Diss. B 730

A MIKROBIOLÓGIAI AKTIVITÁS ÉS A KÉMIAI SZERKEZET ÖSSZEFÜGGÉSEINEK VIZSGÁLATA SZTEROID GLIKOZIDOKKAL UJ ANALITIKAI MIKROBIOLÓGIAI ELJÁRÁS ALKALMAZÁSÁVAL

Doktori értekezés

Készitette és a József Attila Tudományegyetem Természettudományi Karához benyújtja

B e r e k I m r e

Készült

a JATE Növényélettani és Mikrobiológiai Tanszékén

1971.

JATE KÖZPONTI KÖNYVTÁRA
Folyóiratok
Szeged
Diss. B 730
József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára
SZEGED

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS 1

IRODALMI ÁTTEKINTÉS 2

Solanum fajok szteroid glikozidjaival kapcsolatos vizsgálatok 2

1. Mikrobiológiai vizsgálatok 2

2. Egyéb biológiai vizsgálatok 6

VIZSGÁLATI CÉLKITŰZÉSEK 9

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 11

I. ANYAGOK 11

1. Az összehasonlító vizsgálatban alkalmazott szteroid glikozidok ismertetése 11

2. Az összehasonlító vizsgálatban alkalmazott Cynanchum vincetoxicum anyagának és szintetikus származékainak leírása 17

3. Egyéb vizsgálatokban alkalmazott anyagok 25

4. Szteroidok előállítása és eredetük 27

A/ Tomatin 28

B/ Soladulcidin tetraozid 30

C/ Solamargin, solasonin 30

D/ β-solamarin, solamargin-H_2, dioscin 31

E/ Solaradixin 32

5. Soladulcidin tetraozid és a tomatin azonosítása 33
A/ Azonosításhoz felhasznált anyagok és módszerek 35
a/ Kromatografáló lemez 35
b/ Futtatórendszerek 36
c/ Kromatogramok előhívása 36
d/ Nyers növényi extraktum előállítása 37
e/ Szteroid glikozidok hidrolizálása aglikonná 38
B/ Soladulcidin tetraozid és tomatin kromatográfiás azonosítása 38
C/ Soladulcidin és tomatidin kromatográfiás azonosítása 40
6. Tesztmikroorganizmusok 41
A/ A mikrobiológiai aktivitás és kémiai szerkezet összefüggésének vizsgálatánál felhasznált mikroorganizmusok 41
B/ Szteroid glikozidok enzimatikus átalakíthatóságának vizsgálatánál alkalmazott mikroorganizmusok 42

C/ Screen vizsgálatnál felhasznált mikroorganizmusok 42

a/ Solamargin-solasonin glikozid-keverék hatásának vizsgálatánál alkalmazott Dermatophyton és Candida albicans törzsek 42

b/ A nemesítésre kidolgozott mérőmódszernél használt mikroorganizmus 44

7. Táptalajok 44

A/ A mikrobiológiai aktivitás és kémiai szerkezet összefüggésének vizsgálatánál felhasznált táptalajok 44

B/ Szteroid glikozidok enzimatikus átalakíthatóságának vizsgálatánál alkalmazott táptalajok 45

C/ Screen vizsgálatnál felhasznált táptalajok 46

a/ Solamargin-solasonin glikozid-keverék hatásának vizsgálatánál alkalmazott táptalajok 46

b/ A nemesítésre kidolgozott mérőmódszernél használt táptalaj 46

II. MÓDSZEREK 47

1. A mikrobiológiai aktivitás mérésének módszere 47

A/ Szteroid glikozidok aktivitásának összehasonlítása 47

B/ Cynanchum vincetoxicum hatóanyagának és szintetikus származékainak aktivitás mérése 49

C/ Az eredmények értékelésánál felhasznált statisztikai módszer 50

2. Szteroid glikozidok enzimatikus átalakitási lehetőségének vizsgálata 51

3. Solamargin-solasonin 2:1 arányú keverék hatásának vizsgálata humánpatogén gombák ellen 52

A/ Dermatophytonok vizsgálata 52

B/ Candida albicans törzsek vizsgálata 53

C/ A glikozidkeverék hatásának vizsgálata Candida albicans törzsekre, élősejtszám meghatározással 53

4. Solanum laciniatum levélextraktumában a solamargin és solasonin együtt történő meghatározása mikrobiológiai mérőmódszerrel 54

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK 57

1. A mikrobiológiai aktivitás mérése 57

A/ Szteroid glikozidok aktivitásának összehasonlítása 57

B/ Cynanchum vincetoxicum hatóanyaga és szintetikus származékai aktivitásának összehasonlítása 62

2. Szteroid glikozidok enzimatikus átalakítási lehetőségének vizsgálata 69

3. Solamargin-solasonin 2:1 arányú keverék hatásának vizsgálata humánpatogén gombák ellen 72

A/ Dermatophytonok vizsgálata 72

B/ Candida albicans törzsek vizsgálata 76

C/ Glikozidkeverék hatásának vizsgálata Candida albicans törzsekre, élősejtszám meghatározással 77

4. Solanum laciniatum levélextraktumában a solamargin és solasonin együtt történő meghatározása mikrobiológiai mérőmódszerrel 81

ÚJ MIKROBIOLÓGIAI MÉRŐMÓDSZER 85

Antifungális anyagok mikrobiológiai aktivitás és kémiai szerkezet összefüggés vizsgálatánál alkalmazott új mérőmódszer kísérleti részleteinek ismertetése 85

1. Tesztmikroorganizmus kiválasztása 86
2. Táptalaj kiválasztása 92
3. A tesztmikroorganizmus növekedése pufferelt táptalajon 94
4. A tesztmikroba hőoptimumának megállapítása 95
5. Szerves oldószerek növekedésgátló hatásának vizsgálata 96
6. Néhány antifungális vegyület hatása a tesztmikroorganizmus növekedésére 98
7. Mikromódszer kidolgozása és a munkafolyamat ismertetése 101
8. Petri-csészében és Takátsy lemezen végzett kísérlet összehasonlítása 105
ÖSSZEFOGLALÁS 109
IRODALOM 114

BEVEZETÉS

Néhány évvel ezelőtt a szteroid glikozidokat elsősorban a szintetikus szteroid hormonok alapanyagaként tartották fontosnak, ezért indult meg intenzív kutatásuk és ezen ok miatt kezdték el Magyarországon egyes szubtrópusi Solanum fajok termesztését, illetve nemesítését. Ezzel párhuzamosan előtérbe került biológiai hatásuknak vizsgálata is. Az anticarcinogén, arteriosklerosis ellenes és egyéb biológiai hatásuk mellett azonban főleg antifungális tulajdonságuk az, ami napjainkban nagy figyelmet érdemelhet.

Doktori disszertációm egyrészt egy új analitikai mikrobiológiai módszer kidolgozásával, másrészt pedig - erre alapozva - a szteroid glikozidok antifungális tulajdonságának vizsgálatával foglalkozik.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Solanum fajok szteroid glikozidjaival kapcsolatos vizsgálatok

1. Mikrobiológiai vizsgálatok

A tomatinról már az 1940-es években kimutatták, hogy antibakteriális és főleg antifungális hatású /Irving et al. 1945, 1946, 1947, Fontain et al. 1948/. Ebben az időben pontos szerkezete még ismeretlen volt, de már felmerült gyógyászati alkalmazásának lehetősége, mivel állatpatogén gombák ellen igen aktívnak bizonyult. A kezdetben közölt antibakteriális és növénypatogén gombák elleni hatásból levont következtetések a mai vizsgálatok tükrében kissé eltúlzottnak látszanak. Több szerző kimutatta ugyanis, hogy egyes növénypatogén gombák - Septoria lycopersici, Alternaria tomato -, amelyek a paradicsomnövényen élnek, nem fogékonyak a tomatin iránt /Arneson és Durbin 1966, 1968, Korn 1962/. Arneson és Durbin /1967/ megállapitották, hogy a Septoria lycopersici in vitro és in vivo fertőzött levelekben detoxikálja a tomatint úgy, hogy egy konstitu-

tív extracelluláris enzim segitségével egy glukoz egységet hidrolizál le a tomatin molekuláról, a keletkezett inaktiv vegyület a β_2 tomatin. Ezen bizonyitott detoxikáció mechanizmus közlése mellett azonban találunk bizonytalan adatokat arra nézve is, hogy a szteroid glikozidoknak a növények gombafertőzés elleni rezisztenciájukban van némi szerepük /Kuhn és Löw 1947, Allen és Kuc 1964/.

A szteroid glikozidok antifungális hatásának vizsgálata az utóbbi 10 évben vált intenzivvé. Ennek oka talán az, hogy gombás fertőzések ellen még ma sincs biztos hatású gyógyszer. Az ide vonatkozó munkák közül elsőnek Wolters közleményeit emliteném meg /1964a, 1964b, 1965a, 1965b, 1966, 1968/, aki nagy, átfogó vizsgálatokat végzett. Összehasonlitotta a semleges szteroid szaponinok antifungális hatását a bázikus szteroid alkaloidokéval és megállapitotta, hogy az utóbbiak nagyobb aktivitásúak. Ugyszintén kimutatta, hogy a telitett szterán vázas szteroid glikozidok hatása nagyobb /tomatin, solasodulcidin tetraozid/, mint a telitetlen vázas vegyületeké /solasonin, solamargin/. A szteroid glikozidok aktivitását összehasonlitva az aglikonjaiával kitünt, hogy a glikozidok aktivitása a nagyobb. Megállapitotta, hogy a szteroid szaponinok sokkal erő-

sebben gátolják a gombák növekedését, mint a kardenoid glikozidok.

Más kutatók /Tschesche és Wulff 1964, Valle 1957, Kuhn et al. 1950, 1957a, 1957b, Haskins 1965./ szintén a szteroid glikozidok antifungális hatásáról közöltek adatokat. McKee /1959./ a szolanin és rokon vegyületeinek /α-chaconin, szolanidin, demissin, tomatin/ hatását vizsgálta Fusarium coeruleum ellen. Kimutatta, hogy fiatal kultúrák kevésbé ellenállóak, mint az idősebbek; a vegyületek pH optimuma 7 körül van; a Ca ionok antagonizálják a vegyületek hatását.

Egy új szteroid glikozidot - a holotoxint - Shimado 1969-ben izolálta tengeri uborkából /Stichopus japonicus/. A vegyület in vitro igen nagy aktivitást mutatott különböző gombák /dermatophytonok, élesztők, fonalasok és növénypatogén gombák/, baktériumok /Gram pozitiv és negativ ellen, sőt még a Mycobacteriumokra is hatott. Superficiális dermatitisen megbetegedésben szenvedőknél több osakai kórházban kipróbálták és azt találták, hogy 87 eset közül 77-ben javulást eredményezett /88,5%/ - mellékhatást nem észleltek.

Munkánkban elsősorban Ferenczy és Kovai foglalkozik a szteroid glikozidok antifungális hatásvizs-

gálatával /Ferenczy és Kovei 1967a, 1967b, Ferenczy 1968, Ferenczy et al. 1969, 1970a, Kovei 1967, /. Ők fölog a hatásmechanizmust tisztázták. Megállapitották, hogy a szteroid glikozidok szelektiv antifungális tulajdonságúak. Különbség mutatkozik az azonos aglikonú származékok egyes tagjai között a gombagátló aktivitásban, hasonlóan a különböző aglikonú szteroid glikozidokhoz. A Solanum lacinatum szteroidjai közül csak a három cukormolekulát tartalmazó solamargin és solasonin a hatásos, azonban az egy, kettő, illetve a négy cukormolekulát tartalmazó származékokkal. Nagy különbséget mutattak ki a solamargin solasonin aktivitása között is, a solamargin javára. Megállapitották, hogy a solamargin solasonin 1:1 arányú keveréke szinergista kölcsönhatás eredményeképp úgy hat, mintha tiszta solamargin lenne. Az eltérő aktivitást, a szterinekkel történő eltérő intenzitású komplexképzésre vezetik vissza. Bebizonyitották, hogy a solasodin aglikonú glikozidok közül csak a három cukrosok képeznek komplexet az ergosterinnel, vagy kolesterinnel. A solasonin komplexképzése igen kis intenzitású. A létrejött komplexek 1:1 arányúak, a kapcsolódó molekulapárokat gyenge kötőerő - hidrogénhid, vagy van der wals féle kötőerő - tartja össze; kémiai kapcsoló-

dást az infravörös spektrumok alapján kizártnak tartják. A szteroid glikozidok sejteken történő megkötődésének alapja a sejtmembrán ergosterinjével történő komplexképzés. A megkötés eredménye egy nagymérvű membránkárosodás, dezorganizáció, amit mannosav és kálium kiáramlásával lehet követni. A szteroid glikozidok kötődését strukturális és biokémiai vagy egyéb környezeti hatások /pl. hőmérsékleti hatás/ befolyásolják.

Más szerzőkkel összhangban azt is megállapították, hogy baktériumokra nem hatnak /Walters 1966/ úgyszintén a sejtmembránban ergosterint nem tartalmazó gombákra sem /Glauert et al. 1962, Bangham és Horne 1963; valamint az érzékeny törzsek elöregedett sejtjeire is kevésbé hatásosak /McKee 1959/. Ezt a tulajdonságot felhasználva, Visnyowszki /1971./ módszert dolgozott ki a vegyület alkalmazásával történő gombamutánsok feldúsítására.

2. Egyéb biológiai vizsgálatok

A szteroid glikozidoknak antifungális tulajdonságuk mellett más biológiai hatásuk is van. Ezzel a kérdéssel foglalkozó közlemények is főleg az utóbbi tíz évben jelentek meg.

Biológiai hatásuk rendkívül változatos. Egyes glikozidoknál - tomatin, soladulcidin tetraozid, - solanin - citosztatikus hatást állapitottak meg /Tschesche és Wulff 1965/. A solanin mitózisgátlóként is hat, és gátolja az egerek ascites tumorsejtjeinek a O_2 felvételét /Alsuddin és Martin-Smith 1962a, 1962b/. Az α - solaninról, demissinről és tomatinról kimutatták /Abbott et al. 1960, Mann et al. 1964, Mann és Mc Bain 1966/, hogy az emberi plazma kolesterás enzimjét in vitro gátolja. Megállapitották, hogy a tomatinnak antihisztamin hatása van /White et al. 1964/. Kupchan és mtsai /1965/ közölték a β -solamarin tumorgátló hatását sarkóma 180 ellen egerekben.

A solasodinról kimutatták, hogy egerekben erős szivtónikus és antiflogistikus hatása van /Martin-Smith és Sugrue 1964/, továbbá azt, hogy bizonyos mértékig befolyásolja az érfal permeabilitását, valamint a központi idegrendszerre is hat /Lahiri et al. 1966/. Emellett a solasodinnak és glikozidjainak akceleráló szivhatását is bizonyitották és hasonlónak találták a veratrinhoz. Schreiber és Ripperger 1965-ben az Ausztráliában honos Solanum armatumot vizsgálva megállapitották, hogy termése toxikus; ez a levélben levő kis mennyiségü solasodin vagy pedig

két ismeretlen N_2-mentes szteroid glikozid miatt van.

Alaeddin és Martin-Smith /1962a/ a solanocapsinról megállapitották, hogy lassitja a szivverdülést és koordinációs zavarokat hoz létre a szivizomra gyakorolt közvetlen hatása útján. Szovjet kutatók /Konovalov 1966, Banaikov és Konovalov 1966/ pedig a szaponin jellegű szteroid glikozidok arteriosklerosis elleneo hatásáról számoltak be.

A szteroid glikozidok - alkaloidok, szaponinok - hemolizáló tulajdonságát többen megállapitották, illetve vizsgálták /Sandor et al. 1961, Tschesche és Wulff 1964, Ferenczy et al. 1966c/ és arra a következtetésre jutottak, hogy a hemolizis, a kolesterinnek a vörös vérsejt membránjából való kioldódása útján jön létre.

Vendrig 1964-ben közölte, hogy a tomatin és a digitonin szokatlan, eddig még nem tapasztalt növekedésszabályozó hatást gyakorol növényekre.

Egyes szteroid glikozidoknak - tomatin, demissin - koloráló bogár /Leptinotarsa decemlineata/ és lárvája elleni "elriasztó" hatását is megállapitották /Kuhn és Löw 1947, 1953b., 1957a, 1957b, 1961, Schreiber 1954, Fraenkel 1959/, sőt Stürckow és Quadbeck /1958/ részletesen tanulmányozta ezt a hatást az imágók kemoreceptorain végzett elektrofiziológiai mérésekkel.

VIZSGÁLATI CÉLKITŰZÉSEK

Disszertációmban a szteroid glikozidok mikrobiológiai aktivitásának és kémiai szerkezetének kapcsolatát vizsgáltam, valamint ezen vegyületek antifungális hatását és gyakorlati felhasználásuk lehetőségét. Ezen feladatok megvalósításához a következő munkát kellett elvégeznem:

1. előállítani és azonosítani a tomatint, soladulcidin tetraozidot, solamargint és a solaradixint;

2. kidolgozni egy új, gyors mikrobiológiai mérőmódszert antifungális anyagok mikromennyiségeinek aktivitás-összemérésére /a módszer kidolgozását és ezzel kapcsolatos eredményeket a disszertáció végén, külön fejezetben tárgyalom/, amelynek alkalmazásával választ kaphatok arra a kérdésre, hogy

3. a szteroid glikozidok esetén a mikrobiológiai aktivitás és a kémiai szerkezet között milyen kapcsolat van. A vegyületeket tomatin:soladulcidin tetraozid, solamargin : β-solamarin, solamargin : solamargin-H_2 - dioscin párosításban vizsgáltam. Azért esett ezekre a vegyületekre a választásom, mert a párokba állított vegyületek kémiai szerkezete csak egy-egy helyen tér el egymástól, az F gyűrűben

levő N atom sztérikus helyzetében; vagy N_2 helyett O_2 van, vagy a szteroid váz telített.

4. A módszert más antifungális anyagok esetén is kipróbáltam. A Cynanchum vincetoxicum hatóanyagának és szintetikus származékainak /14. cryptopleurin ill. tylophorin származékok/ aktivitás összehasonlítását végeztem el.

Az antifungális hatást tartva szem előtt, gyakorlati szempontból hasznosnak találtam,

5. ha megvizsgálom a szteroid glikozidok, konkrétan a solaradixin mikrobiológiai átalakíthatóságát solasoninná /biológiailag inaktív vegyület aktív vegyülettá való átalakulását/;

6. ha megvizsgálom a solamargin - solasonin glikozidkeverék antifungális hatását 21 Dermatophyton és 26 Candida albicans törzzsel szemben.

7. Mivel a solamargin - solasonin glikozidkeverék gyógyszerként való felhasználhatósága nem kizárt és szteroidalapanyagként is nagy jelentőségű, célomul tűztem, hogy gyors és főleg egyszerű mikrobiológiai screen-módszert dolgozzak ki, amely a Solanum laciniatum és egyéb Solanum fajok hatóanyagra történő nemesítésénél felhasználható.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

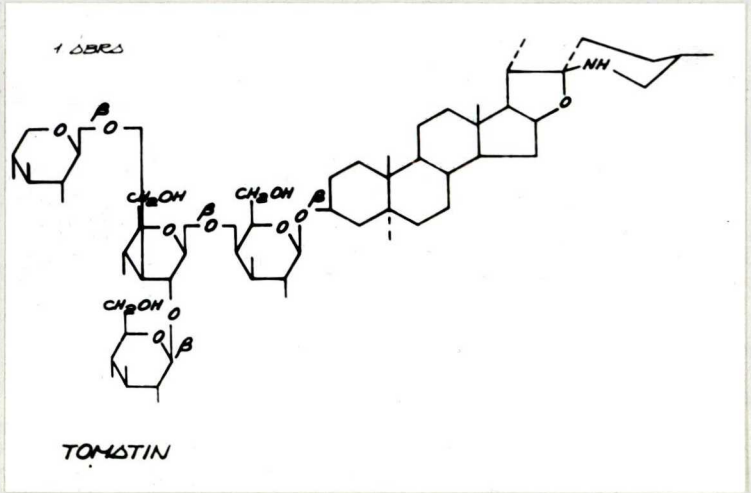
A/ ANYAGOK

1. Az összehasonlító vizsgálatban alkalmazott szteroid glikosidok ismertetése

Tomatin /α-tomatin/

Elsősorban a Solanum lycopersicum L. szteroid glikoalkaloidája /Fontaine et al. 1948/, de más Solanum fajokban is előfordul kisebb mennyiségben /Schreiber és Aurich 1963a/. Színtelen, kristályos anyag. Op.: 272-274°C /dekomp./, fajlagos forgatóképessége: $/\alpha/_D^{20} = -19°$ /piridinben/. Összegképlete: $C_{50}H_{83}O_{21}N$, molsúlya: 1034,222. Szerkezetét /1. ábra/ Kuhn és mtsai /1950, 1952a, 1952b, 1953a, 1953b, 1956, 1957b/, Fontaine és mtsai /1951/, Uhle és Moore /1954/ tisztázták. Aglikonja telített: tomatidin, F gyűrűjének térállása β helyzetű; cukorkomponensei: 2 mol D-glukóz, 1-1 mol D-galaktóz és D-xilóz. Jellemző tulajdonsága a szterinekkel /kolesterin, ergosterin/ történő intenzív molekulakomplex-képzés /Sander et al. 1960, Tschesche és Wulff 1964/, mely kvantitative játszódik le és így pl.

kolesterin mennyiségi meghatározására alkalmas /Kabara et al. 1961, Edwards et al. 1964/. UV-ben nincs jellemző abszorpciós spektruma.

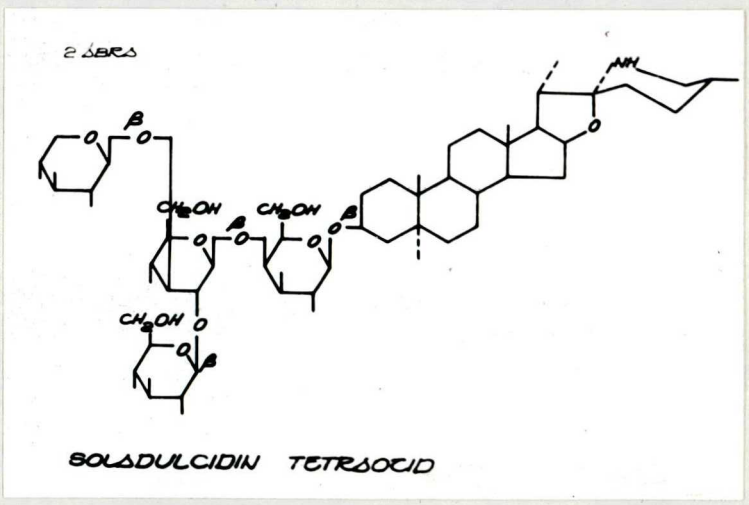


1. ábra

Soladulcidin tetraozid

a Solanum dulcamara L. szteroid glikoalkaloidája /Alkemeyer és Sander 1959/. Színtelen kristályos anyag. Op.: 268-270°C /dekomp./, fajlagos forgatóképessége: $/\alpha/_D^{20} = -55,1° \pm 1°$ /piridinben/. Összegképlete: $C_{50}H_{83}O_{21}N$, molsúlya: 1034,222. Szerkezetét /2. ábra/ Alkemeyer és Sander /1959/, San-

der és mtsai /1962/ tisztították. Aglikonja telített: soladulcidin F gyűrűjének térállása α helyzetű; cukorkomponensei: 2 mol D-glukóz, 1-1 mol D-galaktóz és D-xilóz. A tomatinhoz hasonlóan szterinekkel molekulakomplexet képes /Sander et al. 1960, Techesche és Wulff 1964/. UV-ben nincs jellegzetes abszorpciós spektruma.

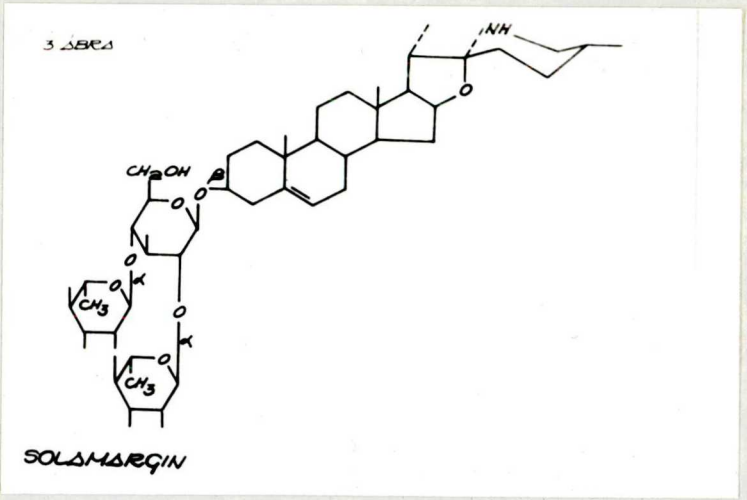


2. ábra

Solamargin /α-solamargin/

Magyarországon a Solanum laciniatum Ait.-ból állítják elő /Földesi et al. 1962/, de igen sok Solanum fajban megtalálható /Schreiber 1958a, 1958b,

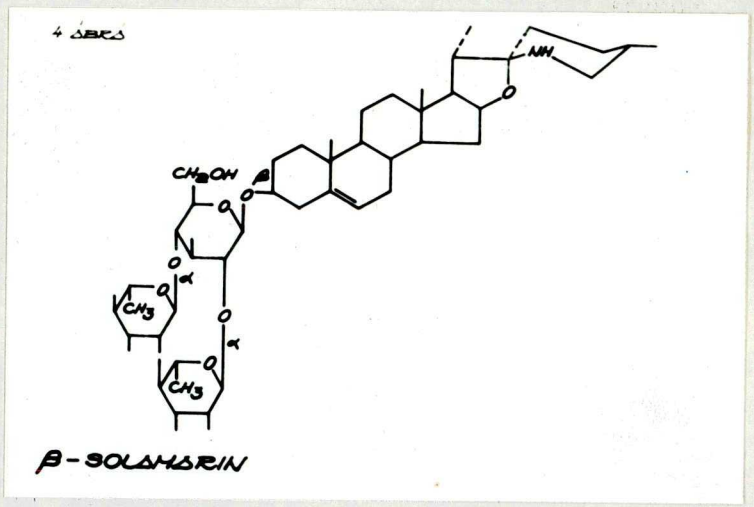
Schreiber et al. 1963b, Scheiber és Ripperger 1963c, Perez-Medina 1964, Nakleit et al. 1963, Bite et al. 1962/. Szintelen kristályos anyag. Op.: 301-303°C /dekomp./, fajlagos forgatási értéke: $/\alpha/_D^{20}$ = -110° /piridinben/. Összegképlete: $C_{45}H_{73}O_{15}N$, molsúlya: 868,042. Szerkezetét /3. ábra/ Perez-Medina és mtsai /1964/, Kuhn és Löw /1954, 1955a/, Kuhn és mtsai /1955b/, Briggs és mtsai /1952/ tisztázták. Aglikonja Δ^5 helyzetben telítetlen: solasodin, F gyűrűje α térállású; cukorkomponensei: 2 mol L-ramnóz, 1 mol D-glukóz. Sterinekkel molekulakomplexet képez /Tschesche és Wulff 1964/. UV-ben nincs jellemző abszorpciós spektruma.



3. ábra

β-solamarin

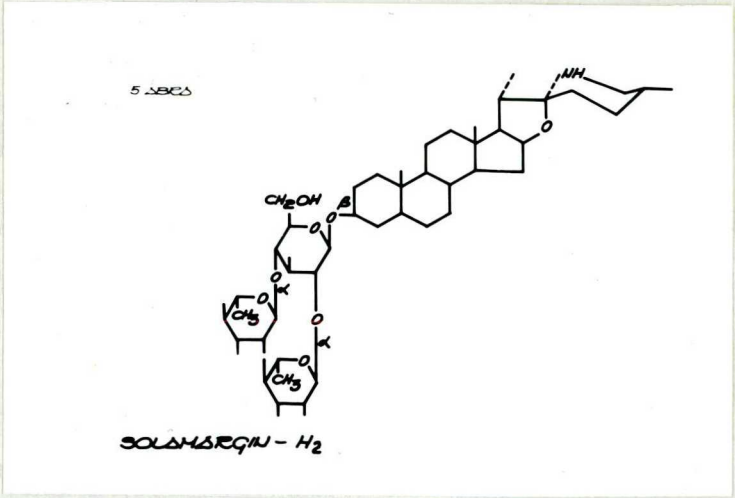
a Solanum dulcamara L. szteroid glikoalkaloidja /Boll és Andersen 1962a, Boll 1962b, 1963a, 1963b/. Ízintelen, kristályos anyag. Op.: 275-277°C /dekomp./, fajlagos forgatási értéke /α/$_D$ = -85,6°. Összegképlete: $C_{45}H_{73}O_{15}N$, molsúlya 868,042. Szerkezetét /4. ábra/ Boll /1963a, 1963b/ tisztázta. Aglikonja Δ^5 helyzetben telítetlen: Δ^5 tomatidenol, F gyűrűje β térállású; cukorkomponensei: 2 mol L-ramnóz, 1 mol D-glukóz. UV-ben nincs jellegzetes abszorpciós spektruma.



4. ábra

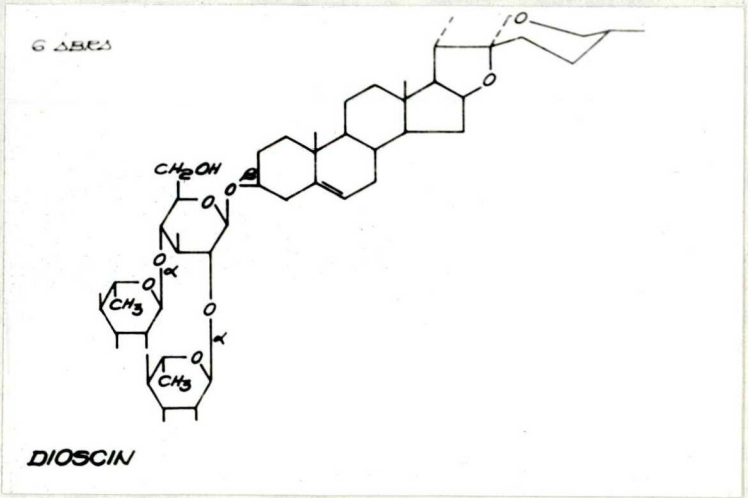
Dioscin

szaponin típusú vegyület, régebben elsősorban Dioscorea fajokból állították elő, ma más több Solanum fajból is /Hite és Shabana 1969/. Színtelen kristályos anyag. Op.: 268°C /dekomp./ fajlagos forgatási értéke: $/\alpha/_D$ = -124° /dioxánban/. Összegképlete: $C_{45}H_{72}O_{16}$, molsúlya 869,15. Szerkezetét /6. ábra/ Kawasaki és mtsai /1962a/, Kawasaki és Yamauchi /1962b/, Kawasaki és Miyahara /1963/ tisztázták. Aglikonja Δ^5 helyzetben telítetlen: diosgenin, F gyűrűje α helyzetű; cukorkomponensei: 2 mol L-ramnóz, 1 mol D-glukóz. Szterinekkel molekulakomplexet képez.



5. ábra

Solasargin Δ^5 helyzetben hidrogénezett /Solasargin-H_2/ műtermék /5. ábra/, platinakatalizátor jelenlétében történő redukcióval állították elő a JATE Szerves Kémiai Intézetében.

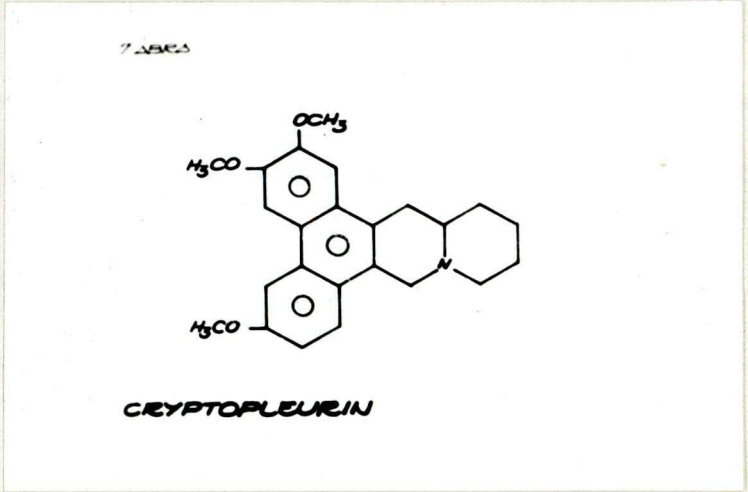


6. ábra

2. Az összehasonlító vizsgálatban alkalmazott Cynanchum vincetoxicum anyagának és szintetikus származékainak ismertetése

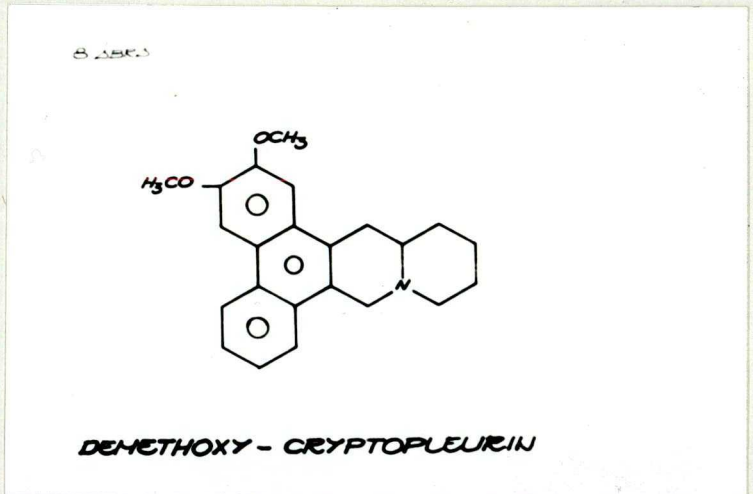
A növényben előforduló anyagokat Indiából /Presidency College, Madras/ kaptuk. A szintetikus származékok a JATE Szerves Kémiai Intézetében készültek.

Cryptopleurin: $C_{24}H_{27}O_3N_1$ Op.: 197-198°C. Mm: 377,488 /7. ábra/. Szintetikus származék /de természetben is megtalálható a Cryptocarya pleurospermában - Fridrichsons és Mathieson 1954/.



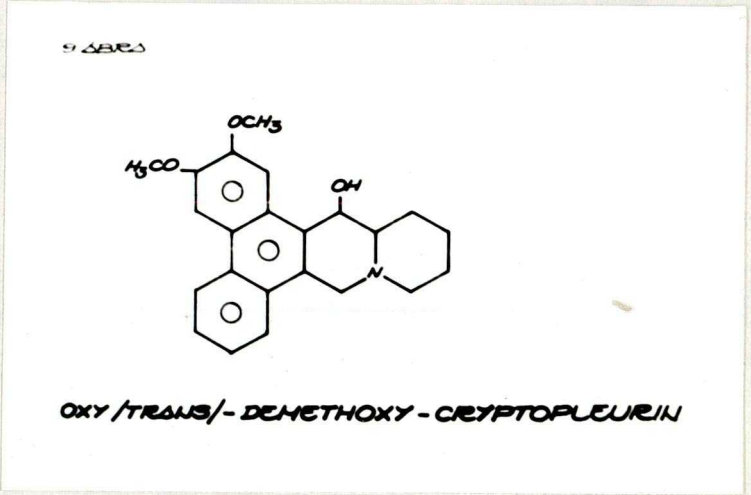
7. ábra

Demethoxy-cryptopleurin: $C_{23}H_{25}O_2N_1$ Op.: 188-189°C. Mm.: 347,461 /8. ábra/. Szintetikus származék.



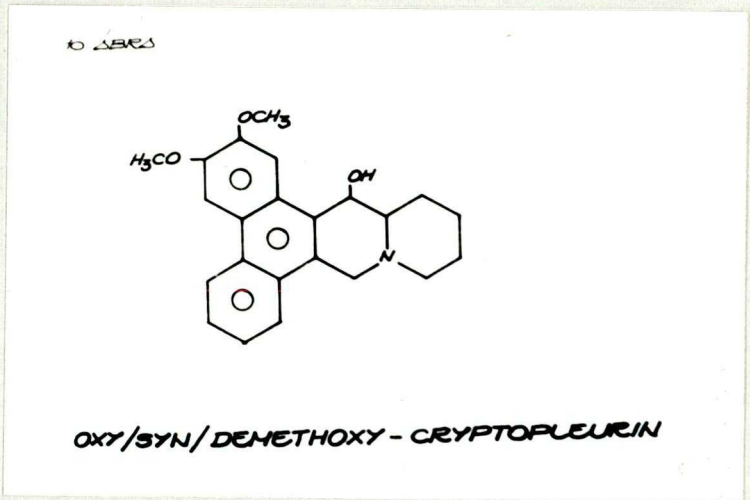
8. ábra

Oxy/trans/-demethoxy-cryptopleurin: $C_{23}H_{25}O_3N_1$.
Ms.: 363,461 /9. ábra/. Szintetikus származék.



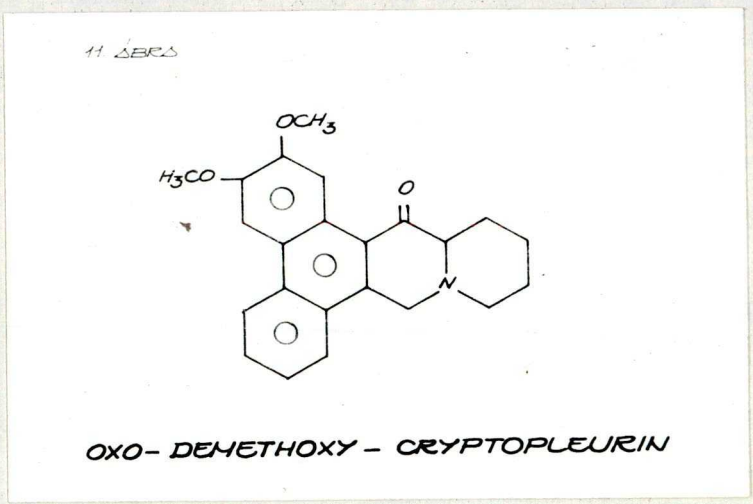
9. ábra

Oxy/syn/-demethoxy-cryptopleurin: $C_{23}H_{25}O_3N_1$.
Ms.: 363,461 /10. ábra/. Szintetikus származék.



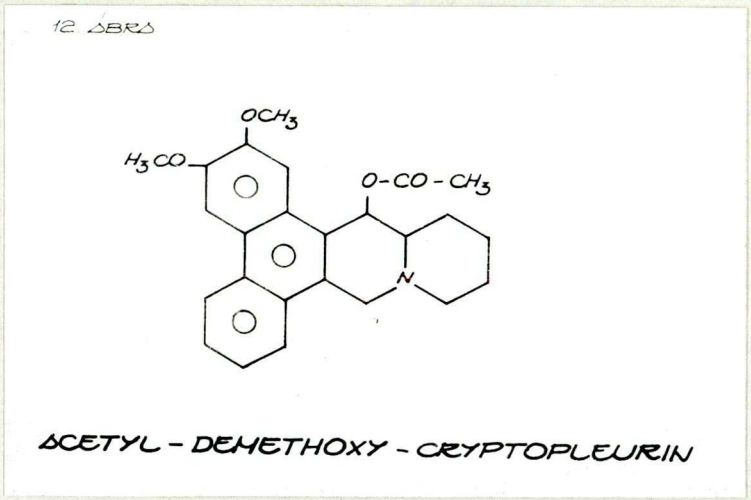
10. ábra

Oxo-demethoxy-cryptopleurin: $C_{23}H_{23}O_3N$. Mr.: 361,445 /11. ábra/. Szintetikus származék.



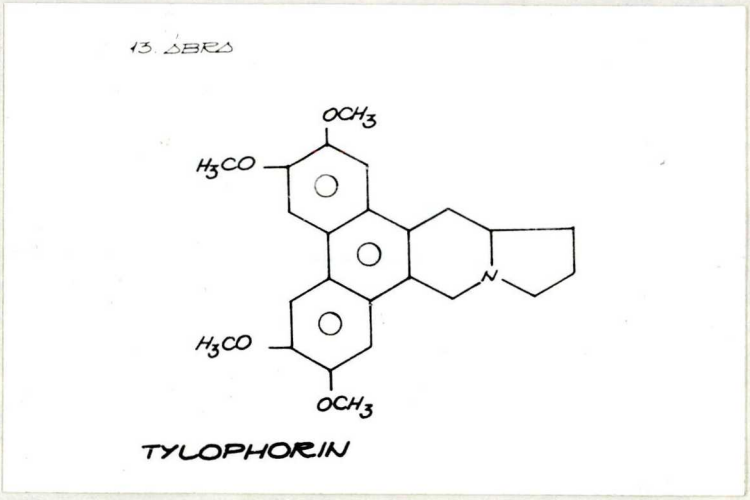
11. ábra

Acetyl-demethoxy-cryptopleurin: $C_{25}H_{25}O_4N$. Mr.: 405,499 /12. ábra/. Szintetikus származék.



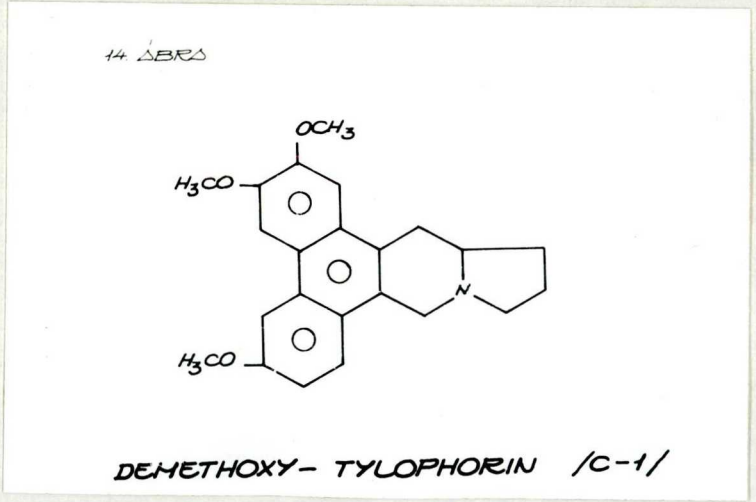
12. ábra

Tylophorin: $C_{24}H_{27}O_4N$. HCl. Mr.: 431,969 /13. ábra/ Növényi eredetű. /Hydrochlorid formában állították elő./ Op.: 278°C.



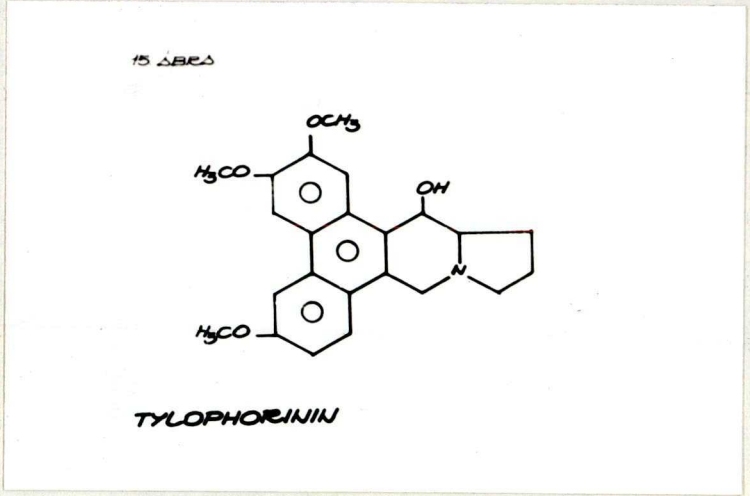
13. ábra

Demethoxy-tylophorin /C-1/: $C_{23}H_{25}O_3N$ Mr.: 364,469 /14. ábra/. Növényi eredetű, a Cynanchum vincetoxicum fő alkaloidája. Op.: 212-214°C.



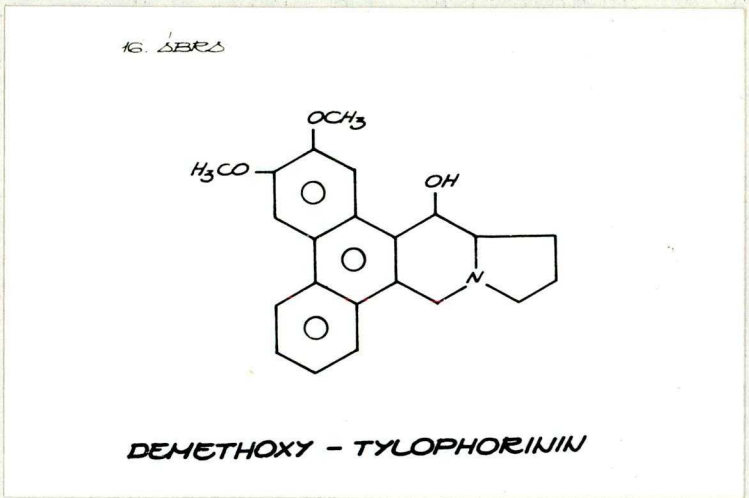
14. ábra

Thylophorinin: $C_{23}H_{25}O_4N$ Mr.: 380,469 /15. ábra/. Növényi eredetü, Op.: 245°C.



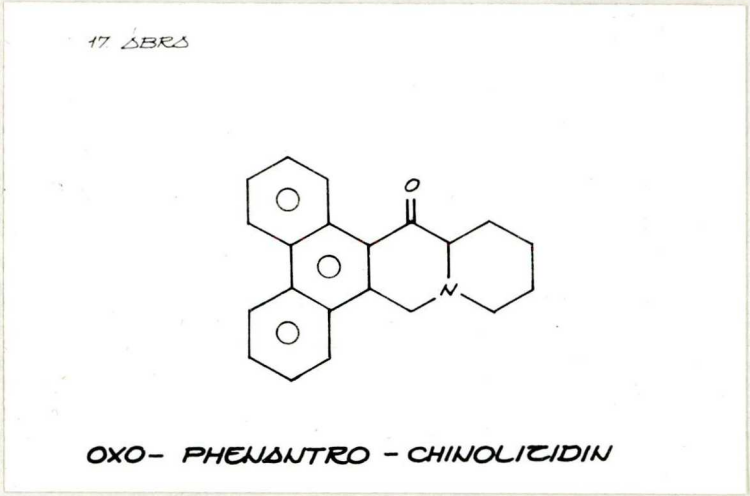
15. ábra

Demethoxy-tylophorinin: $C_{22}H_{23}O_3N$. Mr.: 350,442 /16. ábra/. Szintetikus származék.



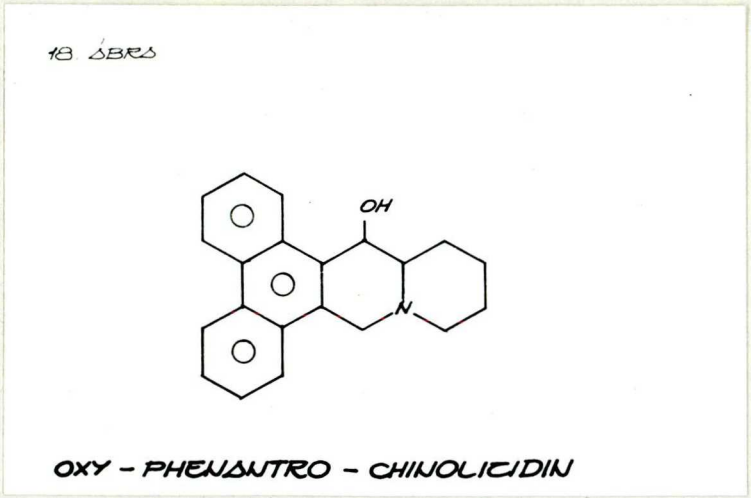
16. ábra

Oxo-phenantro-chinolizidin: $C_{21}H_{15}ON$ Mr.: 301,391 /17. ábra/. Szintetikus származék.



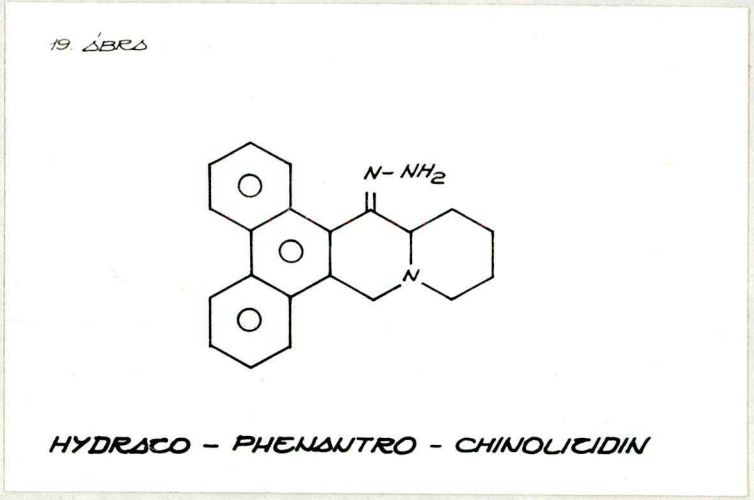
17. ábra

Oxy-phenantro-chinolizidin: $C_{21}H_{21}ON$ Mr.: 303,407 Szintetikus származék. Op.: 231-232°C.



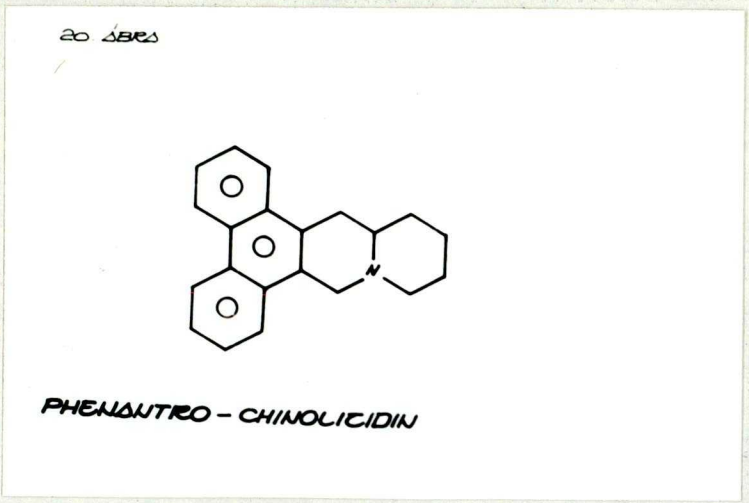
18. ábra

Hydrazo-phenantro-chinolizidin: $C_{21}H_{21}ON_3$ Mr.: 315,423 /19. ábra/. Szintetikus származék.



19. ábra

Phenantro-chinolizidin: $C_{21}H_{21}N$ Mr.: 287,407 /20. ábra/. Szintetikus származék. Op.: 174-175°C.

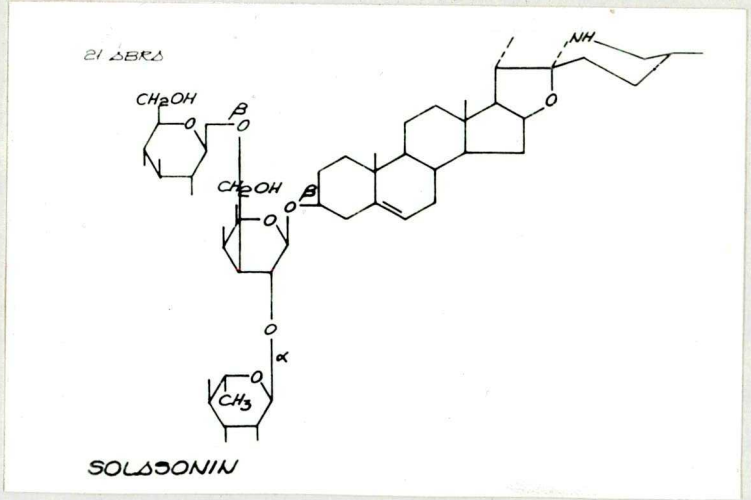


20. ábra

3. Egyéb vizsgálatokban alkalmazott anyagok

Solasonin /α-solasonin/

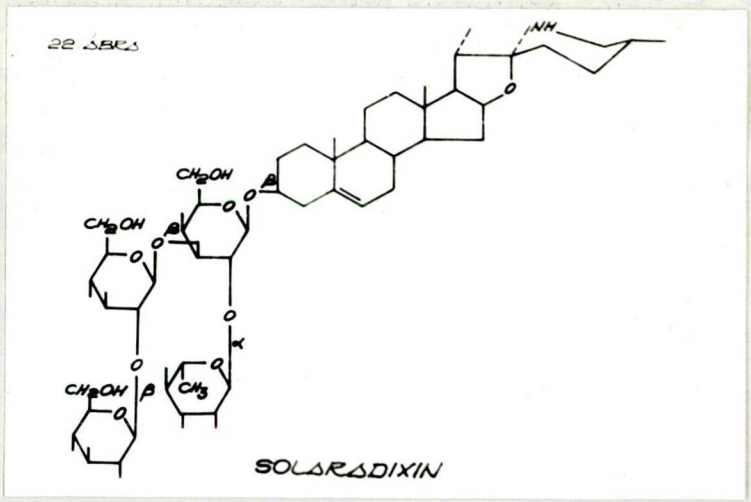
Solanum fajokban gyakran előforduló szteroid glikoalkaloid /Tuason et al. 1958, Zito et al. 1962, Schreiber et al. 1963b, Perez-Medina et al., 1964, Bognár és Kaklein 1965b/. Színtelen, kristályos anyag. Op.: 292-294°C /dekomp./, fajlagos forgatási értéke /α_D^{20} = -75° /piridinben/. Összegképlete: $C_{45}H_{73}O_{16}N$, molsúlya 884,042. Szerkezetét /21. ábra/ Briggs és mtsai /1952, 1963/, Kuhn és mtsai/1955 a, 1955b/ tisztázták. Aglikonja telítetlen: solasodin; F gyűrűjének térállása α helyzetű, cukorkomponensei: 1-1 mol L-ramnóz, D-glukóz, D-galaktóz. UV-ben nincs jellemző abszorpciós spektruma.



21. ábra

Solaradixin

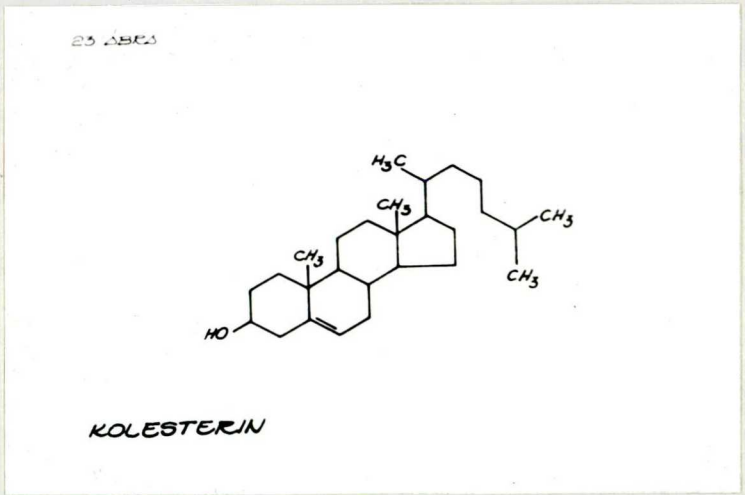
eddigi ismereteink szerint kizárólag a Solanum laciniatum Ait.-ban, annak is elsősorban a gyökérkérgében fordul elő /Bite et al. 1962/. Színtelen, kristályos anyag. Ellentétben az eddig ismertetett szteroidokkal vízben jól oldódik. Op.: 275-278°C /dekomp./, fajlagos forgatási értéke /α_D^{20} = -69,7° /piridinben/. Összegképlete: $C_{51}H_{85}O_{21}N$, molsúlya: 1064,182. Szerkezetét /22. ábra/ Bite és mtsai /1970/ tisztázták. Aglikonja telítetlen: solasodin, cukorkomponensei: 2 mol D-glukóz, 1-1 mol D-galaktóz és L-ramnóz.



22. ábra

Kolesterin

szintelen, kristályos anyag, a legkorábban ismert zoosterin. Szerves oldószerekben jól oldódik, vízben kevésbé. Összegképlete: $C_{27}H_{46}O$, molekulasúlya: 386,665 /23. ábra/. A vizsgálataimhoz felhasznált kolesterin Merznal kiszerelésű p.a. minőségű gyári készítmény volt.



23. ábra

4. Szteroidok előállítása és eredetük

A szteroid glikoalkaloidák előállítására az irodalomból több módszer ismeretes. Az alapelv mindegyiknél egyforma: alkoholos vagy savas extrahálás,

az extraktum bepárlása vagy lúgos lecsapás, majd az így nyert csapadék tisztítása és abból a kívánt vegyület kinyerése kromatográfiás, komplexképzéses vagy egyéb módszerrel /Kuhn és Löw 1947, McKee 1959, Sander et al. 1960, 1961, 1962, Sander 1963a, Boll 1962b, Schreiber és Aurich 1963a, Schreiber és Sipperger 1963c, Perez-Medina et al. 1964, Tomowa 1964, Tschesche és Wulff 1964, Bito és Magyar 1966a, Bito és Rottegi 1967, 1968b, Rosunok 1967, Allen 1968, Schinada 1969/. A szteroid glikoalkaloidok előállítására új módszert dolgoztam ki, amelynek alapelve az előzőekkel megegyezik, azonban részleteiben eltérő.

A/Tomatin

A begyűjtött zöld növényeket /Solanum lycopersicum/ friss állapotban dolgoztam fel. Azonos mennyiségű, 5 %-os HCl-val pH 5-re beállított desztillált vízzel extrháltam 50-55°C-on 1 óráig. Az extrhálást háromszor megismételtem és a kivonatot összegyűjtöttem, majd pH 10-re állítottam 5 %-os NaOH-dal. A lúg hatására az oldatból csapadék formájában kiválik a szteroid glikozid és még sok szennyeződés. 8-10 óra ülepedés után az anyalúgot leöntöttem, a sárd csapadékos részt centrifugáltam, desztillált

vizzel többször átmostam, hogy 7-es pH-jú legyen. Az így kapott sűrű massza 20 grammjához 100 ml 96 %-os etanolt öntöttem és 10 percig forraltam, rodós szűrőn leszűrtem és a szűrletet forrásponton tartottam. Ezzel párhuzamosan 1 g kolesterint oldottam 100 ml 96 %-os etanolban forralás közben. Teljes oldódás után a két forráspontra melegített oldatot összeöntöttem és hűlni hagytam. Az oldatból kolesterin-tomatin komplex kristály vált ki. 12 óra szobahőn vagy jégszekrényben való állás után, a kristályokat szűrtem, + 3°C-os desztillált vizzel átmostam, majd forró abszolut metanolban feloldottam és felo mennyiségű kloroformot hozzáadva melegítettem. Ebben az oldószer-elegyben a komplex jól oldódik és komponenseire esik szét. Egynegyed rész desztillált víz hozzáadásával a rendszer két fázisra válik; az alsó kloroformos fázisban van a kolesterin, a felső kloroformmal többször kirázom, majd vízfürdőn 1/5-ére bepárolom - a tomatin tűkristályokban válik ki.

A komplexkristályok feloldásához sok metanol kell, ezért célszerűbb piridint használni. Ebben az esetben hasznos, ha a komplexkristályokat előzőleg izopropanolban átkristályosítjuk. Kloroform helyett CCl_4-ot is használhatunk, mivel a kolesterinnek szintén kiváló oldószere.

Ezzel a módszerrel szárított növényből is elő tudjuk állítani a tomatint.

Előfordul, hogy a növény Septoria lycopersicivel fertőzött. A gomba egy konstitutiv extracelluláris enzim segítségével hidrolizál egy glukóz-egységet a tomatin-molekuláról, és egy három cukormolekulát tartalmazó származék, β_2 tomatin keletkezik /Arneson és Durbin 1967/. Ebben az esetben a koleszterinnel történő komplexképzéses módszert csak a β_2 tomatin etilacetátos kirázással történő eltávolítása után alkalmazhatjuk. Ugyanis a β_2 tomatin is képes koleszterinnel komplexet hosszabb idő alatt.

B/ Soladulcidin tetraozid

Solanum dulcamara L-ből állítottam elő a tomatin előállításával megegyező módon.

A tomatin és a soladulcidin tetraozid rosszul kristályosodó, un. kocsonyásodásra hajlamos vegyület. Az átkristályosítást NH_4OH-dal lúgosított acetonban találtam legkönnyebben kivitelezhetőnek.

C/ Solamargin, solasonin

A Tiszavasvári Alkaloida Gyártól kapott, Solanum laciniatumból nyert glikozida keverékből állítottam elő, oszlopkromatográfiás eljárással. Ad-

szorbens: Al_2O_3 Brockmann, amelyet használat előtt 4 órán 350°C-os aktiválásnak vetettem alá. Kifejlesztő elegyként izopropanol:benzol:víz = 5:1:1 arányú oldószerkeveréket alkalmaztam. Ugyanebben az elegyben szuszpendálva az Al_2O_3-ot készítettem el az oszlopot, 25x200 mm méretben. 20 ml kifejlesztő elegyben 2 g keveréket oldottam és felvittem az oszlopra. A solamargin kinyerése után a solasonint 50 %-os etanollal mostam le. A mintegy 200 db 3 ml-es mennyiségű frakciók tisztaságát rétegkromatográfiásan ellenőriztem. Az azonos vegyületeket tartalmazó frakciókat összeöntve vízfürdőn bepároltam a kristályosodás megindulásáig, majd jégszekrényben hűtve kristályosítottam tovább. Az anyagokat 96 %-os etanol:aceton = 2:1 arányú keverékben kristályosítottam át.

D/ β-solamarin, solamargin-H_2, dioscin

β-solamarin: NDK-ból, Prof. Schreibertől kaptam a vegyületet;

solamargin-H_2: a JATE Szerves Kémiai Intézetében készült solamarginból, katalitikus hidrogénezéssel;

dioscin: Gyógyszeripari Kutató Intézetből kaptam, dr. Bite F.-től.

E/ Solaradixin

Solanum laciniatum Ait. gyökereit friss állapotban felaprítottam, háromszoros mennyiségű 96 %-os etanolban ázattam több napon keresztül, majd forrásponton extrháltam fél óráig, ezután az extraktumot bepároltam. A kapott ragacsos massza kb. 1-1 g-ját, az etanol:benzol:NH_3:víz = 25:10:4:4 arányú elegy 10-10 ml-ében oldottam. Ezeket a 10-10 ml-eket vittem fel egy-egy speciálisan elkészített kromatografáló oszlopra.

Kromatografáló oszlop: 45-50 cm hosszú, kb. 5 cm átmérőjű csöveket készítettem műszaki rajzpapírból, amelynek egyik végébe egy jól illeszkedő fémhengert tettem. Az így kapott csövekbe finomra átszitált/10-40 u részecske méretű/ gipsz:szilikagél, 1:1 arányú keverékből desztillált víz hozzáadásával kapiákony szuszpenziót öntöttem. 24 órás szobahőmérsékleten való állás után 72 órán át szárítottam, illetve aktiváltam 120°C-on. A szárítás után a papírformákat leválasztottam a kiszáradt oszlopokról és a fémhengerbe mértem a fentebb említett extraktumot. Az oszlop kifejlesztése ugyanebben az oldószerben történt. A kifejlesztést követően kiszáritottam az oszlopot és egy kapillárissá kihúzott csőben levő módosított Hanson-Dam reagens segítségével elő-

hívtam az oszlopot egy-egy vékony csíkban. Azt a részt, ahol szteroid glikozidokra jellemző színreakciót kaptam, kivágtam az oszlopból /felszeletelve az oszlopot/. A kivágott részeket dörzsmozsárban porrá törtem, kromatografáló csőbe raktam és 96 %-os etanollal eluáltam. Az oldatot bepároltam és az így kapott amorf anyaggal végeztem további vizsgálataimat. Vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálattal ellenőrizve a solaradixin tisztaságát, a solaradixin mellett csak kis mennyiségű solasonin-szennyeződést kaptam.

5. A soladulcidin tetraozid és a tomatin azonosítása

Irodalomból ismeretes /Boll és Andersen 1962a, Sander et al. 1962, Tomowa 1962, Boll 1963a, 1963b, Sander 1963a, 1963b, Tomowa 1964, Bognar és Makleit 1965a, Schreiber és Bönsch 1965, Makleit 1966, Willuhn 1966, 1967, 1968, Makleit et al. 1967, Rozumek és Sander 1967/, hogy a Solanum dulcamara L. faj a szteroid glikozidok előfordulása szempontjából nem egységes, földrajzilag elkülönült kémiai rasszok figyelhetők meg, a hatóanyagtartalom azonban genetikailag determinált. Ez azt jelenti, hogy

a Ny-Európában található egyedek fő aglikonként tomatidenolt tartalmaznak /solamarin/, a K-európai egyedek pedig soladulcidint /soladulcidin tetraozid/; de termőhelyváltozással nem termel más szteroid glikozidot a növény. A két földrajzi terület között átmenet van, tehát un. átmeneti típusú egyedek alakultak ki, amelyek keverten tartalmaznak többféle szteroid glikozidot. Magyarországon elsősorban a kelet-európai törzsek fordulnak elő /soladulcidin a fő aglikon, mellette solasodin is kimutatható kisebb mennyiségben/, kivételt képeznek az un. "fűvészkerti" példányok, amelyek nyugat-európai típusúak /Pápai és Berek 1967/. A Solanum dulcamarat Szegeden és Fehértón gyűjtöttem. Az előbb felsorolt irodalmak szerint ezekben a fő aglikon a szoladulcidin; az a szteroid glikozid, amelyet előállítottam, a soladulcidin tetraozid. Ezt azonosító vizsgálattal bizonyítottam. Az azonosító vizsgálatot kiterjesztettem a tomatinra is /bár Hanske 1966-ban készült összefoglalója szerint a Solanum lycopersicumban csak ez az egyetlen szteroid glikoalkaloid fordul elő/, mivel szerkezete az F gyűrű térállásának kivételével teljesen megegyezik a soladulcidin tetraozidával. Ez a tény nagy segítséget jelent a vegyü-

letek vékonyréteykromatográfiás vizsgálatánál, mivel a két vegyület Rf értéke megegyezik vagy közel azonos.

Ezen kívül a módosított Hansen-Dam féle reagenssel adott színreakció is azonos - szürkés-zöld, ill. szürkés-kék, eltérően a solasodin /telítetlen/ aglikonú vegyületek intenzív piroses-lila színétől.

A/Azonosításhoz felhasznált anyagok és módszerek

A kromatográfiás vizsgálatokat korábbi tapasztalatok alapján /Kosava és Majkova 1961, Tschosche és Wulff 1964, Heftmann 1965, Rozumek és Sander 1967, Willuhn 1966, Vágujfalvi et al. 1966, Bito és Rettegi 1967, Forenczy et al. 1966a, Blunden és Hardman 1968, Rozumek 1969/ az alábbiak szerint végeztem.

a/ Kromatografáló lemez

Az alkalmazott adszorbens szilikagél /Kieselgel G. Merck nach Stahl/ volt, amelyet 1:3 arányban desztillált vízzel szuszpendáltam és 10 mg/cm² vastagságban kentem fel üveglemezre. 24 órás szobahőn való állás után a lemezeket kétórás 110 °-os melegítéssel aktiváltam.

b/ Futtatórendszerek

Soladulcidin tetraozid és tomatin esetén:

I. etilacetát:metanol:ammoniumhidroxid - 10:10:1

II. benzol:etanol:víz:ammoniumhidroxid - 10:10:1:1

III. kloroform:etanol:ammoniumhidroxid - 20:10:1

Soladulcidin és tomatidin esetén:

I. kloroform: metanol - 20:2

II. benzol:etanol - 10:2

III. benzol:etanol:ecetsav - 10:2:1

c/ A kromatogramok előhívása

Kémiai előhívásnál módosított Hansen-Dam féle reagenst /Vahouny et al. 1963/ használtam. Összetétele: cc. H_2SO_4:jégecet: $FeCl_3$-100 ml:100 ml:100 mg. Az előhívás történhet lepermetezéssel, illetve leborítással - a kromatogrammal megegyező nagyságú üveglapon a reagens néhány ml-ét szétkenem, majd a kifejlesztett kromatogramra borítom. A tomatin és a soladulcidin tetraozid esetén /telített aglikon/ a jellemző zöldes-kék szín kifejlődését felírás 100°C-os melegítéssel segítettem elő.

Biológiai előhívást is alkalmaztam a szteroid glikozidoknál korábbi tapasztalatok alapján /Betina és Baráth 1964, Kleine és Golab 1965, Hamilton és

Cook 1968/ az alábbi módszerrel. A kifejlesztett, jól kiszáritott kromatogramot 1,5 % agar tartalmi bouillon táptalajjal leöntöttem, majd a tesztmikroorganizmus konidium szuszpenziójával /Syncephalastrum racemosum, 500.000 konidium/ml csapviz/ a réteget leoltottam - a szuszpenziót ecsettel egyenletesen szétkentem. A lemez felületének beszáradását követő 24 órás, 30°C-os nedves kamrás inkubálás után értékeltem. A konidium szuszpenzióba a felkenés előtt CTC-t és streptomycint vittem 20-20 µg/ml mennyiségben, a levegőből történő baktériumfertőzés teljes visszaszoritása céljából. Korábbi vizsgálatok tisztázták /Kevei 1967/, hogy az alkalmazott antibiotikumok a tesztorganizmus fejlődését nem befolyásolják, a vizsgált anyagokkal különösnhatásba nem lépnek.

d/ Nyers növényi extraktum előállitása

Infravörös lámpával megszáritott Solanum dulcamara és Solanum lycopersicum leveleket poritottam és tizszeres mennyiségű 96 %-os etanollal visszafolyós hűtővel extraháltam fél órán át, majd redős szűrőn megszűrtem a törmelékektől. Ezt a nyers extraktumot használtam fel a kromatográfiás vizsgálatnál.

c/ Szteroid glikozidok hidrolizálása aglikonná

Az irodalomban több, egymástól némileg eltérő módszereket írtak le a hidrolizálással kapcsolatban /Kuhn et al. 1950, Gracza és Szász 1962, Boll 1963a, 1963b, Schreiber és Rönsch 1965, Rozumek és Sander 1967, Ripperger és Schreiber 1968, Saber et al. 1968/.

Módszerem a következő volt.

A soladulcidin tetraozid és a tomatin 5-5 mg-ját egy-egy ml 50 %-os etanolban feloldtam. Az oldathoz 2-2 ml 5 %-os HCl-at adtam és forrásban levő vízfürdőn csapadék megjelenéséig főztem /kb. 25 perc/. Ezután tömény NaOH-dal leállítottam a hidrolizist, majd 10 percig ismét vízfürdőn melegítettem, hogy hidrokloridmentes bázist kapjak. A keletkezett aglikonokat 4-4 ml etilacetátba ráztam át, és ezt használtam fel a vizsgálathoz.

B. Soladulcidin tetraozid és tomatin kromatográfiás azonosítása

A kromatografáló lemezre a következő anyagokból vittem fel közel azonos mennyiségeket /50-100 µg/.

1. Solanum dulcamara extraktum

2. általam előállított soladulcidin tetraozid

3. autentikus soladuleidin tetraozid

4. Solanum lycopersicum extraktum

5. általam előállított tomatin

6. autentikus tomatin.

Az előzőekben említett háromféle futtatóban fejlesztettem ki egy-egy lemezt, majd kémiailag előhívtam. Az eredményeket /Rf értékeket /1. táblázat/ futtatóelegyként részletezem.

Anyagok	I. futtató	II. futtató	III. futtató
1.	0,312	0,202	0,101
2.	0,310	0,206	0,096
3.	0,305	0,195	0,089
4.	0,308	0,201	0,094
5.	0,321	0,233	0,119
6.	0,316	0,225	0,098

1. táblázat: az egyes anyagoknak, különböző futtatórendszerben kapott Rf értékei

Mikrobiológiai módszerrel is előhívva a lemezeket a táblázatba foglalt értékekkel teljesen megegyező eredményt kaptam; a növényi extraktumnak, az általam előállított és az autentikus anyagnak a gátlási zónája mindkét szteroid glikozidnál egybeesett.

C/ Soladulcidin és tomatidin kromatográfiás azonosítása

A kromatografáló lemezre egy-egy foltba a következő anyagokból vittem fel közel azonos mennyiségeket /50-100 µg/:

1. általam előállított soladulcidin
2. autentikus soladulcidin
3. általam előállított tomatidin
4. autentikus tomatidin.

Az előzőekben említett futtatókban kromatografálva a lemezeket, kémiai előhívás után az alábbi R_f értékeket kaptam /2. táblázat/.

Anyagok	I. futtató	II. futtató	III. futtató
1.	0,123	0,240	0,336
2.	0,132	0,251	0,383
3.	0,169	0,335	0,438
4.	0,178	0,342	0,456

2. táblázat: az aglikonok különböző futtatórendszerben kapott R_f értékei

Az eredményekből teljesen egyértelműen látszik, hogy az általam előállított anyag valóban a soladul-

cidin tetraozid és a tomatin. Azonban az is kiderül, hogy az F gyűrű térállása hatással van a vegyületek polaritására, aglikonoknál az kifejezettebb, mint a glikozidoknál, ahol a cukorkomponensek határozzák meg döntően az R_f értékekben kifejezett futási magasságot.

6. Tesztmikroorganizmusok

A/ A mikrobiológiai aktivitás és kémiai szerkezet összefüggésének vizsgálatánál felhasznált mikroorganizmusok

Szteroid glikozidok esetén:

Hansenula anomala

Candida albicans CBS-562

Actinomucor repens 215 /I./

Syncephalastrum racemosum

Cynanchum vincetoxicum anyagainak és az intetinus származékainak vizsgálatához a

Candida albicans CBS-562

Actinomucor repens 215 /I./ törzseket használtam.

B/ Sztteroid glikozidok enzimatikus átalakíthatóságának vizsgálatánál alkalmazott mikroorganizmusok

Mucor spinosus 17/1
Mucor racemosus 13
Mucor fragilis 15
Fusarium poae 210
Fusarium moniliforme 8
Fusarium oxysporum 17
Aspergillus japonicus 5
Aspergillus foetidus 9
Aspergillus awamori 3
Rhizopus arrhizus 18/1
Rhizopus nigricans 18/5
Rhizopus circinans 6/3
Penicillium lanosum 251
Penicillium expansum 37
Penicillium avellaneum 41
Syncephalastrum racemosum
Cunninghamella echinata 8/2
Actinomucor repens 125
Trichoderma glaucum 41
Trichothecium roseum 19
Alternaria tenuis 6/3

C/ Screen vizsgálatnál felhasznált mikroorganizmusok

a/ Solamargin-solasonin glikozidkeverék hatásának vizsgálatánál alkalmazott Dermatophyton és Candida albicans törzsek

Trichophyton mentagrophytes Börkl. 1389/a
Trichophyton mentagrophytes Börkl. 1389/b

Trichophyton mentagrophytes	2/1	OKI
Trichophyton rubrum	2/2	OKI
Trichophyton gallinae	2/3	OKI
Trichophyton terrestris	2/4	OKI
Trichophyton sudanense	2/5	OKI
Trichophyton violaceum	2/6	OKI
Trichosporon cutaneum	2/7	OKI
Trichosporon undulatum	2/8	OKI
Microsporon nanum	8/1	OKI
Microsporon fulvum	8/2	OKI
Microsporon gypseum	8/3	OKI
Microsporon cookei	8/4	OKI
Microsporon vanbreuseghemii	8/5	OKI
Keratinomyces ajelloi	3/1	OKI
Keratinomyces longifusum	3/2	OKI
Kaufmannwolfia interdigitalis	9/1	OKI
Kaufmannwolfia pedis	9/2	OKI
Epidermophyton floccosum	1/5	OKI
Achorion schönleini	7/1	OKI

Candida albicans 68/355	Candida albicans 69/18
Candida albicans 69/c	Candida albicans 68/514
Candida albicans 69/7	Candida albicans 68/527
Candida albicans 69/18	Candida albicans 68/25
Candida albicans 68/518	Candida albicans 68/85
Candida albicans 58/554	Candida albicans 68/160

Candida albicans 68/486	Candida albicans 68/152
Candida albicans 68/218	Candida albicans 68/164
Candida albicans 68/100	Candida albicans 68/159
Candida albicans 69/70	Candida albicans 68/177
Candida albicans 68/92	Candida albicans 68/56
Candida albicans 68/32	Candida albicans 68/K_2
Candida albicans 68/30	Candida albicans CBS 562

b/ A nemesítésre kidolgozott mérőmódszernél használt mikroorganizmus

Actinomucor repens 215 /I./

7. Táptalajok

A/ A mikrobiológiai aktivitás és kémiai szerkezet összefüggésének vizsgálatánál felhasznált táptalajok

A szteroid glikozidok és a Cynanchum vincetoxicum anyagainál, illetve szintetikus származékainál a következő, kétféle táptalajt használtam.

Sabouraud táptalaj

40 g glukóz	20 g agar
10 g pepton	1000 ml víz

Szintetikus táptalaj:

5 g $/NH_4/_2SO_4$	20 g agar
1 g KH_2PO_4	1 ml élesztőkivonat
0,5 g $MgSO_4$	1000 ml víz
10 g glukóz	

Élesztőkivonat elkészítése: 10 g pékélesztőt 100 ml vízben 5 percig főztem, majd lecentrifugáltam. A szupernatanst használtam fel.

A pH-t minden esetben Na_2CO_3-dal állítottam be. A kész felfőzött táptalajba a baktériumfertőzés megelőzése céljából 20-20 µg/ml oxytetracyclint és streptomycint tettem.

B/ Szteroid glikozidok enzimatikus átalakíthatóságának vizsgálatánál alkalmazott táptalajok

a/ Szteroid átalakításnál használt tápoldat:

0,5 % maláta	0,01 % KH_2PO_4
1 % pepton	0,001 % $MgSO_4$
0,1 % $/NH_4/_2SO_4$	desztillált víz

A tápoldat pH-ját 5 %-os HCl oldattal állítottam be pH 5-re, ezt kétszeri sterilezés után is ellenőriztem.

b/ A mikrobiológiai előhíváshoz bouillon táptalajt használtam.

1 db Yeztor kocka
5 g szacharóz
2 g pepton
15 g agar
1000 ml desztillált víz.

C/ Screen vizsgálatnál felhasznált táptalajok

a/ Solamargin - solasonin glikozidkeverék hatásának vizsgálatánál alkalmazott táptalajok

Sabouraud és szintetikus táptalajjal dolgoztam /Összetételét lásd: Anyagok c. fejezet 7. A/ pont alatt/.

b/ A nemesítésre kidolgozott mérőmódszernél használt táptalaj

Sabouraud táptalaj.

II. MÓDSZEREK

1. A mikrobiológiai aktivitás mérésének módszere

A/ Szteroid glikozidok esetén

A vegyületeket 50 %-os etanolban oldottam és 11 lépcsős 2/3-oló higitási sorozatot készítettem úgy, hogy a törzsoldat mindegyik anyag esetén 100 µg/ml táptalaj legyen és a táptalaj 1,5 %-nál több etanolt ne tartalmazzon. Ezt a következőképpen értem el /nehezítette a vizsgálatot az, hogy az egyes anyagokból csak 10 mg állt rendelkezésemre/:

3	ml 50 %-os etanol	10 mg anyag
0,3	ml 50 %-os etanol	1 mg anyag

0,1 ml-ben tehát 333 µg van.

Tehát, ha 0,1 ml-t viszek 3,3 ml táptalajba, akkor 100 µg/ml táptalaj lesz a koncentráció /a táptalaj 1,65 % etanolt tartalmaz/.

Az elkészített oldószeres higitási sorozat minden egyes tagjából 0,1 ml oldatot vittem át az előzőleg kémcsövekbe kimért 3,3 ml táptalajba.

A munkafolyamat további részét az Uj mikrobiológiai mérőmódszer c. fejezet 7. pontja alatt leirtak szerint végeztem.

A vegyületeket a kémiai szerkezet hasonlósága alapján csoportosítottam és vizsgáltam.

Tomatin - soladulcidin tetraosid

solamargin -β solamarin

solamargin - solamargin-H_2

solamargin - dioscin

A mycelium-oszlop tesztet az Uj mikrobiológiai módszer 7. pontja szerint végeztem.

A mikrobák felhasznált mennyisége minden esetben 6.10^5 konidium, illetve élesztősejt/ml volt, a Takátsy lemez egy mélyedésében levő táptalaj felületére minden esetben 600 konidiumot illetve élesztősejtet vittem rá, 1 kacs 0,001 ml szuszpenziót tartalmaz. A sejtszámot Bürker kamrában ellenőriztem.

pH 7-es Sabouraud és szintetikus táptalajon dolgoztam, 8 párhuzamosan.

30°C-on történő 24 órás inkubálás után értékeltem. Minimális gátló koncentrációnak azt a legkisebb koncentráció-értéket vettem, ahol még teljes gátlás volt tapasztalható.

B/ Cynanchum vincetoxicum hatóanyagainak és szintetikus származékainak vizsgálata

Mivel a vegyületek mikrobiológiai aktivitása ismeretlen volt - kivéve a demetoxy-tylophorint /Ferenczy et al. 1966b, Háznagy et al. 1967/, először minden vegyületből 1-ezer-, 10-ezer-, 100-ezer-, 1 millió-, 10 milliószoros higitást készitettem DMSO-ban.

A higitási sorozat elkészitésénél molekulasúlyokat vettem figyelembe /kis molekulasúlyú vegyületekről lévén szó, a szubsztituensek a molekulasúlyokat számottevően megváltoztatják/ a következőképpen:

pl. ha a molsúly 363,41, akkor 3,6 mg/4 ml az 1000-szeres higitás. Ha ebből 0,1 ml-t viszek 5 ml táptalajba /50.000x/ akkor ez 18 µg/ml koncentrációnak felel meg /a törzsoldatot tehát úgy készitem el, hogy a folyadékmennyiség állandó s csak a bemért anyag mennyisége változik a molsúlynak megfelelően/.

Ebben az esetben a DMSO-t 2 %-ban tartalmazza a táptalaj. Ezért:

7,3 mg/4 ml DMSO

0,05 ml - 5 ml táptalajba - 1 % DMSO lesz.

Jozsef Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára SZEGED

Ezzel a 10-es léptékü higitási sorozattal megállapitottam hozzávetőleg a vegyület mikrobiológiai aktivitását /Actinomucor mycelium-oszlop teszttel/ és a minimális gátló koncentrációhoz tartozó higitásból a további vizsgálathoz 11 lépcsős 2/3-oló higitást készitettem /néhány vegyületnél előfordult, hogy a 100% higitást kellett törzsoldatnak venni/.

A munkafolyamat megegyezett az Uj mikrobiológiai mérőmódszer c. fejezet 7. pontja alatt leirtakkal.

A vegyületeket három csoportban vizsgáltam.

1. Cryptopleurin és származékai,
2. Tylophorin és származékai,
3. Phenantro-chinolizidin és származékai /methoxy csoportot nem tartalmaznak/.

A vizsgálatokat 4 párhuzamosban végeztem pH 7-es Sabouraud és szintetikus táptalajon dolgoztam. 30°C-os, 24 órás inkubálás után értékeltem az eredményeket.

C/ Az eredmények értékelésénél felhasznált statisztikai módszer

Az értékelésnél az egyes minimális gátló koncentrációk középértékét vettem:

$$S = \sqrt{\frac{/x-x_i/^2}{n/n-1/}}$$

x = középérték

x_i = középtől való eltérés

n = ismétlések száma

n-1 = szabadsági fok

A fenti képlet segítségével kiszámoltam az empirikus közép szórását. A szabadsági fok ismeretében kikerestem a Student-féle táblázatból azt az értéket, amellyel szorzva az S-t, megkaptam a 95 %-os megbizhatósági szinthez tartozó szórást.

2. Szteroid glikozidok enzimatikus átalakitási lehetőségének vizsgálata

pH 5-ös, malátás tápoldatból /lásd: Anyagok c. fejezet 7/B/a. alatt/ 100 ml-es Erlenmeyer lombikokba 15-15 ml-t töltöttem és ehhez annyi solaradixint adtam, hogy 0,5 mg/ml legyen a koncentrációja. Ezután az Anyagok c. fejezet 6/B/a pontja alatt felsorolt mikrobákat un. "massziv oltással" leoltottam a tápoldatba. A kontroll a csak solaradixint tartalmazó tápoldat volt. 30°C-on végeztem az inkubációt.

Az ellenőrzés a 3., 6. és 9. napon történt vékonyrétegkromatográfiás eljárással. Az emlitett időpontokban a tápoldatból steril pipettával két-

szer - esetenként - 0,1 ml-t vittem fel a kromatografáló lemez /szilikagél G nach Stahl/ két startpontjára. A két folt közé pedig glikozidkeverék /solasonin, solamargin, β-solamargin/ 1 mg/ml-es alkoholos oldatából 0,05 ml-t; a solaradixin 0,5 mg/ml-es alkoholos oldatából pedig 0,025 ml-t vittem fel. Ezek szolgáltak összehasonlításul a tápoldatban szereplő anyagokhoz. A lemezeket szárítás után az etanol:benzol:ammoniumhidroxid:víz - 10:10:1:1 arányú elegyében futtattam meg kétszer. Az előhívás a már említett módosított Hansen-Dam reagenssel történt. A mikrobiológiai előhívást az Anyagok c. fejezet 5/d pontja alatt leírtak szerint végeztem.

3. Solamargin-solasonin 2:1 arányú keverék hatásának vizsgálata humánpatogén gombák ellen

A/ Dermatophytonok vizsgálata

6,5 pH-jú Sabouraud táptalajt használtam 200, 100, 50 µg/ml-es glikozid koncentrációval és 5 ml megfelelő glikozid koncentrációjú ferdeagarat tartalmazó kémcsövekbe oltottam le a mikrobákat úgy, hogy a táptalaj felületére három helyen szélesztet-

tem a 2000 spóra/kacs szuszpenziót. Az inkubálást 30°C-on végeztem, az eredményt a 3., 6., 9. és 12. napon értékeltem.

B/ Candida albicans törzsek vizsgálata

A kísérletet pH 7-es Sabouraud táptalajon végeztem; 200, 100, 50 µg/ml táptalaj glikozid koncentrációval. A Petri-csészék felületére, forintnyi területre 2000 sejtet vittem /előzőleg Bürker-kamrában számoltam/. 30°C-on inkubáltam és 48 órás eredményt olvastam le.

C/ A glikozid keverék hatásának vizsgálata Candida albicans törzsekre élősejtszám-meghatározással

A vizsgálatot Sörensen-féle foszfát pufferrel /M/15/ végeztem. 4, 7, 9-es pH mellett, a puffer-ben készítettem el a 10000 sejt/ml szuszpenziót. A glikozid keverék koncentrációja 200, 100, 50, 25, 12,5 µg/ml volt. Ebből a rendszerből vettem a 0, 2, 4, 6, 8, 10 órás időmintákat. A minták /0,1 ml/ kb. 1000 sejtet tartalmaztak, és ezt egy Petri-csésze két felére szélesztettem.

A higitási szerozatot DMSO-ban készítettem el, a kontrol minden esetben 1 % DMSO-t tartalmazott. A szélesztést pH 7-es Sabouraud táptalajon végeztem. 30°C-on inkubáltam és 48 órás eredményeket értékeltem.

4-es és 9-es pH-n két törzzsel, a Candida albicans CB 562 és Candida albicans 69/19-cel dolgoztam, 7-es pH-n a Candida albicans 68/355-ös törzset is vizsgáltam.

4. Solanum laciniatum levélextraktumában a solasonin és solamargin együtt történő meghatározása mikrobiológiai módszerrel

A Solanum laciniatumban levő genuin szteroid glikozidok /solasonin, solamargin/ kvantitativ analitikai meghatározását elsőszorban közvetve, az aglikon /solasodin/ hidrolitikus lehasítása útján végzik /Szilágyi és Tétényi 1967/, az aglikon meghatározását pedig kémiai módszerrel /bár közvetlen alkaloidmeghatározás is elvégezhető -/Ferenczy szóbeli közlése/-. Az irodalomban a meghatározást illetően valóban főleg kémiai módszerekkel találkozunk, méggpedig:

fotometrikus /Pett és Winkler 1960, Szász et

al. 1961, Gracza és Szász 1962, Waclaw és Roskrutova 1965, Creanga és Husetescu 1968, Birner 1969/;

preparativ /Tuzson 1953, Tuzson és Kiss 1957, Lénárd és Tuzson 1959, Mekleit 1966/;

potenciometrikus /Buzhentseva és Tubina 1959/ és

titriometrikus eljárásokkal /Gyenes 1950, 1953a, 1953b, Valovicsné 1964, Szilágyi és Tétényi 1967/.

A Solanum laciniatumban levő szteroid glikozidok meghatározása elsősorban azért fontos, hogy a nemesítési munkában a magas hatóanyagtartalmú egyedek szelekcióját el tudják végezni. Ehhez pedig gyors és egyszerű módszer szükséges, olyan, amelylyel adott esetben több ezer egyedet is rövid idő alatt képesek legyenek összehasonlítani. Ilyen feladatra a kémiai módszerek nem alkalmasak, mivel kivitelezésük munka- és anyagigényes. A meghatározásra mikrobiológiai módszert még nem írtak le, pedig véleményem szerint ez a kérdés /szelektálás/ kizárólag csakis mikrobiológiai mérőmódszerrel oldható meg.

A meghatározást az alábbi, általam kidolgozott, még nem közölt eljárás szerint végeztem.

A Solanum laciniatum különböző egyedeiről be-

gyűjtött leveleket külön-külön csoportban infra lámpa alatt szárítottam, majd megőröltem. 1 g-hoz 5 ml vizet adtam, majd 2 órai állás után 10 ml 96 %-os etanolt. Visszafolyós hűtővel 1 óra hosszat extraháltam. Az extraktumból 0,1 ml-t vittem 15 ml szintetikus táptalajba /Anyagok c. fejezet 7/C/b./ és Petri-csészébe öntöttem. A táptalaj pH-ját Sörensen-féle foszfát pufferral /M/15/ 7-re állítottam.

Actinomucor repens 125 spóraszuszpenzióját használtam /1 millió spóra/ml/ indikátorként. Whatman No 1 szűrőpapírkorongokat /5 mm átmérőjű/ tettem a spóraszuszpenzióba és ezeket helyeztem a táptalaj felületére.

A kísérletekhez a JATE fűvészkertjében termesztett Solanum laciniatum 16 egyedéről szedett levélmintákat dolgoztam fel, valamint az Iregszemcsei Mezőgazdasági Kutatóintézetből kapott 4 olyan egyed leveleit, amelyeket 8, 10 és 12 órakor szedtek.

A kvantitatív összehasonlításhoz kalibrációs görbét készítettem a következő módon: solasonin-solamargin keverékből hígítási sorozatot készítettem úgy, hogy a táptalajban keverékot 50, 25, 12,6, 6,2, 3,1, 1,5 µg/ml koncentrációban tartalmazza. Ezután a fentebb említett módon elkészített korongokat a táptalaj felületére ráhelyeztem. 30°C-on inkubáltam, 20 és 24 órás telepátmérőket mértem.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

1. A mikrobiológiai aktivitás mérése

A/ Szteroid glikozidok aktivitásának összehasonlítása

Sabouraud táptalajon 24 órás eredmények mycelium-oszlop teszttel /3. táblázat/.

Anyagok	minimális gátló koncentráció µg/ml	
	Actinomucor repens	Syncephalastrum racemosum
tomatin	14,7 ± 3,94	66
solanidinidin tetraozid	18,02 ± 6,00	66
solamargin	17,1 ± 8,72	44
β-solamarin	83 ± 10,33	> 100
solamargin-H_2	45,4 ± 13,95	100
dioscin	29,4	> 100

3. táblázat: a vizsgált vegyületek minimális gátló koncentrációi

Szintetikus táptalajon a 24 órás eredményeket konidium, illetve élesztősejt teszttel a 4. táblázat tartalmazza.

Sabouraud táptalajon 24 órás eredmények konidium ill. élesztősejttel

Anyagok	minimális gátló koncentráció µg/ml			
	Actinomucor repens	Syncephalastrum racemosum	Candida albicans	Hansenula anomala
tomatin	3,05 ± 0,725	4,2 ± 0,320	16,45 ± 2,99	4,75 ± 0,279
soladulcidin tetraozid	2,71 ± 1,27	3,7	16,45 ± 2,99	4,2 ± 0,320
solamargin	13	10,85 ± 0,714	33,5 ± 5,65	13
β-solamarin	16,35 ± 2,99	16,35 ± 2,99	>100	13
solamargin-H_2	26,97 ± 7,56	36,7 ± 6,51	>100	36,7 ± 6,51
dioscin	44	> 100	>100	2,7 ± 0,289

3/a. táblázat: a vizsgált vegyületek minimális gátló koncentrációi

Anyagok	minimális gátló koncentráció µg/ml			
	Actinomucor repens	Syncephalastrum racemosum	Candida albicans	Hansenula anomala
tomatin	44	8,7	29,4	10,8 ± 2,65
solanidin tetraozid	66	13	36,4 ± 6,53	8,7
solamargin	83 ± 5,0	36,7 ± 6,52	100	44
β-solamargin	> 100	24,5 ± 4,22	> 100	> 100
solamargin-H_2	> 100	66	> 100	66
diosgin	> 100	> 100	> 100	2,55 ± 0,249

4. táblázat: a vizsgált vegyületek minimális gátló koncentrációi

Eredményeimből a következő konklúziók vonhatók le.

1. A N atom szterikus helyzete nem döntő a molekula mikrobiológiai aktivitása szempontjából. A biológiai aktivitás mértéke hasonló a tomatinnál a soladulcidin tetraozidhoz, a β-solamarinnál hasonló a solamarginhoz /a tomatin és a solamargin valamivel nagyobb hatású/.

2. Δ^5 helyzetben a telítetlen kötés megszüntetése /solamargin H_2/ csökkenti a mikrobiológiai aktivitást. Ez az eredmény megerősíti Ferenczy et al./1967a, 1967b,/ és Walters /1964b/ megállapítását, hogy a cukorkomponensek befolyásolják a szteroid glikozidok mikrobiológiai aktivitását - módosítja a vegyület oldhatóságát, a hatás erősségét, esetleg a gombák által való felvételt -, ugyanis jelen esetben egy soladulcidin aglikonú, három cukormolekulát tartalmazó vegyületet kaptam, amelynek aktivitása kisebb, mint a solamarginé vagy a soladulcidin tetraozidé.

3. A dioscin mikrobiológiai aktivitása kisebb a vizsgált gombákkal szemben, mint a solamarginnak, tehát az O_2 jelenléte az F gyűrűben befolyásolja a vegyület hatását. Szembetűnő viszont a Hansenula anomala-val szemben mutatott igen nagy aktivitás,

amit más szerzők is leírtak /Imai et al. 1967a, 1967b/, ugyanakkor más gombákkal szemben a többi szteroid szaponinhoz hasonló hatást mutat /Wolters 1968/.

4. Az eredményekből látható, hogy Sabouraud táptalajon a vegyületek mikrobiológiai aktivitása nagyobb, mint szintetikus táptalajon.

Külföldi kutatók közül elsősorban Wolters /1964b, 1966, 1969/ foglalkozott szteroid glikozidok antifungális aktivitásának összehasonlításával. Kísérleteiben más vizsgálati módszert /"csatorna" teszt, "fólia" módszer/ alkalmazott, amely pontatlan értékelést tesz lehetővé. A táptalaj pH-ja 5,4 volt - ami szintén nem szerencsés, ugyanis a vegyületek maximális hatása 7-es pH felett van. Összehasonlította a soladulcidint és a tomatidint /aglikonok/; a soladulcidin tetraozidot és a tomatint /glikozidok/; a solasodint és a Δ^5 tomatidenolt /aglikonok/.

A soladulcidin és a tomatidin összehasonlításánál megállapította, hogy a tomatidin aktívabb, a kvalitatív hatás megegyezik.

A soladulcidin tetraozid és a tomatin vizsgálatának eredményei azt mutatják, hogy a kvalitatív hatás itt is megegyezik, de az aglikonokkal ellentét-

ben a tomatin nem minden esetben hatott erősebben. Elkészitette a vegyületek érzékenységi görbéjét - Claviceps, Trichothecium, Piricularia, Polyporus gombák felhasználásával. A soladuleidin tetraozid érzékenységi görbéje meredekebb, küszöbérték /ami a Piricularianál 1 mm-es gátlási zónát hozott létre/ 10 µg/ml, a teljes gátlás 45 µg/ml koncentrációnál van. Tomatin esetében a küszöbérték 2,5 µg/ml, a minimális gátló koncentráció 20 µg/ml. Ugyanakkor azt is megállapitotta, hogy tomatin hatására a hyfák torzképződményei gyakrabban és kifejezettebben jelentkeznek. Véleménye szerint a vegyületek sztérikus eltérése az érzékenységi görbék meredekségében jelentkezik. Ami ennek a biológiai alapját illeti, ma még tisztázatlan. Az sem bizonyos, hogy a szteroid glikozidok változatlan alakban lesznek-e hatásosak, mivel a gombák 7., 9., 11. helyzetben hidroxilálhatják ezeket a vegyületeket.

A solasodinról és a Δ^5 tomatidenolról megállapitotta, hogy aktivitásuk néhány kivételtől eltekintve hasonló, azonban eltér a fent emlitettektől.

Az általam használt módszer pontosabb kiértékelést tesz lehetővé, egyrészt, mert mindig a teljes gátlást létrehozó koncentrációt vettem alapul,

másrészt, mert 7-es pH-jú táptalajon dolgoztam.

A metodikai eltérések ellenére Wolters és az én eredményeim között elvi eltérés nincs, azonban kvantitative nem hasonlíthatók össze az 5,4-es pH és az enyémtől eltérő tesztmikroorganizmusok alkalmazása miatt.

B/ Cynanchum vincetoxicum hatóanyagának és szintetikus származékai aktivitásának összehasonlítása

Cryptopleurin és származékai

Sabouraud táptalajon 24 órás eredmények /5. táblázat/.

Szintetikus táptalajon 24 órás eredmények /6. táblázat/.

A legnagyobb hatású a természetesen is előforduló cryptopleurin. Demethoxy származékánál az aktivitás csökken /ez a legnagyobb hatású, a JATE Szerves Kémiai Intézetében előállított szintetikus származék/. Oxy-demethoxy származékainál további csökkenést látunk /trans és syn helyzetűnél egyforma/. Oxo csoport bevitelekor a vegyület hatástalanná válik. Az aktivitás akkor csökken legkevésbé, ha acetyl csoportot tartalmaz a demethoxy származék.

Anyagok	minimális gátló koncentráció µg/ml		
	Actinomucor repens mycelium oszlop	Actinomucor repens konidium	Candida albicans
cryptopleurin	0,056	0,037	0,025
dmo-cryptopleurin	0,15	0,044	0,15
oxy/trans/-dmo-cryptopleurin	3,5	1,5	5,3
oxy/syn/-dmo-cryptopleurin	3,5	1,5	5,3
oxo-dmo-cryptopleurin	> 180	> 180	> 180
acetyl-dmo-cryptopleurin	1,81 ± 0,166	0,89	2

5. táblázat. A vizsgált vegyületek minimális gátló koncentrációi

Anyagok	minimális gátló koncentráció µg/ml		
	Actinomucor repens mycelium oszlop	Actinomucor repens konidium	Candida albicans
cryptopleurin	0,126	0,084	0,056
dmo-cryptopleurin	0,39 ± 0,135	0,23	0,52
oxy-/trans/-dmo-cryptopleurin	15 ± 4,77	8	18
oxy-/syn/-dmo-cryptopleurin	15 ± 4,77	8	18
oxo-dmo-cryptopleurin	> 180	> 180	> 180
acetyl-dmo-cryptopleurin	1,5 ± 0,912	0,89	0,89

6. táblázat. A vizsgált vegyületek minimális gátló koncentrációi

Tylophorin és származékai:

Sabouraud táptalajon 24 órás eredményeket a 7. táblázatban tüntettem fel.

Szintetikus táptalajon a 24 órás eredményeket a 8. táblázat tartalmazza.

Legnagyobb aktivitása a növényben található természetes vegyületeknek van, ezek közül is a demethoxy-tylophorinnak /C-1/. Ha ez a vegyület -OH csoportot tartalmaz /tylophorinin/ aktivitása minimálisan csökken. Demethoxy-tylophorinin esetén hatástalan lesz a vegyület. a tylophorinnak /4 methoxy csoport/ aktivitása kisebb, mint a C-1-nek /3 methoxy csoport/.

Phenantro chinolizidin és származékai:

Sabouraud táptalajon, 24 órás eredmények a 9. táblázatban szerepelnek.

Az oxo és hydroxo származékok hatástalanok. Legnagyobb aktivitása magának a vásznak van, oxy csoport csökkenti az aktivitást. Feltűnő, hogy ezek a vegyületek Candida albicansra nem, vagy csak igen nagy koncentrációban hatnak.

Ezen kísérletsorozatnak, amit már a Vizsgálati célkitűzések cimű fejezetben említettem, az volt a célja, hogy a szteroid glikozidok mikrobiológiai

Anyagok	minimális gátló koncentráció µg/ml		
	Actinomucor repens mycelium oszlop	Actinomucor repens konidium	Candida albicans
tylophorinin	0,25	0,165	0,25
dmo-tylophorinin	> 175	117	> 175
tylophorin	1,97 ± 0,433	0,954	1,43
dmo-tylophorin /C-1/	0,15	0,066	0,10

7. táblázat. A vizsgált vegyületek minimális gátló koncentrációi

Anyagok	minimális gátló koncentráció ug/ml		
	Actinomucor repens mycelium csoport	Actinomucor repens konidium csoport	Candida albicans
tylophorinin	0,62 ± 0,105	0,37	0,84
dmo-tylophorinin	> 175	78	> 175
tylophorin	2,57 ± 0,716	1,2	2,8
dmo-tylophorin /C-1/	0,35	0,15	0,53

8. táblázat. A vizsgált vegyületek minimális gátló koncentrációi

Anyagok	minimális gátló koncentráció µg/ml		
	Actinomucor repens mycelium oszlop	Actinomucor repens konidium	Candida albicans
oxo-phenantro-chinolizidin	> 150	> 150	> 150
oxy-phenantro-chinolizidin	19,7	5,8	> 152
hydrazo-phenantro-chinolizidin	> 157	> 157	> 157
phenantro-chinolizidin	6,75 ± 0,783	2,1	143,5

9. táblázat. A vizsgált vegyületek minimális gátló koncentrációi

aktivitásának összehasonlítására kidolgozott mérőmódszert más vegyületekkel szemben is kipróbáljam. Bebizonyosodott, hogy a módszer kis mennyiségű antifungális anyagok aktivitás-összemérésére igen alkalmas, minimális szerkezeti változásokat nagy érzékenysséggel követ.

2. Szteroid glikozidok enzimatikus átalakítási lehetőségeinek vizsgálata

Kísérleteimben a solaradixin átalakíthatóságát vizsgáltam.

Első mintavétel - 3. napon

Mucor racemosus: a solaradixint kb. 20 %-ban átalakította egy polárosabb vegyületté, amely a startponton maradt.

Mucor spinosus: a solaradixint kb. 50 %-ban átalakította az előnével hasonló polárosságú vegyületté.

Ezen vegyület keletkezése csak két úton képzelhető el:

a/ 3 cukormolekulát tartalmazó vegyület keletkezett;

b/ a szteroidvázat hidroxilálta a nikroba.

A két vegyület közül az utóbbi keletkezése a való-

szinübb. A többi mikrobe esetén átalakitás nem volt.

Második mintavétel - 6. napon

Ekkor már több mikrobe esetén történt változás.

Mucor racemosus: a solaradixinnek kb. 40 %-a alakult át a már többször emlitett poláros vegyülettté.

Mucor spinosus: a solaradixin kb. 70 %-a alakult át az emlitett poláros vegyülettté.

Aspergillus japonicus: jól kivehető solaradixin ——→ solasonin átalakitást tapasztaltam, ugyanakkor azt is, hogy solaradixint vesz fel és tart vissza a mikrobe.

Aspergillus foetidus: minimális solaradixin felvétel történt.

Aspergillus awamori: minimális solaradixin felvételt tapasztaltam.

A többi mikrobánál változást nem találtam.

Harmadik mintavétel - 9. napon

Mucor racemosus: A solaradixin kb. 50 %-a alakult át polárosabb vegyülettté.

Mucor spinosus: A solaradixin kb. 90-95 %-a alakult át polárosabb vegyülettté.

Aspergillus japonicus: a solaradixin teljes mennyisége átalakult solasoninná.

Aspergillus foetidus: a solaredixin teljes mennyisége átalakult solasoninná.

Aspergillus awamori: a solaredixin teljes mennyisége átalakult solasoninná.

A többi mikroba nem hozott létre átalakitást.

Az eredményekből az alábbi következtetések vonhatók le.

1. Az Aspergillus japonicus, Aspergillus foetidus és Aspergillus awamori törzsek a mikrobiológiailag inaktiv solaredixinből egy mikrobiológiailag aktiv vegyületet - solasonint - hoztak létre. A solaredixin ebben az esetben egy "prekursor" antifungális vegyületként fogható fel, amelynek átalakitásával a keletkezett solasonin révén, a mikroba önmagát pusztitja el. Hasonló megállapitásra jutottak Ferenczy és mtsai /1970b/, amikor bebizonyitották az Aspergillus japonicus-szal történő solaredixin ——→ solasonin átalakitást. Ez elméletileg fontos megállapitás, mivel a prekursor antibiotikum kutatásnak egy újabb lehetőségére mutat rá.

2. A Mucor racemosus és Mucor spinosus törzsek a solaredixint egy polárosabb vegyülettá alakitották át. A kérdés az volt, hogy ez az új, a solaredixinnél polárosabb vegyület mikrobiológiailag aktiv, vagy inaktiv. A kérdést mikrobiológiai előhivással

döntöttem el, ahol ez a vegyület inaktívnak mutatkozott.

3. Solamargin és solasonin 2:1 arányú keverék hatásának vizsgálata humánpatogén gombák ellen

A/ Dermatophytonok vizsgálata

a/ 200 µg/ml-es glikozid koncentrációnál:

3. és 6. napon egyetlen törzs sem növekedett.

9. napon: Keratinomyces ajelloi és Microsporon fulvum gyengén fejlődni kezdett, majd a 12. napon erőteljesen kifejlődött mind a hat telep.

A többi törzs nem indult fejlődésnek.

b/ 100 µg/ml-es glikozid koncentrációnál: /az egyszerűség kedvéért a következőkben csak azok nevét írtam ki, amelyek növekedtek/:

3. napon: Microsporon fulvum

6. napon: Microsporon fulvum
Trichosporon cutaneum

9. napon: Keratinomyces ajelloi
Microsporon fulvum
Trichosporon cutaneum
Trichosporon undulatum

Trichophyton terrestris

Keratinomyces longifusum

12. napon: a 9. napon felsoroltak fejlődtek csak.

c/ 50 µg/ml-es glikosid koncentrációnál

3. napon: Microsporon fulvum

Microsporon gypseum

Trichosporon cutaneum

Trichosporon undulatum

Trichosporon vanbreuseghemii

6. napon: /az előzőekben felsoroltakon kívül/

Keratinomyces ajelloi

Trichophyton terrestris

9. napon: /a 3. és 6. napon felsoroltakon kívül/

Trichophyton mentagrophytes Körkl.1309/a

Kaufmannwolfia interdigitalis

Trichophyton gallinae

Microsporon cookei

12. napon: /a 3., 6., 9. napon felsoroltakon kívül/

Trichophyton mentagrophytes

d/ 25 µg/ml-es glikosid koncentrációnál

3. napon: Trichophyton rubrum

Epidermophyton floccosum

Trichophyton terrestris

Trichophyton sudanense

Trichophyton violaceum

Acharion schönleini - kivételével minden törzs fejlődésének indult.

6. napon: Csak az Epidermophyton floccosum gátlódott.

9. napon: Kivétel nélkül minden törzs telepet képezett.

A kontrollok kivétel nélkül a 6. naptól kezdve mind telepet képeztek, a Trichophytonok és a Microsporonok nagy része már a 3. napon.

Az eredményekből következik, hogy a solasonin-solamargin glikozid-keverékek mint gyógyszernek van perspektívája, mivel 100 µg/ml koncentrációban 16 törzset még 12 nap után is gátol és 50 µg/ml-es koncentrációban 14 törzset 6 napig. Külön érdekes, hogy az Epidermophyton floccosum, amely az egyik leggyakoribb mikroba, mely fertőzést okoz, még 25 µg/ml glikozid-koncentrációban is 6 napig teljesen gátolt a növekedésben.

A bőrgyógyászati klinikumban a felületi mykosisok ellen használt gyógyszerek kemoterápeutikum és antibiotikum jellegűek.

Kemoterapeutikum jellegűek, felületen használatosak az antiparasitaer ecsetelők. Általánosan 70 %-os alkohol az alapanyaguk, amelybe 2-3 % asa-

licilsav, 2-4 % rezorcin, 0,25 % tripoflavin, 1 % malachitzöld, 1-2 % fuchsin, 1-2 % gentiánibolya tehető külön, külön. Ezeket főleg dermatophytonos fertőzések ellen használják. Serjedző gombákkal szemben 5 % bórsav vagy 5 % borax tartalmú 70 %-os alkoholt alkalmaznak. Kenőcsök is használatosak, amelyeknek alapanyaga változó lehet, 5 %-ként, 3 % szalicilsavat vagy 0,5 - 1 % cinobert tartalmazhat.

Az antibiotikum jellegűek elsősorban kenőcsök. Alapanyaguk változó, 5 % griseofulvint /gricin, dermatophytonok ellen/, vagy 1-2 % nystatint illetve pymaricint /főleg serjedző gombák ellen/ tartalmazhatnak.

A gyógyulási arány rendkívül változó /10-100 %/, ez függ az indikációs területtől, a mikrobától, a beteg egyéni reakciójától, de elsősorban a megfelelő gyógyszer megválasztásától.

A solasonin-solamargin glikozidkeverék alkalmazása egy új lehetőség lenne a dermatomykozisok gyógyítására, ugyanis könnyen kezelhető, mellékhatása - toxicitása - igen kis mértékű, tehát felületen alkalmazva nagy jelentőségű lehetne. Természetesen az in vitro kísérlet pozitív eredményeit még in vivo kísérleteknek kell megerősíteni.

B/ Candida albicans törzsek vizsgálata

a/ 200 µg/ml-es koncentrációnál

Candida albicans 68/355 indult fejlődésnek.

b/ 100 µg/ml-es koncentrációnál

Candida albicans 68/355

c/ 50 µg/ml-es koncentrációnál

Candida albicans 68/30

Candida albicans 68/1600

Candida albicans 68/152

Candida albicans 68/177

Candida albicans 68/56

Candida albicans 69/19

Candida albicans 68/355

törzsek indultak fejlődésnek.

A vizsgált 26 törzs esetén 19-nél 50 µg/ml-es koncentrációnál teljes gátlást tapasztaltam. Ez az adat is amellett szól, hogy a glikozidkeverék mint gyógyszer jelentős lehetne.

A 200 µg/ml-es koncentrációnál csak a Candida albicans 68/355-nél nem tapasztaltam gátlást.

C/ Glikozidkeverék hatásának vizsgálata Candida albicans törzsekre, élősejtszám meghatározással

a/ pH 4-es pufferben

Candida albicans CB 562 /10. táblázat/.

óra	200 µg/ml	100	50	25	12,5	Kontroll
0	300 ± 20	←			→	300 ± 20
2	300 ± 20	←			→	300 ± 20
4	300 ± 20	←			→	300 ± 20
6	250 ± 30	←			→	250 ± 30
8	100 ± 15	←			→	100 ± 15
10	90 ± 10	←			→	90 ± 10

10. táblázat: élősejtszám/0,05 ml

Savas közegben a glikozidkeverék elveszti aktivitását. Az értékek a kontrollal paralel csökkennek. A csökkenés oka az erősen savas közeg.

Candida albicans 69/19 /11. táblázat/.

óra	200 µg/ml	100	50	25	12,5	Kontroll
0	750	←			→	750
2	740	←			→	740
4	730	←			→	730
6	720	←			→	720
8	710	←			→	710
10	700	←			→	700

11. táblázat: élősejtszám/0,05 ml

Gyakorlatilag semmi változás nincs. Ez a törzs kevésbé érzékeny a savas környezetre.

b/ pH 9-es puffer

Candida albicans CB 562 /12. táblázat/.

óra	200 µg/ml	100	50	25	12,5	Kontroll
0	280±20	←			→	280±20
2	11±3	43±4	4±2	22±2	150±16	280±30
4	0	2±1	2±2	8±3	25±5	280±30
6	0	0	0	0	8±4	280±30
8	0	0	0	0	8±3	280±25
10	0	0	0	0	6±3	180±25

12. táblázat: élősejtszám/0,05 ml

4 órától kezdve a 200, 100, 50 µg/ml-es koncentrációban gyakorlatilag 0-ra esik az élősejtszám, 12,5 µg/ml-nél is rendkívül erősen lecsökken. A vegyület kiválóan hat lúgos közegben.

Candida albicans 69/19 /13. táblázat/.

óra	200 µg/ml	100	50	25	12,5	Kontroll
0	600±50	←			→	600±50
2	600±50	←			→	600±50
4	600±50	←			→	600±50
6	49±5	80±10	100±12	220±20	400±50	500
8	21±3	30±3	70±8	150±10	200±20	480
10	5±3	20±2	40±5	23±5	60±5	450

13. táblázat: élősejtszám/0,05 ml

Minden koncentrációnál van sejtszámcsökkenés, mely 6 óra után mutatkozik meg. Ez a törzs ellenállóbb, mint az előző.

c/ pH 7-es pufferben

Candida albicans CB 562 /14. táblázat/

óra	200 µg/ml	100	50	25	12,5	Kontroll
0	150±18	200±30	230±25	250±30	300±32	300±32
2	80±10	141±13	180±20	220±23	250±27	200±30
4	20±3	93±10	100±15	150±17	140±19	280±30
6	16±2	74±8	110±12	130±14	130±15	280±30
8	4±1	48±5	90±9	120±13	135±15	250±28
10	0	20±5	60±7	100±11	100±12	250±28

14. táblázat: élősejtszám/0,05 ml

Az idővel arányosan csökken az élősejtszám. Ez minden koncentrációnál összevethető, de legerősebb természetesen 200 µg/ml-nél.

Candida albicans 68/355 /15. táblázat/.

óra	200 µg/ml	100	50	25	12,5	Kontroll
0	460	←	—	—	→	500
2	460	←	—	—	→	500
4	460	←	—	—	→	500
6	300±30	380±42	500	←	→	500
8	90±10	110±17	300±30	420±45	500	500
10	32±5	84±9	162±17	350±37	450±48	500

15. táblázat: élősejtszám/0,05 ml

Ez a törzs a legellenállóbb az összes többi Candida albicans törzshöz képest.

Candida albicans 69/19 /16. táblázat/.

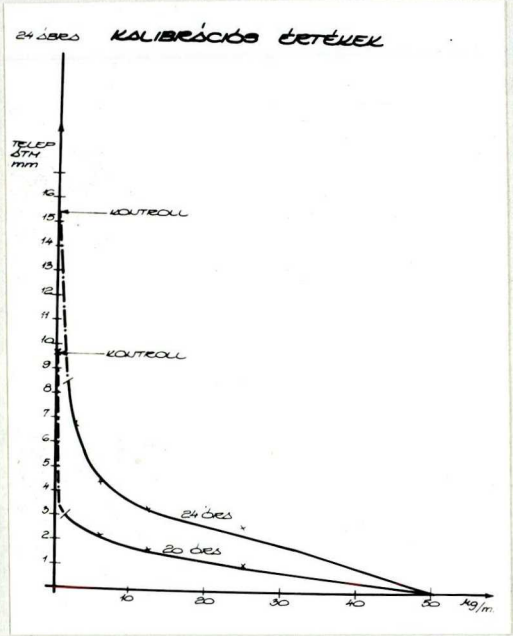
óra	200 µg/ml	100	50	25	12,5	Kontroll
0	400	←			→	400
2	400	←			→	450
4	400	←			→	450
6	110±12	300±33	450	←	→	470
8	24±3	150±16	300±32	400±42	450	450
10	7±2	64±7	230±25	250±28	300±32	350±40

16. táblázat: élősejtszám/0,05 ml

A kísérletekből általánosan levonható az a következtetés, hogy a glikozidkeverék lúgos pH tartományban a leghatásosabb. Az egyes Candida albicans törzsek között nagy eltérés van a glikozidkeverék érzékenységét illetően. Ezen kísérletek alapján nem mondható nagy hatásúnak a keverék, - kivétel a 9-es pH-nál kapott eredmény. Megjegyzendő azonban, hogy a mikrobák csak 10 óra hosszat voltak kitéve a glikozidkeverék hatásának.

4. Solanum laciniatum levélextraktumában a solamargin és solasonin együtt történő meghatározása mikrobiológiai módszerrel

a/ Kalibrációs értékek felvétele /24. ábra/



24. ábra. Solamargin-solasonin 2:1 arányú glikozidkeverék különböző koncentrációihoz tartozó telepátmérők 20, illetve 24 órás értékei

b/ Füvészkertből származó 16 példány leveleinek vizsgálata /17. táblázat/.

Minták	20 óra	24 óra
1	3 mm	7,6 mm
2	4,0	9,6
3	4,0	9,0
4	4,6	7,6
5	4,6	8,6
6	3,6	8,3
7	4,6	8,6
8	4,0	9,6
9	4,3	9,0
10	3,3	9,0
11	4,3	9,3
12	4,3	9,3
13	4,6	9,6
14	4,3	8,0
15	3,6	8,0
16	3,6	8,6
Kontroll	8,6	15,1

17. táblázat. Az egyes mintákban levő glikozidkeverék gátló hatása a telepek növekedésére - telepátmérők mm-ben

c/ Iregszemcsei Mezőgazdasági Kutatóintézetből kapott növények vizsgálatának eredményei /18. táblázat/

Minták	20 óra	24 óra
1/8	3,6 mm	9,6 mm
1/10	3,4	8,6
1/12	3,5	7,6
2/8	2,2	7,3
2/10	1,3	5,6
2/10	1,0	5,3
3/8	3,0	7,6
3/10	2,6	7,3
3/12	2,0	6,6
4/8	1,8	6,0
4/10	1,3	4,3
4/12	1,2	4,3
Kontroll	7,8	15,0

18. táblázat: a mintajelzések az egyedenkénti három különböző időmintát jelölik /8, 10, 12 óra/

Minden esetben leventem a telepátmérőkből a korongok átmérőjét /5 mm/. Az értékek négy párhuzamos kisérlet eredményei.

Az eredményekből látható, hogy az egyes egyedek hatóanyagtartalma között különbség van. A kisebb átmérőhöz természetesen nagyobb hatóanyagkoncentráció tartozik. A telepátmérők jó mérhetősége miatt, legalább a 24 órás inkubációs idő szükséges, de 36 órai inkubáció még pontosabb értékelést tesz lehetővé. A módszer érzékenysége 1 µg/ml koncentráció alatt van. Az Iregszemcséről származó Solanum laciniatum három különböző időpontban szedett leveleinek hatóanyagtartalma eltérő, legmagasabb 12 órakor. A növények ipari hajtásait tehát ebben az időpontban célszerű begyűjteni, ugyanis kb. 20-30 %-kal magasabb a hatóanyagtartalom.

Nem állitom, hogy ez a módszer alkalmas analitikai vizsgálatra, de összehasonlító vizsgálatra igen. Tehát nemesitésnél hatóanyagtartalom szerinti szelektálásra az eddigi hosszadalmas anyag- és munkaigényes kémiai vizsgálatok helyett célszerűbb felhasználni.

ÚJ MIKROBIOLÓGIAI MÉRŐMÓDSZER

Antifungális anyagok mikrobiológiai aktivitás és kémiai szerkezet összefüggésének vizsgálatánál alkalmazott új módszer kísérleti részleteinek ismertetése

Számos módszert írtak eddig le különféle gátló anyagok vizsgálatára /Bajam és Adcock 1953, Jackson et al. 1954, Grove és Randall 1955, Linton 1958, Mc Kee 1959, Koopmans 1960, Kavanagh 1953, Wolters 1963, 1969, Koch és Kaplan 1965, Stillwell és Hodgson 1968, Berek és Novák 1969/. Ezen módszereknél általában a tesztmikroba növekedését illetve gátlását közvetlenül láthatjuk, mérhetjük, vagy pedig különböző reagensek segítségével láthatóvá illetve mérhetővé tehetjük. A vizsgálatokhoz főleg Petri-csészét, vagy műanyag tálcát használtak, agardiffúziós, vagy táptalaj-higításos módszerrel dolgoztak.

Vizsgálati módszerem kidolgozásánál szem előtt kellett tartanom a következőket:

a/ kis anyagmennyiségekkel dolgozom - tehát mikromódszer legyen;

b/ nagy paralel számot adlkalmazhassak;

c/ pontos, reprodukálható eredményre van szükségem;

d/ táptalajkomponensek csak korlátozott mennyiségben állnak rendelkezésemre;

e/ gyors módszer legyen.

1. Tesztmikroorganizmus kiválasztása

Korábbi vizsgálataimból ismert volt, hogy az Actinomucor repens igen gyorsan növő apatogén fonalas gomba. Előnye - más gombákhoz viszonyítva - a széles intervallumú pH és hőoptimum. A következő öt törzsből választottam ki azt, amely az általam támasztott igényeket - növekedési gyorsaság - telepnagyság - mérhetőség - a legjobban kielégítette.

Actinomucor repens 215 /I./

Actinomucor repens 382 /II./

Actinomucor repens 395 /III./

Actinomucor repens 940 /IV./

Actinomucor repens 955 /V./

A vizsgálatot mycelium-oszlop teszttel végeztem el: fiatal telepek széléből lyukasztóval 2 mm átmérőjű korongokat vágtam, ezt a táptalaj felületére

helyeztem és mértem a telepek átmérőjét.

pH 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-as cukros bouillon és szintetikus táptalajt használtam az összehasonlításhoz.

Cukros bouillon táptalaj:

2 db Yester /húsleves/ kocka	20 g agar
4 g pepton	1 ml élesztőkivonat
10 g glukóz	1000 ml víz

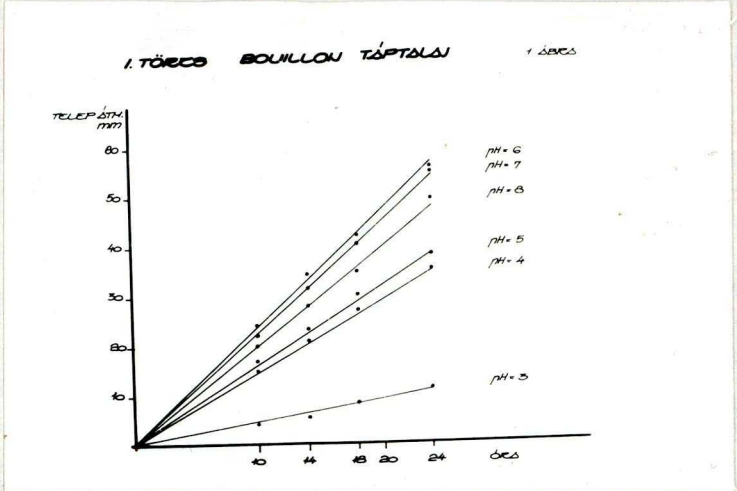
Szintetikus táptalaj:

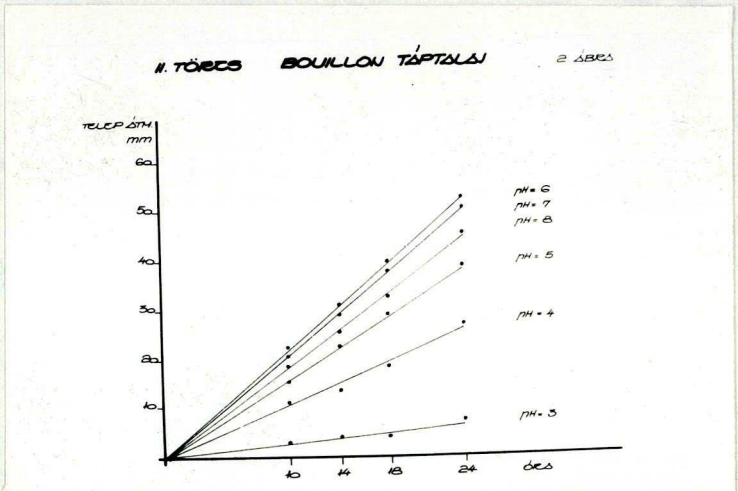
5 g $/NH_4/_2SO_4$	20 g agar
1 g KH_2PO_4	1 ml élesztőkivonat
0,5 g $MgSO_4$	1000 ml víz
10 g glukóz	

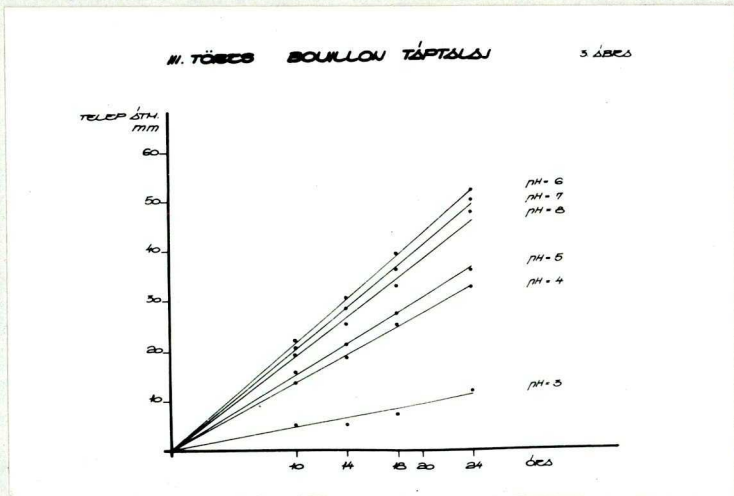
Élesztőkivonat készítése: 10 g pékélesztőt 100 ml vízben 5 percig főztem, majd lecentrifugáltam. A szupernatanst használtam fel.

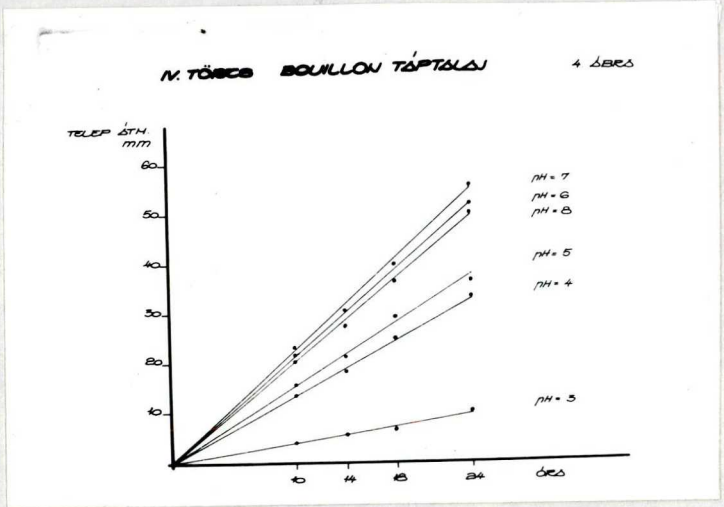
A telepátmérőket 10, 14, 18, 20, 24 órában mértem, 30°C-on inkubáltam.

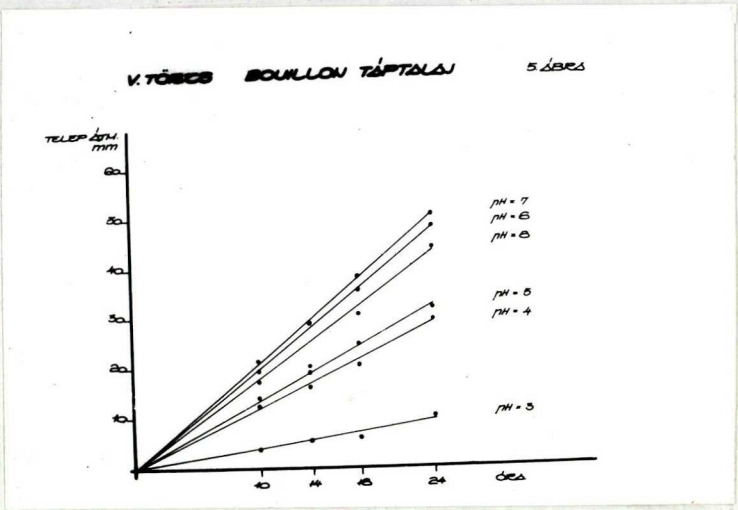
Eredmények: /1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10. ábra/.


I. TÖRZS BOUILLON TÁPTALAJ
1 ÁBRA
TELEP ÁTM. mm
80
50
40
30
20
10
pH = 6
pH = 7
pH = 8
pH = 5
pH = 4
pH = 3
10
14
18
20
24
ÓRA


II. TÖRZS BOUILLON TÁPTALAJ
2 ÁBRA
TELEP ÁTM. mm
60
50
40
30
20
10
pH = 6
pH = 7
pH = 8
pH = 5
pH = 4
pH = 3
10
14
18
24
ÓRA


III. TÖRZS BOUILLON TÁPTALAJ
3 ÁBRA
TELEP ÁTM. mm
60
50
40
30
20
10
pH = 6
pH = 7
pH = 8
pH = 5
pH = 4
pH = 3
10
14
18
20
24
ÓRA

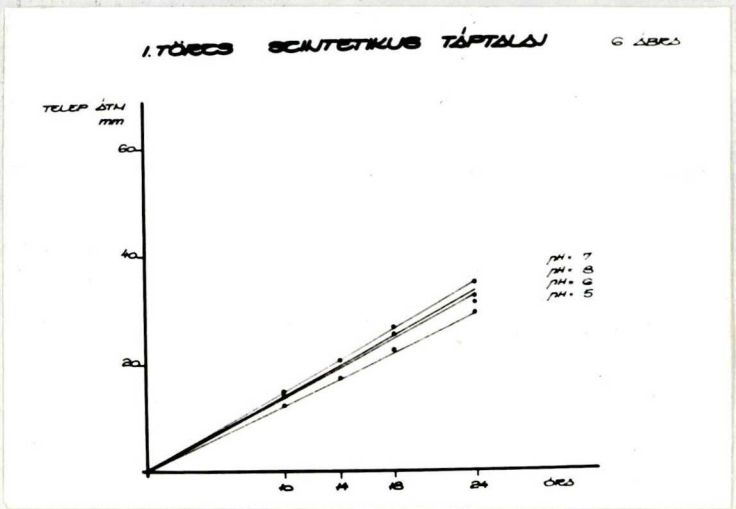


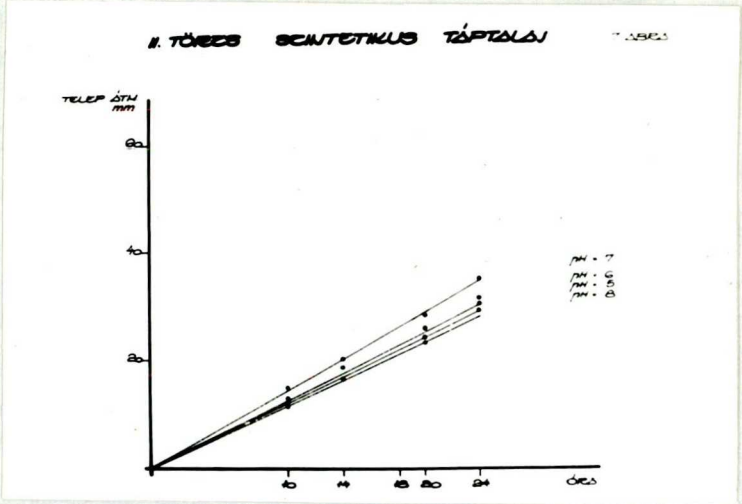


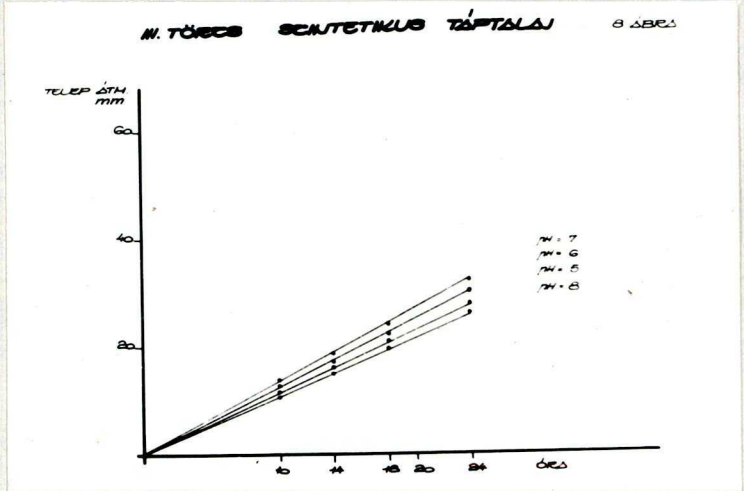
1-5. ábra: Az öt különböző Actinomucor repens törzs növekedési gyorsaságának összehasonlítása különböző pH-jú bouillon táptalajon

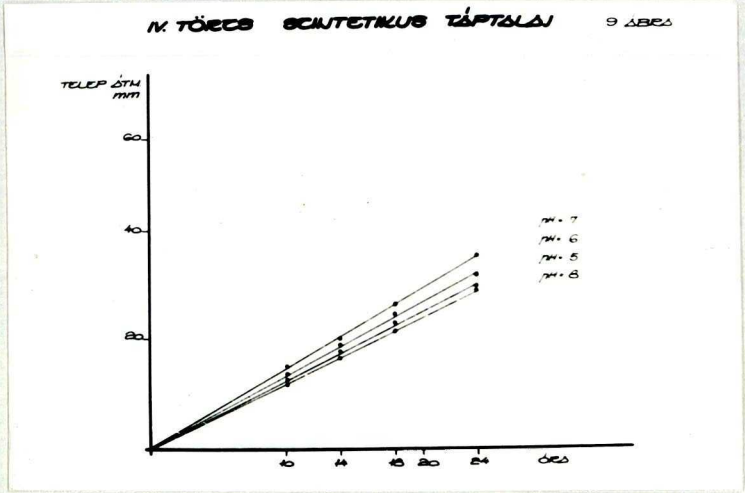
Bouillon táptalajon az I., II. és III. törzs 6-os pH-n nőtt a leggyorsabban, a IV. és V. törzs 7-es pH-n. Összehasonlítva egymással, az I. törzs növekedési gyorsasága a legnagyobb. Az is megfigyelhető, hogy 6-, 7-, 8-as pH-n nincs az értékek között

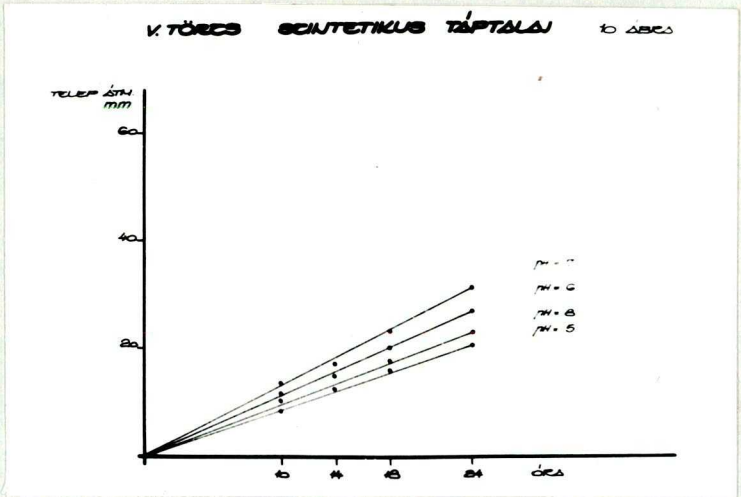
nagy különbség, tehát a tesztmikrobának nincs éles pH optimuma. A telepátmérők mérhetősége megfelelő, teljesen egyöntetű, szabályos, tömött, kerek telepeket kaptam.











6-10. ábra. Az öt különböző Actinomucor repens törzs növekedési gyorsaságának összehasonlítása különböző pH-jú szintetikus táptalajon

szintetikus táptalajon mind az öt törzs 7-es pH-n nőtt a leggyorsabban, főleg az I. törzs. 3-, 4-es pH-n nincs növekedés. 5-, 6-, 7-, 8-as pH-n a telepátmérőkben nincs kiugró különbség, ez is azt mutatja, hogy nincs éles pH optimum. A telepek itt is mérhetőek, kerek de kissé köszöbös. Az I. törzs mérhetőségét találtam kielégítőnek.

A következő vizsgálatokban ezen eredmények alapján mindig az Actinomucor repens 215 /I./ törzzsel dolgoztam.

2. Táptalaj kiválasztása

Hétféle táptalajt próbáltam ki, hogy melyik a legmegfelelőbb, amelyen az I. törzs jól mérhető és gyorsan nő. A kiválasztásnál szempontom volt még az, hogy melyik táptalajt tudom bármikor azonos minőségben előállítani. Ismert ugyanis, hogy bizonyos táptalajkomponensnek - yeastor, pepton - minősége szinte minden egyes gyári szériában eltérő.

1. cukros bouillon + 1 ml élesztőkivonat
2. cukros bouillon + a szintetikus táptalaj sói + 1 ml élesztőkivonat
3. szintetikus táptalaj + 4 g pepton
4. szintetikus táptalaj + 1 % pepton + 0,5 NaCl

5. szintetikus táptalaj + 1 % pepton + 0,5 NaCl +
+ 1 ml élesztőkivonat

6. glukózos Sabouraud táptalaj

7. glukózos Sabouraud + 1 ml élesztőkivonat

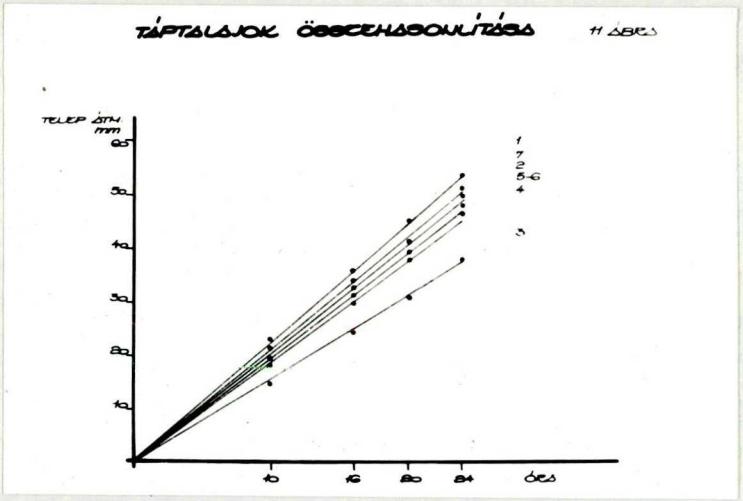
Glukózos Sabouraud táptalaj:

40 g glukóz 20 g agar

10 g pepton 1000 ml víz

pH 6-on dolgoztam. A pH-t minden esetben Na_2CO_3-tal állítottam be. 30°C-on inkubáltam, 10, 16, 20, 24 órában mértem a telepátmérőket.

Eredmények /11. ábra/



11. ábra. Az Actinomucor repens 215 /I./ növekedési gyorsaságának összehasonlítása az előzőekben felsorolt táptalajokon - a számok az egyes táptalajok sorszámai

További vizsgálataimhoz az élesztőkivonatos glukózos Sabouraud táptalajt /a továbbiakban csak Sabouraud

táptalajként említem/ használtam /7-es jelzésű egyenes/, ugyanis elkészítése a többihez viszonyítva a legegyszerűbb, a telepek szabályosak, kiválóan mérhetők, s csak egy változó faktort, peptont tartalmaz. Szintetikus táptalajon a telepek kezdetben szétkúszók, később tömöttek, bolyhosak - bár jól mérhetők -, de viszonylag kis átmérőjűek. Általában a szervetlen sók jelenlétében a telepek szétkúszók, kerületük nem éles.

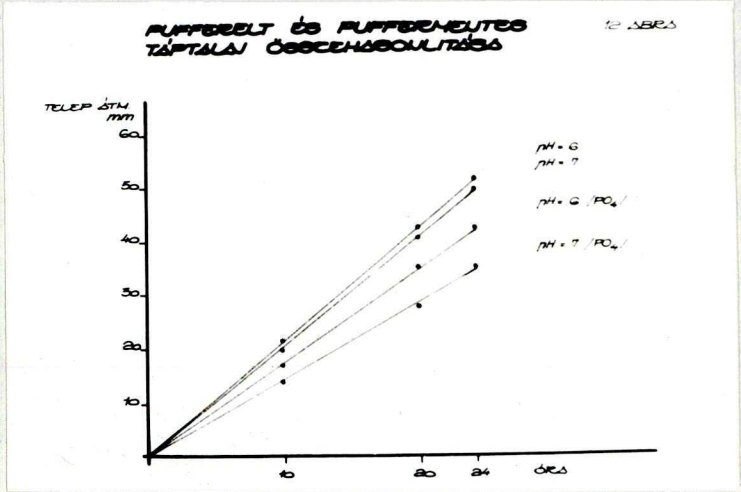
3. A tesztmikroorganizmus növekedése pufferelt táptalajon

Gyakran előfordul, hogy szigorúan meghatározott, konstans pH-n kell dolgoznunk. Ezt puffer alkalmazásával érjük el. A kísérletben Sorrensen PO_4 pufferrel /M/13/, illetve Na_2CO_3-tal pH 6-ra és 7-re beállított Sabouraud táptalajokon hasonlítottam össze a gomba növekedési gyorsaságát és mérhetőségét.

Eredmények: /12. ábra/

Pufferelt táptalajon a telepmorfológia hasonlít ahhoz, amit a szintetikus táptalajon láttam. A telepek bolyhosak, inkább felfelé nőnek. Szervetlen sók jelenléte a táptalajban nem biztosítja a maximális növekedési gyorsaságot, - a Na_2CO_3 tartalmú tápta-

lajon a telepátmérők jóval nagyobbak és pontosabban mérhetők.



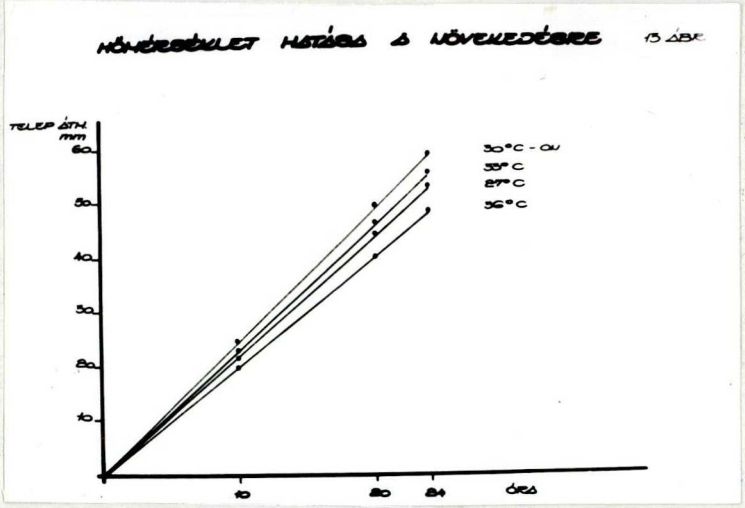
12. ábra. Az I. törzs növekedésének mértéke puffe-rolt és puffermentes 6-, 7-es pH-jú táptalajokon

4. A tesztmikroba hőoptimumának megállapítása

A kísérletben 27°C-, 30°C-, 33°C-, 36°C-os termosztátot állítottam be. pH 7-es Sabouraud táptalajon mértem 10, 20, 24 órában a telepátmérőket.

Eredmények: /13. ábra/

A mikroba 30°C-on leggyorsabban, bár 27-30-33°-on is a telepátmérők értékei közel vannak egymáshoz, nincs éles hőmérsékleti optimum. Az inkubálást ezek után mindig 30°C-os termosztátban végeztem.



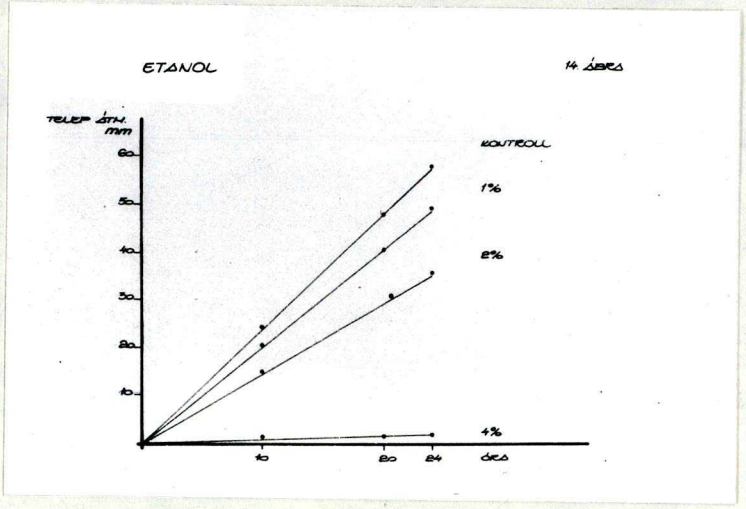
13. ábra. A hőmérsékletnek az I. törzs növekedésére gyakorolt hatása

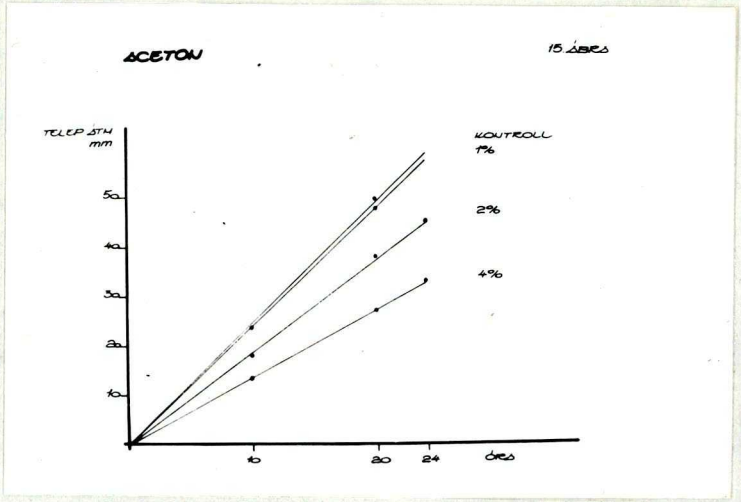
5. Szerves oldószerek növekedésgátló hatásának vizsgálata

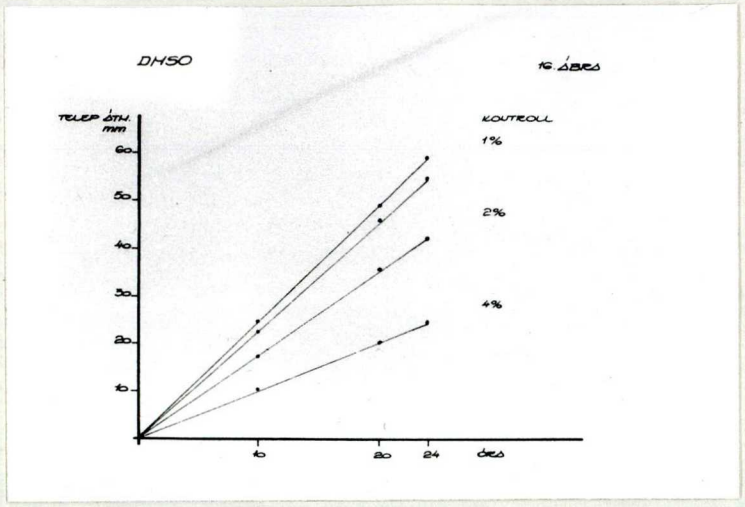
Gyakran előfordul, hogy a vizsgálandó antifungális vegyület nem vízoldékony /tehát táptalajban nem tudjuk feloldani/. Ilyen esetben először feloldjuk valamilyen szerves oldószerben és ezt az oldatot visszük a táptalajba. A leggyakrabban használatos oldószerek: aceton, etanol, dmso /dimetilszulfoxid/. Ebben a kísérletben arra a kérdésre akartam feleletet kapni, hogy ezen oldószerek gátolják-e a tesztmikroba növekedését s ha igen, milyen koncentrációban és mennyire.

pH 7-es Sabouraud táptalajon dolgoztam, a táptalaj az oldószerek 1, 2, 4 %-os mennyiségét tartalmazta. 30°C-on inkubáltam, 10, 20, 24 órás telepátnárőket mértem.

Eredmények : /14., 15., 16. ábra/







14-16. ábra. Szerves oldószerek hatása az I. törzs növekedésére

6. Néhány antifungális vegyület hatása a teszt-mikroorganizmus növekedésére

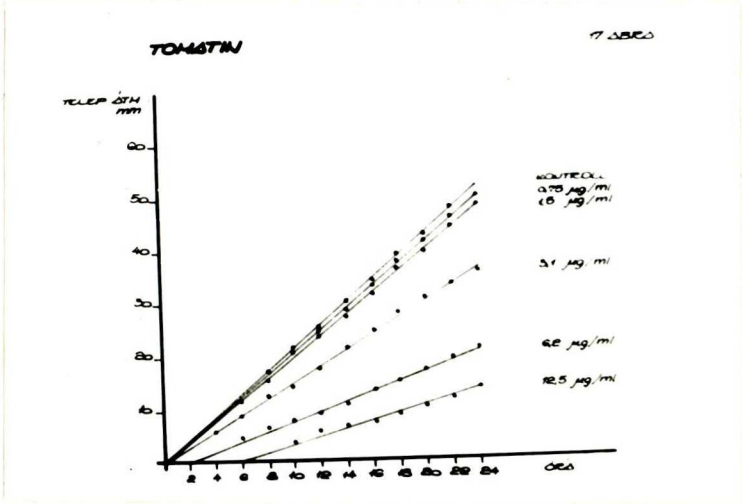
Korábbi vizsgálataink alapján felvetődött az a kérdés, hogy a mycelium oszlop teszt a vizsgálat korai időszakában /1-4 óra/ érzékenyebb-e, mint később /18-24 óra/. Ennek eldöntésére az alábbi 5 antifungális anyag hatását vizsgáltam 24 órán át - 2 órás időközökben mérve a telepátmérőt, pH 7-es Sabouraud táptalajon, 30°C-on inkubálva.

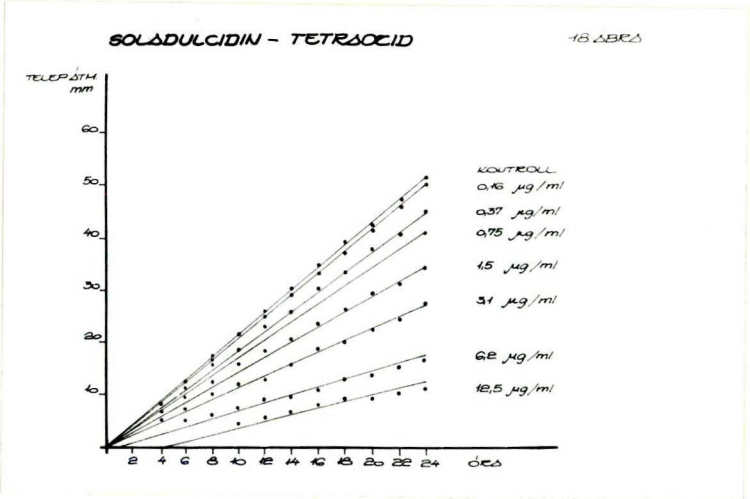
tomatin	100 µg/ml táptalaj
solasodulcidin tetraozid	100 µg/ml
nystatin	20 µg/ml

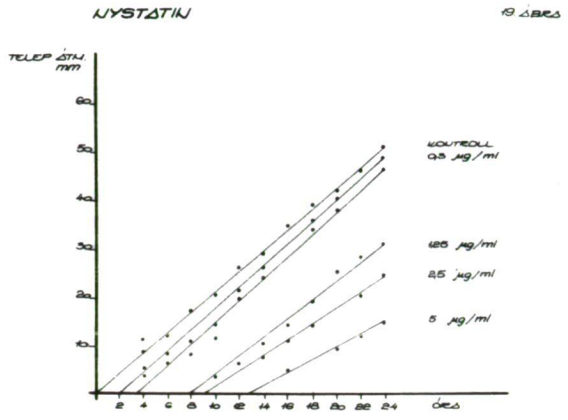
amphotericin B	50 µg/ml
griseofulvin	100 µg/ml

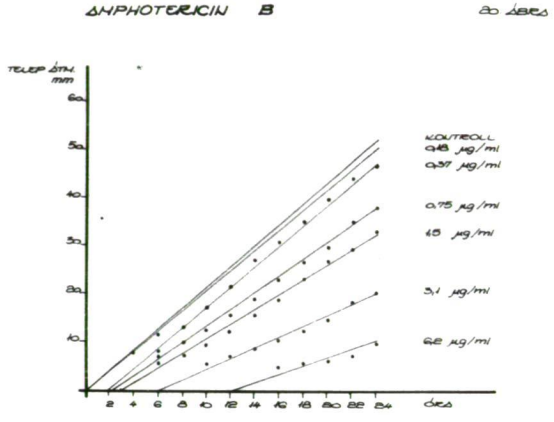
Az anyagokat dmso-ban oldottam és tizlépcsős felező higitást készítettem. A táptalajba olyan mennyiségű dmso-ban vittem be az anyagokat, hogy a táptalaj 1 %-nyi dmso-t tartalmazzon.

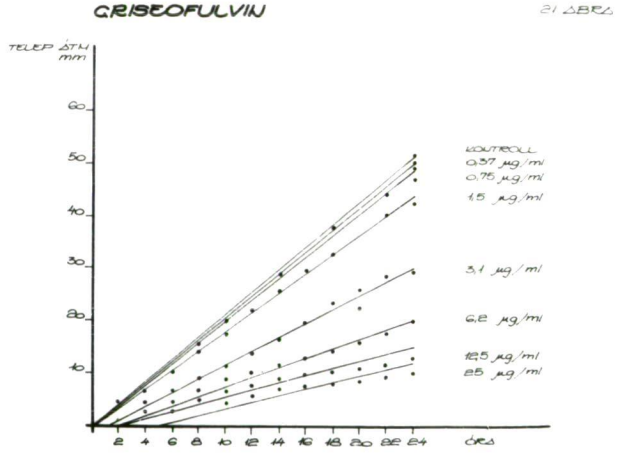
Eredmények: /17., 18., 19., 20., 21. ábra/











17-21. ábra. A vizsgált vegyületek gátló hatása az I. törzs növekedésére

Az adatok alapján megállapitható, hogy a vizsgált vegyületek magasabb koncentrációnál az inkubáció kezdeti időszakában a növekedésben teljes gátlás van, amely később részleges gátlásba megy át. Tehát a mikroba érzékenysége a vizsgálat korai időszakában nagyobb, mint 18-24 óra múlva. Ez egyben azt is jelenti, hogy kétórás inkubálás után kisebb koncentrációkat tudunk mérni, mint 24 óra múlva. Tehát a módszer egyrészt gyors,/kétórás eredmény is értékelhető/, másrészt igen érzékeny az inkubálás kezdeti időszakában.

7. Mikromódszer kidolgozása és a munkafolyamat ismertetése

Mivel mikromódszer kidolgozására törekedtem, Petri-csészék helyett a Takátsy-féle szerológiai mikrotitráló lapot használtam. Nagysága 128x92x10 mm, amely 8 sorban, soronként 12 db mélyedést tartalmaz. A lemezek pleziből vagy polisztirolból készülnek. A mélyedések metszetének profilja tölcsérszerű. Alul 5 mm, felül pedig 7 mm átmérőjű. A mélyedés 0,2 ml folyadék befogadására alkalmas. Egyetlen lemez 32 Petri-csészét helyettesit. Itt természetesen nem mérek telepátmérőt, csak azt nézem,

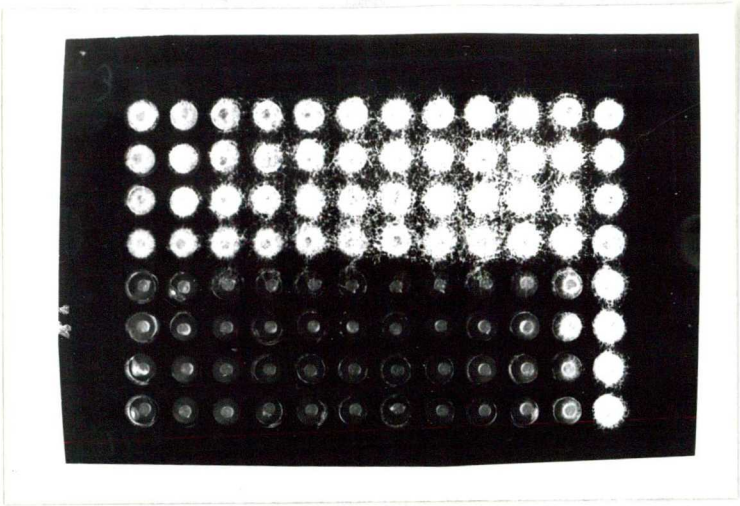
hogy + /van növekedés/, - /nincs növekedés/. Ez tö-
kéletesen elegendő ahhoz, hogy megállapitsam egy
vegyület minimális gátló koncentrációját.

A lemezen a mycelium-oszlop teszt kiválóan al-
kalmazható. Az oszlopátviteltől számitott 2 óra múl-
va már láthatunk növekedést, cytoplaszt alatt /25x
nagyitás/ könnyen el tudjuk dönteni a positivitást,
illetve negativitást. 24 órás inkubálás után ismét
leolvashatjuk az eredményt.

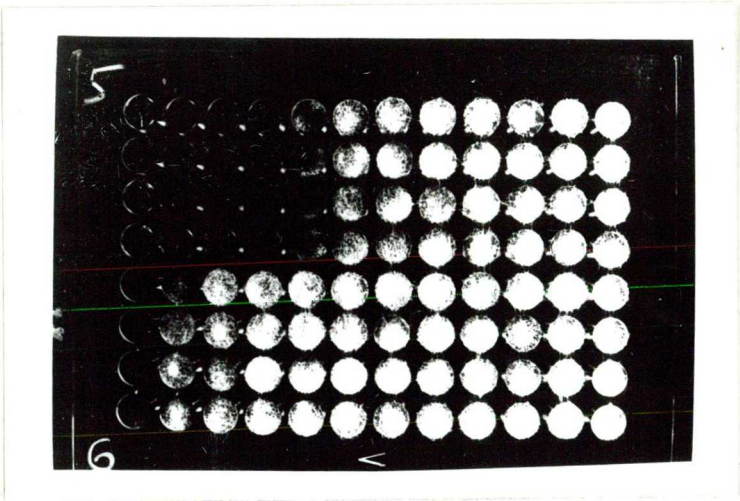
Fonalas tesztmikrobák esetében a mycelium-osz-
lop teszt mellett használhatunk konidium tesztet,
de ugyanigy dolgozhatunk élesztőkkel is /22., 23.,
24. ábra/. A táptalaj felületére meghatározott és
minden esetben ugyanolyan mennyiségü konidiumot,
illetve sejtet viszünk /egy mélyedésre 1 kacccsal
600 sejtet, illetve konidiumot/, ugyanis az inoku-
lum koncentrációja lényeges a vizsgálat érzékenysé-
ge szempontjából /Linton 1958/.

A munkafolyamat minden esetben a következő volt:
1. a kisérletet megelőző napon:

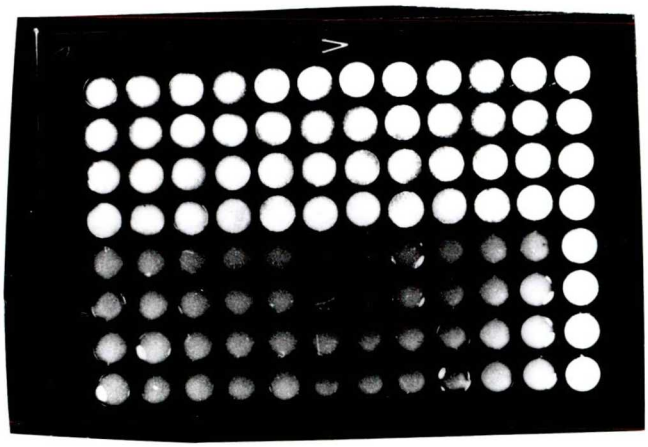
a/ leoltom a fonalas tesztmikrobát kb. 2 mm
vastagságú Sabouraud táptalajra Petri-csészében /az
előtenyészet táptaleja és pH-ja minden esetben meg
kell, hogy egyezzen a tulajdonképpeni kisérletben
alkalmazott táptalajjal és annak pH-jával/;



22. ábra. Actinomucor repens mycelium-oszlop teszt 24 órás inkubáció után



23. ábra. Actinomucor repens konidium teszt 24 órás inkubáció után



24. ábra. Candida albicans élesztőcejt teszt 24 órás inkubáció után

b/ elkészítem a vizsgálandó anyag oldószeres higitási sorozatát /minden esetben 11 lépcsős 2/3-oló higitást alkalmaztam, az utolsó mélyedést kontrollként használtam/;

c/ tiszta /HCl-dal kiforralt/ kémcsövek előkészítését végeztem el, a táptalajhigitási sorozat elkészítéséhez.

2. A kísérlet napján:

a/ táptalaj felfőzése, lemezek sterilezése UV alatt;

b/ 50-70°C-os vízfürdőn levő kémcsövekbe a higitási sorozathoz szükséges, megfelelő mennyiségű táptalaj bepipettázása;

c/ az oldószeres higitási lépcsőkből megfelelő mennyiség átvitele /úgy számolunk, hogy az lehetőleg 0,05 vagy 0,1 ml legyen/ a kémcsőben levő táptalajba;

d/ az így elkészitett táptalajhigitási sorozat lépcsőnkénti bevitele a lemezek mélyedéseibe;

e/ a mycelium-oszlopok rávitele a táptalaj felületére, a már előzőekben ismertetett módon, vagy konidium, illetve sejtleoltás szuszpenzióból oltókaccsal.

8. Petri-csészében és Tekátny lemezen végzett kisérlet Összehasonlitása

A mikromódszerrel kapcsolatosan felmerült az a kérdés, hogy a 0,2 ml táptalaj és a benne levő hatóanyag mennyisége ugyanazt a miliőt biztositja-e a tesztmikrobának, amit egy Petri-csésze. Vajon a kis táptalaj- és gátlószermennyiség - bár a koncentráció ugyanaz - ugyanazt a gátló koncentrációt eredményezi-e, amit a Petri-csészében végzett vizsgálatnál tapasztaltam. Ennek megállapitására Összehasonlító vizsgálatot végeztem három anyaggal /az anyagokat dmso-ban oldottam/. Sabouraud táptalajon /pH 7, Na_2CO_3-dal/:

nystatin	10 μg/ml táptalaj
oxy/trans/-demethoxy-cryptopleurin	10 μg/ml
digitonin	100 μg/ml

Ezen törzsoldatokból 11 lépcsős 2/3-oló higitási sorozatot készítettem. A táptalajhigitási sorozatot egyrészt lemezekben, másrészt Petri-csészékben vizsgáltam.

Tesztmikrobaként

Actinomucor repens I.

Syncephalastrum racemosum

gombákat használtam. Mycelium-oszlop és konidium tesztet alkalmaztam. 30°C-on inkubáltam és 24 órás eredményeket hasonlítottam össze.

Eredmények: /1. táblázat/

A kétféle változatban elvégzett kísérlet eredményeinek egy része teljesen megegyezik, a többinél az eltérések hibahatáron belül vannak /egy higitási lépcső/, tehát a Takátsy-féle lemezen a módszer érzékenysége nem csökken.

Az antifungális anyagok aktivitás-vizsgálatához egy teljesen új, eddig még nem közölt, mikrobiológiai mérőmódszert dolgoztam ki. Tesztmikroorganizmusnak az Actinomucor repens 215 /I./-t találtam log-

Anyagok	eszközök	Actinomucor repens Syncephalastrum racemosum			
		Mycelium-oszlop teszt	Konidium teszt	Mycelium oszlop teszt	Konidium teszt
nystatin	csésze	10	10	4,4	0,88
	lemez	6,6	6,6	4,4	0,59
digitonin	csésze	4,4	2,9	2,9	1,3
	lemez	2,9	4,4	4,4	1,3
oxy/trans/-demethoxy-cryptopleurin	csésze	1,9	0,88	1,9	0,88
	lemez	1,9	0,88	1,9	0,88

1. táblázat. A vegyületek minimális gátló koncentrációi µg/ml-ben

megfelelőbbnek, és más gombák is felhasználhatók. A módszer kidolgozásakor figyelemmel voltam a táptalaj és megfelelő inkubációs hőmérséklet kiválasztására /a mikroorganizmus növekedési gyorsaságának fokozására/; a szerves oldószerek növekedésgátló hatására, valamint arra, hogy a módszer megbízható és kis anyagigényű legyen.

A mikromódszert a gyakorlatban több helyen fel lehet használni, pl. antifungális vegyületek koncentráció-változásának követésére, - mivel igen gyors, érzékeny és kis anyagmennyiséget igényel. Egy ilyen vizsgálatnak igen nagy jelentősége lenne szisztémás mykozisok esetén, ugyanis a megfelelő gyógyszert /griseofulvin, amphotericin B, nystatin stb./ pontosan és megfelelő időben lehetne adagolni. Antibakteriális anyagok vizsgálatánál - baktériumok felhasználásával - szintén hasznos módszer lehet. Ugyancsak alkalmazható antifungális vegyületek screen vizsgálatánál is.

ÖSSZEFOGLALÁS

Disszertációm a szteroid glikozidok antifungális hatásával foglalkozik; a mikrobiológiai aktivitás és a kémiai szerkezet kapcsolatát és annak eredményeire támaszkodva gyakorlati felhasználásuk lehetőségét vizsgáltam.

A vizsgálati cél megkívánta azt, hogy egy új mikromódszert dolgozzak ki /Új mikrobiológiai mérőmódszer cím alatt ismertettem/, amellyel az aktivitás-szerkezet kapcsolatát értékelni tudom. A módszert - mintegy a módszer megbízhatóságának és alkalmazhatóságának igazolására - a Cynanchum vincetoxicum hatóanyagainak és szintetikus származékainak aktivitás összemérésére is felhasználtam.

A gyakorlati felhasználás gondolatának felvetése kézenfekvő volt, mivel Magyarországon a Solanum laciniatumot intenzíven termesztik, iparilag vonják ki a solamarginé és a solasoniné a szintetikus szteroid hormonok gyártásához. Ezért vizsgáltam meg ezen két vegyület aktivitását humánpatogén gombákkal szemben és ezért dolgoztam ki mikrobiológiai módszert a Solanum laciniatum hatóanyagra történő nemesítéséhez. A gyakorlati felhasználás lehetőségét tovább szélesí-

tettem azzal, hogy a solaradixin solasoninná történő átalakithatóságát is megvizsgáltam.

1. Munkám során eddig még nem közölt eljárással előállitottam a tomatint /Solanum lycopersicum L.-ből/, a soladulcidin tetraozidot /Solanum dulcamara L.-ből/, és a solaradixint /Solanum laciniatum Ait.-ból/. A solamargint oszlopkromatográfiával választottam el a solasoninától, a Tiszavasvári Alkaloidagyárban előállitott solamargin-solasonin glikozidkeverékből. A tomatint és a soladulcidin tetraozidot /és aglikonjait/ vékonyrétegkromatográfiás módszerrel - kémiai -, a glikozidoknál mikrobiológiai előhivással is azonositottam.

2. Megállapitottam, hogy a szteroid glikozidok mikrobiológiai aktivitása és kémiai szerkezete között szoros kapcsolat van. A vegyületeket tomatin : soladulcidin tetraozid, solamargin:β-solamarin, solamargin:solamargin-H_2:dioscin párositásban vizsgáltam Actinomucor repens, Syncephalastrum racemosum, Candida albicans és Hansenula anomala mikroorganizmusok alkalmazásával. A tomatin kvalitativ és kvantitativ hatása csaknem teljesen azonos a soladulcidin tetraozidéval; a solamarginnak pedig a β - solamarinéval, - bár az előbbi nagyobb hatásúnak látszik. A szteroid vázF gyürüjében levő N atom szterikus helyzete nem

befolyásolja lényegesen a vegyületek mikrobiológiai aktivitását. A solamarginnak, a solamargin-H_2 és dioscin relációjában végzett összehasonlító vizsgálata azt mutatta, hogy a szteroid váz megváltozása maga után vonja az aktivitás változását is - solamargin-H_2 esetében a dioscinhoz hasonló csökkenés volt /kivétel a Hansenula anomala/.

3. Az általam kidolgozott módszert a Cynanchum vincetoxicum hatóanyagainak és szintetikus származékainak - 1A cryptopleurin, illetve tylophorin származék - aktivitás-összehasonlításánál is alkalmaztam /tesztmikroorganizmusok: Candida albicans, Actinomucor repens/. Cryptopleurin származékoknál legnagyobb hatása magának a cryptopleurinnak van, oxy-, demetoxy-, acetyl-származékainál sorrendben csökken, az oxo-származék hatástalan. A tylophorin vegyületek esetén a legnagyobb aktivitással a természetesen előforduló demetoxy-tylophorin bir /C-1/ vegyület. A metoxy csoportot nem tartalmazó phenantro-chinolizidin vázas származékok vizsgálatakor kiderült, hogy a váz maga is aktív, az oxy csoport csökkenti az aktivitást, az oxo és hydrazo származékok hatástalanok.

4. 21 gombatörzzsel vizsgáltam a solaradixin mikrobiológiai átalakíthatóságát solasoninná. Három törzs /Aspergillus japonicus, Aspergillus foetidus

és Aspergillus awamori/ a mikrobiológiailag inaktív solaradixint aktív solasoninná alakították át. A Mucor racemosus és Mucor spinosus törzsek pedig egy másik - nem azonosított - mikrobiológiailag inaktív vegyületet állítottak elő a solaradixinből. A többi törzs nem okozott változást.

5. A solamargin-solasonin 2:1 arányú glikozidkeverék hatását vizsgálva megállapítható, hogy a 21 Dermatophyton közül a 200 µg/ml-es glikozid-koncentráció 6 napig az összes törzset gátolja a növekedésben, 100 µg/ml 16 törzset még 12 nap után is, 50 µg/ml 14 törzset 6 napig, - köztük pl. az Epidermophyton floccosum-ot, az egyik leggyakoribb fertőzésokozót. A vizsgálatban szereplő 26 Candida albicans közül a 200 és 100 µg/ml-es glikozid koncentráció csupán 1 törzset nem gátolt a növekedésben, 50 µg/ml-es glikozid koncentrációnál 19 törzs esetében 48 óra után is teljes gátlást tapasztaltam. A glikozidkeverék időbeli hatását Candida albicans élősejtszám-meghatározással követtem. Savas /pH 4/ közegben a keverék elveszíti aktivitását, lúgos közegben, - pH 9-nél - 50 µg/ml glikozid koncentrációnál 6 óra után már nincs élősejt a vizsgálati elegyben. Semleges /pH 7/ közegben 6 óra alatt az élősejtszám 50 %-kal csökken. A disszertációnk megírása közben megkes-

dett állatkísérletek eredményei alapján /OKI/ a glikozidkeverék ígéretes gyógyszernek bizonyul.

6. A Solanum laciniatum hatóanyagra történő nemesítésre mikrobiológiai mérőmódszert dolgoztam ki, amelynek alkalmazásával egyedenkénti szelekciót lehet végezni. A módszer egyszerűsége, gyorsasága, kis anyagigénye előnyt biztosít az irodalomban ismeretes módszerekkel szemben.

BIBLIOGRAPHY

Abbott, D.C.-Field, K. and Johnson, B.I. 1960. Observation on the correlation of anticholinesterase effect with solanine of potatoes. Analyst, 85: 375.

Alauddin, M. and Martin-Smith, M. 1962a. Biological activity in steroids possessing nitrogen atoms. Part I. Synthetic nitrogenous steroids. J. Pharm. Pharmacol., 14: 325.

Alauddin, M. and Martin-Smith, M. 1962b. Biological activity in steroids possessing nitrogen atoms. Part II. Steroidal alkaloids. J. Pharm. Pharmacol., 14: 469.

Alkemeyer, H. and Sander, H. 1959. Ein Glycoalkaloid aus Solanum dulcamara L. Naturwiss., 46: 207.

Allen, E.H. and Kuc, J. 1964. Steroid alkaloids in decease resistance of white potato tubers. Phytopathology, 54: 886.

Allen, E.H. and Kuc, J. 1968. α-solanine and β-chachonine as fungitoxic coumpounds in extracts of Irish potato tubers. Phytopathology, 58: 776.

Arneson, P.A. and Durbin, R.D. 1966. Detoxification of tomatine by Septoria lycopersici. Phytopathology, 56: 870.

Arneson, P.A. and Durbin, R.D. 1967. Hydrolysis of tomatine by Septoria lycopersici. A detoxification mechanism. Phytopathology, 57:1358.

Arneson, P.A. and Durbin, R.D. 1968. To sensitivity of fungi to α-tomatidine. Phytopathology, 58: 536.

Bangham, A.D. and Horne, R.W. 1962. Action of saponine on biological cell membranes. Nature, 196: 952.

Bansikov, V.M. i Konovalov, M.N. 1966. Dalnejšie izucsényije lecsevnih szregosstv iz ssaponinov protiv cserevralnovo ateroszklerosa. Herba Hung., 5: 153.

Berek, I. and Novák, E.K. 1969. Some contribution to the action of nystatin on yeasts. II. Internationales Symposium Wirkungsmechanismen von Fungiciden Antibiotika und Cytostatika. Reinhardsbrunn. /in Press/.

Betina, V. and Baráth, Z. 1964. Bioautographic detection of antibiotics in preparative thin-layer chromatography. Jour. Antibiot., 17: 127.

Birner, J. 1969. Determination of total steroid basis in Solanum species. Journ. of Pharmaceutical Sciences, 58: 258.

Bito, P., Jóksy, L. und Pongrácz-Stark, L. 1962. Neuere Angaben über die Steroidsubstanzen des Solanum laciniatum. Acta Chim. Acad. Sci. Hung., 34: 363.

Bito, P. és Magyar, Gy. 1966a. $\Delta^{3,5}$ kettős kötésű szteroidok előállítása. Magyar Kémiai Folyóirat. 72: 201.

Bito, P. és Rettegi, T. 1966b. Szteroid-glikozidok előállítása. Magyar Kémiai Folyóirat, 72: 512.

Bito, P. and Rettegi, T. 1967. Preparation of steroid glycosides. Acta Chim. Acad. Sci. Hung., 52: 79.

Bito, P. and Shabana, M.M. 1969. Solanum glycosides. III. Dioscin. Acta Chim. Acad. Sci. Hung., 62: 283.

Bito, P. Shabana, M.M. Jókay, L. and Pongrácz-Stark, L. 1970. Solanum glycosides. IV. Solarodizin. Acta Chim. Acad. Sci. Hung., 63: 343.

Blunden, G. and Harman, R. 1968. Quantitativ estimation of monohydroxy saturated steroidal sapogenin in plant materials by densitometric thin-layer chromatography. J. Chromatog., 34: 507

Bognár, R. és Makleit, S. 1965a. Szteroidalkaloid-glikozidok. A Solanum dulcamara L. szteroidalkaloid-glikozid tartalmáról. Herba Hung., 4: 101.

Bognár, R. und Makleit, S. 1965. b. Steroidalkaloid-glykoside. 8. Mitteilung: Zusammenfassung der eigenen bisherigen Untersuchungsergebnisse über das Vorkommen von Steroidalkaloidglykosiden in Pflanzen der Gattung Solanum. Pharmazie, 20:40.

Boll, P.M. and Andersen, B. 1962a. Alkaloidal glycosiden from Solanum dulcamara III. Differentiation of geographical strains by means of thin-layer chromatography. Planta Med., 10: 421.

Boll, P.M. 1962b. Alkaloidal glycosides from Solanum dulcamara. II. Three new alkaloidal glycosides and a reassessment of Soledulcamaridine. Acta Chem. Scand., 16: 1519.

Boll, P.M. 1963a. Alkaloidal glycosides from Solanum dulcamara. IV. The constitution of β- and γ-solamarine. Acta Chem. Scand., 17: 1852.

Boll, P.M. 1963b. Alkaloidal glycosides from Solanum dulcamara. V. The constitution of α-solamarin. Acta Chem. Scand., 17: 2126.

Briggs, L.H. Brooker, E.G., Harvey, W.E. and Odell, A.L. 1952. Solanum alkaloids. Part VIII. Solamargine, a new alkaloid from Solanum marginatum. J. Chem. Soc. /London/, 3: 3582.

Briggs, L.H. Cambie, R.C. and Hoare, J.L. 1963. Solanum alkaloids. Part XVI. The sugar moiety of solanine. J. Chem. Soc. /London/, 2848.

Creanga, E. und Mustescu, I. 1968. Bestimmung von Solasodin in Solanum laciniatum. Pharmazie, 23: 724.

Edwards, C.H. Edwards, G.A. and Gadsen, E.L. 1964. Tomatine and digitonin as precipitating agents in the estimation of cholesterol. Anal. Chem., 36: 420.

Ellis, E.M. and Donald, C.H. 1965. A rapid antibiotic sensitivity test. Am. Jour. of Med. Tech., 18: 61.

Ferenczy, L., Horváth, K. und Zsolt, J. 1966a. Dünnschichtchromatographie von antifungalen Substanzen aus höheren Pflanzen. Herba Hung., 5: 88.

Ferenczy, L., Zsolt, J., Hámnagy, A., Tóth, L. and Szendrein K. 1966b. The antifungal compounds of Cynanchum vincetoxicum /L./ Pers. I. The quantitative antifungal spectrum of substance C-1. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 12: 337.

Ferenczy, L. and Kevei, F. 1967a. Studies on antifungal steroid glycosides I. Data on the mode of action of some antifungal steroid glycoalcaloids. Wirkungsmechanismen von Fungiziden und Antibiotika. I. Internat. Symposium, Reinhardsbrunn, 1966. Akad. Verlag, Berlin, pp. 59.

Ferenczy, L. and Kevei, F. 1967b. Mechanism of action of antifungal steroid glycoalkaloids. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 14: 127.

Ferenczy, L. 1968. Szóbeli közlés.

Ferenczy, L., Kevei, F., Berek, I. and Téren, J. 1969. Some new data on the antifungal effects of steroid glycosides. II. Internationales Symposium Wirkungsmechanismen von Fungiciden, Antibiotika und Cytostatica. Reinhardsbrunn. /in Press/.

Ferenczy, L., Kevei, F., Zsolt, J., Téren, J., and Berek, I. 1970a. Sensitivity of fungal protoplast to various antibiotics. Proceedings of the Second International Symposium on Yeast Protoplasts /Ed.: O. Necas and A. Svoboda/ University J.E. Purkyne, Brno. pp. 95.

Ferenczy, L., Shabana, M.M. and Bito, P. 1970b. Solanum glycosides. VI. Preparation of solasonine from solarodixine with Aspergillus japonicus culture. Acta Chim. Acad. Sci. Hung., 65: 101.

Fontaine, T.D. Irving, G.W. Ma, R.H. Poole, J.B. and Doolittle, S.P. 1948. Isolation and partial characterization of crystalline tomatine, an antibiotic agent from the potato plant. Arch. Biochem., 18: 467.

Fontaine, T.D. Ard, J.S. and Ma, R.M. 1951. Tomatidine, a steroid secundary amine. J. Am. Chem. Soc., 73: 878.

Földesi, D. Máthé, I. und Tétényi, P. 1962. Solanum aviculare Forst.- Solanum laciniatum Ait. Pharmazie, 17: 777.

Fraenkel, G.S. 1959. The raisondd'etre of secondary plant substances. These odd chemicals arose as a mean protecting plants from insects and now guide insects food. Science, 129: 1466.

Fridrichsons, J. and Mathieson, A. McL. 1954. Stucture of a derivate of cryptopleurine. Nature, 173: 732.

Glauert, A.M., Dingle, J.T. and Lucy, J.A. 1962. Action of saponine on biological cell membranes. Nature, 196: 953.

Graess, L. und Szász, K. 1962. Bestimmung des Steroid-alkaloid-Gehaltes einiger Solanaceaen-Drogen mit Hilfe einer neuen, kolorimetrischen Methode. Arch. Pharm., 295/67: 895.

Grove, D.C. and Randell, V.A. 1955. Assay methods of antibiotics. /Medical Encyclopedia, New York/.

Gyenes, I. 1950. Alkaloidák mikromeghatározása 0,05 n-paratoluolszulfosavval. Magyar Kémiai Folyóirat, 56: 383.

Gyenes, I. 1953a. Szteránvázas glukoalkaloidok I. Tomatin és tomatidin meghatározása 0,005 n paratoluolszulfonsavval; tomatintartalmú drog értékmeghatározása. Magyar Kémiai Folyóirat, 59: 353.

Gyenes, I. 1953b. Tomatin meghatározása 0,005 n paratoluolszulfonsavval. Magyar Kémiai Folyóirat, 59: 159.

Hamilton, P.B. and Cock, C.B. 1968. Some techniques for tioautography of antimicrobial substances on thin-layer chromatograms. J. Chromatog., 35: 295.

Hoskins, R.H. 1965. Sterols and temperature tolerance in the fungus Pythium. Science, 157: 1559.

Hársnagy, A., Tóth, L. és Szendrei, K. 1967. A Cynanchum vincetoxicum /L./ Pers. gyökerének hatóanyagairól. Acta Pharm. Hung., 37: 186.

Heftmann, E. 1965. Thin-layer chromatography of steroids. Chrom. Reviews, 7: 179.

Imai, S. Murata, T. Fujioka, S. Murata, K. and Goto, M. 1967a. Studies on crude drugs and oriental crude drug preparations by bioassay. Search for biologically active plant ingredients by means of antimicrobial test /3/. On the antifungal principles of Dioscorea sp. Annual Report of the Takeda Research Laboratories, 26: 66.

Imai, S. Fujioka, S. Murata, E. Goto, M. Kawasaki, T. and Yamauchi, T. 1957b. Studies on crude drugs and oriental crude drug preparations by bio-assay. Search for biologically active plant ingredients by means of antimicrobial tests /4/. On the antifungal activity of diosgin and related compounds. Annual Report of the Takeda Research Laboratories, 26: 76.

Irving, G.W. Fontaine, T.D. and Doolittle, S.P. 1945. Lycopersicon a fungistatic agent from the tomato plant. Science, 102: 9.

Irving, G.W. Fontaine, T.D. and Doolittle, S.P. 1946. Partial antibiotic spectrum of tomatine an antibiotic agent from the tomato plant. J. Bacteriol., 52: 601.

Irving, G.W. 1947. The significance of tomatine in plant and animal desease. J. Washington Acad. Sci., 37: 293.

Jackson, I.L.W. Dye, W.E. and Mitchell, R.B. 1954. Use of haemoglobin indicator for rapid method of determining antibiotic sensitivity of microorganisms. Rep. Biol. and Med., 12: 171.

Kabore, J.J. McLaughlin, J.T. and Riegel, C.H. 1961. Quantitative microdetermination of cholesterol using tomatine as precipitating agent. Anal. Chem., 33: 305.

Kavanagh, F. 1963. Analitical microbiology. Academic Press /New York/.

Kawasaki, T. Yamauchi, T. and Yamauchi, K. 1962a. Saponins of Japanese Dioscoreaceae. X. Kikuba saponin. Chem. Pharm. Bull., /Tokyo/ 10: 698.

Kawasaki, T. and Yamauchi, T. 1962b. Saponins of Japanese Dioscoreaceae. XI. Structures of dioscin, gracillin and kikuba saponin. Chem. Pharm. Bull., /Tokyo/ 10: 703.

Kawasaki, T. and Miyahara, K. 1963. Thin layer chromatography of steroid saponins and their derivates. Chem. Pharm. Bull., /Tokyo/ 11: 1346.

Kern, H. 1962. Über die Beziehungen zwischen dem Alkaloidgehalt verschiedener Tomatensorten und ihrer Resistenz gegen Fusarium lycopersici. Phytopathol. Z., 19: 351.

Kovei, F. 1967. Hatásmódvizsgálatok szelektiv antifungális aktivitású szteroidglikozidokkal. Doktori értekezés. Szeged.

Kline, B.M. and Golab, T. 1965. A simple technique in developing thin-layer bioautographs. J. Chromatog., 18: 409.

Koch, W. and Kaplan, D. 1965. Micromethod for measuring microbial sensitivity to drugs. Nature, 208: 50.

Konovalov, M.M. 1966. Pervije itogi perszpectivi iszpolszovanyija dlja lecsenyija ateroszklerosza. Herba Hung., 4: 119.

Koopmans, R.K. 1960. A new, simple quantitative micromethod for the rapid determination of bacterial susceptibility. Antibiotics and Chemotherapy, 10: 612.

Kosova, V. und Hajkova, I. 1961. Beitrag zur chromatographischen Auswertung von Glikoalkaloiden in Solanum aviculare Forst. Planta Med., 9: 216.

Kuhn, R. und Löw, I., 1947. Über Demissin, ein Alkaloidglykosid aus den Blättern von Solanum demissum. Chem. Ber., 80:406.

Kuhn, R. Löw, I. und Gauche, A. 1950. Über das Alkaloid-Glykosid von Lycopersicum esculentum var. pruniforme und seine Wirkung auf die Larven des Kartoffelkäfers. Chem. Ber., 83: 448.

Kuhn, R. und Löw, I. 1952a. Abbau von Tomatin zum Tigogenin lacton. Chem. Ber., 85: 416.

Kuhn, R. Löw, I. und Trischmann, H. 1952b. Überführung von Tomatidin in Demissidin. Angew. Chem., 64: 397.

Kuhn, R. Löw, I. und Trischmann, H. 1953a. Abbau von Tomatidin zum 5-Methyl-2-äthyl-pyridin. Chem. Ber., 86: 372.

Kuhn, R. und Löw, I. 1953b. Über Lycobiose und Lycotriose, ein Disaccharid und Trisaccharid aus Tomatin. Chem., Ber., 86: 1027.

Kuhn, R. und Löw, I. 1954. Die Konstitution des Solanins. Angew. Chem., 66: 639.

Kuhn, R. und Löw, I. 1955a. Die Alkaloidglukoside der Blätter von Solanum aviculare. Chem. Ber., 88: 289.

Kuhn, R. Löw, I. und Trischmann, H. 1955b. Die Konstitution des Solanins. Chem. Ber., 88: 1492.

Kuhn, R. Löw, I. und Trischmann, H. 1956. Die Konstitution des Tomatins. Angew. Chem., 68: 212.

Kuhn, R. und Löw, I. 1957a. Neue Alkaloidglycoside in den Blättern von Solanum chacoense. Angew. Chem., 69: 236.

Kuhn, R. Löw, I. und Trischman, H. 1957b. Die Konstitution der Lycotetrose. Chem., Ber., 90: 203.

Kuhn, R. und Löw, I. 1961. Zur Konstitution der Leptine. Chem. Ber., 94: 1088.

Kupchan, S.M. Barboutis, S.J., Knox, J.R. and Cam, C.A.L. 1965. Beta-solamarine: tumor inhibitor isolated from Solanum dulcamara. Science, 150: 1827.

Lahiri, S.C., Maiti, P.C. and Chatterjee, I. 1966. Pharmacological properties of a glykoalkaloidal fraction obtained from Solanum auriculatum Ait., Experientia, 22: 464.

Lénárd, I. és Tuzson, P. 1959. Solanum-alkaloidák VII. A Solanum aviculare szolanszodin tartalmának meghatározásáról. Acta Pharm. Hung., 29: 146.

Linton, A.H. 1958. Influence of inoculum size on antibiotic assay by the agar diffusion technic with Klebsiella pneumoniae and streptomycin. Journ. Bact., 94: 76.

Makleit, S., Bognár, R. és Dobos, L. 1963. Szteroidalkaloid-glikozidok IV. Gyakorlati szempontból jelentős Solanum fajok. Herba Hung., 2:19.

Makleit, S. 1966. Szteroidalkaloid-glikozidokkal és szteroidalkaloid-aglikonokkal kapcsolatos vizsgálatok. Kandidátusi értekezés. Debrecen.

Makleit, S., Bognár, R. és ifj. Máthé, I. 1967. Szteroidalkaloid-glikozidok. XII. További Solanum dulcamara L. törzsek vizsgálata. Herba Hung., 6: 13.

Manske, R.H.F. 1968. The alkaloids chemistry and physiology. Academic Press /New York, London/ p. 15.

Martin-Smith, M. and Sugrue, M. 1964. Biological activity in steroids possessing nitrogen atoms: recent advances. J. Pharm. Pharmacol., 16: 569.

Mc Kee, R.K., 1959. Factors affecting the toxicity of solanine and related alkaloids to Fusarium caeruleum. J. Gen. Microbiol., 20:686.

Mann, J.J., McBain, J.B. and Dennis, M.I. 1964. Detection of naturally occuring cholinesterase inhibitors in several crops by paper chromatography. Nature, 202: 697.

Mann, J.J. and McBain, J.B. 1966. Detection of cholinesterase-inhibiting insecticide chemicals and pharmaceutical alkaloids on thin-layer chromatograms. Nature, 209: 1351.

Patt, P. und Winkler, W. 1960. Zur Darstellung und Bestimmung von Solanin durch Ionenaustausch. Arch. Pharm., 293: 846.

Pápai, I. és Berek, I. 1967. A Solanum dulcamara L. antifungális anyaginak vizsgálata. VIII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia. Pályamunka. Debrecen.

Perez-Medina, L.A., Travocedo, E. and Devia, J.E. 1964. Glycoalcaloids in Columbian Solanaceae I. Planta Med., 12: 478.

Rajam, P.C. and Adcock, I.D. 1953. A rapid test for screening the sensitivity of Staphylococci to antibiotics. Am. Jour. Clin. Path., 23: 1168.

Ripperger, H. und Schreiber, K. 1968. Struktur von Paniculonin A und B, zwei neuen Spirostenglykosiden aus Solanum paniculatum L. Chem. Ber., 101: 2456.

Rozumek, K.E. und Sander, H., 1967. Ein Beitrag zur chemischen Differenzierung innerhalb der Art von Solanum dulcamara L. Arch. Pharm., 300: 316.

Rozumek, K.E. 1969. Dünnschicht-chromatographische Trennung von Tomatidenol, Solasodin und Soladulcidin bzw. Yamogenin, Diosgenin und Tigogenin. J. Chromatog., 40: 97.

Rushentseva, A.K. and Tubina, I.S. 1959. Determination of solasodine in Solanum aviculare and in pure solasodine preparation. Med. Prom., SSSR, 13: 40.

Saber, A.H., Balboa, S.I. and Zaky, A.Y. 1968. A pharmacognostical study of Solanum burbankii Bitter. Planta Med., 16: 191.

Sander, H., Alkemeyer, M. and Hänsel, R. 1960. Eine neue Methode zur Trennung der Glycoalkaloide von Solanum dulcamara L. Pharmaceut. Acta Helv., 35: 30.

Sander, H., Hanzer, H. und Hänsel, R. 1961. Über die Tomatinbildung in Tomaten-keimlingen. 1. Mitteil.: Nachweis neutraler und basischer Saponine in etiolierten Keimlingen. Planta Med., 9: 8.

Sander, H., Alkemeyer, M. und Hänsel, R. 1962. Über Solanum dulcamara L. 4. Mitteil.: Chemische Differenzierung innerhalb der Art und Isolierung von Soladulcidintetraosid. Arch. Pharm., 295: 6.

Sander, H. 1963a. Über Solanum dulcamara L. 7. Mitteil.: Abbau von Sirosolanolglycosiden in reifenden Früchten. Planta Med., 11:23.

Sander, H. 1963b. Über Solanum dulcamara L. 8. Mitteil.: Chemische Differenzierung innerhalb der Art Solanum dulcamara L. Planta Med., 11: 303.

Schreiber, K. 1954. Solanum-Alkaloide I. Mitt.: Solacaulin, ein neues Glykoalkaloid aus den Blättern von Solanum acaule. Chem. Ber., 87: 1007.

Schreiber, K. und Aurich, O. 1963a. Solanum Alkaloide. XXV. Mitt.: Identifizierung von Tomatin als ein Hauptalkaloid der Wildkartoffel Solanum demissum Lindl. Z. Naturforsch., 18b.: 471.

Schreiber, K., Aurich, O. and Oeske, G. 1963b. Solanum alkaloids XVIII. Thin-layer chromatography of Solanum steroid alkaloids and steroidal sapogenins. J. Chromatog., 12: 63.

Schreiber, K. und Bipperger, H. 1963c. Isolierung einiger Glykoside aus Solanum armatum R. Br. Solanum-Alkaloide. XXXVI. Mitteil. Arch. Pharm., 296/68: 792.

Schreiber, K. und Rönsch, H. 1965. Die Steroidalkaloide und -sapogenine chemisch unterschiedlicher Sippen von Solanum Dulcamara L. LIII. Mitteil.: Solanum Alkaloide Arch. Pharm., 298: 285.

Shimada, S. 1969. Antifungal steroid glykoside from sea cucumber. Science, 163: 1462.

Stillwell, M.A. and Hodgson, A. 1968. A rapid test for an antifungal substance produced by a wood-inhabiting fungus in culture. Can. Jour. of Microbiol., 14: 807.

Stürckow, B. und Quadbeck, G. 1958. Elektrophysiologische Untersuchungen über den Geschmacksinn des Kartoffelkäfers Leptinotarsa decemlineata Say. Z. Naturforsch., 13b.: 93.

Szász, K., Gracza, L. és Lőrincz, Cs. 1961. Növénynemesitésnél alkalmazható gyorsmódszer. Acta Pharm. Hung., 31: 211.

Szilágyi, I. és Tétényi, P. 1967. Módositott szolanszodin meghatározás. Herba Hung. 6: 231.

Tomowa, M. 1962. Untersuchung von Solanum-Arten auf Glykoalkaloidgehalt 3. Mitteil.: Untersuchung über Solanum dulcamara L. var. persicum Willd. Planta Med., 10: 450.

Tomowa, M. 1964. Untersuchung des Glycoalkaloidgehalts einiger Solanum-Arten 4. Mitteil.: -Solamargin in Solanum dulcamara L. var. persicum Willd. Planta Med., 12: 541.

Tschesche, R. und Wulff, G. 1964. Konstitution und Eigenschaften der Saponine. Planta Med., 12: 272.

Tschesche, R. und Wulff, G. 1965. Über die antimikrobielle Wirksamkeit von Saponinen. Z. Naturforsch., 20b.: 543.

Tuzson, P. 1953. A paradicsomlevél tomatin-tartalmáról. Acta Pharm. Hung., 24: 5.

Tuzson, P. és Kiss, Z. 1957. Solanum-alkaloide, II. Soladulcidin. Acta Chim. Acad. Sci. Hung., 12: 31.

Tuzson, P., Magyar, G. and Kiss, Z. 1958. Solanum-alkaloidák. III. Solanum-fajok vizsgálata. Acta Pharm. Hung., 28: 151.

Uhle, F.C. and Moore, J.A. 1954. The partial synthesis of tomatidine. J. Am. Chem. Soc. 76: 6412.

Vahouny, C.V., Borja, C.R. and Weersing, S. 1953. Radioactive and analytical determination of free and esterified cholesterol following micro thin-layer silicid acid chromatography. Anal. Biochem., 6: 555.

Valle, E. 1957. On antifungal factors in potato leaves. Acta Chem. Scand., 11: 395.

Valovics, Gy-né. 1964. A szolaszonin meghatározása Solanum laciniatum növényben. Herba Hung., 3: 433.

Vágujfalvi, D., Kold, Gy. und Tétányi, P. 1966. Basische und neutrale Steroidsapogenine in Solanum-Arten. Arch. Pharm., 299: 812.

Vendrig, J.C. 1964. Groth-regulating activity of some sapenins. Nature, 203: 1301.

Visnyowski, E. 1971. Szébeli küzlés.

Waclaw, B. and Roskrutowa, I. 1965. The adaptation of the Clarke's reaction to the quantitative solasodin estimation. Diss. Pharm., 17: 563.

White, F.R., Kovács, B.A., Wukkary, J., Goodfriend, L. and Rose, D. 1964. Crown gall and tomatine. Science, 146: 670.

Willuhn, G. 1966. Untersuchungen zur chemischen Differenzierung bei Solanum dulcamara L. I. Genetische Fixierung der unterschiedlichen Steroidalkaloidführung. Planta Med., 14:408.

Willuhn, G. 1967. Untersuchungen zur chemischen Differenzierung bei Solanum dulcamara L. II. Der Steroidgehalt in Früchten verschiedener Entwicklungsstadien der Tomatidenol- und Soladuleidin-Sippe. Planta Med., 15:58.

Willuhn, G. 1968. Untersuchungen zur chemischen Differenzierung bei Solanum dulcamara L. III. Der Steroidalkaloidgehalt in Früchten der Solasodin-Sippe. Planta Med., 16: 462.

Wolters, B. 1963. Biologische Wertbestimmung von Antimikotika mit dem Kanaltest. Planta Med., 11: 183.

Wolters, B. 1964a. Antibiotische Wirkung von Solanum dulcamara gegen Pilze. Naturwiss., 51: 111.

Wolters, B. 1964b. Beziehung zwischen Struktur und antibiotischer Wirkung bei einiger Steroidalkaloiden. Arch. Pharm., 297: 748.

Wolters, B. 1965a. Die antibiotische Wirkung von Solanum dulcamara L. Pharmazeutische Z., 110: 1718.

Wolters, B. 1965b. Der Anteil der Steroidsaponine in der antibiotischen Wirkung von Solanum dulcamara. Planta Med., 13: 189.

Wolters, B. 1966. Zur antimikrobiellen Wirksamkeit pflanzlicher Steroide und Triterpene. Planta Med., 14: 392.

Wolters, B. 1968. Über die antibiotische Wirkung natürlicher Steroidglikoside mit und ohne Saponincharakter. Planta Med., 16: 114.

Wolters, B. 1969. Zur Verwendung vorbeschichteter Folien bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung pflanzlicher Fungistatica. Planta Med., 17: 42.

Schreiber, K. 1958.a. Die Alkaloide von Solanum dulcamara L. Planta Med., 6:94.

Schreiber, K. 1958.b. Über das Vorkommen von Solasodinglykosiden in Solanum nigrum L. und ihre industrielle Vorwertung Planta Med., 6:435.

Végezetül, dolgozatom összeállitása után szeretnék köszönetet mondani:

Dr. Szalai István professzor úrnak, a tanszék vezetőjének, munkám messzemenő támogatásáért, a kisérleti lehetőségek biztositásáért;

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

Dr. Zsolt János tudományos kutatóval és

Dr. Kevei Ferenc tanársegéddel együtt mindhármuknak a baráti segitségnyújtásért;

Fehér László IV. éves biológus hallgatónak a technikai segitségért.

Köszönettel tartozom

Dr. Ivanovics György egyetemi tanár, akadémikus úrnak, aki doktori disszertációm megvédéséhez szükséges felkészüléskor messzemenő megértést tanúsitott.

Berek Jenne

Szeged Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED