

A SZEGEDI ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM MIKROBIOLÓGIAI INTÉZETE

CHLORPROMAZIN-METABOLITOK ÉS NÉHÁNY SZERKEZETI ANALÓG
PLAZMIDTÖRLŐ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

egyetemi doktori disszertáció



S c h n e i d e r B é l a

S z e g e d
1 9 7 8

B 5068



E 1.715

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok B é l á d i I l o n a egyetemi tanárnak és M o l n á r J ó z s e f egyetemi docensnek, akik a kísérleti feltételek megteremtésével, hasznos szakmai tanácsaikkal és a legmesszebbmenő segítségükkel a disszertáció elkészítését támogatták.

TARTALOMJEGYZÉK

Irodalmi áttekintés

A plazmidokról általában	1 oldal
Plazmidreplikáció és inkompatibilitás	5 -"-
A plazmidok molekuláris modelljei	11 -"-
Kromoszomális integráció	12 -"-
Plazmidelimináció	14 -"-
Célkitűzések	19 -"-
Anyagok és módszerek	24 -"-
Eredmények	
Antibakteriális hatások vizsgálata	35 -"-
Az F'lac plazmid törlése	40 -"-
Fémkomplexek viselkedése	55 -"-
Az R faktor eliminálása	66 -"-
A plazmidtörlő-vegyületek mutagén hatásának vizsgálata	69 -"-
A plazmidtörlő-vegyületek <u>in vitro</u> hatása a thymus DNS-re	
Spektrofotometria	75 -"-
DNS-olvadáspont meghatározás	81 -"-
Az eredmények megbeszélése	82 -"-
Tézisek	92 -"-
Irodalomjegyzék	94 -"-

IRODALMI ÁTTEKINTÉS:

A plazmidokról általában

Az utóbbi néhány évben egyre több olyan bakteriális tulajdonságot irtak le, amelyről feltételezhető, hogy genetikai szabályozásuk nem kromoszómális, hanem "extrakromoszómális". Az "extrakromoszómális" elem fogalmán egy olyan genetikai egységet értünk, amely fizikailag elválik a sejt-kromoszómától, és ebben az állapotban stabil. Ez a kifejezés tehát felölel olyan elemeket, mint pl. a P_1 profág, de kizárja a transzdukcióval átvitt DNS-t.

Amint azt jelenleg a baktériumokkal kapcsolatban használják, az "extrakromoszómális" elem kifejezés a plazmid kifejezés szinonimja. Ez továbbá úgy deffiniálható, mint egy olyan elem, amely nem létfontosságú a gazda-faj normális sejtjeinek működéséhez, vagyis ami a legtöbb esetben letális hatás nélkül vehető fel, vagy veszíthető el.

Azokat a plazmidokat, amelyekről kimutatható, hogy képesek elfoglalni egy kromoszómális helyet, episzómáknak hívják. Bár az episzóma deffiníció magába foglalja a plazmid és a gazdasejt kromoszóma közötti kapcsolatot, ugyanaz az extrakromoszómális DNS lehet episzóma az egyik baktériumban, és plazmid a másikban. Gyakran értelmezik úgy, hogy a plazmidok azok az episzómák, amelyeknek a kromoszómális helyét még nem állapították meg valamely gazdában. Szem előtt kell tartani azonban, hogy nem bizonyítja a priori

érv azt, hogy egy plazmidnak szükségképpen képesnek kell lennie integrálódni bármiféle gazdasejt kromoszómába, vagy azzal genetikailag homológnak kell lennie.

A plazmidok alapvetően két nagy csoportba sorolhatók, úgy-
mint fertőző és nem fertőző plazmidok.

A fertőző, vagy önátvivő plazmidok /pl. F, Col, Ib / a gazdasejtben a donorállapot létrejöttét szabályozzák olyan fizikai tulajdonságokon keresztül, mint amilyenek pl. a sex-pilusok.

A konjugáció lehetővé teszi, hogy a plazmid az egyik gazdasejtből átlépjen, egy másik sejtbe - a recipiensbe - ami ezáltal maga is donorrá alakul. Azokat a fertőző plazmidokat, amelyek elősegítik más genetikai anyag - kromoszómális vagy plazmid - átvitelét, sex-faktornak nevezik.

Kimutatták azonban, hogy sok esetben a sex-faktor hordozás nem jelent egyuttal donor állapotot egy törzs minden sejtjében /73, 75, 106/, az F kivétel a szabály alól.

A legtöbb sex-faktor fertilitási tulajdonságai általában el vannak nyomva a sejtek nagyobb részében, ez a jelenség az ugynevezett fi^- faktornak köszönhető.

De vannak R faktorok, amelyeknek fertilitása nem gátolt, ezeket fi^+ faktornak nevezik. Ugy vélik, hogy azok fertilitását egy operátor-represszor típusu rendszer szabályozza /73, 76/.

A donor-állapot manifesztálódásaként specifikus, fonalsze-

rű képződmények keletkeznek a gazdasejt felszínén, amit sex-pilusnak, vagy sex-fimbriának neveznek /14/. Egyes kutatók arra a következtetésre jutottak, hogy a genetikai anyag a donor sejtéből a recipiens sejtbe a piluson keresztül jut át /14/. Noha a pilusokról kimutatták, hogy a konjugáció folyamatában fontos szerepet játszanak, az előbbi következtetés mégis legfeljebb közvetett bizonyítékokon nyugszik /84/.

A pilusok két nagy osztályát plazmidok determinálják. Az F faktorok F pilusokat szintetizálnak, amelyek him specifikus fágok megkötésére alkalmasak. A him specifikus fágokat ma már helyesebben F specifikus fágoknak nevezik. Ilyenek pl. az MS_2 ; R_{17} stb.

Ezzel ellentétben az I típusu faktorok I pilusokat szintetizálnak, amelyeken nincsenek az F-specifikus fágok megkötésére képes adszorpciós helyek. Ellenben vannak olyan adszorpciós helyek, amelyek egy másik fágcsoporthú megkötésére képesek. Ezt a fágcsoporthú I-specifikusnak nevezik, mivel először a Col Ib faktornál írták le /73/.

Mindeddig az F típusu faktorok felosztása azonos volt a fi^+ faktorokéval, és az I típusu faktorokat fi^- -nak tartották. Ma azonban már világos, hogy számos fi^- faktor nem I típusu /11, 32, 63, 117/. Egyesekről megállapították, hogy egy harmadik típusu pilust képeznek /63/. Érdekes, hogy az Angliában izolált fi^- faktorok zöme I típusu, a Japánban keletkező fi^- faktorok több-

sége viszont nem I típusu /32/. Ismeretes továbbá, hogy bizonyos I típusu plazmidok gátolják az F faktor fertőzőképességét, ha ugyanabban a sejtben vannak, ezek tehát fi^+ ak, Ezek a változatok világosan jelzik, hogy a fertilitás szabályozás magyarázata bonyolultabb, mint egy egyszerű represszor-operátor kölcsönhatás /39, 46, 124/. A másik csoportba sorolt nem fertőző plazmidok nem képesek létrehozni a donor állapotot /pl. Col El/, és/vagy egy sex-faktor plazmidnak kell jelenlennie ugyanabban a sejtben, hogy létrejöhessen konjugációs átvitelük, vagy ezt az átvitelt egy fág biztosítja. A nem fertőző plazmidok plazmidtermészetét ezért nehezebb megállapítani. Lényeges, hogy átvitelük nincs kapcsolatban semmilyen kromoszómális markerrel. Mindkét plazmidfajta azonban hatékonyan átvivődik általános átvivő fágrendszerben /5, 6, 41, 44, 119/.

A részletesen tanulmányozott bakteriális plazmidok zöme az Enterobacteriaceae családkhoz tartozik, bár ujabban egyre több a Staphylococcus genushoz tartozót is jellemeztek. Az enterális baktériumokban a klasszikus F plazmid azonosítását követően az utóbbi időben két másik plazmidcsoport - a colicinogen /Col/ plazmidok és a fertőző gyógyszerrezisztencia /R/ plazmidok - vált ismertessé.

A plazmidok tanulmányozásának aktualitását kétségek nélkül a polyreziisztens baktériumtörzsek egyre nagyobb mértékű megjelenése indokolja, valamint az, hogy ezen kórokozók

által létrehozott betegségek kezelése igen gyakran eredménytelen.

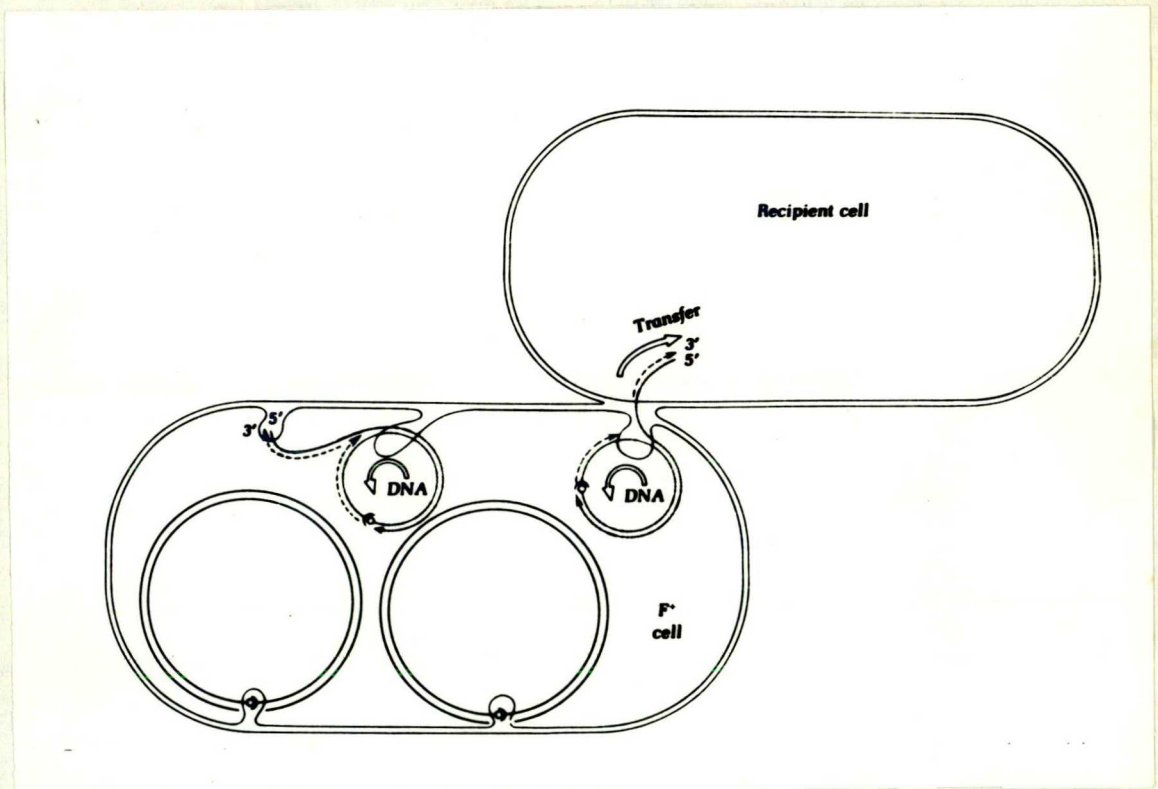
Az említett jelenségek hátterében a fertőző gyógyszerrezisztencia faktorok állnak. Tanulmányozásuk azért is fontos, hogy elejét vehessük a polyreziisztens kórokozók további elterjedésének és megkísérelhessük csökkenteni gyakoriságukat, ezzel elhárítva azokat az akadályokat, amelyeket ma még a kemotherápiában jelentenek.

A plazmidreplikáció és inkompatibilitás

A plazmidok replikációjának ma is használatos modellje Jacob, Brenner és Cuzin-től származik /58/. Bár ma már valószínűnek látszik, hogy e modell egyes aspektusai túlságosan le vannak egyszerűsítve, mégis ez marad a plazmid replikáció és szegregálódás magyarázatára szolgáló elméletek alapja. Hipotézisük szerint a replikációra képes DNS molekulák - amiket replikonoknak neveznek - gyűrűs alakúak, és legalább két olyan génszakaszt hordoznak, amelyek replikációjukat szabályozzák. A replikon egyik pontján egy regulátor gén helyezkedik el, amely diffúzióra képes anyagot, iniciátort termel. Ez az anyag hatást gyakorol a replikációs operátorra, ezzel lehetővé téve, hogy a DNS replikációja egy adott ponttól kezdődjék. Feltetelezik tehát, hogy a replikáció szabályozása pozitív szabályozás alatt áll.

Az autonom F^+ állapotú F plazmid replikációja szintén oly módon van szabályozva, hogy a plazmidnak csak egy példánya található egy baktériumban. Ebben az állapotban F nincsen integrálva a gazdakromoszómába.

Az F szabályozott replikációnak és stabil öröklődésének magyarázatára feltételezték, hogy az F replikon olyan sejtsoporthoz kötődik, amelyhez a kromoszómális replikon is kötődik. Ez a kötődési hely - amiről feltételezték, hogy a sejthártyán található - szabályozza és vezeti azokat a jeleket, amelyek a kromoszóma és az összes kapcsolt plazmid replikációját elindítják /1. ábra/.



1. ábra.

Az F plazmid replikációjának mechanizmusa^X

^X: Az ábra E. Jawetz, J.L. Melnick, és E.A. Adalberg: Review of medical microbiology /Lange Medical Publications Los Atlos California, 1976/ c. könyvből átvéve./

A membránhely a kapcsolódó plazmidokkal minden sejtgenerációban lemásoldók, ily módon a plazmid átvivődik minden leánysejtbe. Ezáltal biztosított a sejtjellemzők stabil átörökítése, függetlenül attól, hogy azokat plazmidok, vagy kromoszómák szabályozzák.

Minthogy számos plazmid molekulasúlyát ismerjük, és ismerjük a gazdakromoszóma molekulasúlyát is - E. coli esetében a leggyakrabban használt érték 2500 Mdal /29/-, a plazmid DNS és a kromoszómális DNS arányának mérése lehetővé teszi a plazmidpéldányok száma és a kromoszóma közti arány kiszámítását azokban az esetekben, ahol a sejtben csak egyetlen méretű plazmidmolekula található.

A plazmid DNS és a kromoszómális DNS arányát különféle módszerekkel határozták meg /23, 50, 112/. Annak ellenére, hogy ezeket a módszereket bizonyos ellenőrizhetetlen kísérleti különbségek terhelik, az ilyen típusu kísérletekből azonban egy fontos adatot nyerhetünk. Nevezetesen, sok plazmidnál a példányok száma kromoszómánként egy vagy kettő. A plazmidok egy csoportjára ez az arány nem érvényes, és az egy kromoszómára jutó plazmidpéldányok száma 10-40 között van. Ilyen plazmid pl. a Col El is.

Bár a módszertani fogyatékokból következő az adatok durvák, a plazmidok két osztálya ismerhető fel.

Az elsőbe tartoznak azok, amelyeknél a plazmid és a kromoszóma példányszámának aránya közel van egyhez, és amelynek DNS replikációját - "szoros"-nak nevezik /64/.

A másodikban a plazmidok példányszáma tizszer vagy többször nagyobb mint a kromoszómák példányszáma, és amelyeknél a DNS replikációt "lazá"-nak nevezik /94/. Valószínű, hogy a "lazulás" a szabályozó gének hiánya miatt lép fel, és a szoros szabályozás represszor gének révén játszódik el.

Inkompatibilitás:

Ugyanabban a baktériumban általában nem létezik stabilan két izogen plazmid. Így egy F' lac plazmid nem vihető át stabilan egy Hfr törzsbe /4/. Ha ugyanazt a plazmidot egy F' gal törzsbe visszük át, akkor az egyes sejtekben vagy az F' lac, vagy az F' gal marad meg, de mindkettő egyszerre sohasem /35/. Ez a jelenség, amit plazmid-inkompatibilitásnak neveznek, megkülönböztetendő a "belépési kizárás"-tól. Ez utóbbi a plazmidtartalmu sejtek felületének olyan irányu megváltozását jelentik, aminek hatására gátolt a rokontermészetű plazmidbelépés /38, 82/. Inkompatibilitás olyan plazmidok között is fennállhat, amelyek nem izogének pl. a ColV2 - K94 és F /61, 69/. Egyik plazmid - a fent bemutatott pár tagjai közül az első - kizárja a másikat /46, 69/. Ismeretes, hogy a fi^- vagy fi^+ R faktorpárok inkompatibilisek, míg a fi^- és fi^+ plazmidpárok stabilan együttesen is előfordulhatnak ugyanabban a sejtben /93, 120/.

Ujabb eredmények azonban azt mutatják, hogy bár az összes fi^+ R faktor inkompatibilis, számos kompatibilis csoportot találtak a fi^- R faktorok között /11, 32/.

Az inkompatibilitást rendszerint úgy értelmezik, hogy az közeli rokonságot jelez és a szóbanforgó faktorok valamilyen közös evolúciós eredetére utalhat. Nyilvánvaló, hogy amíg a plazmidok replikálódásáról és e folyamat szabályozásáról nem rendelkezünk alaposabb ismeretekkel, az inkompatibilitás alapja nem tekinthető tisztázottnak.

Az izogén plazmidok közötti inkompatibilitást is azzal magyarázzák, hogy csak egy membránhely van, amiért versengés folyik, és az izogen plazmidok közül csak egy képes megkötődni és stabilan öröklődni. A látszólag kapcsolatban nem álló plazmidok közötti inkompatibilitást azzal magyarázzák, hogy azok ugyanazt a replikációs helyet használják, ami a fentihez hasonló versengéshez vezet. A kapcsolatban nem álló és kompatibilis plazmidokról feltételezték, hogy a membrán különböző helyeihez kapcsolódnak. Ez a modell vonozó és egyszerű magyarázatot adott arra a kérdésre, hogy miért öröklődhetnek stabilabban a plazmidok annak ellenére, hogy a baktériumban csupán egy példányban találhatók, emellett alapot szolgáltatott az inkompatibilitás magyarázatához is.

Cuzin és Jacob /30/ hét generáción keresztül vizsgálták egy E. coli törzs F'_{lac}^+ plazmidjára a magas hőmérséklet hatását. Ezalatt végbement a kromoszómareplikáció, de az F ismétlődése blokkolva volt, minthogy F-nek egy hőérzékeny mutánst használtak, ami nem volt képes szaporodni ezen a hőmérsékleten. A nem replikálódó F faktor azonban azokból

a sejtekből szegregálódott, amelyekben az F faktor gátlása előtt szintetizált kromoszómális DNS is szegregálódott. Újabb kísérletek hasonló fizikai kapcsolatot mutattak ki a szaporodás és sejtosztódás folyamán F' faktor és a kromoszómális DNS között azt követően, hogy az F' replikációt acridinorangeval gátolták /54/. A membránreplikonmodell alapján azonban a plazmidreplikáció és inkompatibilitás számos aspektusát nehéz magyarázni. A sejtek inkompatibilitása egy ráfertőzött F' elemmel szemben úgy lenne magyarázható, hogy a Hfr sejtekben az F úgy van kapcsolva membránkötődési helyéhez, mint F⁺ vagy F' sejtekben /83/. Mégis sok, ilyen Hfr törzsben a kromoszóma F kontíniumot nem akadályozza F plazmid /19, 125/. A fenti jelenségek könnyebben értelmezhetők, ha feltételezzük, hogy a szabályozás egy represszor révén történik. Az ilyen negatív szabályozó rendszer egy iniciátor révén lehet szupresszálni a pozitív szabályozásra.

Pritchard és munkatársai /89/ feltételezték, hogy a gázdasejt konstitutive termel iniciátort, de a replikon gének szakaszosan inhibitort termelnek. Minden replikációs ciklus kezdete után hamarosan beindul az inhibitor termelés, meggátolva egy újabb replikációs ciklust mindaddig, amíg a növekedő sejttérfogat miatt az inhibitor koncentrációja lecsökken.

Plazmidok molekuláris modelljei:

A plazmidok kémiai természetüket tekintve DNS molekulák. A gazdasejtbe beépített radioaktív ^{32}P lebomlása után inaktiválódtak az F-, R-, és Col faktorok /65, 102, 122/. A bakteriális plazmidok fizikai tulajdonságait először Sinsheimer és munkatársai /17, 18/, valamint Vinogradov és munkatársai /113/ vizsgálták. Kimutatták, hogy a kettősfalu DNS lineáris vagy cirkulációs konfigurációban található. A lineáris, kettősfalu DNS molekulaforma önmagával záródhat, és köralaku molekulát képezhet akár úgy, hogy a DNS fonalak egyike kapcsolódik, és a másikban szakadás marad, akár úgy, hogy mindkét fonal záródik. Minthogy ez utóbbi szerkezetben mindkét fonalvég kovalensen kötött, ezt kovalensen kötött zárt köralaku /CCC/ - covalenten-closed-circular-molekulának nevezik. Ha ezekből a sejtekből izoláljuk, akkor a DNS molekula önmaga körül spirálisan megcsavarodik, szuper-helix alakot vesz fel.

Az R faktorok eredete és fejlődése sok tekintetben azonos az F'faktorok eredetével és fejlődésével /33, 117/. Feltételezték, hogy a bakteriális kromoszómában egy transzfer faktor integrálódik a gyógyszerrezisztenciára mutált kromoszómális gén közelében. Amikor a kromoszómából kiválik a transzfer faktor, akkor ezt a közeleső bakteriális DNS szakaszt is magával viheti, amely utóbbi az ujonnan keletkező R faktor részévé válik.

Egy másik lehetséges modell szerint az extrakromoszómális DNS számos bakteriumfajában különböző, egymástól függetlenül ismétlődő és autonom replikon formájában van jelen. Ezek közül a replikonok közül egyesek transzfer faktor formáját ölthetik, amilyen pl. az F. Mások colicin aktivitással rendelkező nem fertőző plazmidok formáját ölthetik, amilyen pl. a Col El. Megint mások az antibiotikumokkal vagy nehézfémekkel szembeni rezisztenciát meghatározó géneket hordozhatnak, vagy képesek lehetnek ilyen rezisztenciára mutálni. Minthogy számos nem fertőző plazmid együttesen transzferálódik, ha ugyanabban a sejtben több fertőző plazmid társaságában van jelen /4, 27, 85, 104/ az elmondottakból következik, hogy egy független transzfer faktor és egy független nem fertőző gyógyszerrezisztencia faktor jelenléte ugyanabban a sejtben valószínűleg egy R faktor tulajdonságaival ruházná fel a sejtet, vagyis a fertőző gyógyszerrezisztenciával.

Kromoszómális integráció:

Az F plazmid egyik fő tulajdonsága, hogy integrálódni képes az E. coli K 12 gazdatörzs kromoszómájába. Eme tulajdonsága miatt episzómának tekintették, és ez a tulajdonság felhasználható a plazmid deffiníciójára /59/. Az integrálódás azonban nem eszenciális tulajdonsága a plazmidoknak, mert több plazmidról kimutatták, - így pl. Col Ib, és Col El-ről - hogy nem integrálódnak a

kromoszómába, legalábbis egyik legáltalánosabb gazdájukba, az E. coli K12-be. A Col Ib vagy Col El átvitele egy sorozat Hfr K-12 donorból ily módon független bármiféle kromoszómális markertől /25, 75/.

Hogy a Col Ib plazmidhordozó konjugációs képességet biztosít E. coli K12-nek; és azt a tulajdonságát, hogy képes átvinni kromoszómális markereket, gyakran kromoszómális integrációval magyarázzák /24/. Kromoszómális DNS másolásának kezdeti stádiumában hőérzékeny /ts/ E.coli mutánsok alkalmazásával nyert újabb bizonyítékok támasztják alá azonban azt a feltevést, hogy a Col Ib nem integrálódik az E. coli-ba /52, 53/. Az ilyen ts mutánsok revertánsait - amelyek szaporodásra képesek az egyébként a szaporodást kizáró hőmérsékleten - egyre gyakrabban találják meg F-sex-faktort hordozó törzsekben. Ezek a revertánsok az "integriv szupresszio"-nak nevezett mechanizmus eredményeként keletkeznek, ami az F-sex-faktor kromoszómába való integrálódásából ered oly módon, hogy a kromoszómális kettőződés számára új iniciációs hely keletkezik az integrált sex-faktorban /81/.

Ilyen revertánsok nem izolálhatók a Col Ib faktort hordozó ugyanilyen mutánsokból, ami azt jelenti, hogy ezek a plazmidok nem képesek integrálódni az E. coli K-12-be.

Más kutatók azt is megállapították, hogy bizonyos temperált fágok- mint amilyen pl. a P_1 fág- a profág állapotukat úgy alakítják ki, hogy nem integrálódnak a kromoszómába /56, 27, 75/.

Ezek alapján lehetséges, hogy az episzómák a plazmidok speciális osztályát képviselik. Rendelkeznek azzal a tulajdonsággal, hogy képesek integrálódni bizonyos gazdasejtek kromoszómájába. Jelenleg azonban nyitott az a kérdés, hogy a kromoszómális integrálódásnak van-e valamilyen jelentősége a plazmid gazda viszony kialakulása, vagy stabilitása szempontjából.

Elimináció:

Bizonyos esetekben, amikor ugyanazon baktériumsejt több genetikai tulajdonsága bizonyul "extrakromoszómális"-nak - amit többek között az mutat, hogy spontán módon, vagy kurálás hatására elveszhetnek a sejtből - fontos tudni, hogy ezeket a tulajdonságokat egyetlen plazmid hordozza-e, vagy egynél több elem játszik szerepet /45, 74, 121/.

A plazmidok által hordozott géncsoportot két jól elkülöníthető kategóriába lehet sorolni, úgy mint: kointegrátumok és agregátumok.

A kointegrátumoknak nevezett plazmidgének csoportjába rendszerint spontán vagy kurálás hatására bekövetkező együttes elimináció jön létre. Ebben a csoportban a kotranszdukció sem kivételes. Ez azonban csak olyan génlokuszok között várható, amelyek ugyanazon a DNS molekulán eléggé közel vannak egymáshoz.

Ezzel ellentétben a plazmidagregátumok csoportjában található gének egymástól függetlenül tipikusan vivődnek át,



vagy egymástól függetlenül vesznek el és figyelhető meg a kotranszdukció.

Az F és Col E₂ plazmidok viselkedése jellemző a plazmid-agregátumokra.

Közismert, hogy a baktériumok igen kis gyakorisággal vesznek el a plazmidjukat minden különösebb behatás nélkül, ez a spontán elimináció. Bizonyos kémiai vagy fizikai behatásokkal a plazmidvesztés gyakorisága fokozható. Ez a jelenség adta meg az alapját a mesterséges plazmidtörlésnek. A kémiai anyagok közül különböző festékek, mint az akridinek/26, 51, 118/, ethidiumbromid /10/, kristályibolya /95/, bizonyos felületaktiv anyagok / 57, 96, 105/, vagy a rifampin /8, 22, 60/, hatásosak a plazmidok eliminációjára. A thymin-éheztetés szintén csökkenti a plazmidhordozó baktériumok számát /26,45/. A különböző plazmidok különböző mértékben kurálhatók, és a kurálhatósági hajlam nem függ olyan tényezőktől, mint a sex-faktor aktivitása.

A Col E1 plazmid rezisztens az acridinorangeval szemben, ugyanakkor az F plazmid esetében a leghatékonyabb kuráló ágensnek bizonyult / 26/. Az F plazmid acridinorangeval való kurálása csak az autonom állapotra korlátozódik, az integrált "plazmid" ellenálló /51/. Ismert, hogy az autonom F kurálása acridinorangeval az F replikálódásának gátlásán alapul /54/. A különféle plazmidok között tapasztalt molekuláris összefüggések nem szolgáltatnak magyarázatot a kurálás mechanizmusára. Tekintve, hogy az összes plazmid superhelix szerkezetű, és mivel sok plazmid kurálható

szelektíven és DNS-hez kötődő festékekkel, feltételezték /43/, hogy a kurálás a plazmid DNS speciális konformációjától függhet.

Ez az elmélet azonban nem veszi figyelembe a kuráló szerekkel szembeni érzékenységet, illetve azok eltéréseit. Így pl. a Col Ib és Col El kolicinogen plazmidok teljesen ellenállóak az acridinorangeval végzett kurálással szemben. Az F viszont érzékeny /26/, bár a Col Ib és az F mérete hasonló, és a Col El sokkal kisebb. Az elfogadott álláspont szerint úgy tűnik, hogy a kurálás a plazmidreplikáció akadályozásából ered /30, 54/. Ismert, hogy a kromoszómális replikáció iniciálisa érzékenyebbé válik az acridinorangeval szemben, ha azt egy integrált F faktor szabályozza /81/. Ugy látszik, hogy az F plazmid replikáció a kromoszómális replikációhoz viszonyítva nagyobb érzékenységet mutat az acridinorangeval szemben, ami az iniciálásban lévő különbségből adódhat.

A rifampinról - ami az RNS polimerázhoz való kötődés révén megakadályozza az RNS lemásolódását /123/, - szintén kimutatták, hogy St. aureusban kurálja a plazmidot /60/.

Ujabban azt is tapasztalták, hogy az E. coliban lévő Col El-et is törli /22/.

Feltételezték, hogy a DNS replikáció iniciálásához elsősorban a transzkripció folyamata és nem annak terméke szükséges /37/. Ebből arra lehet következtetni, hogy a kurálás alapja ebben az eseményben rejlik, és minden olyan vegyület, ami megzavarja a plazmid-DNS-replikáció iniciálását, hatékony kuráló ágens lehet /15, 16/.

Vinograd és munkatársai vizsgálták az ethidiumbromid hatását közvetlenül a plazmid DNS-re /7,91/. Az ethidiumbromidról ismert, hogy interkalálódik a DNS szomszédos bázispárai közé, és ezért a hélix menetemelkedése megváltozik. Így a DNS megnyulik, és ennek következtében csökken a fajsúlya. Az ethidiumbromid beépülése azonos mértékű a cirkuláris vagy lineáris DNS-nél, és ez mindkét szerkezet esetében azonos mértékű fajsúlycsökkenéshez vezet. Ezzel szemben az ethidiumbromid beépülése a CCC-DNS-be korlátozott, mert a két fonál egymáskörüli rotációja gátolt a szabadon rotáló vég hiánya miatt. Így az ethidiumbromid jelenlétében a CCC -DNS megnyulása kisebb, mint a másik két forma esetében, és így a fajsúlycsökkenés kisebb /7,91/.

A bakteriális plazmidok eliminálása igen komplex kérdés, amely nem egyszerűsíthető le az említett bizonyos festékek interkalációjára. Bradly és munkatársai acridinszármazékokkal végzett kísérletei alapján olyan következtetésre jutottak, miszerint ezek a festékek a plazmid-DNS külső felületéhez is kötődhetnek /13/. Proflavinszármazékok esetében Li és Crothers hasonló eredményt kapott/68/. Lerman és munkatársai kétféle kötődési típusról számolnak be az acridinorange és DNS vonatkozásában. Az egyik típus, amelyik gyöngén kötődik a DNS külső részéhez, a másik pedig egy erősebb, stabilabb kötés, amely a festékmolekuláknak a bázispárok közé történt interkalációjából ered /66/. Lerman eredményeit támasztják alá Nevielle és Davies adatai /80/, akik kimutatták, hogy a DNS által megkötött festék-

nek csak egy része interkalálódott, míg egy másik tekintélyes része külső kötésben kapcsolódott a DNS-hez. Feltételezik, hogy az interkalálódó diacridinek szekunder aminocsoportjaikon keresztül kapcsolódnak a DNS foszfátcsoportjaihoz /99/, és ez a kölcsönhatás determinálná az acridinek biológiai aktivitását. Azonban ismeretes a diacridinek DNS polymerase gátló hatása is, amely a szekunder aminocsoportok methilálásával fokozható /99/. A már említett ethidiumbromid szintén rendelkezik hasonló hatással /1/. Egyéb plazmidtörölő anyagok, mint a tiloron, és a chlorpromazin, ugyancsak blokkolni képesek a DNS polymeraset /20, 86/. Elméletileg a DNS polymerase gátlás is előidézhetheti a plazmidreplikon működőképtelenségét. Tomoeda /108, 109/ és munkatársai kimutatták, hogy a detergens SDS hatásos volt az F' lac⁺ és R faktor eliminálásában E. coli esetében. Salisbury és munkatársai /114/ SDS E.coli K12-re gyakorolt hatását vizsgálták. Azok a baktériumkultúrák, amelyek pilusokat szintetizálnak, érzékenyebbek voltak SDS-re, mint a represszált kultúrák, amelyben a pilusokat csak a sejtek töredéke produkálta. SDS kezelés a pilussal nem rendelkező sejtek szelekciójához vezetett.

Célkitűzések:

Intézetünkben mintegy tíz éve kezdődött el az R, illetve F faktort hordozó törzsek tanulmányozása.

Elsőnek Dobozy, és Hammer izoláltak R faktort hordozó törzseket /36/. Majd Mándi és Marjai emberi vizelettel üritett szenzitív E. coli törzsek polyrezisztenciáját mutatták ki, az R faktort hordozó törzsekkel való érintkezés után /70/.

Az E. coli R faktor transzfer gátlását rifampin és derivátumainak jelenlétében Mándi és Béládi írták le /71/. A későbbiekben fenotiazinok antibakteriális hatásáról és R faktor törléséről Molnár és munkatársai számoltak be /79/, akik kutatásaik során azt is bebizonyították, hogy a chlorpromazin, levomepromazin, prometazin eliminálják az E. coli F' lac plazmidjét is /72/.

A kémiai szerkezet és a plazmidtörölő hatás közötti korrelációt vizsgálva bizonyítást nyert, hogy az imipramin, amitriptilin, és dietazin is igen kifejezett plazmidtörölő hatással rendelkezik, míg a chlorpromazin egyik biológiailag inaktív metabolitja, a chlorpromazin-szulfoxid ilyen hatással nem rendelkezik /77/.

További érdekes megfigyelés volt az, hogy a chlorpromazin hatására lon⁻ mutansok szelektálódtak az E.coli tenyészetekből /78/.

Miután ismeretessé vált a chlorpromahin antibakteriális és plazmidtörölő tulajdonsága /79/, valamint az, hogy a chlor-

promazin-szulfoxid sem antibakteriális sem plazmidtörlő hatással nem rendelkezik, érdekesnek látszott néhány biológiaiilag aktiv chlorpromazin-metabolit antibakteriális, plazmidtörlő és mutagén hatásának tanulmányozása.

A fenti vizsgálatok alapján valószínűnek látszott, hogy a chlorpromazin molekulaszervezetében történt változások valamilyen módon befolyásolják a metabolitok antibakteriális és plazmidtörlőképességét.

Célunk az volt, hogy elkülönítsük az antibakteriális és plazmidtörlő hatásért felelős molekulastrukturákat, illetőleg pontosabban meghatározzuk azokat a követelményeket, amelyekkel a három gyűrűnek rendelkeznie kell ahhoz, hogy plazmideliminációt idézhessen elő.

Mivel a korábbi kísérletek során kiderült az, hogy a chlorpromazin mellett a prometazin, dietazin, és levomepromazin is ugyanazokat a biológiai hatásokat hozták létre a baktériumtenyészetekben, felvetődött az a lehetőség is, hogy az anyagok metabolizálódnak a baktériumtenyészetben, és egy képződő közös metabolit tehető felelőssé az antibakteriális, illetve a plazmidtörlő hatásokért.

Munkánk során az alábbi kérdésekre igyekeztünk választ keresni:

1. Van-e a chlorpromazinnak olyan metabolitja, amely kifejezettebb antibakteriális és plazmidtörlő hatást mutat, mint maga a chlorpromazin?
2. Elkülöníthetők-e az antibakteriális és plazmidtörlő hatásokért felelős molekulaorbitálok a biológiai hatások alapján?

3. Az acridinorangehoz hasonló kémiai struktúra következményeként létrehoz-e valamelyik chlorpromazin-metabolit framesift mutációt a Salmonella tiphymurium his igényes törzsén?
4. A vizsgált vegyületek molekulaorbitálját megváltoztató kelátképzés következtében megváltoznak-e a chlorpromazin-metabolitok biológiai hatásai?

Az antibakteriális hatások vizsgálata során mindenek előtt a bakteriosztatikus hatásokat tanulmányoztuk különböző Gram-pozitív, illetve Gram-negatív baktériumokon, majd a metabolitok baktericid hatásának vizsgálata után került sor a plazmidtörlés optimális feltételeinek, illetőleg a mutagén hatásnak tanulmányozására.

A plazmidtörlésre vonatkozó kísérletekhez az E. coli K12 F' lac plazmidot hordozó törzset választottuk modellként.

Jelen munkánkban az emberi szervezetben is megtalálható biológiailag is aktív chlorpromazin-metabolitok, úgymint 7-hidroxichlorpromazin; 7-8 dihidroxichlorpromazin; 7-8 dioxochlorpromazinnal, valamint néhány más háromgyűrűs vegyülettel folytatott kísérletekről számolunk be. A kísérletek során a chlorpromazin-metabolitok hatását a chlorpromazinnal, mint kontrollal hasonlítottuk össze. Munkahipotézisünket a következő szempontok figyelembevételével állítottuk fel:

1. A chlorpromazin molekulaszervezete hasonló a közismerten interkalálódó acridinorangeéhoz.



2. A chlorpromazin ugyanolyan plazmidtörő hatással rendelkezik, mint az acridinorange.
3. A chlorpromazin plazmidtörő hatásmechanizmusa bizonyítottan nem szelekciós mechanizmuson alapul.

A fenti szempontok alapján feltételeztük, hogy a chlorpromazin -metabolitok esetleges plazmidtörő hatása az interkaláción alapul.

Az interkaláció kritériumai ismeretesek: nevezetesen egy minimálisan $28 \text{ \AA}^2$ területű hetero vagy karbociklusos gyűrűrendszer, amelyen egy vagy két erősen protonált, valamint egy erősen elektronegativ szubsztituens helyezkedik el - képes az interkalációra.

Elsőegíti az interkalációt egy olyan oldallánc jelenléte, amelyben két pozitív töltés található. Az oldalláncban található két pozitív töltésnek azonban bizonyos távolságra kell elhelyezkednie /97, 114/.

Miután az általunk vizsgálni kívánt vegyületek megfelelnek az említett követelményeknek, ez a tény egy további indokot szolgáltatott a chlorpromazin-metabolitok plazmidtörő hatásának vizsgálatához, valamint a DNS-re gyakorolt hatásának tanulmányozásához.

A chlorpromazin-metabolitok komplexképzését a borjuthymus-DNS-sel különböző módszerekkel vizsgáltuk. /Agaroz gél-elektroforézis; spektrofotometria; olvadáspontmeghatározás/. Az antibakteriális, plazmidtörő a mutagén hatások, valamint a DNS-sel történő komplexképző vizsgálatához a chlorpromazin-metabolitokon kívül bevontunk egy ujonnan szin-

tetizált háromgyűrűs vegyületet is az 1-dimethylamino-3-/9 phenantril/-3 propanolt, valamint a közismerten interkalálódó acridinoranget, és a tiloront.

Az említetteken kívül, megvizsgáltuk az asszimetrikus töltéselosztású methilénkék, és az ugyancsak háromgyűrűs de nem planaris szerkezetű morphin hatását is.

Ezeket a kísérleteket elsősorban egy hatékony plazmidtörő vegyület modelljének keresése indokolta. Ennek ismeretében elejét lehetne venni az egyre fokozódó polirezisztens törzsek mértéktelen szaporodásának; s csökkenteni a - ma még napról-napra több problémát okozó therápiás gondokon.

Anyagok és módszerek:

I. Anyagok:

1. Táptalajok:

EMB táptalaj /28/: Pepton /Bacto-Difco/ Difco Lab.

Detroit, Mich. USA 100.0 g

Yeast Extract - Difco Lab. Det-

roit, Mich. USA 10.0 g

NaCl 50.0 g

K_2HPO_4 20.0 g

Lactose 200.0 g

Eosin sárga 4.0 g

Methilénkék 0.65g

/a táptalajhoz adása előtt 10 ml
alkoholban oldjuk/

DM viz 5000.0 ml

pH: 7,2

MTE táptalaj /2/: NH_4Cl 1.0 g

K_2HPO_4 7.0 g

NaH_2PO_4 3.0 g

NaCl 0.8 g

Tryptone-Difco Lab.Detroit,Mich.USA 10.0 g

Yeast Extract - Difco Lab. Detroit,
Mich. USA 1.0 g

$MgSO_4$ 0.25g

DM viz 1000.0 ml

pH 7,3

A táptalajhoz sterilizés után felhasználás előtt 40%-os gluco-
se oldattal komplettálunk; 1000 ml/0,25 ml arányban.

EP táptalaj /31/:	Élesztőkivonat	100.0 ml
	Pepton /Richter Bp./	10.0 g
	NaCl	5.0 g
	DM viz	1000.0 ml
	pH 7.4	

Az élesztőkivonat elkészítése:

4 kg pékélesztő 4 l csapvizben felfuszpendálva, majd
10 l csapvizzel kiegészítve. Autoklávozás.

EP agar készítésekor EP leveshez 1,8%-os agarat mérünk

M-9 minimáltáptalaj /70/:

K_2HPO_4	6.0 g
NaH_2PO_4	3.0 g
NH_4Cl	1.0 g
NaCl	0.5 g
glucose	4.0 g
B ₁ vitamin	5.0 mg
$MgSO_4$	0.001 M
DM viz	1000.0 ml
pH 7.2	

Selektív táptalaj /103/:

EP agar felmelegítése után a felhasználás
előtt hozzáadunk

500 ug/ml Sodium Azide /B.D.H. Lab. Chemic.
Group Poole Engl./

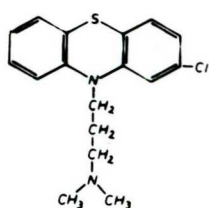
50 ug/ml Kanamycin sulphate

II. Baktériumtörzsek:

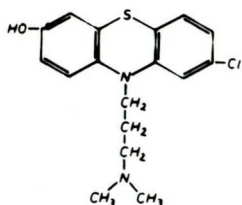
1. E. coli K12 LE 140 /Lac Δ ; mal, str^r, λ ^r/
2. E. coli C 600 R 144 drd⁺ /thr⁻; leu⁻; represszált pilusszintézisű/
3. E. coli C 600 R 144 drd³ /derepresszált pilus-szintézisű/
4. Salmonella typhimurium His⁻ /frameshift/ mutánsa
5. B. anthracis VR^x
6. Staphylococcus aureus
7. Staphylococcus pyogenes
8. Diplococcus pneumoniae
9. Proteus vulgaris
10. Klebsiella pneumoniae
11. Pseudomonas aeruginosa

x: 5 - 11 sorszámú baktériumtörzsek vizsgálati anyagból származnak.

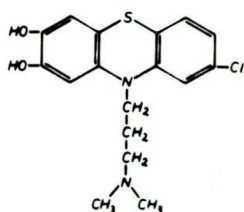
III. A plazmidtörléshez használt anyagok; és szerkezeti képletei:



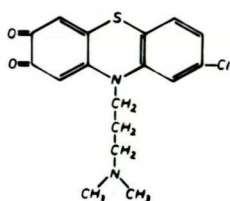
1. Chlorpromazin^X



2. 7-hydroxi-chlorpromazin^{XX}



3. 7-8-dihydroxi-chlorpromazin^{XX}

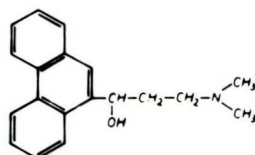


4. 7-8-dioxo-chlorpromazin^{XX}

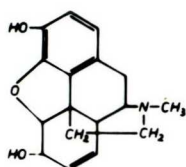
2. ábra.

^X: EGYIT Gyógyszervegyészeti Gyártól, Budapest.

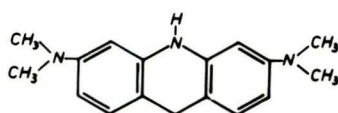
^{XX}: Psychopharm. Research Branch National Inst. of Mental Heath Rockville - USA.



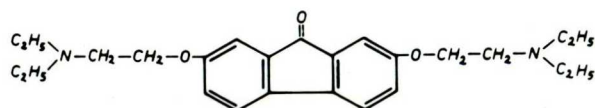
1-dimethylamino-3-
/-9 phenantril/
-3 propanol^x



Morfin^{xx}



Acridinorange^{xxx}



Tiloron^{xxxx}

3. ábra

- x: JATE Szerveskémiai Intézet, Szeged
 xx: SZOTE Egyetemi Gyógyszertár
 xxx: REANA1, Budapest
 xxxx: Merrel Natin. Lab. Division of Richardson Merrel Inc.
 Cincinatti, Ohio - USA

IV. Egyéb anyagok:

Agaroz - gélelektroforézishez; - SIGMA CHEMICAL COMPANY
St. Louis USA

"E" puffer - gélelektroforézishez:

0,04 M TRIS

0,005 M Sodium Azide

0,001 M EDTA

pH 7,7

Calf thymus DNS - olvadáspont-meghatározáshoz: Böehring
Mannheim GmbH. BRD.

"SSC" - olvadáspont-meghatározáshoz: 0,02 M SSC készítése
az alábbiak szerint:

0,154 M NaCl

0,154 M Sodium citrate ötvenszeresére higitva

V. Módszerek:

A. Bakteriológiai módszerek:

1. A minimális bakteriosztatikus koncentráció /MIC/ meghatározása

A meghatározást sorozathigitási módszerrel végeztük. MTE leves táptalajba az egyes baktériumtörzsek éjszakai levestenyészetének 10^{-4} higitását készítettük, és ebből 0,05 ml-t $/8 \times 10^3 - 5 \times 10^3/$ baktériumot oltottunk 5-5 ml MTE levesbe. Az MTE leves különböző koncentrációban tartalmazta a plazmidtörléshez használt anyagokat. A tenyészeteket $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 24^{h} át inkubáltuk sötétben, majd megállapítottuk a minimális bakteriosztatikus koncentrációt. A MIC értéket a vizsgált vegyületeknek az a legkisebb koncentrációja jelentette, amely már megakadályozta a baktériumok elszaporodását.

2. Baktericid hatás vizsgálata:

Az egyes vegyületeket a különböző baktériumtörzsek 0,22-0,25 sejtszuszpenziójához adtuk $/5-8 \times 10^8$ sejt/ml/ különböző koncentrációban. Az egyes mintákat fénymentes helyen inkubáltuk $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 60 percig; majd különböző higitásokat készítettünk, amelyekből 0,1 - 0,1 ml-t plétoltunk MTE agar lemezre. A túlélő baktériumok számát az inkubációs idő eltelte után meghatároztuk.

3. F' lac plazmid törlésének vizsgálata:

A F' lac plazmid törlésének vizsgálata az alábbiak szerint történt. Az E. coli K12 LE 140 törzs éjszakai levestenyészetéből 10^{-4} higitásokat készítettünk, amelyekből 0,05-0,05 ml-t mértünk MTE levesbe. A beoltott baktériumok száma 5×10^3 volt. A tenyészeteket a kuráló ágensek különböző koncentrációival egészítettük ki, majd statikus inkubáció következett 37°C -on 24^{h} keresztül. Azokból a csövekből, ahol még baktériumnövekedés volt - a MIC értékek alatti koncentráció - különböző higitásokat készítettünk. A higitásokból 0,1-0,1 ml-t szélesztettünk EMB agar lemezre. A lemezeket 37°C -on inkubáltuk 24^{h} át. A különálló telepeket tartalmazó lemezeken megszámoltuk a lac⁻/rózsaszínű/ és a lac⁺/lilas színű/ telepeket külön-külön.

4. R faktor törlésének vizsgálata:

E. coli C 600 R 144 drd³; illetve E. coli C 600 R 144 drd⁺ törzsek éjszakai levestenyészetéből 10^{-4} higitásokat készítettünk. Ezekből 0,05-0,05 ml-t mértünk 5-5 ml MTE levest tartalmazó kémcsőbe. Az így beoltott baktériumok száma kb. 5×10^3 volt. A tenyészeteket a vegyületek különböző koncentrációinak jelenlétében statikus körülmények között 37°C -on; 24^{h} -át inkubáltuk. A még növekedést mutató csövekből mintát vettünk, s különböző higitásokat készítettünk, amelyekből 0,1-0,1 ml-t EP agarra szélesztettünk. Ezután ismét 37°C -os inkubáció következett 24^{h} keresztül. Azokról a

lemezekről, amelyeken izolált baktériumtelepek voltak, bársonykoronggal kanamycintartalmu EP agarra replikáztunk. A replikalemezeket 37°C -on 24^{h} át inkubáltuk. Az inkubációs idő elteltével a kanamycintartalmu lemezeken nőtt telepeket a "mesterlemezen" lévő telepekével egybevetve megállapítottuk a kanamycinérzékenységre vált telepek számát.

5. Mutagén hatások vizsgálata:

A Salmonella typhimurium his^{-} igényes 13. sz. mutánsát 1 éjszakán át növesztettük nutrien broth-ban /Difco/, amelyből 10^{-2} higitást készítettünk, majd ebből 0,1 ml-t oltottunk friss nutrien broth-ba. A kulturát ezek után 8^{h} keresztül 37°C -on inkubáltuk levegőztetve. A baktériumtenyészetekből 0,1 ml-t mértünk 25 ml M-9 lágyagarba, amely különböző koncentrációkban tartalmazta a chlorpromazin-metabolitokat. Gyors összekeverés után a lágyagarba kevert baktériumokat kiöntöttük M-9 táptalaj felszínére. Mind az M-9 lemezek, mind pedig a lágyagar 0,5 M histidint, illetve 0,5 M biotint tartalmazott.

A lemezeket 37°C -on 48^{h} át inkubáltuk, majd megszámláltuk a his^{+} revertans telepeket.

B. Fizikokémiai módszerek:

1. Agaroz gélelektroforézis:

Gélelektroforetikus vizsgálataink során R.B. HELLING által javasolt eljárást követtük /49/.

"E" pufferbe 1,4%-os agarozt készítettünk. Az agarozt fel-tisztulásig forraltuk, majd 50 C⁰-ra való lehüléskor a rendszerhez az egyes plazmidtörelő anyagokat hozzáadtuk 10 ug/ml végkoncentrációban.

Előmelegített pipettával a gélrt a kiöntőcsőbe mértük. Der-medés után néhány mm-t kifujva, az agaroz oszlop "fejrészét" éles pengével lemetszettük. Az oszlop tetejére felvitt DNS-t a futási front jelölése érdekében 8%-os saccharos, és 0,025 %-os bromfenolkék tartalmu festékekkel jelöltük. 600 ug/ml DNS oldathoz 0,1 ml jelzőfestéket kevertünk, amelyből 100 ul-t vittünk az oszlop startpontjára. Így a DNS végkoncentrációja 30 ug/ml-re lett beállítva. A futtatás értékelését UV átvilágítással végeztük.

2. Spektrofotometriás mérések:

Spektrofotometriás méréseinket UNICAM SP 800 készüléken végeztük, 225-325 人 hullámtartományban.

A mérőküvetta 30 ug/ml DNS-t tartalmazott, fiziológiás só-oldatban higitva. A vizsgált vegyületeket ugyancsak fizi-ológiás sóoldatban higitottuk fel, amelyből 10 ug/ml-t adtunk mind a mérőküvetta-ban lévő DNS-hez, mind a referens-küvetta-ba. Ezek után felvettük a komplexspektrumokat.

3. Olvadáspont-meghatározás:

A plazmidtörlésre használt anyagaink hatását megvizsgáltuk a borju thymus DNS olvadáspontjára is. Méréseinket GILFORD 250 spektrofotométerben, thermoprogramozással végeztük. A hőmérséklet emelése percenként 1°C -kal történt. Méréseink alkalmával a DNS végkoncentrációja 50 ug/ml ; a komplexképző vegyületeké 25 ug/ml volt. Oldószerként $0,02\text{ M SSC}$ -t alkalmaztunk.

Eredmények:

Antibakteriális hatások vizsgálata:

Az antibakteriális hatások tanulmányozása során először a chlorpromazin-metabolitok bakteriosztatikus hatását vizsgáltuk különböző Gram-negativ és Gram-pozitiv baktériumok jelenlétében, sorozathigitás módszerével.

Megállapítva a minimális bakteriosztatikus koncentrációkat, MIC értéknek a vizsgált vegyületeknek azt a legkisebb koncentrációját vettük, amely már megakadályozta a baktériumok elszaporodását.

A tesztelt vegyületek MIC értékei Gram-pozitiv baktériumok esetében lényegesen alacsonyabbak, mint ugyanazon vegyületek Gram-negativ baktériumok vonatkozásában. A Gram-pozitiv baktériumok közül a Diplococcus pneumoniae mutatta a legkifejezettebb érzékenységet az alkalmazott vegyületekkel szemben. Ugyanakkor a Gram-negativ Pseudomonas aeruginosa gyakorlatilag rezisztensnek bizonyult /1. táblázat/.

Amint a táblázat adatai alapján látható, a chlorpromazin-metabolitok bakteriosztatikus hatásában nem volt lényeges különbség ugyanazon baktériumfaj vonatkozásában.

A vegyületek baktericid hatását egy Gram-pozitiv és egy Gram-negativ baktériumon tanulmányoztuk.

Amikor az E. coli és Staphylococcus törzsekből sós vízbe szuszpendált sejtteit kezeltük, különböző koncentrációju chlorpromazin-metabolittal, megállapítottuk, hogy elpusztítják a nem szaporodó baktériumokat is.

Ez a direkt baktériumkárosító hatás kifejezettebben érvényesül a Staphylococcus aureus sejtjein, mint az E. coli esetében /4., 5. ábra/.

Érdekes, hogy a chlorpromazin, és a 7-hydroxi-chlorpromazin közel ugyanolyan mértékű baktericid hatást; a 7-8 dihydroxi-chlorpromazin gyengébb baktériumölő hatást mutatott, míg a vizsgált fentioiazinok közül a 7-8-dioxo-chlorpromazin mutatott legkisebb mértékben baktericid jelleget.

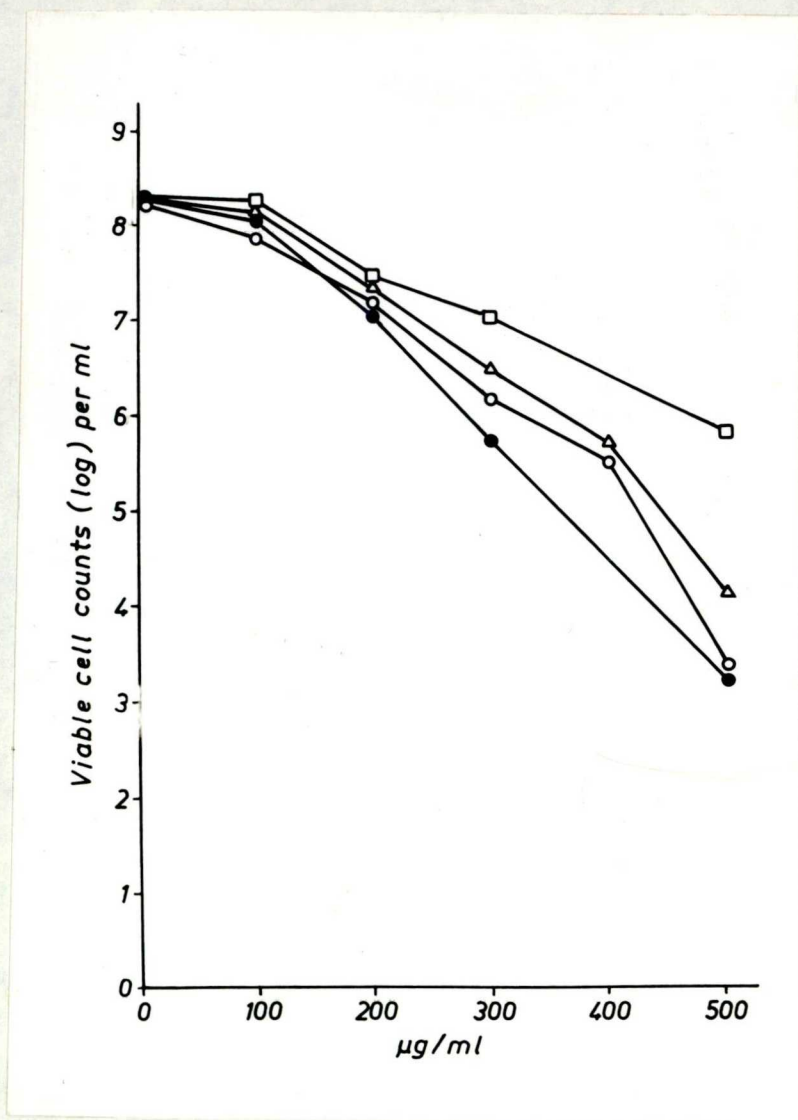
1. táblázat

A minimális bakteriosztatikus koncentráció meghatározása a különböző Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok esetében.
/ ug/ml /

Baktérium törzs	Chlor pro-mazin	7-hyd-roxi c h l o r p r o m a z i n	7-8-dihyd-roxi p r o m a z i n	7-8 dioxo	Morfin
Bacillus anthracis VR	20	10	15	10	1000
Staphylococcus aureus	30	15	10	10	1000
Streptococcus pyogenes	20	10	10	15	1000
Streptococcus viridans	30	20	15	15	1000
Diplococcus pneumoniae	5	5	5	5	1000
E.coli K12 ^x LE 140	90	90	140	140	1000
Proteus vulgaris	250	250	250	250	1000
Klebsiella pneumoniae	250	150	250	250	1000
Pseudomonas aeruginosa	500	500	500	500	1000

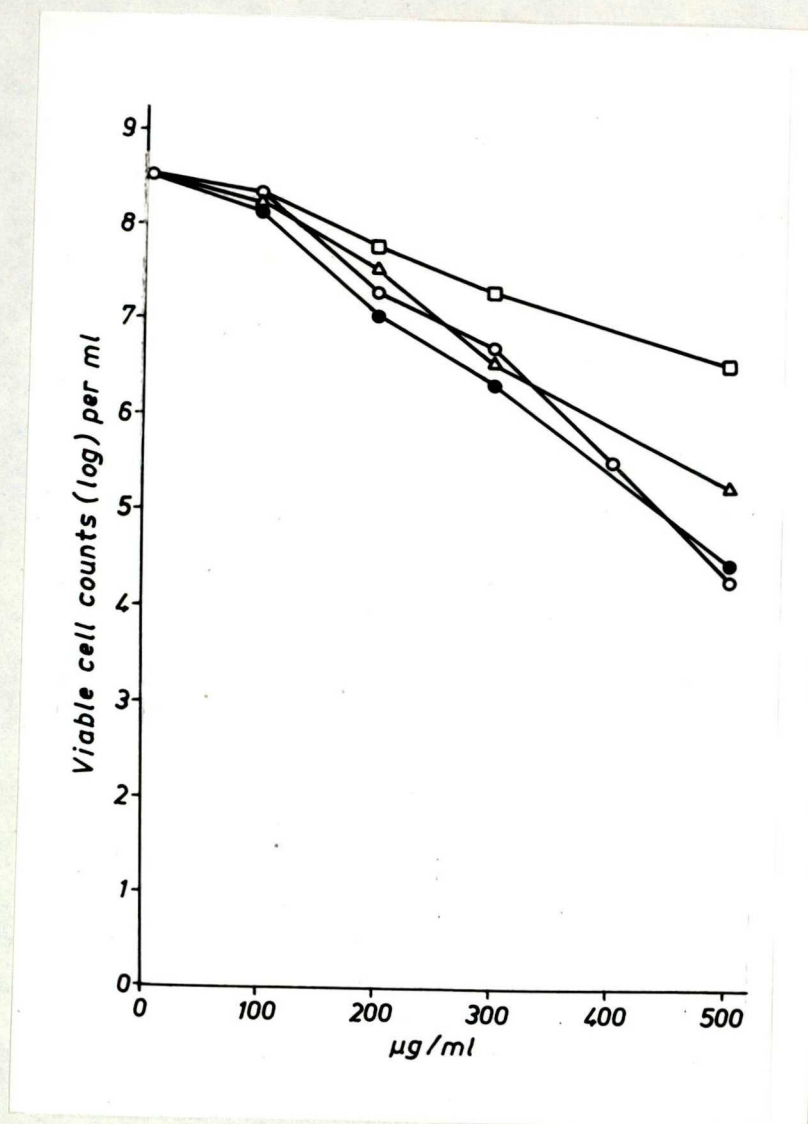
^x: Az E. coli K12 LE 140 esetében a MIC értékeket acridin-orangeval, tiloronnal és az 1-dimethylamino-3/-9 phenantril/-3 propanol vonatkozásában is meghatároztuk. Ezeket az alábbiakban adjuk, az értékek ug/ml-ben értendők.

1-dimethylamino-3/-9 phenantril/-3 propanol	100
Acridinorange	90
Tiloron	600



4. ábra

A 7-hydroxi-chlorpromazin; 7-8-dihydroxi-chlorpromazin; 7-8-dioxochlorpromazin; és a chlorpromazin baktericid hatásának vizsgálata Staphylococcus törzsön.



5. ábra.

A 7-hydroxi-chlorpromazin; 7-8-dihydroxi-chlorpromazin; 7-8-dioxochlorpromazin; és a chlorpromazin baktericid hatásának vizsgálata E. coli törzsön.

Az F' lac plazmid törlése:

Az előzőekben meghatároztuk az egyes vegyületek MIC értékeit az E.coli K12 LE 140 törzsére vonatkozóan. A plazmid-törlési kísérleteket a MIC értékek alatti koncentrációk mellett végeztük.

Megállapítottuk, hogy a biológiailag aktív chlorpromazin-metabolitok közül a 7-hydroxi-chlorpromazin rendelkezett viszonylag magasabb plazmidtörlő-képességgel /2. táblázat/. A 7-8-dihydroxi-chlorpromazin 0,3 %-ban eliminálta az E. coli F' lac plazmidját /3. táblázat/, míg a 7-8-dioxo-chlorpromazin - amelyben a kapcsolódó két oxigén atom következtében megváltoztak a gyűrűrendszer töltésvizsgálatai, és megszakadt a "pi" elektronrendszer, - még 150 ug/ml koncentráció mellett sem mutatott plazmidtörlő hatást /4. táblázat/. A fenti kísérletek alapján úgy látszik, hogy elválaszthatók az egyes hatásokért felelős molekulastruktúrák. Amíg a konjugált "pi" elektronrendszerrel rendelkező 7-hydroxi-chlorpromazin antibakteriális és plazmidtörlő hatással egyaránt rendelkezett, a 7-8-dioxo-chlorpromazin csak antibakteriális hatást mutatott.

Meg kell jegyezni, hogy a 7-8-dihydroxi-chlorpromazin alacsony plazmidtörlőképessége annak az eredménye, hogy az alkalmazott kísérleti körülmények között a vegyületek tekintélyes része 7-8-dioxo-chlorpromazinná oxidálódott. A további vegyületek vizsgálatakor a plazmidtörlést a molekula planaris területének nagysága függvényében vizsgáltuk. Ennek alapján



vált ismeretessé, hogy a viszonylag kis / $26,4 \text{ \AA}^2$ / planaris területű tiloron is rendelkezik plazmidtörlő hatással /5. táblázat/.

A továbbiakban a töltésviszonyok szerepét tisztáztuk az antibakteriális, illetve plazmidtörlő hatások szempontjából. Az acridinorange 80 ug/ml koncentrációban 20%-os gyakorisággal, /6. táblázat/, míg a hozzá hasonló strukturával rendelkező methilénkék amelyben a quaterner N^+ töltése polarizálja a három gyűrű elektronrendszerét- még 400 ug/ml koncentrációban sem törölte az F' lac plazmidot. Ezen utóbbi kísérletek eredményei a töltésszimmetria szerepére utalnak a plazmidtörlő hatás kialakításában. A fenti szempontok figyelembevételével szintetizáltunk egy új háromgyűrűs vegyületet; az 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanolt, amely igen hatásosan eliminálta az F' lac plazmidot /7. táblázat/. Ugyanakkor egy ethidiumbromidhoz hasonló szerkezetű fenantren vegyület a nem planaris strukturájú morfin még 1000 ug/ml koncentrációban sem törölte az F' lac plazmidot.

2. táblázat

A 7-hydroxi-chlorpromazin plazmidtörölő hatása az E.coli K12
LE 140 F'lac törzsére

Koncentráció ug/ml	Baktériumszaporodás 24 ^h után	Vizsgált telepek száma	Lactose- telepek %-ban
0	$4,6 \times 10^8$	1680	0
30	$3,4 \times 10^8$	2860	0,1
40	$2,9 \times 10^8$	2100	0,8
50	$2,0 \times 10^8$	2285	1,0
60	$1,2 \times 10^8$	2103	1,5
70	$8,0 \times 10^7$	2135	2,0

3. táblázat

A 7-8-dihydroxi-chlorpromazin plazmidtörölő hatása az E.coli
K12 LE 140 F'lac törzsére

Koncentráció ug/ml	Baktériumszaporodás 24 ^h után	Vizsgált telepek száma	Lactose- telepek %-ban
0	$7,0 \times 10^8$	2390	0
20	$7,0 \times 10^8$	1860	0
40	$5,0 \times 10^8$	3050	0,2
60	$4,5 \times 10^8$	4500	0,5
80	$3,0 \times 10^8$	3360	0,1
100	$3,1 \times 10^8$	3315	0,2
120	$2,0 \times 10^7$	3445	0,3

4. táblázat

A 7-8-dioxo-chlorpromazin plazmidtörölő hatása az E.coli K12
LE 140 F'lac törzsére

Koncentráció ug/ml	Baktériumszaporodás 24 ^h után	Vizsgált telepek száma	Lactose ⁻ telepek %-ban
0	$5,8 \times 10^8$	1429	0
20	$2,5 \times 10^8$	1200	0
40	$2,6 \times 10^8$	2360	0
60	$9,0 \times 10^7$	1465	0
80	$6,0 \times 10^7$	2423	0
100	$5,4 \times 10^4$	1021	0
120	$3,0 \times 10^3$	1846	0,1
140	$3,1 \times 10^1$	2673	0,1

5. táblázat

A tiloron plazmidtörölő hatása az E.coli K12 Le 140 F'lac
törzsére

Koncentráció ug/ml	Baktériumszaporodás 24 ^h után	Vizsgált telepek száma	Lactose ⁻ telepek %-ban
0	$4,2 \times 10^9$	1180	0
100	$3,1 \times 10^9$	1096	0
200	$9,0 \times 10^8$	1766	0
300	$1,6 \times 10^4$	748	0
400	$8,4 \times 10^6$	984	1,0
500	$3,2 \times 10^3$	1146	1,5

6. táblázat

Az acridinorange plazmidtörölő hatása az E.coli K12 LE 140
F'lac törzsére

Koncentráció ug/ml	Baktériumszaporodás 24 ^h után	Vizsgált telepek száma	Lactose- telepek %-ban
0	$2,0 \times 10^9$	1032	0
10	$7,6 \times 10^8$	1425	0
20	$2,0 \times 10^8$	1230	0
40	$3,0 \times 10^7$	747	2,0
60	$4,2 \times 10^7$	896	12,5
80	$3,8 \times 10^5$	1840	20,0

7. táblázat

Az 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol plazmidtörlése
az E.coli K12 LE 140 F'lac törzsére

Koncentráció ug/ml	Baktériumszaporodás 24 ^h után	Vizsgált telepek száma	Lactose- telepek %-ban
0	$6,0 \times 10^8$	871	0
20	$4,0 \times 10^8$	940	0
40	$4,0 \times 10^8$	1825	1,0
60	$2,0 \times 10^8$	2540	5,0
80	$2,1 \times 10^7$	1796	30,0

A plazmidtörölő kísérletek során felvetődött a szelekciós hatásmechanizmus lehetősége. Nevezetesen a lactose-negatív - plazmidjukat vesztett baktériumok - megjelenése lehet-e annak a következménye, hogy a plazmidot hordozó baktériumok nagyobb számban pusztulnak el, míg a plazmid nélküli baktériumok még szaporodni képesek a vizsgált plazmidtörölő vegyületek megfelelő koncentrációinak jelenlétében.

Az említett feltevés szerint a plazmidjukat spontán elvesztett baktériumok csökkent érzékenysége a törölő vegyületekkel szemben vezetne azok nagymértékű elszaporodásához. A lehetőség kizárása érdekében összehasonlítottuk az eredeti F⁺lac plazmidot hordozó baktérium érzékenységét a plazmidját elvesztett baktériumokéval.

A kísérlet során mindkét baktériumtörzs éjszakai MTE levestenyészetéhez különböző koncentrációban adtuk a chlorpromazint, az 1-dimethylamino-3-/9 phenantril/-3 propanolt és a tiloront. A mintákat 37 C^o-on 60'-ig statikus körülmények között inkubáltuk.

A fiziológiás sósvízben készített hígításokból 0,1 - 0,1 ml-t plétoltunk EP lemezre, majd 24^h-ás inkubáció után megszámoltuk a telepek számát. Ilyen módon meghatároztuk az egyes mintákban az élő baktériumszámot. /8-10 táblázat/.

8. táblázat

A chlorpromazin baktericid hatásának vizsgálata az E.coli K12 LE 140 F'lac⁺ és lac⁻ törzsein

Baktérium törzs	Chlorpromazin koncentráció ug/ml				
	0	60	70	80	100
Lactose ⁺	1,2x10 ⁸	7,0x10 ⁷	4,0x10 ⁶	1,0x10 ⁶	3,0x10 ⁵
Lactose ⁻	2,0x10 ⁸	1,6x10 ⁸	1,7x10 ⁷	8,0x10 ⁶	1,0x10 ⁶

9. táblázat

Az 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol baktericid hatásának vizsgálata az E.coli K12 LE 140 F'lac⁺ és lac⁻ törzsein

Baktérium törzs	1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol koncentráció ug/ml					
	0	80	100	120	140	160
Lactose ⁺	5,6x10 ⁸	1,3x10 ⁸	7,0x10 ⁷	1,2x10 ⁷	1,0x10 ⁶	4,0x10 ⁵
Lactose ⁻	5,7x10 ⁸	1,0x10 ⁸	9,4x10 ⁷	7,5x10 ⁷	1,0x10 ⁷	5,0x10 ⁶

10. táblázat

A tiloron baktericid hatásának vizsgálata az E.coli K12 LE 140 F'lac⁺ és lac⁻ törzsein

Baktériumszám	Tiloron koncentráció ug/ml			
	0	400	500	600
Lactose ⁺	1,7x10 ⁸	8,0x10 ⁷	6,0x10 ⁷	3,9x10 ⁷
Lactose ⁻	2,0x10 ⁸	1,5x10 ⁸	9,8x10 ⁷	4,0x10 ⁷

Amint a táblázatok eredményeiből kitűnik, a lactose-pozitív és a plazmidjukat vesztett lactose-negatív baktériumok szenzitivitása közel azonos mértékű a vizsgált vegyületekkel szemben. A két baktérium közötti érzékenység különbség olyan minimális, hogy a lactose-negatív baktériumok megjelenése nem magyarázható egyszerűen a szelekció érvényrejutásának tényével.

A további kísérleteinkben néhány vegyület plazmidtörölő-képességét vizsgáltuk a pH függvényében, abból a célból, hogy megállapíthassuk a plazmidelimináció optimális feltételeit.

A kísérletek során alkalmazott MTE táptalajsorozat pH koncentrációját 1 n HCl-lel; illetve 1 n NaOH-val pH 6,4-7,8-ra állítottuk be.

Miután az alkalmazott pH intervallum szélső értékeinél a MIC értékek változása volt tapasztalható, a vegyületek három különböző koncentrációjának plazmidtörölő-képességét vizsgáltuk a pH függvényében. /11-16 táblázat./

11. táblázat

A chlorpromazin plazmidtörölő hatása a pH függvényében
az E.coli K12 LE 140 F'lac törzsén

pH	koncentrá- ció ug/ml	Lactose- telepek %-ban	pH	koncentrá- ció ug/ml	Lactose- telepek %-ban
6,4	40	0	7,2	40	19,4
	50	0		50	21,3
	60	0		60	30,3
6,6	40	0	7,4	40	21,7
	50	0		50	25,3
	60	0		60	38,8
6,8	40	0	7,6	40	23,3
	50	0		50	28,6
	60	0		60	37,2
7,0	40	6,3	7,8	40	17,5
	50	13,6		50	32,6
	60	23,8		60	0

12. táblázat

A 7-hydroxi-chlorpromazin plazmidtörölő hatása a pH függvényében az E.coli K12 LE 140 F'lac törzsére

pH	koncentráció ug/ml	Lactose ⁻ telepek %-ban	pH	koncentráció ug/ml	Lactose ⁻ telepek %-ban
6,4	50	0	7,2	50	1,0
	60	0		60	1,5
	70	0		70	2,0
6,6	50	0	7,4	50	1,1
	60	0		60	1,7
	70	0		70	2,0
6,8	50	0	7,6	50	1,1
	60	0		60	1,5
	70	0		70	1,8
7,0	50	0,5	7,8	50	0,8
	60	1,0		60	0,5
	70	1,0		70	0

13. táblázat

A 7-8-dihydroxi-chlorpromazin plazmidtörölő hatása a pH függvényben az E.coli K12 LE 140 F'lac törzsére

pH	koncentráció ug/ml	Lactose ⁻ telepek %-ban	pH	koncentráció ug/ml	Lactose ⁻ telepek %-ban
6,4	80	0	7,2	80	0,1
	100	0		100	0,2
	120	0		120	0,3
6,6	80	0	7,4	80	0,1
	100	0		100	0,2
	120	0		120	0,2
6,8	80	0	7,6	80	0,2
	100	0		100	0,3
	120	0		120	0,3
7,0	80	0	7,8	80	0,1
	100	0		100	0
	120	0		120	0

14. táblázat

A 7-8-dioxo-chlorpromazin plazmidtörölő hatása a pH függvényében az E.coli K12 LE 140 F'lac törzsén

pH	koncentráció ug/ml	Lactose ⁻ telepek %-ban	pH	koncentráció ug/ml	Lactose ⁻ telepek %-ban
6,4	100	0	7,2	100	0
	120	0		120	0,1
	140	0		140	0,1
6,6	100	0	7,4	100	0
	120	0		120	0,1
	140	0		140	0
6,8	100	0	7,6	100	0,1
	120	0		120	0
	140	0		140	0
7,0	100	0	7,8	100	0
	120	0,1		120	0
	140	0		140	0

15. táblázat

Az 1-dimethylamino-3-~~9~~ phenantril/-3 propanol plazmidtörölő
hatása a pH függvényében az E.coli K12 LE 140 F'lac
törzsén

pH	koncentrá- ció ug/ml	Lactose- telepek %-ban	pH	koncentrá- ció ug/ml	Lactose- telepek %-ban
6,4	40	0	7,2	40	0,7
	60	0		60	7,9
	80	0		80	28,8
6,6	40	0	7,4	40	3,1
	60	0		60	8,0
	80	0		80	33,0
6,8	40	0	7,6	40	2,4
	60	2,5		60	9,6
	80	6,4		80	34,5
7,0	40	0,6	7,8	40	2,3
	60	4,8		60	10,8
	80	24,6		80	0

16. táblázat

A tiloron plazmidtörölő hatása a pH függvényében az E.coli
K12 LE 140 F'lac törzsén

pH	koncentráció ug/ml	Lactose ⁻ telepek %-ban	pH	koncentráció ug/ml	Lactose ⁻ telepek %-ban
6,4	100	0	7,2	100	0
	200	0		200	0
	400	0		400	1,4
6,6	100	0	7,4	100	0
	200	0		200	0
	400	0		400	1,8
6,8	100	0	7,6	100	0
	200	0		200	0
	400	0		400	2,1
7,0	100	0	7,8	100	0
	200	0		200	0
	400	0,3		400	1,9

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a plazmidtörlés gyengén lúgos, pH 7,2-7,6 tartományban a legkifejezettebb a jó plazmidtörlő hatású vegyületeknél, mint a chlorpromazin és az 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol esetében.

A táptalaj pH-jának növelésével nem volt lényegesen fokozható a 7-hydroxi-chlorpromazin; a 7-8-dihydroxi-chlorpromazin; valamint a tiloron plazmidtörlő hatása.

Teljesen közömbösen viselkedett a 7-8-dioxo-chlorpromazin, amely vonatkozásában semmiféle eliminációs készség nem mutatkozott a relative magasabb lúgos tartományban.

A pH 7 alatti tartományban gyakorlatilag nem észleltünk plazmidtörlő hatást.

Az eddigiek során megismertük, hogy a három gyűrű töltésviszonya és a táptalaj pH-ja hogyan befolyásolja a plazmidtörlést. A további kísérleteinkben a gyűrűrendszerben lévő szubsztitúensek töltésviszonyait változtattuk meg kelátkomplexek kialakításával.

Fémkomplexek viselkedése.

Ezekben a kísérletekben a plazmidtörő vegyületek bivalens kationokkal képzett kelátkomplexeinek plazmidtörlését tanulmányoztuk.

A chlorpromazin, a chlorpromazin-metabolitok, az acridinorange, és a tiloron Mg, Ma, Ca, Cu, Zn-el alkotott komplexeit Rajan /92/ és munkatársai módszerével készítettük MTE táptalajban. Az egyes vegyületek különböző koncentrációit tartalmazó táptalajokat a fém sók különböző koncentrációival / 0,03 M; 0,075 M; 0,15 M/ egészítettük ki. A táptalajokat 10 percig szobahőn inkubáltuk a komplexkialakulás biztosítása érdekében.

A komplexeket tartalmazó táptalaj 5 ml-be 5×10^3 baktériumsejtet oltottunk. A mintákat 37°C -on inkubáltuk 24^{h} -n keresztül, majd azok fiziológiás sósvizes hígításaiból 0,1-0,1 ml-t pletoltunk differenciáló /EMB/ táptalajra. A lemezeket 37°C -on inkubáltuk, és 24^{h} után megszámoltuk a lactose-pozitív, illetve a lactose-negatív telepeket.

Vizsgálatainkat olyan koncentrációk mellett végeztük, amelyeknél - a fém sók hiányában - a vegyületek a legkifejezettebb törlést mutatták. A 17-23 táblázatokban feltüntetett eredményeket összehasonlítva a kontroll - fémkomplex nélküli - adatokkal azt találtuk, hogy a kétértékű fémionok jelenlétében a plazmideliminálás lényegesen csökkent.

A chlorpromazin esetében 0,15 M Mg^{++} jelenlétében bár baktériumnövekedés megfigyelhető, plazmidvesztett telepek egyáltalán nem mutathatók ki, míg a további fém sók említett molaritása

mellett baktériumnövekedés sem volt. A molaritás csökkentésével az eliminálás mértéke is emelkedik, bár Cu^{++} és Zn^{++} nehézfémek jelenlétében még 0,075 M-nál sem volt baktériumnövekedés. A chlorpromazin-metabolitok közül a 7-8-dihydroxi-chlorpromazin és a 7-8-dioxo-chlorpromazin fémionok jelenlétében gyakorlatilag elveszítették minimális plazmidelimináló-képességüket. A viszonylag magasabb törlési rátát mutató 7-hydroxi-chlorpromazin bár vesztett plazmidtörlő-képességéből, ezek az értékcsökkenések - összehasonlítva a kontroll adatokéval - nem oly szembeötlők, mint a chlorpromazin esetében.

A chlorpromazinhoz viszonylag hasonló viselkedést mutat az 1-dimethylamino-3-/9 phenantril/-3 propanol. Jelenlétében az alkalmazott legmagasabb Cu^{++} , és Zn^{++} koncentrációk mellett szintén nem volt baktériumnövekedés. A fémsókoncentrációk csökkentésével a plazmidtörlés emelkedett.

A tiloronnal végzett kísérletekben magasabb Cu^{++} , és Zn^{++} koncentrációkat alkalmazva szintén a baktériumnövekedés elmaradását tapasztaltuk.

Feltűnő, hogy a viszonylag magas 400 ug/ml tiloron a 0,03 molaritású fémsók jelenlétében is alig mutat plazmidtörlő hatást.

Acridinorange esetében igen kifejezett plazmidtörlés-csökkenés figyelhető meg 0,15 M fémsókoncentrációkat alkalmazva. Ebben az esetben csak Mg^{++} , Mn^{++} , és Ca^{++} jelenlétében tapasztaltunk baktériumnövekedést, míg a Cu^{++} és Zn^{++} hason-



ló koncentrációi már gátolták a baktériumok szaporodását. Megállapítható, hogy a fémsók molarányának csökkentésével emelkedik az acridinorange plazmidtörlőképessége. Azonban a fémsók 0,03 M koncentrációjának jelenlétében kapott plazmid-törlési értékek még mindig lényegesen alacsonyabbak a kontroll értékekhez képest.

Egy következő kísérletsorozatban a chlorpromazint és a MgSO_4 -et választottuk modellként, amelyben a kelátképzés hatását pontosabban tanulmányoztuk. A komplexképzésben résztvevő mindkét anyag molarányát változtatva vizsgáltuk a chlorpromazin plazmidtörlő-képességének alakulását. /Az eredményeket a 24. táblázat szemlélteti./

Amint az eredményekből kitűnik, a Mg^{++} nem akadályozzák meg a chlorpromazin plazmidtörlő-képességét közel azonos molaris arányok mellett. Valószínűsíthető, hogy a plazmidtörlő-vegyület és a fémsók közötti komplexképződésen túlmenően más természetű mechanizmus érvényrejutásával is számolni kell az elimináció gátlásában, hisz a fémsókból lényegesen magasabb koncentráció szükséges a plazmidtörlőhatás kivédéséhez, mint ami a kelátkomplexek kialakulásához szükséges.

17. táblázat

A chlorpromazin és néhány bivalens fémsó kelátkomplexének plazmidtörölő hatása az E.coli K12 LE 140 F'lac törzsére

Fémsó koncentráció /M/		K u r á l ó a n y a g k o n c e n t r á c i ó /ug/ml/					
		40		50		60	
		Össztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /	Össztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /	Össztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /
Kontroll		8,0x10 ⁷	20,0	5,0x10 ⁷	22,0	4,0x10 ⁷	29,0
MgSO ₄	0,15	5,0x10 ⁷	-	3,0x10 ⁷	-	2,0x10 ⁷	-
	0,075	5,8x10 ⁷	5,0	2,6x10 ⁷	8,0	1,8x10 ⁷	7,0
	0,03	6,2x10 ⁷	10,1	3,8x10 ⁷	11,3	2,8x10 ⁷	8,1
MnSO ₄	0,15	-	-	-	-	-	-
	0,075	7,6x10 ⁶	8,9	5,4x10 ⁶	8,6	4,0x10 ⁶	4,8
	0,03	5,0x10 ⁷	9,6	4,0x10 ⁷	9,0	2,0x10 ⁷	8,7
CaSO ₄	0,15	-	-	-	-	-	-
	0,075	7,0x10 ⁶	6,4	6,6x10 ⁶	8,6	5,4x10 ⁶	8,0
	0,03	6,0x10 ⁷	9,6	5,0x10 ⁷	8,9	4,0x10 ⁷	8,8
CuSO ₄	0,15	-	-	-	-	-	-
	0,075	-	-	-	-	-	-
	0,03	5,5x10 ⁷	7,8	4,8x10 ⁷	11,1	4,3x10 ⁷	10,5
ZnSO ₄	0,15	-	-	-	-	-	-
	0,075	-	-	-	-	-	-
	0,03	5,4x10 ⁷	8,5	4,3x10 ⁷	7,4	4,1x10 ⁷	10,0

18. táblázat

A 7-hydroxi-chlorpromazin és néhány bivalens fémsó kelátkomplexének plazmidtörölő hatása az E.coli K12 LE 140 F⁺lac törzsére

Fémsó koncentráció /M/	K u r á l ó a n y a g k o n c e n t r á c i ó / ug/ml /					
	50		60		70	
	Ossztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /	Ossztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /	Ossztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /
Kontroll	2,0x10 ⁸	1,0	1,4x10 ⁸	1,5	9,0x10 ⁷	2,0
MgSO ₄	0,15	6,0x10 ⁷	0,5	4,1x10 ⁷	0,7	8,0x10 ⁶
	0,075	9,0x10 ⁷	0,8	8,0x10 ⁷	1,3	2,0x10 ⁷
	0,03	2,0x10 ⁸	0,7	1,4x10 ⁸	1,2	8,0x10 ⁷
MnSO ₄	0,15	8,0x10 ⁷	0,4	5,0x10 ⁷	0,3	1,0x10 ⁷
	0,075	9,0x10 ⁷	0,8	7,0x10 ⁷	0,9	4,9x10 ⁷
	0,03	2,3x10 ⁸	0,8	1,8x10 ⁸	1,0	9,0x10 ⁷
CaSO ₄	0,15	1,0x10 ⁸	-	8,0x10 ⁷	-	7,0x10 ⁷
	0,075	1,5x10 ⁸	-	9,0x10 ⁷	-	8,0x10 ⁷
	0,03	2,0x10 ⁸	0,6	1,1x10 ⁸	0,8	9,1x10 ⁷
CuSO ₄	0,15	-	-	-	-	-
	0,075	-	-	-	-	-
	0,03	1,1x10 ⁸	0,6	8,0x10 ⁷	0,6	6,5x10 ⁷
ZnSO ₄	0,15	-	-	-	-	-
	0,075	-	-	-	-	-
	0,03	1,4x10 ⁸	0,6	7,0x10 ⁷	0,5	3,5x10 ⁷

19. táblázat

A 7-8-dihydroxi-chlorpromazin és néhány bivalens fémsó kelátkomplexének plazmidtörölő hatása az E.coli K12 LE 140 F'lac törzsére

Fémsó koncentráció		K u r á l ó a n y a g k o n c e n t r á c i ó / ug/ml /					
		80		100		120	
/M/		Össztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /	Össztelepsz. / log /	Lac ⁻ tel. / % /	Össztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /
Kontroll		3,0x10 ⁸	0,1	3,1x10 ⁸	0,2	2,0x10 ⁷	0,3
MgSO ₄	0,15	1,5x10 ⁷	-	1,5x10 ⁷	-	1,0x10 ⁷	-
	0,075	5,0x10 ⁷	-	6,0x10 ⁷	-	4,0x10 ⁷	-
	0,03	1,0x10 ⁸	-	9,0x10 ⁷	-	8,0x10 ⁷	-
MnSO ₄	0,15	1,0x10 ⁷	-	6,0x10 ⁶	-	5,0x10 ⁷	-
	0,075	3,0x10 ⁷	-	1,0x10 ⁷	-	6,0x10 ⁸	-
	0,03	9,0x10 ⁷	-	3,0x10 ⁷	-	1,0x10 ⁷	-
CaSO ₄	0,15	1,2x10 ⁷	-	6,0x10 ⁶	-	5,6x10 ⁶	-
	0,075	4,0x10 ⁷	-	9,0x10 ⁶	-	8,0x10 ⁶	-
	0,03	1,0x10 ⁸	-	1,0x10 ⁷	-	1,0x10 ⁷	-
CuSO ₄	0,15	-	-	-	-	-	-
	0,075	1,4x10 ⁷	-	6,0x10 ⁶	-	5,0x10 ⁶	-
	0,03	9,0x10 ⁷	-	1,0x10 ⁷	-	9,0x10 ⁶	-
ZnSO ₄	0,15	-	-	-	-	-	-
	0,075	-	-	-	-	-	-
	0,03	1,5x10 ⁷	-	8,0x10 ⁶	-	6,0x10 ⁶	-

20. táblázat

A 7-8-dioxo-chlorpromazin és néhány bivalens fémsó kelátkomplexének plazmidtörölő hatása az E.coli K12 LE 140 F[']lac törzsére

Fémsó koncentráció /M/	K u r á l ó a n y a g k o n c e n t r á c i ó / ug/ml /					
	100		120		140	
	Össztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /	Össztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /	Össztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /
Kontroll	5,4x10 ⁴	-	3,0x10 ⁴	0,1	3,1x10 ³	0,1
MgSO ₄	0,15	-	-	-	-	-
	0,075	3,0x10 ⁴	2,0x10 ⁴	-	1,5x10 ⁴	-
	0,03	5,5x10 ⁵	1,3x10 ⁵	-	1,0x10 ⁵	-
MnSO ₄	0,15	-	-	-	-	-
	0,075	3,2x10 ⁴	1,0x10 ⁴	-	9,0x10 ³	-
	0,03	4,8x10 ⁵	4,0x10 ⁵	-	8,0x10 ⁴	-
CaSO ₄	0,15	-	-	-	-	-
	0,075	2,0x10 ⁴	1,1x10 ⁴	-	9,0x10 ⁶	-
	0,03	3,6x10 ⁵	1,0x10 ⁵	-	8,0x10 ⁴	-
CuSO ₄	0,15	-	-	-	-	-
	0,075	-	-	-	-	-
	0,03	2,5x10 ⁵	1,1x10 ⁵	-	7,0x10 ⁴	-
ZnSO ₄	0,15	-	-	-	-	-
	0,075	- ⁵	-	-	-	-
	0,03	2,4x10 ⁵	8,0x10 ⁴	-	5,0x10 ⁴	-

21. táblázat

Az 1-dimethylamino-3-/9 phenantril/-3 propanol és néhány bivalens fémsó kelátkomplexének plazmidtörölő hatása az E.coli K12 LE 140 F'lac törzsére

Fémsó koncentráció /M/	K u r á l ó a n y a g k o n c e n t r á c i ó / ug/ml /					
	40		60		80	
	Össztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /	Össztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /	Össztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /
Kontroll	4,0x10 ⁸	1,0	2,0x10 ⁸	5,0	2,1x10 ⁷	30,0
MgSO ₄	0,15	1,0x10 ⁷	-	8,0x10 ⁶	-	3,0x10 ⁶
	0,075	4,2x10 ⁷	-	1,1x10 ⁷	-	2,1x10 ⁷
	0,03	5,5x10 ⁷	0,6	4,4x10 ⁷	2,1	3,2x10 ⁷
MnSO ₄	0,15	1,7x10 ⁷	0,4	1,4x10 ⁷	0,6	8,0x10 ⁶
	0,075	2,2x10 ⁷	0,5	1,5x10 ⁷	0,6	1,1x10 ⁷
	0,03	3,4x10 ⁷	0,7	2,0x10 ⁷	1,5	2,0x10 ⁷
CaSO ₄	0,15	2,1x10 ⁷	-	1,8x10 ⁷	-	5,7x10 ⁷
	0,075	3,2x10 ⁷	0,5	2,0x10 ⁷	1,4	1,8x10 ⁷
	0,03	5,0x10 ⁷	0,8	3,3x10 ⁷	1,3	1,0x10 ⁷
CuSO ₄	0,15	-	-	-	-	-
	0,075	1,8x10 ⁷	0,5	1,1x10 ⁷	0,8	9,0x10 ⁶
	0,03	5,4x10 ⁷	0,8	3,2x10 ⁷	1,4	1,1x10 ⁷
ZnSO ₄	0,15	-	-	-	-	-
	0,075	-	-	-	-	-
	0,03	5,2x10 ⁷	0,4	4,3x10 ⁷	1,5	1,1x10 ⁷

22. táblázat

A tiloron és néhány bivalens fémsó kelátkomplexének plazmidtörölő hatása az E.coli
K12 LE 140 F'lac törzsére

Fémsó koncentráció /M/		K u r á l ó a n y a g k o n c e n t r á c i ó / ug/ml /					
		100		200		400	
		Össztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /	Össztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /	Össztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /
Kontroll		$2,0 \times 10^8$	-	$4,0 \times 10^7$	-	$6,0 \times 10^6$	-
MgSO ₄	0,15	$3,3 \times 10^7$	-	$1,3 \times 10^7$	-	$1,0 \times 10^6$	-
	0,075	$5,0 \times 10^7$	-	$2,5 \times 10^7$	-	$4,0 \times 10^6$	-
	0,03	$1,4 \times 10^8$	-	$3,1 \times 10^7$	-	$4,6 \times 10^6$	0,7
MnSO ₄	0,15	$2,0 \times 10^7$	-	$1,0 \times 10^7$	-	$1,1 \times 10^6$	-
	0,075	$5,2 \times 10^7$	-	$3,4 \times 10^7$	-	$4,3 \times 10^6$	-
	0,03	$1,3 \times 10^8$	-	$3,1 \times 10^7$	-	$4,9 \times 10^6$	0,7
CaSO ₄	0,15	$4,4 \times 10^7$	-	$1,3 \times 10^7$	-	$1,0 \times 10^6$	-
	0,075	$6,9 \times 10^7$	-	$2,7 \times 10^7$	-	$3,5 \times 10^6$	-
	0,03	$1,5 \times 10^8$	-	$3,0 \times 10^7$	-	$3,8 \times 10^6$	0,3
CuSO ₄	0,15	-	-	-	-	-	-
	0,075	-	-	-	-	-	-
	0,03	$5,6 \times 10^7$	-	$8,4 \times 10^6$	-	$1,0 \times 10^6$	0,4
ZnSO ₄	0,15	-	-	-	-	-	-
	0,075	-	-	-	-	-	-
	0,03	$5,5 \times 10^7$	-	$8,2 \times 10^6$	-	$1,1 \times 10^6$	0,3

23. táblázat

Az acridinorange és néhány bivalens fémsó kelátkomplexének plazmidtörlő hatása az E.coli K12 LE 140 F'lac törzsére

Fémsó koncentráció /M/		K u r á l ó a n y a g k o n c e n t r á c i ó / ug/ml /					
		40		60		80	
		Össztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /	Össztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /	Össztelepsz. /log/	Lac ⁻ tel. / % /
Kontroll		8,0x10 ⁷	2,0	4,2x10 ⁷	12,5	3,8x10 ⁶	20,0
MgSO ₄	0,15	5,2x10 ⁷	0,7	1,0x10 ⁷	0,9	1,1x10 ⁶	1,5
	0,075	6,4x10 ⁷	0,9	1,8x10 ⁷	1,3	2,0x10 ⁶	2,5
	0,03	7,1x10 ⁷	6,9	2,6x10 ⁷	8,6	3,0x10 ⁶	9,3
MnSO ₄	0,15	4,8x10 ⁷	0,5	9,0x10 ⁶	0,7	1,0x10 ⁶	1,4
	0,075	5,3x10 ⁷	0,8	2,1x10 ⁷	1,5	2,1x10 ⁶	2,4
	0,03	6,6x10 ⁷	1,2	3,0x10 ⁷	4,9	2,9x10 ⁶	6,8
CaSO ₄	0,15	6,4x10 ⁷	0,7	9,8x10 ⁶	1,0	1,4x10 ⁶	1,8
	0,075	6,8x10 ⁷	0,8	1,1x10 ⁷	1,5	1,8x10 ⁶	2,5
	0,03	7,2x10 ⁷	1,0	2,4x10 ⁷	5,6	2,4x10 ⁶	7,4
CuSO ₄	0,15	-	-	-	-	-	-
	0,075	9,0x10 ⁶	1,1	5,5x10 ⁶	1,3	8,0x10 ⁵	2,8
	0,03	2,4x10 ⁷	0,8	1,0x10 ⁷	4,3	2,0x10 ⁶	6,8
ZnSO ₄	0,15	--	-	-	-	-	-
	0,075	8,4x10 ⁶	0,6	6,1x10 ⁶	3,8	9,0x10 ⁵	4,0
	0,03	2,7x10 ⁷	0,6	1,2x10 ⁷	4,1	1,2x10 ⁶	5,4

24. táblázat

A különböző molaritású chlorpromazin és MgSO_4 plazmidtörölő hatása %-ban az E.coli K12 LE 140 F'lac törzsére

Chlorpromazin koncentráció		Magnéziumsulfát koncentráció /M/					
M	ug/ml	1×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-2}	3×10^{-2}	$7,5 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-1}$
$6,4 \times 10^{-5}$	20	0,5	0,8	0	0	0	0
$9,6 \times 10^{-5}$	30	2,0	2,1	0	0	0	0
$1,2 \times 10^{-4}$	40	11,0	18,0	0	0	0	0
$1,6 \times 10^{-4}$	50	----	22,0	0	0,1	0	0
$1,9 \times 10^{-4}$	60		29,0	0,5	0	0	0
$2,5 \times 10^{-4}$	80		----	2,0	0,1	0	0
$3,2 \times 10^{-4}$	100			1,5	0,4	0,2	0
$6,4 \times 10^{-4}$	200			----	0	0,6	0,1
$9,6 \times 10^{-4}$	300				0	2,0	2,8
$1,2 \times 10^{-3}$	400				----	0	1,5
$1,6 \times 10^{-3}$	500					0	0

Az R plazmid eliminálása

Miután az előzőekben megvizsgáltuk az F' lac plazmidtörlés optimális feltételeit, a továbbiakban néhány kísérletben választ kerestünk arra a kérdésre is, hogy a vizsgált vegyületek plazmidtörlő hatása hogyan érvényesül az R plazmidot hordozó represszált és derepresszált pilusszintézisű E.coli törzseken.

A kísérleteket a módszertani részben közölteknek megfelelően végeztük. Az egyes plazmidtörlő vegyületek jelenlétében tenyésztett baktériumkulturák higitásait antiboitikummentes MTE táptalajra plétoltuk. Az így kinőtt telepeket másnap /24^h után/ kanamycintartalmu táptalajra replikáztuk. A lemezeket 37 °C-on 24^h át inkubáltuk, majd összehasonlítottuk a kanamycintartalmu táptalajon kinőtt baktériumtelepek számát a mesterlemezen lévőkével. A két érték különbsége alapján állapítottuk meg a kanamycinrezisztencia gyakoriságát. Az eredményeket a 25., 26. táblázat szemlélteti.



25. táblázat

A chlorpromazin; a 7-hydroxi-chlorpromazin; a 7-8-dihydroxi-chlorpromazin; a 7-8-dioxo-chlorpromazin; az 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol; tiloron; és az acridinorange plazmidtörlő hatása az E.coli C 600 R 144 drd⁺ / represszált pilusszintézisű / törzsre

Vegyületek	Koncentráció ug/ml	Kanamycinrezisztencia törlése %-ban
Chlorpromazin	60	1,0
7-hydroxi-chlorpromazin	60	0,1
7-8-dihydroxi-chlorpromazin	120	0,1
7-8-dioxo-chlorpromazin	120	0,0
1-dimethylamino-3-/-9 phen- antril/-3 propanol	80	1,0
Tiloron	400	0,1
Acridinorange	160	1,5
Kontroll	0	0,0

26. táblázat

A chlorpromazin; a 7-hydroxi-chlorpromazin; a 7-8-dihydroxi-chlorpromazin; a 7-8-dioxo-chlorpromazin; az 1-dimethyl-amino-3-/-9 phenantril/-3 propanol; tiloron és az acridin-orange plazmidtörlő hatása E.coli C 600 R 144 drd³/derep-resszált pilusszintézisü/ törzsre

Vegyületek	Koncentráció ug/ml	Kanamycinrezisztencia törlés %-ban
Chlorpromazin	60	0,7
7-hydroxi-chlorpromazin	60	0,2
7-8-dihydroxi-chlorpromazin	120	0,1
7-8-dioxo-chlorpromazin	120	0,0
1-dimethylamino-3-/-9 phen- antril/-3 propanol	80	0,8
Tiloron	400	0,2
Acridinorange	160	0,5
Kontroll	0	0,0

A 25., 26. táblázat eredményeiből kitűnik, hogy a vizsgált plazmidtörlő vegyületek lényegesen kisebb gyakorisággal képesek eliminálni az E.coli R faktorát, mint az F' lac plazmidot. Ezen utóbbi adatok arra engednek következtetni, hogy mind a chlorpromazin; mind metabolitjai; valamint az 1-dimethyl-amino-3-/-9 phenantril/-3 propanol; és a tiloron plazmidtörlése az acridinorangehoz hasonlóan főképp az F plazmidot hordozó törzseken érvényesül.

A plazmidtörölő vegyületek mutagén hatásának vizsgálata.

Az általunk vizsgált vegyületek plazmidtörölőképessége azt mutatta, hogy a hatásos vegyületeink valamiképpen gátolják a plazmid replikációt, illetve kölcsönhatásba kerülnek a plazmid DNS-sel.

A plazmid DNS szintézisére gyakorolt gátló hatás alapján feltételeztük, hogy a baktériumkromoszóma replikációját is befolyásolhatják a plazmidtörölő vegyületek.

Ezen feltételezésünket kívántuk alátámasztani azzal, hogy megvizsgáltuk a vegyületek mutagén hatását. Kísérletünk során Ames módszerét követtük /3/ S. typhimurium histidin-igényes mutáns felhasználásával.

Az említett módszeren túl, megvizsgáltuk az ugynevezett lon⁻ mutánsok megjelenésének gyakoriságát a plazmidtörölő vegyületek jelenlétében tenyésztett E.coli K12 LE 140 törzsére vonatkozóan.

A 27. táblázatban feltüntetett eredmények alapján megállapítható, hogy egyik vegyület sem okozott szignifikáns eltérést His revertáns telepek számában. A vegyületek direkt mutagén hatását így kizárhattuk.

Meglepő volt az, hogy a chlorpromazin-metabolitok és a tiloron, valamint az 1-dimethylamino-3-/9 phenantril/-3 propanol jelenlétében tenyésztett E.coli kulturák EMB táptalajon növekedett telepei között a normál telepmorfológiától eltérő, nagy, nyálkasküllemű telepeket találunk. A telepek nagy része - továbboltás után is - meg-

tartotta jellegzetes, nyálkás küllemét. Az ilyen telepekből kenetet készítve és Gram szerint festve mikroszkóp alatt nagy puffadt sejteket, és rövidebb-hosszabb fonalakat láthatunk /28. táblázat; 1-2 kép/.

A továbbiakban a nyálkás telepekből, valamint a normál telepekből szubkulturát készítve parallel vizsgáltuk mindkét kulturában a baktericid hatást. A szubkulturákat 1-1 milliterenként kémcsőbe szétosztottuk, és az egyes csövekhez a vegyületek különböző koncentrációit adtuk. A mintákat 37 C°-on 60'-ig inkubáltuk, majd EP lemezre való plétolás után 24^h múlva meghatároztuk az élő baktériumok számát. Érdekes, hogy acridinorange jelenlétében tenyésztett kultúrákból egyetlen alkalommal sem sikerült nyálkás küllemű lon⁻ telepet izolálni.

A 29-31 táblázatok alapján megállapítható, hogy a nyálkás telepekből származó lon⁻ baktériumok kisebb arányban pusztultak el, mint a normál telepből származók. Az adatok alapján joggal feltételezhetjük, hogy a mucoid -ugynevezett lon⁻ - baktériumok megjelenése szelekció következménye.

27. táblázat

A különböző plazmidtörölő vegyületek mutagén hatásának vizsgálata a S. typhimurium histidin igényes mutánsra

Vegyületek	Koncentráció ug/ml	His ⁺ revertáns telepek száma			
		I.	II.	III.	IV.
Chlorpromazin	60	0	1	1	3
7-hydroxi-chlorpromazin	60	0	0	1	3
7-8-dihydroxi-chlorpromazin	120	0	0	1	2
7-8-dioxo-chlorpromazin	120	0	1	1	1
Kontroll	0	1	1	2	2

/A táblázatban szereplő számértékek a His⁺ revertáns telepek számát jelentik egy-egy petricsészében/

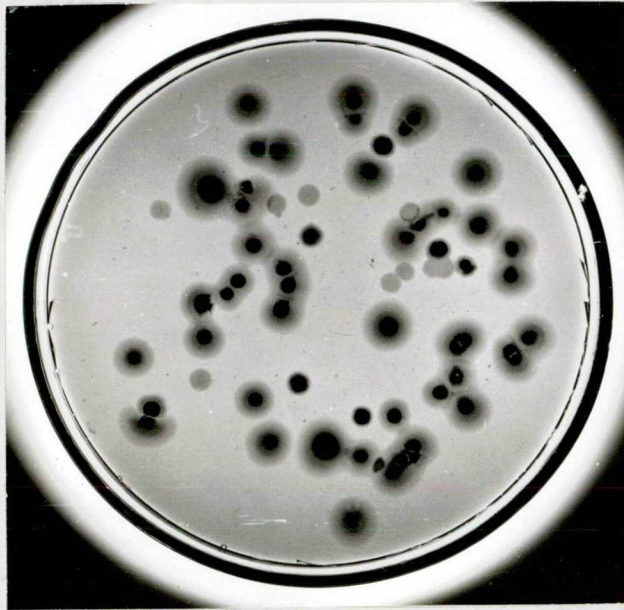
28. táblázat

A különböző plazmidtörölő vegyületek hatására szelektálódott lon⁻ telepek %-os megoszlása az össztelepszámhoz képest

E.coli K12 LE 140 törzsén

Vegyületek	Koncentráció ug/ml	Lon ⁻ mutánsok gyakorisága %-ban
Chlorpromazin	60	2-10
7-hydroxi-chlorpromazin	60	1-3
7-8-dihidroxil-chlorpromazin	120	0-0,3
7-8-dioxo-chlorpromazin	120	0
Tiloron	500	2-4
1-dimethylamino-3-/- -9 phenantril/-3 propanol	80	5-9
Kontroll	0	0

1. kép



Az 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol jelenlétében tenyésztett E.coli K12 LE 140 F' lac normál és szelektálódott nyálkás küllemű telepei.

2. kép



Az 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol hatására szelektálódott nyálkás küllemű telepek Gram szerinti festésének mikroszkópos képe.

29. táblázat

A chlorpromazin baktericid hatása az E.coli K12 LE 140 normál és az ebből izolált lon⁻ mutánsok sejtjeire

Baktérium	Chlorpromazin koncentráció ug/ml				
	0	60	70	80	100
F'lac normál	$1,2 \times 10^8$	$7,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$
F'lac lon ⁻	$1,4 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$

30. táblázat

Az 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol baktericid hatása az E.coli K12 LE 140 normál és az ebből izolált lon⁻ mutánsok sejtjeire

Baktérium	1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol koncentráció ug/ml				
	0	100	120	140	160
F'lac normál	$5,6 \times 10^8$	$7,0 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^5$
F'lac lon ⁻	$5,6 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$7,8 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$

31. táblázat

A tiloron baktericid hatása az E.coli K12 LE 140 normál és az ebből izolált lon⁻ mutánsok sejtjeire

Baktérium	Tiloron koncentráció ug/ml			
	0	400	500	600
F'lac normál	$1,7 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$	$3,9 \times 10^7$
F'lac lon ⁻	$1,5 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$

A plazmidtörlő vegyületek in vitro hatása a thymus DNS-re.

Az előző vizsgálatokban a plazmidtörlő hatások kimutatása azt bizonyította, hogy a plazmidtörlővegyület valamilyen módon kapcsolatba kerülhet a plazmid DNS-sel.

A plazmidtörlés mechanizmusának tisztázásához adatokat keresve, a továbbiakban arra a kérdésre kerestünk választ, hogy in vitro körülmények között kialakul-e valamilyen kölcsönhatás az említett vegyületek és a DNS között. Kísérleteinkhez modellként a thymusból származó DNS-t választottuk.

Gélelektroforézis

A kuráló ágensek és a plazmid-DNS közötti esetleges komplexképződés bizonyítására -első lépésben- gélelektroforetikus vizsgálatokat végeztünk. Abból a feltevésből indultunk ki, hogy az alkalmazott vegyületek a DNS-sel való kapcsolódásuk esetén -gerjeszthetőségük folytán - UV fényben fluoreszkálnak.

Vizsgálatainkat a módszertani részben ismertettek alapján végeztük. A kísérleti eredmények szerint a vizsgált háromgyűrűs vegyületek két csoportba sorolhatók:

Az első csoportba tartozóknál az UV besugárzás hatására az agaróz oszlopban a DNS csíkja erősen fluoreszkál a sötét háttérű mezőben. Ez a jelenség volt megfigyelhető a chlorpromazin, az 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol; a tiloron; valamint az acridinorange esetében.

A második csoportba sorolt morfin az elektroforetikus futtatások után nem mutatta a fluorescens csíkot.

Spektrofotometria

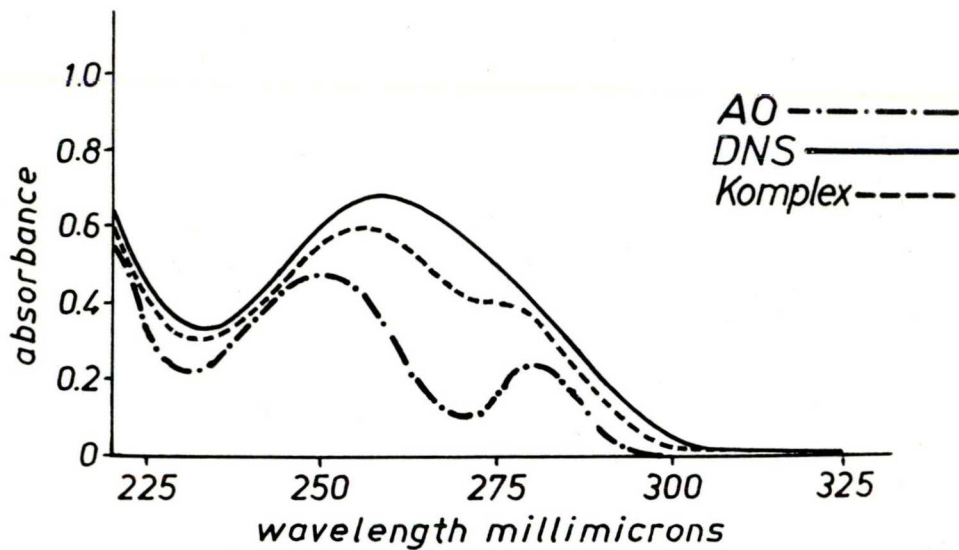
Bár a gélelektroforetikus vizsgálatokkal a plazmidtörölő-anyagok és a DNS közötti kapcsolat detektálható, a módszer még nem ad kielégítő választ a kölcsönkapcsolat milyenségére vonatkozóan.

A kérdés közelebbi tanulmányozása érdekében spektrofotometriás méréseket végeztünk.

A mérési eredmények alapján megállapítható, hogy a DNS-hez adott plazmidtörölő-vegyületek hatására a DNS spektrumában karakterisztikus változások jönnek létre, amelyek három csoportba sorolhatók.

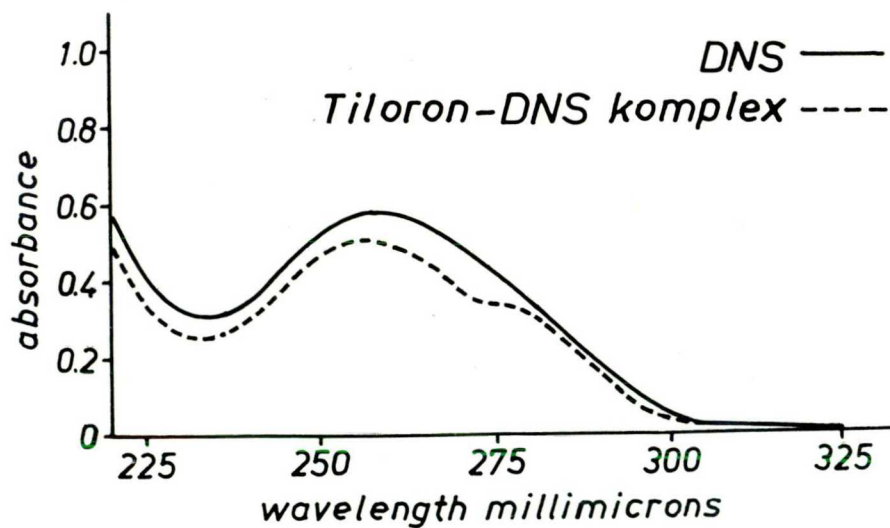
Az első csoportba sorolt anyagok esetében a spektrumlefutásból következtetni lehet a komplex jelenlétére. A DNS-komplex spektrumának változása a kontroll DNS-hez képest hypochrom hatásban és peak eltolódásban nyilvánul meg.

Ebbe a csoportba tartozó komplexekre jellemző, hogy az abszorpciós maximumuk az alacsonyabb hullámhossz felé tolódtak. Ilyen jellegzetességet mutatott az acridinorange, valamint a tiloron /6.,7. ábra/.



6. ábra.

Az acridinorange hatása a thymus DNS abszorpciós spektrumára.

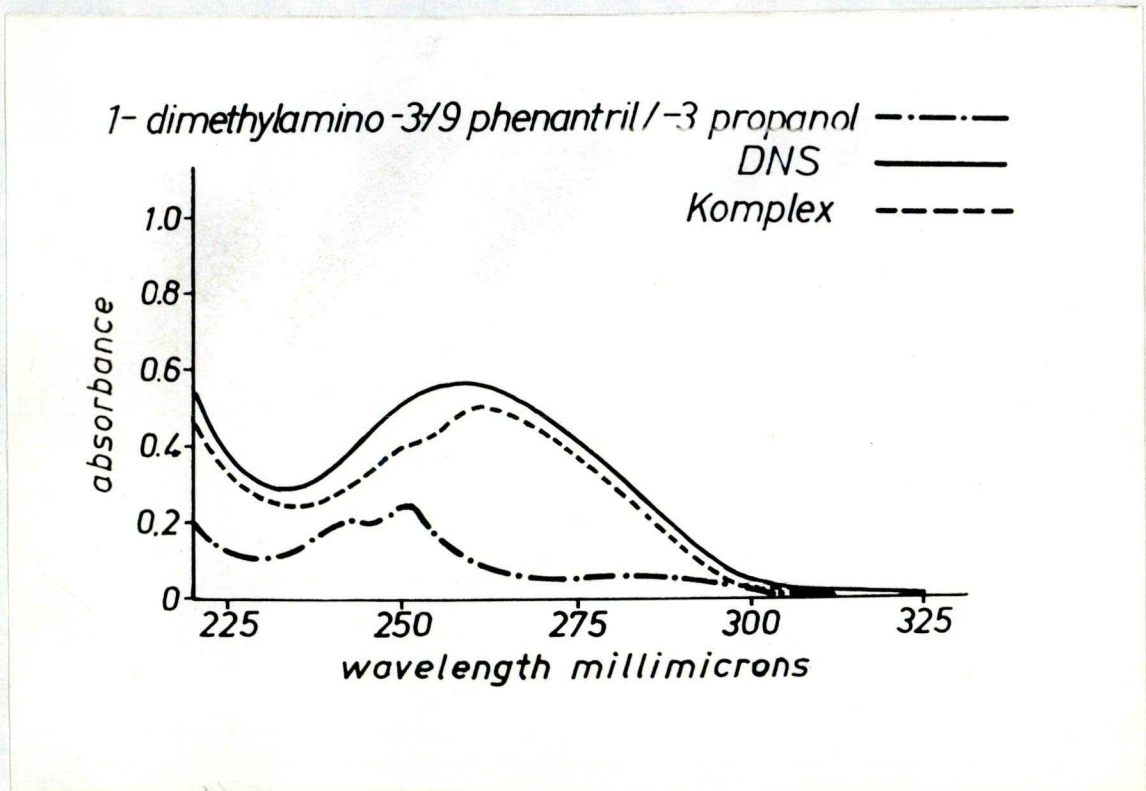


7. ábra.

A tiloron hatása a thymus DNS abszorpciós spektrumára

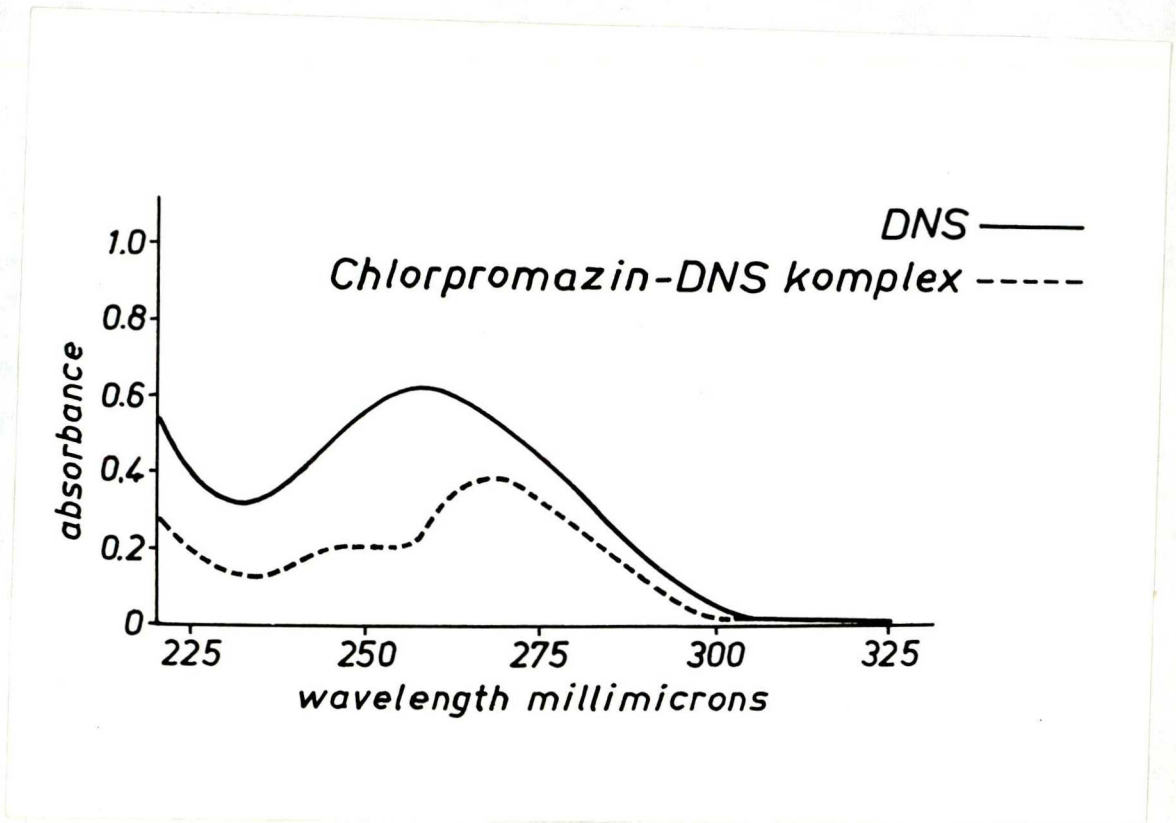


A második csoportba sorolt 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol és a chlorpromazin hatására olyan típusú komplex képződik, amelynek abszorpciós maximuma a magasabb hullámhossz irányába tér ki /8., 9. ábra/.



8. ábra.

Az 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol hatása a thymus DNS abszorpciós spektrumára

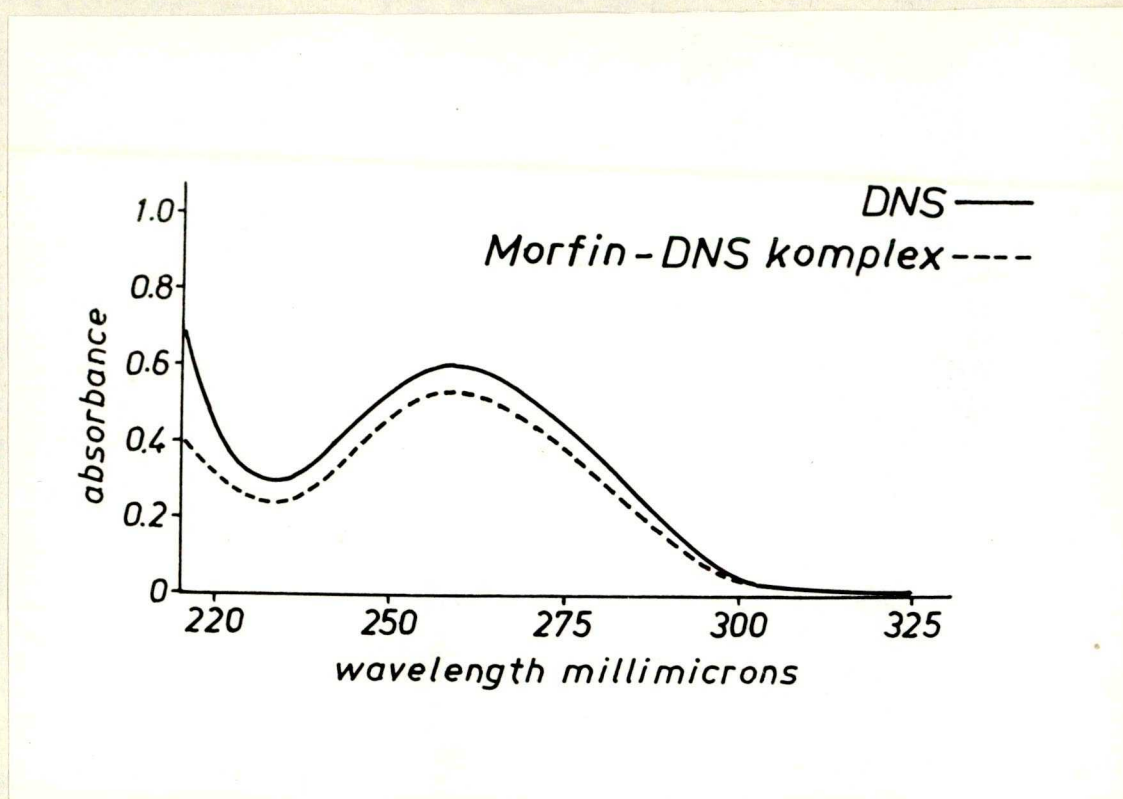


9. ábra.

A chlorpromazin hatása a thymus DNS abszorpciós spektrumára

Akár egyik, akár másik típusu maximum eltolódással állunk is szemben, a komplex jelenléte mindkét esetben nyilvánvaló.

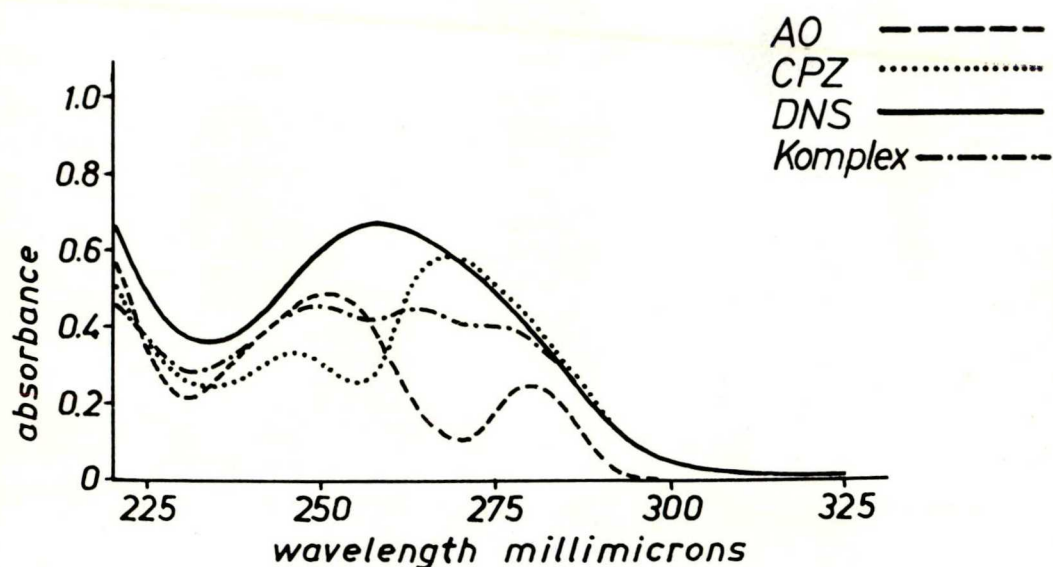
A harmadik csoportba sorolt morfin semmiféle kölcsönkapcsolatot nem mutatott a DNS-sel, s így spektrumváltozást sem idéz elő /10. ábra/.



10. ábra.

A morfin hatása a thymus DNS abszorpció spektrumára

A kölcsönkapcsolat ki nem alakulásáért feltehetően a molekula töltésviszonya, valamint a nem planaris jellege a felelős. A spektrofotometriás mérések során elvégzett kategorizálás alapján különböző csoportba tartozott a chlorpromazin és az acridinorange, mint két jó plasmidtörlő vegyület. Kiváncsiak voltunk arra, hogy a két vegyület együttesen hogyan viselkedik egy közös rendszerben együttesen, és külön-külön adva azokat a thymus DNS-hez /11. ábra/.



11. ábra.

Az acridinorange és a chlorpromazin együttes hatása a DNS abszorpciós spektrumára

A spektrumgörbék alapján arra lehet következtetni, hogy azonos intenzitással kötődik mindkét vegyület a DNS-hez, más-más típusu komplexet képezve. Így a rendszerben mindkét anyag komplexképző hatása egyszerre érvényesül.

Megjegyezzük, hogy a spektrofotometriás mérések során előszörban a plazmidtörlő anyagok DNS-re gyakorolt hatását vizsgáltuk. A DNS-nek a plazmidtörlő anyagokra gyakorolt hatását csak egy-egy reprezentáns esetében tanulmányoztuk. Így a bemutatott ábrák többségén maga a DNS spektrum, illetve a plazmidtörlővegyülettel alkotott komplex-spektrum látható.

DNS-olvadáspont meghatározás

A plazmidtörlővegyületek és a DNS között létrejött komplexképződés minőségének pontosabb megközelítése céljából megvizsgáltuk néhány plazmidtörlő vegyület hatását az E.coli DNS olvadáspontjára, illetve hődenaturációjára. A kontrollként használt E.coli DNS olvadáspontját 0,02xSSC-ben 66 C°-nak találtuk. A plazmidtörlő vegyületek jelenlétében az olvadáspontok különböző mértékű emelkedését figyeltük meg.

A chlorpromazin esetében a T_m érték 72 C°-nak, az 1-dimethyl-amino-3-/-9 phenantril/-3 propanol esetében 84 C°-nak, míg acridinorange vonatkozásában 83 C°-nak adódott.

A DNS olvadáspontjának emelkedése, illetve a dupla helix stabilitásának növekedése a hődenaturációval szemben az anyagok interkalációs típusu kapcsolódását valószínűsítik.

Az eredmények megbeszélése

A chlorpromazin és a biológiailag aktív metabolitjai bakteriosztatikus hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy a chlorpromazin-derivátumok lényegesen alacsonyabb koncentráció mellett mutattak bakteriosztatikus hatást a Gram pozitív baktériumok vonatkozásában, mint Gram negatívak esetében. Az irodalomból ismert az, hogy állati sejtekben a chlorpromazin károsítja a sejtmembránt /43, 101, 87/ és gátolja több membránhoz kötött enzim működését /67/.

Vannak adatok arra vonatkozóan is, hogy a fenotiazinok megváltoztatják a biomembránok permeabilitását, és az oxidatív foszforilációt is gátolják /107/. Biológiai hatásukat valószínűleg az SH enzimek gátlásával fejtik ki, azonban az antibakteriális hatás mechanizmusára ezidáig nincsenek egyértelmű adatok.

Az antibakteriális hatás kialakulásában a direkt membrán hatáson túl lényeges szerepet játszhat a baktériumsejtfal-strukturája is, mivel a chlorpromazin baktericid hatása kifejezettebben érvényesül a Gram pozitív baktériumokon /12, 34/.

A chlorpromazin-derivátumokkal végzett saját kísérleti eredményeink megerősítik a korábbi adatokat a Gram pozitív és Gram negatív baktériumok eltérő érzékenységeire vonatkozóan. A három chlorpromazin-metabolit baktericid hatását parallel vizsgálva a Gram pozitív és Gram negatív baktériumok egy-egy reprezentánsán megállapítottuk, hogy a baktéri-

cid hatás a legerőteljesebben a 7-hydroxi-chlorpromazin jelenlétében érvényesül, míg a legkisebb hatást a 7-8-dihydroxi-chlorpromazin mutatta.

A chlorpromazin-derivátumok hatására a baktériumtenyészetek részben feloldódtak. Ezek alapján valószínűnek látszott, hogy sejtfalkárosodással is kell számolni. Feltételezésünket alátámasztották a Gram festéssel kapott eredmények is.

Ami a fenotiazinok mint antibakteriális szerek in vivo alkalmazását illeti, vannak olyan adatok, miszerint intramusculáris adagolással csak 0,5 - 5 ug/ml vérszint biztosítható. Ez a koncentráció viszont nem elegendő a baktériosztatikus hatás biztosításához sem /88/.

Ismeretes az a tény is, hogy emberek, nyulak és patkányok vizelete is baktericid hatásúvá válik a fenotiazin orális adagolása után /110/.

Néhány évvel ezelőtt vált ismertté, hogy a chlorpromazin, és három más fenotiazin vegyület az antibakteriális hatás mellett plazmidtörlőképességgel, illetve olyan tulajdonsággal rendelkezik, hogy megszüntetik az E.coli törzsek F, illetve R plazmid hordozását /72, 79/. Másrésről azt is kimutatták, hogy a chlorpromazin-szulfoxid, amely biológiailag hatástalan metabolit, sem antibakteriális, sem plazmidtörlő-képességgel nem rendelkezik /77/.

A viszonylag kis változás a chlorpromazin molekulastruktúrájában a plazmidtörlőképesség és az antibakteriális hatás megszűnését vonta maga után. Mivel a kémiai szerkezet és a

plazmidtörő, valamint az antibakteriális hatás közötti összefüggés volt vizsgálataink fő célja, a továbbiakban olyan chlorpromazin-metabolitokat választottunk munkánkhoz, amelyek biológiai aktivitása megközelíti a chlorpromazin hatását.

Igy például a 7-hydroxi-chlorpromazin, 7-8-dihydroxi-chlorpromazin és a 7-8-dioxo-chlorpromazint /40/. Érdekes, hogy mindhárom chlorpromazin-metabolit rendelkezett bakteriosztatikus és baktericid hatással. Azonban plazmidtörő-képességük agyon különbözött egymástól.

Amíg a 7-hydroxi-chlorpromazin 2-5 % gyakorisággal törölte az E.coli F' lac plazmidját, addig a kontrollként alkalmazott chlorpromazin 30% körüli törlést biztosított. A 7-8-dihydroxi-chlorpromazin és a 7-8-dioxo-chlorpromazin gyakorlatilag nem elinálták a plazmidot.

Hasonló eredményeket kaptunk az R plazmid-törlésre vonatkozó kísérleteinkben is, azzal a különbséggel, hogy az F' lac plazmidot törő anyagaink az R plazmidot mintegy fele olyan gyakorisággal eliminálták.

A plazmidelimináló hatások alapján a chlorpromazin-metabolitokat három csoportba sorolhattuk.

1. Antibakteriális és plazmidtörő hatással rendelkezik a 7-hydroxi-chlorpromazin és a chlorpromazin.
2. Csak antibakteriális hatással rendelkezik a 7-8-dihydroxi-chlorpromazin; és a 7-8-dioxo-chlorpromazin.
3. Sem antibakteriális, sem plazmidtörő hatást nem mutat a chlorpromazin-sulfoxid.

A chlorpromazin, és a 7-hydroxi-chlorpromazin molekulákat konjugált "pi" elektronrendszer jellemzi. A 7-8-dioxo-chlorpromazin molekulában a 7-8-as szénatomoknál megszakad a "pi" konjugáció, és bizonyos töltéspolarizáció történik a gyűrűrendszerben.

A 7-8-hydroxi-chlorpromazin hatástalanságának oka valószínűleg azzal magyarázható, hogy az alkalmazott kísérleti körülmények között nem tudtuk kizárni a levegő oxigénjét a rendszerből. Az viszont ismert, hogy a levegő jelenlétében a vegyület 7-8-dioxo-chlorpromazinná alakul át /47/.

A chlorpromazin-szulfoxid esetében szintén a "pi" konjugáció megszűnése tapasztalható, mert az oxigén atom kapcsolódása után a fenotiazin vázban lévő S atom nem képes a "pi" konjugáció közvetítésére.

Ugyanez a konjugált "pi" elektronrendszer megtalálható a közismerten plazmidtörő és interkalálódó acridinorange molekulában is, viszont hiányzik a methilénkék molekulából. Ezen utóbbi saját kísérleteinkben sem mutatott plazmidtörő hatást.

Kísérleteink további adatokat szolgáltatottak a hatásos, plazmidtörő vegyületek szerkezetére vonatkozóan. Ismereteink alapján új vegyületet szintetizáltunk, az 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanolt. Az újonnan szintetizált vegyület plazmidtörő képessége megegyezett gyakorlatilag az acridinorange és a chlorpromazin plazmidtörő hatásával. Kísérleteink bizonyítják, hogy a plazmideliminációhoz egy viszonylag jól körülhatárolt kémiai struktúra szükséges.

Az általunk tanulmányozott plazmidtörölő vegyületek hatásait sok tekintetben megismertük. A plazmidjukat vesztett baktériumok érzékenységét a plazmidhordozó baktériumok érzékenységével összehasonlítva megállapítottuk, hogy nem volt lényeges különbség a két baktérium érzékenységében a plazmidtörölő vegyületekkel szemben.

Ezek az eredményeink azért is kiemelendők, mert segítségével kizárhattuk a chlorpromazin-metabolitok, valamint az újonnan szintetizált plazmidtörölő vegyület SDS-hez hasonló szelekciós mechanizmusu plazmidtörlését.

Megfigyeléseink alapján a plazmideliminálás mértéke a pH növekedésével bizonyos határok között fokozható. Bár a pH emelésével az élő csiraszám relatív csökkenése volt megfigyelhető, a plazmidtörlés gyakorisága viszont emelkedett. Valószínűsíthető, hogy a bázikus körülmények között a kuraló ágensek disszociációját fokozva azok kapcsolódását a savas karakterű plazmid DNS-hez hatékonyabbá teszi.

Érdekes volt az, hogy a chlorpromazin-derivátumok plazmidtörölő hatása csökkent különböző bivalens fémionok jelenlétében. Ismert, hogy az említett vegyületek vizes oldatokban kelátkomplexeket képeznek a kétértékű fémsókkal /92/.

Valószínűnek látszott, hogy ezen komplexekben a gyűrűrendszerben a szubsztituensek töltésviszonyai megváltoztak, amelynek következtében a vegyületek hatástalanná váltak. Meglepő volt az, hogy az egyes fémsók csak abban az esetben mutattak gátló hatást a plazmideliminációra, ha moláris arányuk jóval meghaladta /50-100-szoros fémsófelesleg/ a plazmidtörölő vegyületekét, illetve a fenotiazinokét.

Azonos molarányban alkalmazva a MgSO_4 -et és a chlorpromazint, a képződött kelátkomplexek közel ugyanolyan plazmidtörlést mutattak, mint a chlorpromazin. Ebből következik, hogy a plazmidtörlővegyületek hatástalanságának oka a fém-sók jelenlétében nem hozható összefüggésbe a kelátkomplexek kialakulásával.

Az előbb említett kelátképzés mellett létezik egy másik mechanizmus is bivalens fém-sók hatását illetően, amely különösen a Mg^{++} , Mn^{++} és a Ca^{++} esetében volt szembetűnő saját kísérleteinkben. Valószínű, hogy az említett fém-sók magas koncentrációi stabilizálhatták a különböző enzimeket, esetleg megakadályozhatták a chlorpromazin és egyéb plazmidtörlő-vegyületek kötődését a bakteriális enzimekhez, vagy egyéb strukturanyagokhoz.

Erre az utóbbi lehetőségre több példát is ismerünk. Az ethidiumbromid antibakteriális hatása kivédhető Mg^{++} jelenlétében B. cereus tenyészetekben /111/. Mások azt figyelték meg, hogy a Mg^{++} gátolták a közismerten interkalálódó tiloron kapcsolódását a DNS-hez /21, 55/. Az ethidiumbromid DNS-be való interkalációját ugyancsak gátolja a Mg^{++} jelenléte /48/.

A bivalens fémionok ilyen nem specifikus hatása úgy tűnik, hogy általános érvényű. Ezt a megállapításunkat támasztják alá azok az eredményeink is, amikor egyéb közismert plazmidtörlő vegyület, mint az acridinorange plazmidtörlő hatása felfüggeszthető 0,1 M MgSO_4 jelenlétében. Miután a vizsgált vegyület plazmidtörlő hatását illetően a szelekció tényét kizárhattuk, a hatásmechanizmus szempontjából kétféle

lehetőség jöhet szóba:

Az egyik a DNS-szintézis enzimatis gátlása, a másik a DNS-struktúra megváltozásával lenne magyarázható, valamilyen komplexképződés, esetleg interkaláció következményeként.

A DNS-sel komplexet képző, vagy interkalálódó anyagok biológiai hatásai legegyszerűbben az acridinorangen a T₇-fág szintézisére gyakorolt hatásával szemléltethető. A polymeráze úgy kapcsolódik a DNS-hez, hogy az enzim molekula felszínén lévő tirozincsoportok interkalálódnak a bázispárok közé.

Az említett folyamat energiafelszabadulással jár, amelynek következménye a DNS lokális olvadása, a promoter nyitása és a dupla helix szétválása /111, 115, 116/.

Amikor az enzim felismeri a DNS-szekvenciákat, a keletkezett komplex elindítja az RNS szintézist. A helix deformítása, terciér struktúrájának megváltozása gátolhatja a komplex kialakulását, illetőleg az RNS szintézis iniciációját.

Az R faktorok - mint ismeretesek - kovalensen zárt cirkuláris, vagy többszörösen felcsavarodott DNS-protein relaxációs komplexek /51/.

Az interkalálódó ethidiumbromid hatására az a DNS részlegesen szétcsavarodik, és nem lesz képes relaxálódni a replikációs origóba. Így az interkalálódás végülis a plazmid-replikáció gátlásához vezet /100/.

A plazmid DNS és a kuráló ágensek között feltételezett kapcsolat bizonyítására modellkísérleteket végeztünk, amelyek során az egyes vegyületek thymus-DNS-hez való kapcsolódását vizsgáltuk különböző módszerekkel.

A gélelektroforetikus vizsgálatok eredményei egyértelmű választ adtak arra, hogy a jó plazmidelimináló-képességgel rendelkező kuráló szerek és a DNS között valamilyen kapcsolat alakult ki. Ezt a kapcsolatot demonstrálhatjuk a chlorpromazin és metabolitjai, valamint az acridinorange, tiloron, és az 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol esetében. A morfin, metilénkék nem kötődött a thymus-DNS-hez. Ezen utóbbi vegyületek az E.coli F'lac plazmidját sem eliminálták.

A gélelektroforetikus vizsgálatok természetesen nem adhattak választ a kialakult kapcsolat minőségére vonatkozóan. A spektrofotometriás mérések alapján viszont megállapítható, hogy a DNS-hez adott plazmidtörelő vegyületek hatására a DNS spektrumában karakterisztikus változások jöttek létre, amelyek hypochrom hatásban és abszorpciós maximumok eltolódásában nyilvánultak meg. Megjegyezzük, hogy a metilénkék és a morfin viszont semmiféle változást nem okozott a DNS-spektrumában. Az abszorpciós maximumok különbözősége arra is felhívja a figyelmet, hogy a különböző vegyületek különböző módon kötődnek a DNS-hez. Azonban egy közös tulajdonságuk van, nevezetesen, hogy hypochrom hatást hoznak létre.

A spektrofotometriás mérések alapján feltételeztük, hogy a plazmidtörlő vegyületek és a DNS között egyidejűleg legalább két különböző kötődés jön létre.

Irodalmi adatok alapján jól ismert, hogy az acridinszármazékok a DNS-hez kívülről is kötődhetnek /13/. Li és Crothers proflavin-származékokkal végzett munkájuk alapján ugyancsak külső kötődésről számolnak be /68/. Lerman már kétféle kötődési típusról beszél az acridinorange és a DNS vonatkozásában. Az egyik típus, amelyik gyöngén kötődik a DNS-helix külső részéhez, a másik pedig egy erősebb, stabilabb kötés, amely a festékmolekuláknak a bázispárok közé történő interkalációjából ered /66/. Lerman adatait támasztja alá Neville és Davies /80/, akik kimutatták, hogy a DNS által megkötött festéknek egy része interkalálódott, egy másik része pedig kívülről kötődött a DNS-hez. Többen feltételezik, hogy az interkalációs típusú kötődésben lényeges szerepet játszhat a DNS foszfátcsoportjaihoz való kapcsolódás, pl. a ciacridinek /99/, vagy a chlorpromazin /90/ esetében. A plazmidtörlő hatáson és a DNS-sel való komplexképződésen túlmenően tájékozódó vizsgálatokat végeztünk annak eldöntésére, hogy néhány jó plazmidtörlő hatású vegyület - mint a chlorpromazin, acridinorange, és az 1-dimethylamino-3,4,9-phenantril-3-propanol a DNS-hez való kapcsolódásában szerepel-e az interkalációs típusú kötődés.

Ismert az, hogy néhány interkalálódó vegyület, mint pl. az aminoacridinek /9/ és az ethidiumbromid stabilizálni képes a DNS-t a hődenaturációval szemben. Kísérleteinkben az

E. coli DNS olvadáspontja valóban megemelkedett az acridinorange, tiloron, és az 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol jelenlétében. Az olvadáspontok megemelkedése, illetve az a tény, hogy a kettős spirál szétcsavarodása magasabb hőmérsékleten következett be, felveti az interkaláció lehetőségét. Pontosabban nem kizárt, hogy a plazmidtörlővegyületek molekulái a bázispárok közé ékelődve egy bizonyos energiával részt vesznek a két lánc összetartásában. A fenti adatok valószínűsítik, de nem bizonyítják az interaklációs típusu kötődést. Megjegyezzük, hogy ezek egyértelmű bizonyítása csak röntgendifrakciós eljárással történhet /66/.

A plazmidtörlés mechanizmusának egy másik alternatívájaként a DNS-polymerase enzimgátlása jöhet szóba. A diacridinek /99/ az ethidiumbromid /1/, a tiloron /20/, de a chlorpromazin is képes a DNS polymerase gátlására /62, 86, 98/.

Akár a vegyületek DNS-be való interkalációjuk, akár a DNS polymerasera gyakorolt gátló hatásuk érvényesül, a plazmidtörlésben a végeredmény gyakorlatilag ugyanaz. A plazmidreplikon működőképtelensége révén gátlódik a plazmidreplikáció. Miután a baktériumtenyészetekben eliminálódik a plazmid a baktériumsejtek-ből megállapíthatjuk, hogy a kromoszóma replikációja nem károsodott. A fentiekből a plazmidreplikáció szelektív érzékenysége következtethetünk, illetőleg arra, hogy a plazmid DNS és a kromoszóma DNS szintézise báziskülönbségét tekintve eltérnek egymástól.

Ez a különbség magában hordja annak a lehetőségét, hogy az eddig ismerteknél lényegesen jobb plazmidtörlő vegyületek segítségével a plazmideredetű antibiotikumrezisztencia megszüntethető lesz.

Tézisek:

1. A tanulmányozott chlorpromazin derivatumok közül a 7-hydroxi-chlorpromazin; 7-8-dihydroxi-chlorpromazin és a 7-8-dioxo-chlorpromazin bakteriosztatikus, illetve baktericid sajátossággal rendelkeznek. Ezen tulajdonságaik a Gram pozitív baktériumok esetében lényegesen kifejezettebbek, mint a Gram negatív baktériumok vonatkozásában.
2. A 7-hydroxi-chlorpromazin; a 7-8-dihydroxi-chlorpromazin és a 7-8-dioxo-chlorpromazin baktericid hatása különbözött.
3. A további háromgyűrűs vegyületek közül bakteriosztatikus hatást mutat az E.coli K12 LE 140 törzsére a tiloron, s az ujonnan szintetizált 1-dimethylamino-3-/9 phenantril/-3 propanol.
4. A chlorpromazin-derivatumok közül a 7-hydroxi-chlorpromazin rendelkezik plazmideliminációs sajátossággal, míg a 7-8-dihydroxi-chlorpromazin; és a 7-8-dioxo-chlorpromazin nem.
5. A metilénékék kvaterner N^+ töltésének a gyűrűrendszerre kifejtett polarizációs hatásával, valamint a morfin "pi" elektronrendszerének hiányával magyarázható ezen vegyületek plazmidtörlés szempontjából meglévő ineffektivitása.

6. A bivalens fémionok gátolják a 7-hydroxi-chlorpromazin, a chlorpromazin, az acridinorange, az 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol plazmidtörlő hatását, amely nem hozható összefüggésbe a kelátkomplexek kialakulásával.
7. A pH növelésével a tesztelt vegyületek közül a 7-hydroxi-chlorpromazin, az 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol, és a tiloron enyhén lugos közegben törlőképességüket hatékonyabban fejtik ki.
8. A plazmidjukat vesztett baktériumok megjelenése a tenyészetekben nem magyarázható a szelekciós mechanizmus érvényrejutásával.
9. A lon^- mutánsok megjelenése a chlorpromazin-metabolitok és az 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol jelenlétében sem szelekciós mechanizmusu.
10. Az acridinorange, tiloron, chlorpromazin és az 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol a DNS-sel komplexet képez.
11. Az acridinorange, a chlorpromazin, és az 1-dimethylamino-3-/-9 phenantril/-3 propanol a DNS olvadáspontját megemeli, amely a vegyületek interkalálóképességével állhat összefüggésben.

IRODALOM

1. Aktipis, S., Martz, W.W. and Kindelis, A.: Biochemistry, 14, 326-331 /1975/
2. Alföldi, L., Raskó, I., and Kerekes, E.: J. Bacteriol. 96, 1512 /1968/
3. Ames, B.N., Lee, F.D., and Dursten: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 782 /1973/
4. Anderson, E.S., and Lewis, J.J.: Nature /London/ 208, 843 /1965/
5. Anderson, E.S., and Natkin, E.: Mol. Gen. Genet. 114, 261 /1972/
6. Arber, W.: Virology 11, 272 /1960/
7. Bauer, W., and J. Vinograd: J. Mol. Biol. 33, 141 /1968/
8. Bazzicalupo, P., and Tocchini-Valentin, G.P.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 298 /1972/
9. Blake, A. and Peacocke, A.P.: Biopolymers 6, 1225 /1968/
10. Bouanchaud, D.H., Scavizzi, M.R., Chabbert, Y.A.: J. Gen. Microbiol. 54, 417 /1968/
11. Bouanchaud, D.H., Chabbert, Y.A.: J. Gen. Microbiol. 58, 107 /1969/
12. Bourdon, J.L.: Annales L'Institute Pasteur 101, 876 /1961/
13. Bradley, D.F., Wolf, M.K.: Proc. Natl. Acad. Sci. Wash.: 45, 944 /1959/
14. Brinton, C.C., Jr.: Trans. N.Y. Acad. Sci. 27, 1003 /1965/
15. Britten, R.J. and Kohne, D.E.: Science 161, 529 /1968/
16. Brutlag, D., Schekman, R., and Kornberg, A.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2826 /1971/

17. Burton, A., and Sinsheimer, R.L.: J. Mol. Biol. 14, 327 /1965/
18. Campbell, A.M.: Advan. Genet. 11, 101, /1962/
19. Caro, L.G., and Berg, C.M.: Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 33, 559 /1968/
20. Chandra, F., Will, G., Gericke, D., Götz, A.: Biochem. Pharmacol. 23, 3259 /1974/
21. Chandra, P. and Woltersdorf, M.: FEBS Letter 41, 169 /1974/.
22. Clewell, D.B., Evenchik, B., Cranston, J.W.: Nature N. Biol. 237, 29 /1972/
23. Clewell, D.B., and Helinski, D.R.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62, 1159 /1969/
24. Clowes, R.C.: Nature /London/ 190, 988 /1961/
25. Clowes, R.C.: Genet. Res. 4, 162 /1963/
26. Clowes, R.C., Moody, E.E.M., and Pritchard, R.H.: Genet. Res. 6, 147 /1965/
27. Clowes, R.C.: Ann. Inst. Pasteur 107, suppl. no. 5: 74-92 /1974/
28. Clowes, R.C., and Hayes, W.: Experiments in Microbial Genetics. Oxford. Blackwell Scientific Publications /1968/
29. Cooper, S., and Hemlsetter, C.E.: J. Mol. Biol. 31, 519 /1968/
30. Cuzin, F., and Jacob, F.: Ann. Inst. Pasteur 112, 529 /1967/
31. Csizsár, K., Ivánovics, G.: Acta Microbiol. Acad. Sci. hung. 12, 73 /1965/
32. Datta, N., and Hedges, R.W.: Nature /London/ 234, 222 /1971/
33. Davies, J.E. and Rownd, R.: Science 1786, 758 /1972/

34. Decourt, P., Gastal, R., R., Grenat, R.: C.R. Acad. Sci. /Paris/ 237, 1109 /1953/
35. DeHaan, P.G., and Stouthamer, A.H.: Genet. Res. 4, 30 /1963/
36. Dobozy, A., Hammar, H.: Acta Microbiol. Acad. Sci. hung. 15, 181 /1968/
37. Dove, W.F., Inokuchi, H., and Steverns, W.F.: Cold Spring Harbor Laboratory, New York /1971/
38. Falkow, S.L., Tompkins, S., Silver, R.P., Guery, P., and LeBlanc, D.J.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 182, 153 /1971/
39. Finnegan, D.J., Willets, N.S.: Mol. Gen. Genet. 111, 256 /1971/
40. Forrest, I.S., Carr, C.J. and Usdin, E.: The Phenothiazines and Structurally Related Drugs, New-York, Raven Press /1974/
41. Frédéricq, P.: C.R. Soc. Biol. 148, 399 /1954/
42. Guth, P.S., Spirtes, M.A.: Int. Rev. Neurobiol. 7, 231 /1964/
43. Hahn, F.E., and Ciak, J.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 182, 295 /1971/
44. Harada, K., Kameda, M., Suzuki, M., and Mitsuhashi, S.: J. Bacteriol. 86, 1332 /1963/
45. Harada, K., Kameda, M., Suzuki, M., and Mitsuhashi, S.: J. Bacteriol. 88, 1257 /1964/
46. Hausmann, C., and Clowes, R.C.: Bacteriol. 107, 900 /1971/
47. Heikkila, R.E., Cohen, G. and Manian, A.A.: Biochem. Pharmacol. 24, 363 /1974/
48. Helinsky, D.R.: Annual. Rew. Microbiol. 27, 437 /1973/

49. Helling, R.B., Goodman, H.M., and Boyer, H.W.: J. Virol. 14, 1235 /1974/
50. Hickson, F.T., Roth, T.R., and Helinski, D.R.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58, 1731 /1967/
51. Hirota, Y.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 46, 57 /1960/
52. Hirota, Y., Mordoh, J. and Jacob, F.: J. Mol. Biol. 53, 369 /1970/
53. Hirota, Y., Ryter, A., and Jacob, F.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 677 /1968/
54. Hohn, B., and Korn, D.: J. Mol. Biol. 45, 385 /1969/
55. Hyman, R. and Davidson, N.: J. Mol. Biol. 50, 421 /1970/
56. Ikeda, H., and Tomizawa, J.: Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 791 /1968/
57. Inuzuka, N., Nakamura, S., Inuzuka, M., and Tomoeda, M.: J. Bacteriol. 100, 827 /1969/
58. Jacob, F., Brenner, S. and Cuzin, F.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 329 /1963/
59. Jacob, F., and Wollman, E.L.: C.R. Acad. Sci. 247, 154 /1958/
60. Johnston, J.H. and Richmond, M.H.: J. Gen. Microbiol. 69, 137 /1970/
61. Kahn, P., and Helinski, D.R.: J. Bacteriol. 88, 1573 /1964/
62. Khafagy, E.Z. El-Laithi, A.F., El-Makkawi, H.K., and El-Darawy, Z.I.: Biochem. Pharmacology 26, 1205 /1977/
63. Khatoon, H., and Iyer, R.V.: Can. J. Microbiol. 17, 669 /1971/
64. Kontomichalou, P., Mitani, M., and Clowes, R.C.: J. Bacteriol. 104, 34 /1970/

65. Lavallé, R., and Jacob, F.: C.R. Acad. Sci. 252,
1678 /1961/
66. Lerman, J.S.: J. Mol. Biol.: 3, 18 /1961/
67. Leterrier, F., Canva, J., Mariaud, J.F.: C.R. Acad.
Sci. /Paris/ 272, 2668 /1971/
68. Li, K.J. and Crothers, D.M.: J. Mol. Biol. 39, 461
/1967/
69. Macfarren, A.C., and Clowes, R.C.: J. Bacteriol. 94,
365 /1967/
70. Mándi, Y., Marjai, E.: Orvosi Hetilap 114.7., 369 /1973/
71. Mándi, Y., Béládi, I.: Acta Microb. Acad. Sci. hung.
21, 385 /1974/
72. Mándi, Y., Molnár, J., Holland, I.B., Béládi, I.:
Gen. Res. 26, 109 /1975/
73. Meynell, E.G.G., and Datta, N.: Bacteriol. Rev. 32,
55 /1968/
74. Mitsuhashi, Kameda, S.M., Harada, K., and Suzuki, M.:
J. Bacteriol. 97, 1520 /1969/
75. Monk, M., and Clowes, R.C.: J. Gen. Microbiol. 36,
365 /1964/
76. Monk, M., and Clowes, R.C.: J. Gen. Microbiol. 36,
385 /1964/
77. Molnár, J., Mándi, Y., Holland, I.B., Schneider, Gy.:
Acta Microbiol. Acad. Sci. hung. 24, 1 /1977/
78. Molnár, J., Holland, I.B., and Mándi, Y.: Gen. Res.
30 pp. 13 /1977/
79. Molnár, J., Mándi, Y., Király, J.: Acta Microbiol.
Acad. Sci. hung. 23, 45 /1976/
80. Neville, D.M.jr. and Davies, D.R.: J. Mol. Biol. 17,
57 /1966/

81. Nishimura, Y., Cargo, L., Berg, C.M. and Hirota, Y.:
J. Mol. Biol. 55, 441 /1971/
82. Novick, R.P.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 182, 279 /1969/
83. Ohki, M., and Tomizawa, J.: Cold Spring Harbor Symp.
Quant. Biol. 33, 651 /1968/
84. Ou, J.T. and Anderson, T.F.: J. Bacteriol. 102, 648 /1970/
85. Ozeki, H., Stocker, B.A.D., and Smith, S.M.: J. Gen.
Microbiol. 28, 671 /1962/
86. Pisciotta, A. W., and Hinz, J.E. : Federationon
Proceedings, 25. p. 195 /1966/
87. Pollack, A., Levij, I.S.: Cancer Res. 32, 1912 /1972/
88. Popper, M., Lorian, V.: Presse med. 67, 212 /1959/
89. Pritchard, R.H., Barth, P.T., and Collins, J.: Symp.
Soc. Gen. Microbiol. 19, 263 /1964/
90. Pulman, B.: In "Molecular orbitals in Chemistry, Phy-
sic and Biology /Pulman, B., and Löwdin, P. eds./
p. 547. Acad. Press. New-York /1964/
91. Radloff, R., Bauer, W., and Vinograd, J.: Proc. Nat.
Acad. Sci. USA 57, 1514 /1967/
92. Rajan, K.S., Manian, A.A., Davis, J.M. and Skripkus, A.:
The Phenothiazines and Structurally Related Drugs.
Edited by I.S. Forrest, C.J. Carr and E. Usdin.
Raven Press, New-York p. 571. /1974/
93. Romero, E. and Meynell, E.: J. Bacteriol. 97, 780 /1969/
94. Rownd, R.: J. Mol. Biol. 44, 387 /1969/
95. Rubin, S.J., and Rosenblum, E.D.: J. Bacteriol. 108,
1192 /1971/
96. Sallisbury, V., Hedges, R.W., and Datta, N.: J. Gen.
Microbiol. 70, 443 /1972/
97. Salisbury, V., Hedges, R.V., Datta, N.: J. Gen. Micro-
biol. 76, 443 /1972/

98. Sarris, A.H., Niles, E.G. and Canellakis, E.S.:
Biochem. Biophys. Acta 474, 268 /1977/
99. Sarris, A.H., Niles, E.G. and Canellakis, E.S.:
Biophys. Acta 479, 269 /1977/
100. Sausier, J. and Wang, J.C.: Nature in New Biology
239, 167 /1972/
101. Seeman, P.: Pharmacol. Rev. 24, 583 /1972/
102. Silver, S., and Ozeki, H.: Nature /London/ 195,
873 /1962/
103. Sieckmann, Donna G., Reed, N.D., and Georgi, Carl, E.:
Am. Society for Microbiol. vol. 17, No 5. p. 701
/1969/
104. Smith, H.W., and Lingood, M.A.: J. Gen. Microbiol.
62, 287 /1970/
105. Sonstein, S., and Baldwin, J.N.: J. Bacteriol.
109, 262 /1972/
106. Stocker, B.A.D., Smith, S.M., and Ozeki, H.: J. Gen.
Microbiol. 30, 201 /1969/
107. Tjioe, S.A., Manian, A.A., O'Neil, J.J.: Biochem.
Biophys. Res. Commun. 48, 212 /1972/
108. Tomoeda, M., Inuzuka, M., Kubo, N., and Nakamura, S.:
Journal of Bacteriology, 95, 1078 /1968/
109. Tomoeda, M., Inuzuka, M., and Hayashi, M.: Japan J.
Microbiol. 20, 27 /1976/
110. Thomas, J.O., De Ede, F., Eddy, C.: J. Pharmacol. Exp.
Ther. 64, 280 /1938/
111. Tomchick, R. and Mandel, H.G.: J. Gen. Microbiol.
36, 225 /1964/
112. Vapnek, D., Lipman, M.B., and Rupp, W.D.: J. Bacteriol.
108, 508 /1971/

113. Vinograd, J., Lebowitz, J., Radloff, R., Watson, R., and Laipis, P.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 1104 /1965/
114. Vyvyan Salisbury, R.W., Datta, H., and Naomi: J. of Gen. Microbiology 76, 443 /1972/
115. Wakelin, L.P., and Waring, M.J.: Molecular Pharmacol. 9, 544 /1974/
116. Waring, M.J.: In the Molecular Basis of Antibiotic Action Gale, E.F., Cundiffe, E., Reynolds, P.E., Richmond, M.H. and Waring, M.J. Wiley. London 173 /1972/
117. Watanabe, T.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 182, 126 /1971/
118. Watanabe, T., and Fukasawa, T.: J. Bacteriol. 81, 679 /1961/
119. Watanabe, T., and Fukasawa, T.: J. Bacteriol. 82, 202 /1961/
120. Watanabe, T., Nishida, H., Ogata, C., Arai, T., and Sato, S.: J. Bacteriol. 88, 716 /1964/
121. Watanabe, T., and Ogata, Y.: J. Bacteriol. 102, 596, /1970/
122. Watanabe, T., and Takano, T.: Med. Biol. /Tokyo/ 65, 111 /1963/
123. Wehrli, W., and Staehelin, M.: Bacteriol. Rev. 35, 20 /1971/
124. Willets, N.S., and Finnegan, D.J.: in press /1971/
125. Wolf, B., Pato, M.L., Ward, C.B. and Glaser, D.A.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 575 /1968/
126. Womble, D.D., Warren, R.L. and Rownd, R.H.: Nature 264, 676 /1976/

