

PhD értekezés tézisei

**ATP különböző biológiai rendszerekben**

**Intracelluláris ATP biolumineszcens meghatározásának új alkalmazási lehetőségei vörösvértestekben és mikrobiális rendszerekben**

**Készítette: dr. Nagy Sándor**

**Témavezető: dr. Kőszegi Tamás**

**Programvezető: Dr. Kellermayer Miklós**

**Doktori Iskola vezetője: Dr. Nagy Judit**

**Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Gyógyszertechnológiai és Biofarmáciai Intézet**

**Pécs  
2007**

## **1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS**

### **1.1 Általános bevezetés**

#### **1.1.1 Az ATP alapvető jelentőségű a különböző biológiai rendszerekben**

##### **1.1.1.1 A vörösvértest ATP, iongradiens és integritás összefüggésének kérdései**

Az ATP jelentősége jól ismert az energiafüggő életfolyamatokban. Az utóbbi évtizedekben bebizonyították az ATP és az ATP-metabolizmus kulcsszerepét a tárolt humán vörösvértestek funkcionális és szerkezeti integritásának fenntartásában [1-4].

Ennek ellenére alig ismert az ATP szerepe a sejtintegritásban. Az in vitro inkubálás alatt a sejtek kor szerinti eloszlása nem változhat meg, az ATP tartalommal párhuzamosan mért paraméterek újabb betekintést adhatnak még fel nem derített összefüggésekbe a vörösvértestek szerkezeti és funkcionális integritásának fenntartásával kapcsolatban.

##### **1.1.1.2 A direkt bioautográfia TLC lemezen levő tesztmikrobái és az intracelluláris ATP kapcsolata**

A **direkt bioautográfia** a vékonyréteg kromatográfia (TLC) egy detektálási módszere, amelyben az adott anyag antimikrobás (vagy más biológiai) hatását tesztmikrobák segítségével mutatjuk ki, míg a TLC hagyományos detektálási módszerei fizikai kölcsönhatáson vagy kémiai reakciókon alapulnak. A direkt bioautográfiában a biológiai válasz lehet: toxicitás, mutagenitás, sejtalkotók növekedésének gátlása, enzimgátlás stb. [5]. A direkt bioautográfiát ma is széles körben alkalmazzák, elsősorban **antimikrobás hatás** tanulmányozására [5-18], valamint számos **más fontos területen** [10-12].

A **TLC az egyetlen kromatográfiás eljárás**, amely az egyes komponensek elválasztása után **in situ antimikrobás hatást képes detektálni**.

A vizsgálandó összetett anyag TLC lemezen történt elválasztása után, mikrobákat viszünk a TLC lemezre (lemezek bemerítése mikroba szuszpenzióba). Így az elválasztás helyszínén (in situ) megy végbe a mikrobák gyorsított vagy lassított szaporodása (attól függően, hogy a TLC lemezen növekedést serkentő vagy gátló komponenssel találkoznak).

Antimikrobás vegyületek tesztelése során kezdetben hagyományos, egy éjszakán át tenyésztett (ún. post-log fázisú) baktériumokkal dolgoztunk. Ezzel a módszerrel nem vesszük figyelembe, hogy a különféle baktériumok életképessége, szaporodási sebessége egymástól lényegesen különböző. Korábbi kísérleti tapasztalataim alapján, - melyeket a vörösvértest intracelluláris ATP mérések során szereztem - arra gondoltam: mivel a mikrobák életképesség változása intracelluláris ATP szint mérésével követhető és a különféle mikrobáknak különböző az életképessége, így megvizsgálható, hogy milyen inkubációs idő és más paraméter a legelőnyösebb a TLC lemezekten tenyésztett egyes tesztmikroba féleségek számára

Kezdetben a megfuttatott TLC lemezekre öntött agar gélben történt a mikrobák tenyésztése (agar-overlay módszer). Ez az időigényes folyamat csökkenti a módszer érzékenységét. A TLC lemezekten való közvetlen mikroba tenyésztés (direkt bioautográfia) csak a bioautográfia történetének későbbi szakaszában valósult meg. Ez a módszer még nem veszi figyelembe, hogy a direkt bioautográfiás képet befolyásolja: a TLC lemezekten levő élő és az elpusztult mikrobák aránya, valamint a mikrobákból származó metabolikus vegyületek mennyisége. **A tesztmikrobák életfeltételeit a TLC lemezekten alig vizsgálták.** Ez azért fontos, mert a mikrobák az új életkörülmények között (pl. szilikagél rétegben) másként viselkednek, mint a megszokott tenyésztési feltételek (pl. agar gél) mellett. Régebben kizárólag az agar gélt tekintették az egyetlen lehetséges közegnek a mikrobák számára a bioautográfiában (agar overlayer és egyéb

technikák). Amíg az egyik közegben (pl. szilikagél) a kémiai anyagok elválasztása, a másokban (pl. agar gél) a mikroba tenyésztés folyt. Így a hagyományos bioautográfia esetén csak diffúzió útján (a szilika gélből az agar gélbe) jöhetett létre a kémiai anyagok és a mikrobák találkozása. Ezért kisebb érzékenységet, elmosódott gátlási zónahatárt lehetett elérni. Mindezeket túl a lassú diffúzió miatt hosszú volt a TLC lemezek inkubálási ideje. Mivel az ilyen TLC lemez inkubálások nedves atmoszférában történnek, sok esetben a leázó TLC rétegek miatt el sem lehetett végezni a direkt bioautográfias meghatározást (pl. cellulóz, poliamid stb. réteg).

### 1.1.2 Az ATP méréstechnika alkalmazási lehetőségei a különböző biológiai rendszerekben

Az ATP szint mérésére az egyik legjobb módszer eukarióta sejtek és baktériumok életképességének követésére [19, 20]. Az ATP mérésére a leggyorsabb, érzékeny és reprodukálható a szentjánosbogár (firefly, *Photinus pyralis*) biolumineszcens módszer. Strehler [21], Lundin [22] és McElroy [23] a fotonszámlálás alkalmazásával új fejezetet nyitott a biolumineszcens ATP mérés történetében. Az ATP alapvető szerepe miatt a különböző biológiai rendszerek (vörösvértetek, mikrobák) ATP tartalma megváltozik a külső körülmények (tápanyag koncentráció, hőmérséklet stb.) hatására. Ezt az ATP-szint változást az újabb intracelluláris ATP mérési módszerek képesek követni.

Az előbbi fejezetekben vázolt problémák (1.1.1.1. fejezet: vörösvértest ATP és integritás; 1.1.1.2. fejezet: direkt bioautográfia tesztmikrobáinak optimális létfeltételei) tanulmányozására alkalmas az intracelluláris ATP mérése biolumineszcens módszerrel.

## 1.2 Célkitűzések

### 1.2.1 Humán vörösvértetek metabolikus aktivitásának fenntartásához szükséges minimális ATP mennyiség

A rendelkezésre álló számos adat ellenére nem tisztázott, hogy a vörösvértetek életképességének fenntartásához (pl. a nátrium-ionok és kálium-ionok egyenlőtlen ionmegoszlás mechanizmusához), minimálisan mennyi ATP-re van szükség. Ezért **elhatároztuk**, hogy az ATP és vörösvértest integritás közötti kapcsolat tanulmányozására olyan **ATP depléciós modellt** hozunk létre **humán vörösvértetekkel**, amelyben külön **kémiai anyag hozzáadása nem** szükséges az ATP depléció létrehozásához.

### 1.2.2 A direkt bioautográfia hatékonyságának növelése

**Célunk** a vékonyréteg kromatográfiával elválasztott vegyületek antimikrobás aktivitásának detektálását (direkt bioautográfia) megbízhatóbbá, érzékenyebbé, és a lehető leggyorsabbá tenni. Ennek érdekében, alaposan megvizsgáltuk a **direkt bioautográfia hatékonyságát befolyásoló tényezőket**:

- a.) a vékonyréteg kromatográfias **adszorbensek** alkalmasságát előnyös és nem előnyös körülmények között,
- b.) a vékonyréteg kromatográfiában **mozgófázisként** elterjedt oldószerek alkalmasságát,
- c.) a különféle **mikroorganizmusok** (baktériumok, gombák) **metabolikus aktivitását** a TLC lemezen levő mikrobák optimális létfeltételeinek biztosítása érdekében,

d.) a TLC lemezeken történő tenyésztés **inkubációs idejét**, vajon jelentősen különbözik-e az egyes mikroba típusok esetében.

**Amennyiben sikerül megvalósítani a mikrobák intracelluláris ATP mérését a TLC lemezeken, úgy információt szerezhethetünk a TLC lemezen használatos tesztmikrobák életkörülményeiről, és ezzel a módszer tökéletesíthető.**

#### 1.2.2.1 Új alkalmazási terület: gyógyszer hatóanyag-leadás biológiai aktivitásának detektálása

A gyógyszerkészítmények hatóanyag-leadása az egyik legfontosabb biofarmáciai információ. Ha antibiotikumok esetében a kioldódott **hatóanyag mennyiségét**, hagyományos módon (közvetlen spektrofotometriás UV vagy HPLC elválasztást követő UV detektálással) határozzák meg, akkor **nem képesek követni** egy másik fontos paramétert, **a biológiai aktivitás időbeni változását**. Célul tűztük ki intézetünkben (Gyógyszertechnológiai Intézet) új, **mikrobiológiai detektálással végezhető gyógyszer-hatóanyag kioldódásvizsgáló módszer (microbiologically detected dissolution, MDD) kidolgozását.**

## 2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### **2.1 Kémiai anyag hozzáadása nélküli ATP depléció megvalósítása**

A frissen vett CPD-s (citrát-foszfát-dextróz) vért [24] két részre osztva inkubáltuk, az egyik részt 37°C-on, a másik részt 4°C-on tartottuk 110 órán át. A steril feltételeket fenntartva homogenizálás után 12 óránként mintát vettünk. A sterilitást inkubálás után ellenőriztük.

### **2.2 A jellemző metabolikus paraméterek követése a vörösvértest ATP depléció során**

#### **2.2.1 A teljes vér jellemző paraméterei**

A teljes vér egyik részletéből vörösvértest számot, a pH-értéket, hemoglobint, vércukrot határoztunk meg. A teljes Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-szintet lángfotometriával, ATP szintet biolumineszcens módszerrel (belső standard addíciós módszer) mértük [25-27]. A plazma hemoglobint módosított Drabkin módszerrel határoztuk meg.

#### **2.2.2 A vörösvértestek jellemző paraméterei**

Meghatároztuk a vörösvértestek nátrium-, kálium-, és víztartalmát. A nátrium-, kálium-ion koncentráció méréseket lángfotometriával végeztük.

### **2.3 Mikrobiális ATP meghatározása optimális mikroba metabolikus aktivitás elérésére**

#### **2.3.1 Mikroorganizmusok, táptalajok és antimikrobás szerek**

A teszt mikroorganizmusok az amerikai törzsgyűjteményből (American Type Culture Collection - ATCC) származnak: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Escherichia coli* (ATCC 25922). Ezek reprezentatív Gram-pozitív vagy Gram-negatív törzsek. A baktériumokat Mueller-Hinton táptalajon (pH=7,3±0.2) 37°C-os rázótenyésztés alkalmazásával tenyésztettük. Antibiotikumként 0.01-100 ng cefazolint (Totacef) alkalmaztunk. A gombák közül *Candida albicans*-t (ATCC 90028) használtunk. A gombák esetén a Mueller-Hinton táptalajt (pH=7,3±0.2) 5% glükózzal is kiegészítettük, majd 37°C-os rázótenyésztésben tenyésztettük. Antifungális szerként 0,01-20 µg fluconazolt (Mycosyst) ill. 0,01- 4 µg fungizont (Amphotericin B) alkalmaztunk.

### 2.3.2 Vékonyréteg kromatográfia

A TLC állófázisok a következők voltak: Silica Gel, Polyamid Cellulose, Alumíniumoxid 60 (semleges).

A vékonyréteg kromatográfiában széles körben alkalmazott mozgófázisok (metanol, etanol, etilacetát, kloroform, aceton, toluol, tetrahidrofurán), továbbá néhány egyszerű adalékvegyület (sósav, kénsav, ecetsav, ammónium-hidroxid) mikroba-életképességre gyakorolt hatását teszteltük.

### 2.3.3 A direkt bioautográfia optimalizálása az ATP méréssel

#### 2.3.3.1 Mintafelvitel és bioautogram készítés

A 0.01-100 ng cefazolint közvetlenül, kifejlesztés nélkül cseppentettük fel és melegítés nélküli légáramban, szobahőmérsékleten szárítottuk be a TLC lemezekre. A tesztmikroba-szuszpenzióba mártva a lemezeket 37°C-on inkubáltuk különböző ideig (néhány órától 12 órán át), majd MTT-be mártás után egy órán keresztül inkubáltuk azokat ugyanazon a hőmérsékleten. Az inkubálást követően 70%-os etanolba merítettük a lemezeket. A keletkező bioautogramot fénymásoltuk ill. képét szkenneléssel (HP Desk Scan II) számítógépbe vittük.

#### 2.3.3.2 Mikrobák metabolikus aktivitásának követése ATP méréssel a bemeztető mikroba szuszpenzióban

A mikroba számot OD<sub>600nm</sub> turbidimetriás méréssel követtük, de meghatároztuk táptalajon a c.f.u. (colony forming unit) értékeket is. A bemeztető mikroba-szuszpenzió ATP tartalmát biolumineszcens [28-31], fehérjetartalmát festékkötési módszerrel [32] határoztuk meg.

#### 2.3.3.3 Mikrobák metabolikus aktivitásának követése ATP méréssel a TLC lemezekre

A szilikagél egy részét lekapartuk. A lekapart mintákból ATP- [28-31] és protein- [32] tartalmat mértünk az említett módszerekkel.

#### 2.3.3.4 Szkenning elektronmikroszkópia

A TLC lemezekre levő mikrobákat 2,5%-os glutáraldehid vizes oldatával fixáltuk és aceton majd levegőáram segítségével szárítottuk [33, 34]. A mintákat JEOL Fine Coattal (Ion Sputter JFC -1100) kezeltük. Az elektronmikroszkópos képeket JEOL JSM 6300 szkenning elektronmikroszkóppal készítettük.

## 3. EREDMÉNYEK és MEGBESZÉLÉS

### 3.1 Humán vörösvértestek ATP depléciója

A humán vörösvértestek esetében az élő sejt ATP és nátrium-, kálium- ionmilió kapcsolatát vizsgáltuk a vörösvértestek integritásával összefüggésben. E vizsgálataink eredménye: a vörösvértestekben saját plazmájukban történő inkubálás (ATP depléciós modell) során jelentős, és valószínűleg **irreverzibilis intracelluláris K<sup>+</sup> veszteség** csak 48 órás inkubálás után következett be, vagyis **90%-os volt az ATP depléció** [35]. Osztrák szerzők a vértárolással kapcsolatban végzett kísérleteik során idézték és megerősítették ezt az észrevételünket [36].

Leukocita depletált teljes vér alkalmazása során is felhasználtuk eredményeinket [37], amelyek arra utalnak, hogy az **ATP veszteség** a vörösvértest **teljes makromolekuláris szerkezetét** befolyásolja, nemcsak egyes részeit. Ez a feltételezés jó összhangban van számos más tanulmány eredményével [38-40].

### **3.2 Az ATP biolumineszcens mérése alkalmas módszer tesztmikrobák metabolikus aktivitásának követésére a direkt bioautográfia TLC rétegében is**

Az ATP tartalmat a teljes mikrobiális fehérje értékekre vonatkoztattuk [41]. Korábbi kísérletekben éjszakán át tenyésztett, ún. post-log fázisú baktérium szuszpenzióval dolgoztak [42, 43]. A **mikrobák** optimális életfeltételeinek biztosításával igyekeztük elérni a **log fázist a TLC lemezen**. Ehhez közvetlenül log fázisig növesztettük a mikrobákat a TLC lemezek bemerítő mikroba szuszpenziójában. Így **jelentős mértékben csökkentettük a TLC lemezek 37°C-on történő párakamrás inkubálási idejét, ezzel nagymértékben növeltük a direkt bioautográfias módszer felhasználási területét**. Mint ismeretes, a cellulóz vékonyrétegek alkalmasak erősen poláros vegyületek (szénhidrátok, karbonsavak, aminosavak, nukleinsav származékok) elválasztására. A cellulóz természetes királis tulajdonságai lehetővé teszik, hogy a cellulóz vékonyrétegeket régóta alkalmazzák királis vegyületek szeparálására is. Optimalizálási kísérleteink után például lehetségessé vált a párakamrában korábbi módszerek alkalmazásakor leázó cellulóz rétegek felhasználása a direkt bioautográfiaiban. Az említettekén kívül lehetővé vált poliamid vékonyrétegen ciklodextrinnekkel kapcsolódott izomer vegyületek direkt bioautográfias detektálása is [44].

Kísérleteink folyamán világossá vált, hogy **a tesztmikrobák optimális életkörülményei egymástól jelentősen eltérnek**. Ezért fontos azon tesztmikrobák adott típusára jellemző optimális életkörülmények meghatározása, amelyekkel dolgozunk. *E. coli* (Gram-negatív baktérium), *M. luteus*, *B. subtilis* (Gram-pozitív baktériumok) és *C. albicans* (sarjadzó gomba) mikrobák optimális életfeltételeit vizsgáltuk a direkt bioautográfia számára a bemerítő szuszpenzióban és szilikagél TLC lemezen [45-47]. Több összefoglaló közleményben kiemelték optimalizálásunk fontosságát a bioautográfia antimikrobás detektálásában [48, 49].

### **3.3 Szkenning elektronmikroszkópos felvétel direkt bioautogramról**

Az elsők között készítettünk direkt bioautogramról szkenning elektronmikroszkópos felvételt, **amely új lehetőségeket nyit a további kutatások számára**.

### **3.4 Az új módszer alkalmas gyógyszer készítmények in vitro antimikrobás hatóanyag-leadása során bekövetkező biológiai aktivitás változásának követésére**

Tudomásunk szerint, az optimalizált bioautográfias TLC-t **elsők között alkalmaztuk** antimikrobás hatással rendelkező **gyógyszerek in vitro hatóanyag kioldódásának követésére, mikrobiológiai detektálására** [50, 51]. Ez új módszert jelent a gyógyszer hatóanyag leadó rendszerek tervezésében, a kioldódás vizsgálatok tanulmányozásában. Az új módszert eredményesen kipróbáltuk ciprofloxacín, klarithromicin, doxycyklin és nisztatin hatóanyagok esetén. Ha a gyógyszer hatóanyagok metabolitjai antimikrobás hatással rendelkeznek, ezzel a módszerrel monitorozhatók. Ezek a kérdések nagyjelentőségűek a gyógyszerkutatásban. A módszer kiterjeszhető más klinikailag fontos antimikrobás vagy antifungális hatóanyag vizsgálatára.

### **3.5 BioAréna™ : az optimális TLC (OPLC – Overpressured Layer Chromatography) és az optimalizált bioautográfia együttes megvalósítása**

A BioAréna™ egy komplex bioautográfias rendszer, amely a direkt bioautográfia eredményeit integrálja a vékonyréteg kromatográfia (TLC) professzionális módszerével, az OPLC-vel [8, 52-55]. Ez az új elválasztási és detektálási rendszer kiválóan hasznosítja a mikrobák és festékvegyületek, kis- és makromolekulák közötti

kölcsönhatási lehetőségeket. Ennek a módszernek a jobb megvalósítását is lehetővé teszi (az OPLC szeparálást követően) a szorbens rétegen levő baktériumok életképességének vizsgálata.

Munkacsoportunk bioautográfiában elért eredményeiről **könyvfejezetekben** számolt be, amelyek tartalmazzák az újabban észlelt megfigyeléseinket is:

**Planar Chromatography (Springer, 2001) [18],**

**Encyclopedia of Analytical Science, Bioassays: Bioautography (Elsevier, 2005) [56].**

### **A doktori értekezés alapjául szolgáló saját publikációk jegyzéke -**

#### **Publications used as a basis for the present thesis**

##### **Cikkek - Articles**

S. Nagy, M. Paál, T. Kőszegi, A. Ludány, M. Kellermayer,

ATP and Integrity of Human Red Blood Cells

Phys.Chem.Phys.Med.NMR **30** (1998) 141-148. (IF 0,854)

S. Nagy, B. Kocsis, T. Kőszegi, L. Botz, Optimization of Conditions for Culture of the Test Bacteria Used for Direct Bioautographic Detection.

1. The Gram-positive Test Bacterium *Bacillus subtilis*,

J Planar Chrom **15** (2002) 132-137. (IF 1,047)

S. Nagy, T. Kőszegi, L. Botz, B. Kocsis, Optimization of Conditions for Culture of the Test Bacteria Used for Direct Bioautographic TLC Detection. 2. The Gram-negative Test Bacterium: *Escherichia coli*,

J Planar Chrom **16** (2003) 121-126. (IF 0,879)

E. Tyihák, L. Botz, P. Ott, S. Nagy, B. Kocsis, Zs.

Király-Véghelyi, E. Mincsovics,

The Combination of the Overpressured Layer Chromatography and Bioautography and Its Applications to the Analysis of Molecules

Influencing Cell Proliferation

Chem Anal (Warsaw) **48** (2003) 543-553. (IF 0,539)

S. Nagy, B. Kocsis, T. Kőszegi, L. Botz Determination of Optimum

Conditions for Test Microbes Used in Direct Bioautographic TLC Detection 3. Test Fungus: *Candida albicans*, 4. Comparison and summary of detections with Gram-negative and Gram-positive bacteria and fungi. (közlésre elküldve)

T. Kőszegi, J. Petrik, S. Valdimir-Knezevic, S. Nagy, Co-determination of ATP and proteins in Triton X 100 non-ionic detergent-opened monolayer cultured cells (közlésre elfogadva, megjelenés alatt, Luminescence 22 (2007), IF 1,048 /2005-ös/)

A. Dévay, B. Kocsis, Sz. Pál, A. Bodor, K. Mayer, S. Nagy,

A new microbiological detection method for investigation of dissolution from antibiotic drug delivery systems (közlésre elküldve)

##### **Könyvfejezetek – Book chapters**

L. Botz, S. Nagy, B. Kocsis, Detection of microbiologically active compounds: in Planar Chromatography (Ed.: Sz. Nyiredy) Springer, Budapest, 2001, pp. 489-516.

*L. Botz, B. Kocsis, S. Nagy*: Bioautography, BIOASSAYS in Encyclopedia of Analytical Science, Second Edition (Paul J. Worsfold, Alan Townshend and Colin F. Poole, eds.) Elsevier, Oxford (2005) Vol. 1, pp. 271-276.

### **Absztraktok impakt faktoros folyóiratban – Abstracts published in journals with impact factors**

*L. Botz, S. Nagy, B. Kocsis, L.Gy. Szabó*, Chromatographic aspects of direct bioautography and its use for detecting antimicrobial activity of compounds from higher plants. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **13/** Suppl I (1999) 359s (IF 0,810)

*A. Dévay, B. Kocsis, Sz. Pál, A. Bodor, K. Mayer, S. Nagy*, New method for microbiological detection of delivery process from dosage forms containing antibiotics, *Eur.J.Pharm.Sci.* **25** (2005) S81-S83. (IF 2,347)

### **A témához kapcsolódó kongresszusi előadások, posztetek jegyzéke – Oral presentations, posters related to the thesis**

*Nagy, S., Miseta A., Kőszegi T.*

Kemilumineszcenciás és folyadékromatográfiás ATP mérés emberi vörösvértetekben XVIII. Országos Lumineszcencia-spektroszkópia Konferencia, Pécs, 1995

*Botz L., Nagy S., Kocsis B.*

Növényi kivonatok antimikrobás hatásának vizsgálata, Pécsi Fitoterápiás Napok, 1996

*Nagy S., Paál M., Kőszegi T., Ludány A., Kellermayer M.*

Az emberi vörösvértest ATP tartalmának követése kemilumineszcenciás módszerrel XX. Országos Lumineszcencia Spektroszkópia Konferencia, Balatonföldvár, 1997

*Nagy S., Szabó I., Kőszegi T.*

Egyszerű módszer sejt kultúrák ATP tartalmának biolumineszcencia mérésére XXI. Országos Lumineszcencia Spektroszkópia Konferencia, Balatonföldvár, 1998

*Botz, L., Nagy, S., Kocsis, B., Horváth, Gy.*

Planar Chromatographic Aspects of Direct Bioautography, in: Sz. Nyiredy (Ed.) Proc. Int. Symp. Planar Chromatography, Planar Chromatography 2000, Lillafüred, Hungary pp.77-87.

*Tyihák, E., Botz, L., Nagy, S., Kocsis, B., Mincsovics, E.*

BioArena™ as a Complex Bioautographic System, in: Sz. Nyiredy (Ed.) Proc. Int. Symp. Planar Chromatography, Planar Chromatography 2001, Lillafüred, Hungary, pp.3-13.

*Nagy, S., Kocsis, B., Kőszegi, T., Botz, L.*

Optimal Life Condition of Test Bacteria for Direct Bioautographic Detection. in: Sz. Nyiredy (Ed.) Proc. Int. Symp. Planar Chromatography, Planar Chromatography 2001, Lillafüred, Hungary, pp.173-179.

*Nagy, S., Kocsis, B., Dolgos, B., Kőszegi, T., Botz, L.*

Optimized Detection Condition for Direct Bioautography. Proc. Int. Symp. Planar Separation, Planar Chromatography 2003, Budapest, Hungary

### **A témán kívül megjelent publikációk, könyvfejezet, egyetemi doktori értekezés - Other publications**

*Laky, R., Horváth, A., Bartalos, L., Nagy, S.* Kísérletes Orvostudomány **34** 150, 1982

*Wéber, Gy., Nagy, S., Bartalos, L., Kiss, T.,* Laboratóriumi Diagnosztika **11** (1) 9, 1984

*Nagy, S., Ruzsa, Cs.,* Acta Medica Hungarica **43** (4) 423, 1986 (impakt faktor 0,033)

*Jávor, T., Tárnok, F., Past, T., Nagy, S.,* Int. J. Tissue React. **8** (1) 35, 1986 (impakt faktor 0,435)



Nemes J., Röth E., Kapronczay P., Nagy S., Mózsik Gy., Varga, G., Borsiczky, B.  
Hypertonia és Nephrologia, 2 72 – 76, 1998

Cziráki, A., Rinfel, J., Hunyady, B., Nagy, S., Mezey, B., Jávor, T., Schmidt, E., Nemessányi, Z., Mózsik, Gy.  
Orvosi Hetilap 139 (39) 2307 – 2311, 1998

Nemes J., Röth E., Kapronczay P., Nagy S., Mózsik Gy., Varga, G., Borsiczky, B.  
Magyar Belorvosi Archivum 52 87 – 92, 1999

Cytochrome P-450, biochemistry, biophysics and induction  
Proceedings of the 5th International Conference on Cytochrome P-450 held in Budapest, Hungary, 1985  
Editors: Vereczkey L., Magyar K., Budapest, 1985. Akadémiai Kiadó. 570 p.

The free radical evoking capacity of hepatotoxic agents (ethanol and carbon tetrachloride) oxidized by microsomal cytochrome system and the protective effect on these damages by scavengers 67 - 70 p.  
Jávor, T., Horváth T., Wittmann I., Nagy, S., Deli, J., Balogh E. <sup>†</sup>, Kádas, I. <sup>†</sup>  
First Dept. of Med. Univ., <sup>†</sup>Baranya County Hospital, Pécs, Hungary

Nagy, S. Univ. Doc. – Monoszacharidok kötődése hemoglobinhoz különböző kísérleti feltételek között.  
1986

### **Köszönetnyilvánítás**

Hálásan köszönöm Dr. Jobst Kázmér akadémikus úrnak, hogy számomra lehetővé tette a klinikai laboratóriumi munka elkezdését és a módszerek elsajátítását.

Hálásan köszönöm Dr. Kellermayer Miklós professzor úrnak, hogy elindított és segített az igaz tudomány útján, és lehetővé tette a PhD munkám elvégzését, amiben mindvégig támogatott.

Hálás köszönettel tartozom Dr. Botz Lajos docens úrnak, hogy a direkt bioautográfia területén végzett iskolateremtő munkájával megismertetett.

Hálásan köszönöm Dr. Dévay Attila docens úrnak, hogy lehetővé tette és támogatta munkám továbbfejlesztését a gyógyszeres technológiai alkalmazás területén.

Nagyon köszönöm Dr. Mózsik Gyula professzor úrnak a PhD dolgozat szorgalmazását a gyógyszerészképzés érdekében. Köszönöm a dolgozattal kapcsolatos fontos megjegyzéseit.

Nagyon köszönöm Dr. Kocsis Bélának a mikrobiológiában nyújtott alapos elméleti és gyakorlati segítségét.

Hálás vagyok Dr. Kőszegi Tamásnak kutatásaim során adott értékes útmutatásaiért.

Hálásan köszönöm Dr. Miseta Attila professzor úrnak tudományos kutatásaimban adott alapvető tanácsait. Hálásan köszönöm Dr. Tyihák Ernő professzor úr és Dr. Mincsovics Emil fontos segítségét. Köszönöm Dolgos Bélának, Dr. Seress László professzor úrnak és a Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium (PTE ÁOK, Pécs) dolgozóinak a szkennig elektronmikroszkópos képek elkészítését. Köszönöm Martos Veronikának, hogy a könyvtárközi kölcsönzés révén mindig gyorsan, pontosan megkaptam a további kísérletekhez szükséges irodalmi információkat.

Köszönöm a Központi Klinikai Kémiai Intézet munkatársainak (különösen Dr. Ludány Andreának, Györgyi Zsóknak és Orosz Ibolyának) és a Gyógyszeres Technológiai Intézet munkatársainak (Dr. Mayer Klára, Haskó Diana, Bodor Attila, Pál Szilárd, Rattig László és Varga Tamás) értékes segítségét.