással dezintegrált sejtek és az élő sejtek szteroid megkötését, szenzitív fajok esetében, különbség mutatkozik a kötődés sebességében. /A dezintegrált sejtek gyorsabban kötötték meg a vizsgált szteroidglikozidokat, pedig mindkét esetben élő, előlt állapotban a kötődésre képes ergoszterin mennyiség azonos volt./ Ha a szteroidok megkötésének élő sejtek esetében pusztán az előbbieken tárgyalt kapcsolódásbeli okai lennének más tényezőtől nem befolyásoltatva, akkor 0-5°C között vizsgálva az érzékeny fajok tenyészetét a szolamargin megkötésnek be kellett volna következnie. A szteroid kapcsolódás elmaradt, holott in vitro komplex leválás ilyen körülmények között nagy intenzitású, a reakció nem lassul le. A jelenség magyarázásához a sejtfalnak mint élő strukturának tevékenységét kell feltételezni, amely hőmérséklet változás hatására /alacsonyabb hőfokon/ megakadályozza a szteroidok membrán támadásának lehetőségét.

Az érzékeny fajok esetében fellépő "öreg kori rezisztencia"

is a sejtfalban bekövetkező változásokkal magyarázható. Az előregedő sejtfal, ma még ismeretlen okok miatt megakadályozza a szteroidok támadási lehetőségét.

Egyéb körülmény változtatása pl. a pH változás, magára a komplexképződés számára teszi kedvezőtlené a körülményeket, úgy hogy hatás ebben az esetben ezért marad el.

### 3.4.2.

A rezisztencia okának vizsgálata kétféle eredményre vezetett.

#### 3.4.2.1.

Az ergoszterint tartalmazó rezisztens gombák esetében nem az ergoszterin mennyiség az oka annak, hogy hatás velük kapcsolatosan nem mutatható ki. Mennyiségi meghatározással kimutattam, hogy a szenzitív és rezisztens fajok között nincs lényeges differencia az ergoszterin tartalomban (III. táblázat).

Faj név	érzékenység	ergoszterin tartalom mg/g szárazsúly
<i>Pichia saitoi</i>	érzékeny	6,8 ± 0,7
<i>Candida solani</i>	érzéketlen	6,8 ± 0,8
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	érzékeny	15,0 ± 2,5
• <i>Aspergillus japonicus</i>	érzéketlen	11,2 ± 1,2

III. táblázat

Mint azt a rétegekromatográfiás ellenőrzéssel kimutattam, a vizsgált hat órás inkubációs idő alatt enzimatiszus méregtelenítés /cukor lehasítás/ nem történt. /Huzamosabb idő után *A. japonicus* esetében lejátszódik a szolamargin cukor lehasítása, ez azonban csak indukció hatására következik be.

A Solanumokon előforduló, szintén ergoszterin tartalmú rezisztens gombák a Fusariumok (18) esetén indukció nélkül is lejátszódik a folyamat, de szintén huzamosabb időt igényel./ A rezisztencia okát a sejtfal az érzékeny fajoktól eltérő szerkezetében kell keresni, abban, hogy meggátolja a szteroidok membránhoz történő kapcsolódását. A rezisztens fajok ergoszterinjé is képes szolamargin kötésre, ez jól szembe-tűnik a hőkezelt és homogenizált Candida solani sejtek intenzív szteroid megkötéséből. Elegendő azonban egész enyhe sejtfal kezelés, amit a Helix pomatia sejtfaloldó enzim kivonatával végeztem, s a szteroid kötődés végbe megy. Mivel a sejtfal kezelés enzimátikus folyamat, a szteroid megkötés nem hirtelen játszódott le, hanem elhúzódott. Az ellenőrző vizsgálatokból kiderült, hogy protoplaszt képzés nem következett be /a protoplaszt a membrán károsítás után szétesik (39)/, a Candida solani igen ellenálló az ilyen enzimátikus kezelés szempontjából, mégis minimális változás a sejtfal élő struktúrájában, elegendőnek bizonyult ahhoz, hogy a szteroidok a membrán ergoszterinjéhez jussanak. A rezisztenciáért tehát nem az egész sejtfal a felelős.

#### 3.4.2.2.

A szteroidglikozidokkal szembeni rezisztencia oka más mikroorganizmusok esetében az ergoszterin hiány. Ezért nem hatnak pl. a baktériumokra egyáltalán és ezért a komplett rezisztencia a Pythium és Phytophthora fajokkal szemben, (104, 105) itt a dezintegrált sejtek sem mutattak szteroid megkötést. A Solanumok patogén mikroorganizmusainak legismertebb fajai ezek (18, 103) érdekes sajátosságuk, hogy teljes fejlődési

ciklusukat szexszuális reprodukciójukat csak szterinek jelenlétében képesek végig vinni, a gazdanövény szterinjét igénylik (90, 105, 106, 107, 108). A szterint maguk nem képesek felépíteni (93) de a kész szterint akkumulálják /csak akkumulálják és nem metabolizálják/ (90). Ezt a szterin felvételt mesterséges tenyésztési körülmények között is elvégzik és így már érzékennyé válnak az ergoszterin támadáspontú gombaellenes antibiotikumokkal szemben (89, 109), amit saját vizsgálataimmal is bizonyítottam. A szteroid megkötés ugyancsak kis mértékű volt, de a kezelés hatására megváltozott aminosav kiáramlási kép az érzékennyé válást bizonyította.

A rezisztencia oka szteroidglikozidok esetében tehát kétféle: az egyik az eleve meglévő ergoszterin hiány, míg másik esetben a sejtfal okozta membrán hozzáférhetetlenség.

A vizsgálati adatok fenti értékelése alapján a szteroidglikozidok hatásmódja, elsődleges támadáspontja, valamint a szelektivitás, a rezisztencia kérdése tisztázottnak tekinthető. Szükséges volt ezen kérdések tisztázása után annak vizsgálata, hogy az érzékeny mikroorganizmusok esetében tapasztalt hatás milyen mértékű - citikus, sztatikus-e - ezért élősejtszám meghatározást végeztem.

### 3.5. Az élősejtszám alakulása szteroidglikozid kezelés hatására

A szteroidglikozidok élő sejtre gyakorolt hatását különböző tényezők figyelembevételével vizsgáltam. A vizsgálatot elvégeztem az érzékeny mikroorganizmusokkal, nyugvófel-

szines és rázatott körülmények között, különböző pH-n, különböző korú sejtekkel, tápanyag jelenlétében, illetve tápanyagot nem tartalmazó pufferben és vizsgáltam a rezisztens mikroorganizmusok élősejtszám változását is.

#### 3.5.1.1.

Fiatal 12 órás tenyészedejű *Pichia saitoi* élő sejtszámának alakulását szolamargin kezelés hatására a 40. ábra mutatja, a kontrollhoz viszonyítva, rázatott körülmények között.

Az ábrán látható, hogy a sejt pusztulás szolamargin kezelés hatására gyors, gyakorlatilag fél óra alatt eléri a 0-közeli állapotot. A 95%-os megbízhatósági szinten számolt szórás intervallumok valószínűsítik, hogy a csiraszám gyakorlatilag 0. Ez a pusztulás tápanyagok jelenlétében is bekövetkezik, regeneráció nem áll fenn. A kontroll sejtszám gyors emelkedése tápanyag jelenlétében rövid stagnálás után érthető. Puffer közegben, tápanyag hiányában a sejtszám gyakorlatilag nem változik.

Nyugvófelszines, állófázisú rendszer esetén a kép gyakorlatilag egyezik a 40. ábrán látottakkal, csak tápközegben a kontrollsejtszám növekedése volt kisebb mértékű.

#### 3.5.1.2.

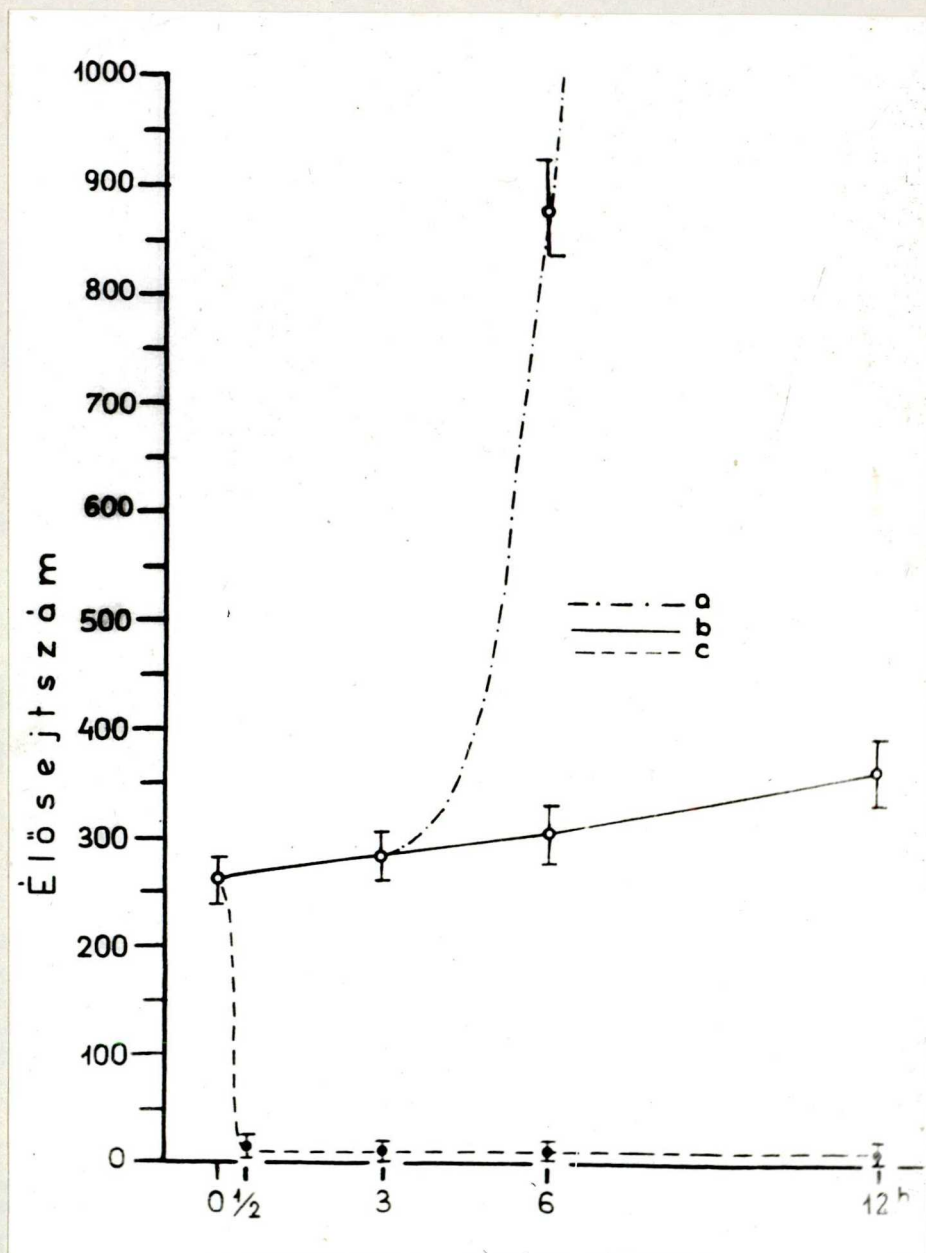
A vizsgálatot pH 5-ös közegben elvégezve a szteroidkezelés hatására nem következett be számottevő sejtszám változás a kontrollhoz viszonyítva.

#### 3.5.1.3.

Különböző korú sejteket inkubálva azt tapasztaltam, hogy bár a 24, 48 órás tenyészetek esetében is csökkent az élősejtszám, ez a lecsökkenés nem okozott nagyságrendi eltérést, a sejtpusztulás folyamata nem volt olyan gyors, mint a fiatal



12 órás tenyészetek esetében (41. ábra). A sejtek nagy része nem pusztult el /csak a tenyészetben lévő fiatalabb sejtek károsodása miatt mutatkozik sejtszám változás/.



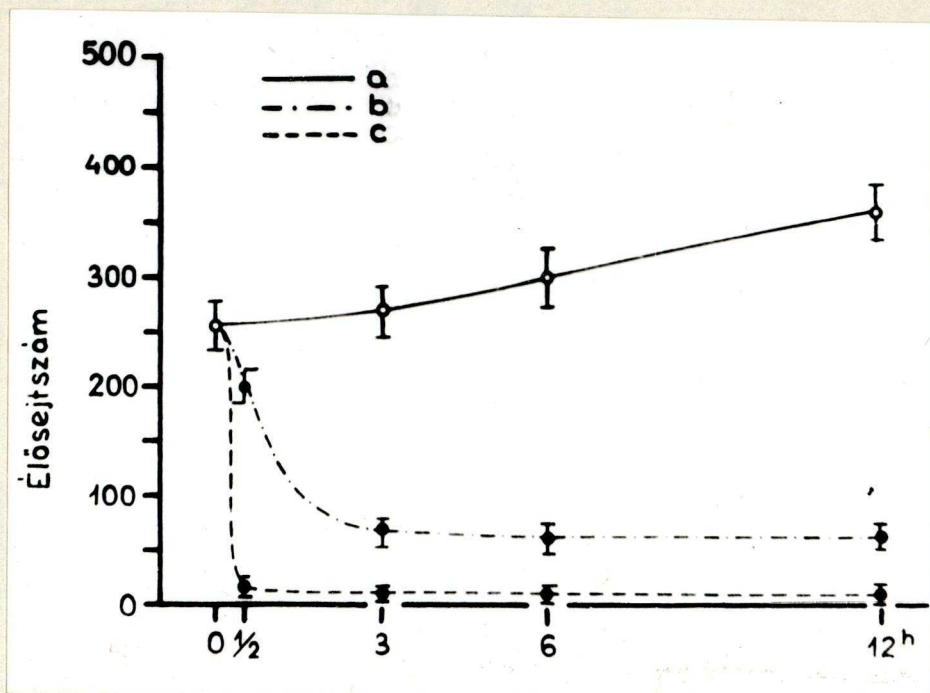
40. ábra

Fiatal Pichia tenyészet élősejtszámának változása szolamargin kezelés hatására

a = kontroll tápközegben;      b = kontroll pufferben;

c = szolamargin kezelt tápközegben,  
illetve pufferben

Élősejtszám 100 =  $10^8$



41. ábra

Különböző tenyésztidejű *Pichia saitoi* tenyészet sejtszám-változása szolamargin kezelés hatására

a = kontroll

b = 28 órás tenyészet szolamargin kezelve

c = 12 órás tenyészet szolamargin kezelve

Élősejtszám 100 =  $10^8$

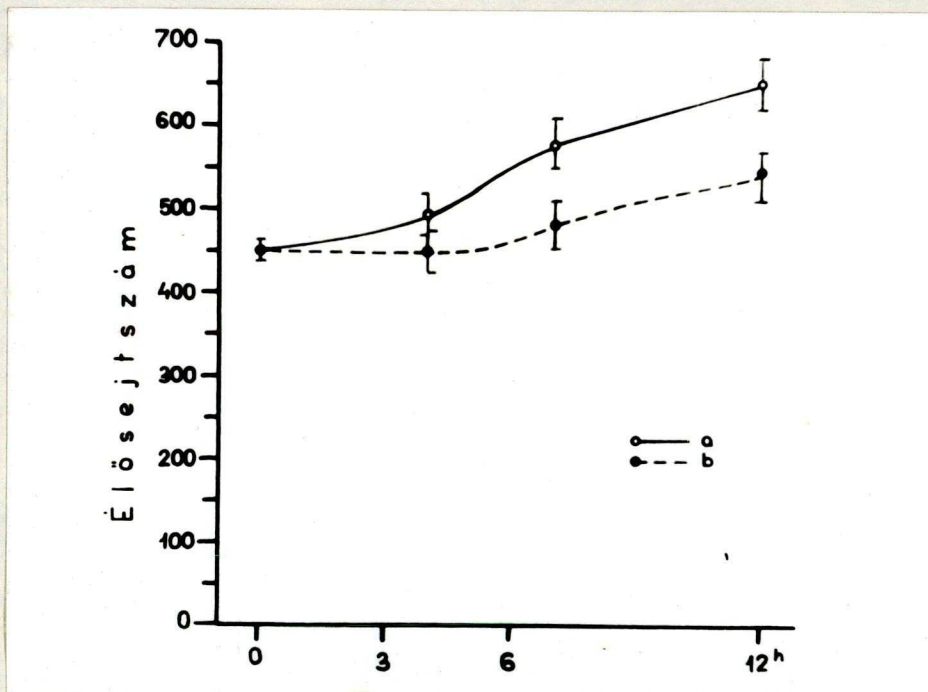
#### 3.5.1.4.

Rezisztens mikroorganizmusok esetében szolamargin kezelés hatására nem következett be lényeges változás. Az élősejtszám szolamargin kezeltnél kontrollközélemben marad, a kontrollhoz viszonyítva is emelkedő tendenciát mutat (42. ábra).

#### 3.5.2.

Összevetve az élősejtszám változásra vonatkozó adatokat megállapítható, hogy érzékeny mikroorganizmusok esetében tapasztalt hatás cidikus. Az érzékeny mikroorganizmusok öreg

tenyészetek részleges pusztulást mutatnak, ami arra enged következtetni, hogy az előregedett sejtek túlélnek a kezelést és csak a viszonylag fiatalabb sejtek pusztulnak el. Az élősejtszám csökkenés a szenzitív fajok esetében, aminosavak, ionok inkubációs elegybe történő adagolásával, nem szorítható vissza. A savas pH-n az aktivitást veszített hatóanyag semmilyen sejtszám változást nem eredményez. A rezisztens mikroorganizmusok vizsgálatokor értelemszerűen élősejtszám változás nem tapasztalható szolamargin kezelés hatására. Ezek az adatok a hatásmódra vonatkozó adatokkal, megállapításokkal összhangban állnak.



42. ábra

*Candida solani* sejtszámváltozása

a = kontroll

b = szolamargin kezelt

Élősejtszám 100 =  $10^8$

4.

Összefoglalás

Munkám célja antifungális aktivitású szteroidglikozidok hatásmódjának, elsődleges támadási pontjának tisztázása volt. A *Solanum laciniatum* AIT, azonos aglikonú származéksorba tartozó szteroidglikozidáin kívül /amelyeket az irodalomból eddig le nem irt módon tisztítottam, nyertem ki a növényből/ a digitonint és a tomatint alkalmaztam modell vegyületként kísérleteimhez.

Munkám során a korábbi tapasztalatok alapján felállított munkahipotézisnek megfelelően, az alábbi vizsgálatokat végeztem el:

- 1/ Széles kvantitatív hatásspektrum felvétele azonos aglikonú származéksorral.
- 2/ In vitro kísérletekkel a szteroidglikozidok szterinekkel történő komplexképzés intenzitásának meghatározása. A komplexképzés környezeti feltételektől való függésének megállapítása.
- 3/ A szűrővizsgálat során kiválasztott tesztorganizmusokkal /szenzitív gombák: *Pichia saitoi*, *Syncephalastrum racemosum*; rezisztens gombák: *Candida solani*, *Aspergillus japonicus*, *Pythium ultimum*, Gram + *Bacillus subtilis*, Gram - *Escherichia coli* baktériumok/ az in vitro vizsgálatok tapasztalatai alapján a szteroidglikozidok támadáspontjának tisztázása, a hatás jellegének megállapítása, a rezisztencia okának felderítés

A vizsgálati eredményekből levonható következtetések az alábbiak:

A szteroidglikozidok szelektív antifungális hatásúak. Különbőség mutatkozik az azonos aglikonú származéksor egyes tagjai között a gombagátló aktivitásban, hasonlóan a különböző aglikonú szteroidglikozidokhoz. A *Solanum laciniatum* szteroidjai közül csak a három cukrot tartalmazó szolamargin és szolaszonin volt hatásos, szemben az egy, kettő illetve a négy cukrot tartalmazó származékokkal. Nagy különbség mutatkozik a szolamargin szolaszonin aktivitása között is, a szolamargin javára. /A szolamargin szolaszonin 1 : 1 arányú keveréke azonban synergista kölcsönhatás eredményeképp úgy hat, mintha tiszta szolamargin lenne./

Az eltérő aktivitás, a szterinekkal történő eltérő intenzitású komplexképzésre vezethető vissza. A szolaszodin aglikonú glikozidok közül csak a háromcukrosok képeznek komplexet az ergoszterinnel, vagy koleszterinnel. A szolaszonin komplexképzése igen kis intenzitású. A létrejött komplex 1 : 1 arányú, a kapcsolódó molekulapárokát igen gyenge kötőerő - hidrogénhid vagy van der Waals féle kötőerő - tartja össze. Az infravörös spektrumok adatai alapján kémiai kapcsolódás nincs. A komplexképzés abszolút szerves közegben és tiszta vizes közegben egyaránt végbemegy. Semleges, illetve gyengén bázikus pH-n a komplexképzés egyező aktivitású, savas közegben a folyamat leáll.

Az érzékeny mikroorganizmusok 100 mg nedves sejt/1 ml 200 µg szolamargin tartalmú inkubációs elegyből a szolamargin /és más aglikonú, hatásos szteroidglikozidokat/ 6 órás in-

kubálás alatt megkötik. A gyenge aktivitású szolaszonin, illetve az inaktív  $\beta$ -szolamargin inkubálása esetén a sejtekhez történő kötődés elmarad. Ez az adat összefüggésben áll a gombagátló aktivitásban, illetve a komplexképzés intenzitásában paralell mutató különbségekkel. A szolamargin sejteken történő megkötődésének alapja a sejtmembrán ergoszterinjével történő komplexképzés. A szteroidglikozid megkötés eredménye egy nagymérvű membránkárosodás, dezorganizáció, amelyet aminosav és kálium kiáramlással tudtam követni. A vizsgált és hatásosnak mutató szteroidok cidikus hatást fejtenek ki. Ionok, aminosavak inkubációs elegybe történő adagolásával a sejtek pusztulását nem lehetett megakadályozni. A szteroidglikozidok megkötődése és ezáltal előidézett sejtkárosodás ugyanolyan környezeti feltételekhez kötött, mint a komplexképzés, de egyéb strukturális és biokémiai tényezők is befolyásolják. A szelektivitás, azaz a rezisztencia, vizsgálataim szerint kétféle okra vezethető vissza. Az egyik az eleve meglévő ergoszterin hiány a baktériumok *Pythium* és *Phytophthora* fajok esetében, a másik a sejtfal által előidézett membránhozzáférhetetlenség. /Ebben az esetben szterin van a sejthártyában, de a szteroidglikozidok nem tudnak hozzá kapcsolódni. Az érzékeny fajok sejtjei előregeve szintén nem mutatnak szteroid megkötést, a sejtek nem károsodnak, ami a megváltozott sejtfal szteroidglikozid kapcsolódást gátló szerepére utal./

A vizsgált szteroidglikozidok szelektív antifungális aktivitású vegyületek. Szelektíve hatnak az ergoszterint tartalmazó gombákra /élesztőgombákra, fonalásokra, a dermato-

phytonokra is/ hatásosak a vörös vérsejtekre (30), protozoákra (81), gátolják a gyökérnövekedést (81), nem hatnak az ergoszterint nem tartalmazó gombákra, baktériumokra, vírusokra (110). A szteroidglikozidok szterin tartalmú membránnal bíró szervezeteket, sejteket képesek támadni.

5.

Irodalom

- (1) IRVING G.W., FONTAINE T.D., DOOLITTLE S.P.: Science 102; 9 /1945/
- (2) SACKMANN W., KERN H., WEISMANN E.: Allg.Pathol.Bacteriol 22; 558 /1959/
- (3) WOLTERS B.: Naturwissenschaften 51; 111 /1964/
- (4) WOLTERS B.: Arch.Pharmazie 297; 748 /1964/
- (5) WOLTERS B.: Pharmazeut.Z. 110; 1718 /1965/
- (6) WOLTERS B.: Planta Med. 13; 189 /1965/
- (7) WOLTERS B.: Planta Med. 14; 393 /1966/
- (8) WOLTERS B.: Pharmazeut.Z. 111; 1826 /1966/
- (9) WOLTERS B.: Deutsch.Apoth.-Z. 106; 1729 /1966/
- (10) GÁL I.: Z.Lebensmitt.Unters.Forschung. 124; 333 /1964/
- (11) GÁL I.: Kandidátusi értekezés /1965/ Budapest
- (12) GÁL I.: Experientia 21; 383 /1965/
- (13) GÁL I.: Élelmiszervizsgálati Közl. 12; 229 /1966/
- (14) GÁL I.: Die Pharmazie 22; 120 /1967/
- (15) PÁPAY I., BEREK I.: Diákköri pályamunka /1967/ Szeged
- (16) HÜTTENRAUCH R.: Die Pharmazie 17; 590 /1962/
- (17) McKEE R.K.: J.gen.Microbiol. 20; 686 /1959/
- (18) MÁTHÉ I., FÖLDESI D.: Az orvosi csucsor - Solanum laciniatum AIT. - Magyarország kulturflórája. 5; (17) /1965/
- (19) TSCHESCHE R., WULFF G.: Z.Naturforschung 20 B;543 /1965/
- (20) FERENCZY L., HORVÁTH K.: M.K.E. VIII. Biokémiai vándor-gyűlés /1967/ pp.: 14/1 - 14/8
- (21) FÖLDESI D., MÁTHÉ I., TÉTÉNYI P.: Die Pharmazie 17; 777 /1962/



- (22) FÖLDESI D., MÁTHÉ I., TÉTÉNYI P.: Gyógyszerészet 8; 300  
/1962/
- (23) BAYLIS G.T.S.: Herba Hung. 5; 283 /1966/
- (24) BITE P., RETTEGI T.: Acta Chim.Acad.Sci.Hung. 52; 79 /1967/
- (25) BITE P., RETTEGI T.: Magyar Kémiai Folyóirat 72;512 /1966/
- (26) BITE P., MAGYAR GY.: Magyar Kémiai Folyóirat 72;201 /1966/
- (27) ALKIEWICZ J., GERTIG H., KAMYSZEK F., KOWALEWSKI Z.,  
MODERSKI F.: Diss.Pharmac.Pharmacolog. 18; 553 /1966/
- (28) KUPCHAN S.M., BARBOUTIS S.J., KNOX J.R., Lau-CAM C.A.:  
Science 150; 1827 /1965/
- (29) TOLDY L.: Magyar Kémikusok Lapja 20; 509 /1965/
- (30) TSCHESCHE R., WULFF G.: Planta Med. 12; 272 /1964/
- (31) KONOVALOV M.N.: Herba Hung. 4; 119 /1966/
- (32) BANSIKOV V.M., KONOVALOV M.N.: Herba Hung. 5; 153 /1966/
- (33) VÁRADI J., CSAPÓ E.: Gyógyszerészet 10; 254 /1966/
- (34) URI J., BÉKÉSI I., VALU J.: M.T.A. V. Oszt.Közl. 16; 239  
/1965/
- (35) OKAMOTO S., SUZUKI Y.: Nature 208; 1301 /1965/
- (36) UMEZAWA H., OKANIDHI M., KONDO S., HAMANA K., UTAHARA R.,  
MAEDA K., MITSUHASHI S.: Science 157; 1559 /1967/
- (37)  
Bull.Hyg. 41; 1138 /1966/
- (38) LEE B.K., WILKIE D.: Nature 206; 90 /1965/
- (39) LAMPEN O.J., McLELLAN W.L., El-NAKEEB M.A.: Antimicrob.  
Agents and Chemotherapy /1965/ p.: 1006
- (40) VÁGUKPALVI D., HELD GY., TÉTÉNYI P.: Bot. Közlem. 53; 125  
/1966/
- (41) SCHREIBER K., ADAM G.; Tetrahedron Letters. 5; /1960/

- (42) SCHREIBER K., ADAM G.: *Experientia* 17; 13 /1961/
- (43) SCHREIBER K., ADAM G.: *Mh.Chem.* 92; 1093 /1961/
- (44) SCHREIBER K., ADAM G.: *Liebigs Ann.Chem.* 666;155 /1963/
- (45) SCHREIBER K., WALTHER A., RÖNSCH H.: *Tetrahedron* 20; 1939  
/1964/
- (46) KUHN R., LÖW I.: *Angew.Chem.* 66; 639 /1954/
- (47) KUHN R., LÖW I., TRISCHMANN H.: *Chem.Ber.* 88; 289 /1955/
- (48) BRIGGS L.H., CAMBIE R.C., HOARE J.L.: *J.Chem.Soc.* /1963/  
London p.: 2848
- (49) SCHREIBER K., HAMMER U., ITHAL E., RIPPENBERGER H.,  
RUDOLPH W., WEISSENBORN A.: *Tagungsber.Deut.Akad.Landwirt-  
schaftswiss.* 27; 47 /1961/
- (50) SZABÓ Zséné, PAPP G.éné: *Gyógyszerkutató Intézet Kiadványa*  
/1962/ Budapest p.: 369
- (51) MAKLEIT S.: *Kandidátusi értekezés* /1966/ Debrecen
- (52) BITE P., JÓKAY L., PONGRÁCZ- STERK L.: *Acta Chem.* 34; 363  
/1962/
- (53) KUHN R., LÖW I., TRISCHMANN H.: *Chem.Ber.* 90; 203 /1957/
- (54) BOGNÁR R., MAKLEIT S.: *Acta Chim.Acad.Sci. Hung.* 49; 109  
/1966/
- (55) FONTAINE T.D., IRVING G.W., DOOLITTLE S.P.: *Arch.Biochem.*  
12; 395 /1947/
- (56) FONTAINE T.D., IRVING G.W., MA R., POOLE J.B., DOOLITTLE S.R.  
*Arch.Biochem.* 18; 467 /1948/
- (57) BENT K.J., MOORE R.H.: *Symposia Soc.gen.Microbiol.* /1966/  
pp.: 82-110
- (58) SCHULZ G., SANDER H.: *Hoppe-Segler's Z. Phys.Chem.* 308; 122  
/1957/

- (59) SANDER H., ALKEMEYER M., HANSEL R.: Pharmaceut. Acta Helv. 35; 30 /1960/
- (60) KABORA J.J., McLAUGHLIN J.T., RIEGEL C.H.: Anal. Chem. 33; 305 /1961/
- (61) EDWARDS C.H., EDWARDS G.A., GADSEN E.L.: Anal. Chem. 36; 420 /1964/
- (62) TSCHESCHE R., WULFF G.: Tetrahedron 19; 621 /1963/
- (63) WINDAUS A.: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 42; 238 /1909/
- (64) SCHULMAN J.H., RIDEAL E.K.: Proc. Roy. Soc. B; 122; 29 /1937/
- (65) JEZERNICZKY J.: Kísérletes Orvostudomány 19; 326 /1967/
- (66) EL-NAKEB M.A., LAMPEN O.J.: J. gen. Microbiol. 39; 285 /1965/
- (67) CAKÓ M.: Diplomamunka /1965/ Szeged
- (68) HAUST H.L., KUKSIS A., BEVERIDGE J.M.R.: Canad. J. Biochem. 44; 119 /1966/
- (69) TSUKAHARA T., TAKASI K., HAYAKOWA M.: J. Antibiot. Ser. B; 16; 184 /1963/
- (70) TSUKAHARA T., SATO A., SHIGENO K.: J. Antibiot. Ser. B; 17; 65 /1964/
- (71) FERENCZY L.: Hungarian Patent /1962/ No. 149; 878
- (72) HEFTMANN E.: Chromatographie Reviews 7; 179 /1965/
- (73) ROZUMBEK K.E., SANDER H.: Arch. Pharmazie 300; 316 /1966/
- (74) WILLUHN G.: Planta Med. 14; 408 /1966/
- (75) VAHOUNY G.V., BORJA C.R., WEERSING S.: Anal. Biochem. 6; 555 /1963/
- (76) TSCHESCHE R., WULFF G.: Chem. Ber. 94; 2019 /1960/
- (77) BETINA V., BARÁTH Z.: J. Antibiot. Ser. A; 17; 127 /1964/
- (78) KLEINE R.M., GOLAB T.: J. Chromatog. 18; 409 /1965/
- (79) PÁLFI G., ZSOLT J.: Acta Biol. Szeged 12; 75 /1966/

- (80) FERENCZY L., ZSOLT J., HÁZNAGY A., TÓTH L., SZENDREI K.:  
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 12; 337 /1965/
- (81) FERENCZY L.: Szóbeli közlés /1966/
- (82) ESKELSON C.D., DUNN L., CASEE C.R.: Clin. Chem. 13; 468  
/1967/
- (83) WISEMAN G.M., CAIRD J.D.: Canad. J. Microbiol. 13; 369 /1967/
- (84) GHOSH A., GHOSH J.J.: Ann. Biochem. Exp. Med. 23; 603 /1963/
- (85) LAMPEN O.J.: Symposia Soc. gen. Microbiol. /1966/ No. 16:  
pp.: 112-129
- (86) VAS K.: Agrokémia és Talajtan 2; 1 /1953/
- (87) SCHLÖSSER E., GOTTLIEB D.: Z. Naturforschung 21 B; 74 /1966/
- (88) ZYGMUNT W.A.: Appl. Microbiol. 14; 953 /1966/
- (89) SCHLÖSSER E., GOTTLIEB D.: J. Bacteriol. 91; 1080 /1966/
- (90) SIESTMA J.H., HASKINS R.H.: Canad. J. Microbiol. 13; 361  
/1967/
- (91) VILLANUEVA J.R.: Protoplast of fungi /In the fungi II/  
/1966/ pp.: 3-62
- (92) LAMPEN O.J.: J. Bacteriol. 84; 1152 /1962/
- (93) HENDRIX J.W.: Mycologia 58; 307 /1966/
- (94) PERRITH A.M., PHILLIPS A.W., ROBINSON T.: Biochem. Biophys.  
Res. Comm. 2; 432 /1960/
- (95) HALDER A., BHATTACHARYA N.D., BANERJEE N.D., BOSE S.K.:  
J. Bacteriol. 93; 2026 /1967/
- (96) BOROWSKI E., CYBULSKA B.: Nature 213; 1034 /1967/
- (97) CIRILLO V.P.: J. gen. Microbiol. 35; 249 /1964/
- (98) DOORMASHKIN R.R., DOUGHERTY R.M., HARRIS R.J.C.: Nature  
194; 11 /1962/
- (99) BANGHAM A.D., HORNE R.W.: Nature 196; 952 /1962/
- (100) GLAUERT A.M., DINGLE J.T., LUCY J.A.: Nature 196; 953 /1962/

- (101) KINSKY S.C., DEMEL R.A., Van DENEN L.L.M.: Biochem. Biophys. Acta 135; 835 /1967/
- (102) KINSKY S.C., LUSE S.A., ZOPPF D., Van DENEN L.L.M., HOXDY J.: Biochem. Biophys. Acta 135; 844 /1967/
- (103) FÖLDESI D., SVÁB J. né: Herba Hung. 3; 333 /1964/
- (104) HASKINS R.H.: Science 150; 1615 /1965/
- (105) SIESTMA J. H., HASKINS R.H.: Canad. J. Microbiol. 13; 361 /1967/
- (106) HASKINS R.H., TULLOCH A.P., MICETICH G.: Canad. J. Microbiol. 10; 187 /1964/
- (107) HENDRIX J.W.: Phytopathol. 55; 790 /1965/
- (108) HENDRIX J.W., NORMAN C., APPLE J.L.: Physiol. Plantarum 19; 159 /1966/
- (109) HENDRIX J.W., LANDER D.K.: J. gen. Microbiol. 44; 115 /1966/
- (110) FERENCZY L., LANTOS J.: Szóbeli közlés /1967/

Végezetül, dolgozatom összeállítása után szeretnék köszönetet mondani:

Dr. Szalai István Professzor Urnak, tanszékvezetőmnek munkám messzemenő támogatásáért, a kísérleti lehetőségek biztosításáért,

Dr. Ferenczy Lajos docensnek, témavezetőmnek a téma kijelöléséért, munkám során adott elméleti és gyakorlati útmutatásaiért,

Dr. Zsolt János tudományos kutatóval együtt mindkettőjüknek a baráti segítségnyújtásért,

Dr. Szabó József tanársegédnek a vizsgálataimhoz használt anyagok állandóinak meghatározásáért, az infraszpektrumok felvételéért,

Dr. Bite Pál tudományos osztályvezetőnek a szolaradixin rendelkezésemre való bocsátásáért,

Dr. Vörös József tudományos kutatónak több gombatorzs szives átengedéséért,

Bognár Teréz és Horváthy Tiborné laboránsoknak a kísérleti munka során nyújtott segítségért.



*Kovács János*