

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 szerezhethünk 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 Szkennig 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 szkennig 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 igyekeztünk 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 említetteken 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 optimált 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.

## **ATP in different biological systems**

### **New applications of intracellular ATP determination by bioluminescent method in red blood cells and microbial systems**

#### **1 Introduction and aims**

##### ***1.1 Introduction***

##### **1.1.1 Significances of ATP in different biological systems**

###### **1.1.1.1 Relationships between red blood cell ATP content, ion gradient and integrity**

In spite of the well known significance of ATP in the energy dependent life processes, the role of ATP in maintaining cellular integrity is poorly understood. The crucial role of ATP and ATP metabolism in maintaining the functional and structural integrity of circulating red blood cells can hardly be questioned. The age distribution of cells is not going to change during in vitro incubations, parameters measured parallel with ATP content can give newer insights into unrevealed connections or further direct evidences for the role of ATP in maintaining structural and functional integrity of red blood cells. As a matter of fact parallel with the development of blood banking, the role of ATP and ATP metabolism in maintaining the functional and structural integrity of stored human red blood cells have been confirmed and proved unequivocally in the last decades [1-4].

Despite of a lot of good publications is not clear how many ATP molecule is needed minimally to maintain living processes of red blood cells.

###### **1.1.1.2 Relationship between intracellular ATP content and viability of testmicrobes on TLC plates of direct bioautography**

Bioautographic TLC is able to detect antimicrobial effects in situ after separation of a mixture. This is an unique chromatographic procedure. Bioautographic methods (contact, immersion, and direct) are based on the biological – antibacterial, antifungal, antitumor, antiprotozoal etc. – effects of the substances on testmicrobes under study [5]. The steps of direct bioautography are performed on the chromatographic plates, the testmicrobes grow directly on the developed TLC plate. Direct bioautography is a powerful method to detect antimicrobial activity of a single compound in a complex mixture of chemicals [5-18]. There are other areas of its application for detection of antimicrobial compounds too [10-12].

In the first step of this technique a sample, which contains compounds with antimicrobial effects, is separated on two TLC plates. After separation of these molecules, one of the plates is used for chemical, the other is used for microbiological detection and identification procedures.

Originally, agar gel (agar-overlayer method) was an essential component in bioautography. TLC plates were employed only for separation and after that they were covered with an agar layer containing the test bacterium. However, the usage of agar-overlayer method has considerable disadvantages. Firstly, separated extracts diffuse slowly from the plate into the agar. During this time the test microbes start to multiply

before the antimicrobial compounds can reach and kill them. Secondly, the excessive dilution of the active compounds moving from the spot on TLC sorbent layer to the test microbes in agar layer considerably reduces the sensitivity of the test. Thirdly, it presents low contrast after development. There were long incubation time of TLC plate carried out in humid atmosphere, TLC layers could be soaked for example in case of polyamide, cellulose layers.

In our experiments we used the direct bioautographic method without agar gel overlayer.

We cultivated the testmicrobes in broth and immersed the developed chromatoplates directly into this broth culture. The broth medium captured by silica beads of a TLC plate after dipping the plate into a microbial culture supplies the nutrient source for the test microbes. There is no doubt that the use of optimized culture parameters to maintain good viability for testmicrobes on TLC plates is essential for correct bioautographic evaluation.

### 1.1.2 ATP measurements in different biological systems

The ATP determination is **one of the best methods to check viability of eukaryotic cells and prokaryotic** microbes [19, 20], all microbes have ATP content.

Firefly (*Photinus pyralis*) bioluminescent method is quick, sensitive and reproducible.

**Application of photon counting by Strehler [21], Lundin [22] és McElroy [23]** made a new way for ATP measurements.

If the external conditions (concentration of alimentary substances, temperature etc.) change then ATP content changes too in different biological systems (red blood cells, microbes). These ATP level changes can be followed by intracellular bioluminescent methods. It opens the door to us to study problems as demonstrated in earlier chapters (1.1.1.1. : red blood cells integrity, 1.1.1.2.: optimal living conditions of testmicrobes in direct bioautography)

## 1.2 Aims

### 1.2.1 How much ATP is needed to maintain metabolic activity of human red blood cells

To monitorize and compare ATP content, hemoglobin release, blood glucose, sodium-potassium distribution, water content and mean corpuscular volume (MCV) of red blood cells stored at 4°C and 37 °C for 110 hours.

Despite of a lot of good publications it is not clear how much ATP is needed to maintain living processes and structural integrity of red blood cells.

It was the reason why, we decided to make an ATP depletion model **without supplemented compound causing ATP depletion** for study of relationship between ATP and integrity of human red blood cells.

### 1.2.2 Increasing of effectiveness of direct bioautography

Direct bioautography was proposed to make so reliable, sensitive and fast as possible. Living conditions of test microbes on TLC plate have hardly studied. This was why **we studied factors influencing of effectiveness of direct bioautography** regularly:

- a.) suitability of TLC **adsorbent** under optimal and non optimal conditions
- b.) suitability of **mobile phase** commonly used in TLC
- c.) **metabolic activity of microbes** (bacteria, fungi) to ensure optimal living conditions in broth culture before dipping of a TLC plate into it and on TLC plate after dipping.

d.) **incubation time** of TLC plate for different types of microbes.

**Measurement of microbial intracellular ATP can be realized on TLC plate, so informations about living conditions of testmicrobes can be received. By this way the direct bioautographic method can be improved.**

#### 1.2.2.1 To frame a test method to follow the dissolution of an antibiotic ingredient

The release of an active agent from a dosage form is a basic and substantial parameter of a pharmaceutical preparation. The **commonly used analytical detection methods** based on UV absorption can measure the dissolved **amount of an active ingredient** from a delivery system however it **is not able to give any information about biological activity of the released drug (antibiotics)**.

**Our aim was to frame a dissolution test method that can follow the antibiotic release by detecting of changes in the antibacterial activity as a function of time.**

## **2 Material and methods**

### **2.1 ATP depletion model in red blood cells**

The CPD (citrate-phosphate-dextrose) blood samples were first divided into two sterilized plastic bags [24] and were incubated parallel either at 4°C or at 37°C for 110 h.

### **2.2 Monitoring of characteristic metabolic parameters in red blood cells during ATP depletion**

Maintaining the steril conditions, total blood samples were taken from the plastic bags at 6th and 12th hours of incubation and there after at every following 12 hours intervals. The total blood  $K^+$ ,  $Na^+$ , ATP and cell counts or after centrifugation for plasma and cell measurements separately.

The plasma sodium, potassium and calcium measurements were performed by flame photometry. The ATP measurements were carried out by Berthold Luminometer with a standard addition technique too [25-27] using ATP bioluminescence CLS II kit (No 1 639 695 Boehringer Mannheim, Germany). Glucose levels were determined by a glucose oxidase-peroxidase (GOD / POD) method. Plasma and total blood hemoglobin was determined by the modified Drabkin method.

### **2.3 Optimization of metabolic activity of testmicrobes in direct bioautography**

#### *Chemicals*

3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was purchased from Sigma (St.Louis, Missouri, USA), Triton X-100 a nonionic detergent from Merck (Darmstadt, Germany) and ethanol from Reanal (Budapest, Hungary).

#### *Microorganisms, media and antimicrobial agents*

The test strains were obtained from the American Type Culture Collections: *Bacillus subtilis*, ATCC 6633, *Micrococcus luteus*, ATCC 9341, *E. coli*, ATCC 25922, *Candida albicans*, ATCC 90028. Mueller - Hinton broth, pH=7,3±0,2 (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) was supplemented with 5% glucose in case of fungus. 0,01-10 ng Cefazolin (Totacef) from Bristol-Myers Squibb S.p.a. Sermoneta (Latina, Italy) as antibacterial-, 0,01-20 µg fluconazol (Mycosyst) and 0,01-4 µg fungizon (Amphotericin B) were used as antifungal testagent, Mueller-Hinton broth in a 500 mL flask was inoculated by broth suspension of test microbe.

*Determination of colony forming unit (c.f.u.)* was carried out by tube dilution method and the growth of microbes was followed by photometer (Perkin-Elmer C4B) at 600nm.

#### *Bioautography*

TLC sorbents for our assays: TLC DC - Alufolien Silica gel 60 F254 (Art. 1.05554, Merck, Darmstadt, Germany), DC - Alufolien Aluminiumoxid 60F<sub>254</sub>, HPTLC-Alufolien Cellulose (Art. 16092, Merck), DC-Alufolien Polyamid 11F<sub>254</sub> were used and cut into sheets of 10 x 10 cm. In our experiments the silica TLC plate gel was used generally.

Sample application modes: without development a series of 0.01-200 ng Cefazolin or other antimicrobial drug was dropped and dried as a test substance on chromatoplates.

#### *Determination of bacterial viability in immersion suspension*

Test strains were grown in Mueller-Hinton broth and kept in a shaker (New Brunswick Co., INC New Jersey, USA) at 37 °C. The microbial number was followed in a spectrophotometer (Perkin Elmer C4B) by determining of the OD at 600nm. The microbial viability in the immersing microbial suspension was determined by a bioluminescent ATP method [28-30] and the protein content by a Protein-Dye Binding (Coomassie Brilliant Blue G-250) assay [31].

#### *Determination of microbial viability on TLC plate*

The test strains were grown in Mueller-Hinton broth at 37 °C. TLC plates were immersed into the given microbial suspension. The microbes were growing on TLC plates further at 37 °C in a moisturized chamber. The TLC plates were one by one processed at different time points. After incubation one part of their silica surface (6 cm<sup>2</sup>) was scratched for ATP and protein determination. The inhibition spots of cefazolin on the unscratched surface of TLC plates were visualised by MTT as part of the bioautographic process.

In the samples the microbial viability was determined by a bioluminescent ATP assay [28, 30]. The protein content was determined after *Bradford* [31] by a Protein-Dye Binding (Coomassie Brilliant Blue G-250) assay.

#### *Scanning Electron Microscopy (SEM)*

The electron micrographs were taken with a Jeol JSM 6300 (Japan) electron microscope. Microbes on TLC plates were fixed with glutaraldehyde (2.5%) followed by dehydration in acetone. Samples were treated with Jeol fine coat (Ion Sputter JFC-1100) [33,34].

### **3 Results and discussion**

#### ***3.1 ATP depletion in human red blood cells***

Human red blood cells were incubated for several days at 4°C and 37 °C, and ATP, glucose, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, hemoglobin, water content, MCV, pH, Ca analysed in time-sequences. At 37 °C total ATP and glucose decreased parallel. Significant and probably irreversible loss of intracellular potassium was seen only when cell ATP content decreased by about 90% [35]. Later this result was cited and confirmed Austrian scientists in their studies on blood preservations [36]. Our results were also used during application of leucocyte depleted whole blood [37].

The release kinetics of K<sup>+</sup> was sigmoidal with a steep increase after 48 hours of incubation, while ATP loss showed an exponential-like kinetics. However, sufficient glucose remained for the metabolic activity of red blood cells even at the termination of

the experiment. In other words, the complete depletion of ATP could not be explained by the lack of glucose and/or phosphate.

Interestingly, hemoglobin did not leak out of cells immediately even after complete ion equilibrium with the surrounding medium. This means that the death of red blood cells did not cause an immediate release of hemoglobin and other intracellular proteins. Release of hemoglobin started only after 96 hours of incubation.

Maximum speed of changes of the examined parameters was found at different time intervals. For example the maximal speed of concentration changes for glucose was found at 12 - 24 hours of incubation, at 24 - 36 hours for ATP, at 48 - 60 hours for  $K^+$  -  $Na^+$  and after 96 hours for hemoglobin.

Our data suggest that loss of ATP affects the whole macromolecular structure of the red blood cells and not only single entities, such as the  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase. It corresponds with the results of other studies [37-39].

### **3.2 Bioluminescent measurement of ATP is suitable method to follow metabolic activity of testmicrobes on TLC plates used in direct bioautography**

ATP values were referred to total microbial protein content [40]. Others worked with overnight-culture (post log phase) [41,42]. Optimal living conditions of testmicrobes were maintained on TLC plates to reach log phase. We used broth culture of testmicrobes **growing in log phase** for immersion of TLC plates. **So incubation time of TLC plates in water vapour-chamber at 37° were reduced highly. After shorter incubation time destruction of sorbent layer could be avoided. Consequently, it might become possible to use adsorbents other than silica, e.g. cellulose, polyamide [43] etc. Application areas of direct bioautography were increased.** Heretofore these layers were detached as a result of soaking because of the aggressive layer pre-conditioning process required for the microbial detection method. Our proposed method does not require the pre-incubation of layers in a humid atmosphere. As we know cellulose TLC-layers are good for separation of highly polar compounds (for example carbohydrates, carbonic acids, amino acids...). For separation of chiral compounds a TLC plate with cellulose layer having natural chirality is more suitable.

In earlier direct bioautographic methods the rate of living and not living microbes, and the role of secondary metabolites from microbes with post log phase were not analysed problems.

**In our studies optimal living conditions of testmicrobes were very different.** Therefore it is **important to determine these special conditions for testmicrobes.** *E. coli* (Gram-negative bacterium), *M. luteus*, *B. subtilis* (Gram-positive bacteria) and *C. albicans* (budding fungus) microbes were studied for direct bioautography in our experiments [44-46].

### **3.3 Scanning electron micrographs of bioautograms**

Scanning electron microscopy of bioautograms was firstly used to visualise microbes trapped to silica particles of the TLC plate surfaces. The shape and size of microbes reflect their viability and the effect of antimicrobial chemicals e.g. The micrograph of TLC bioautogram shows elongated pseudohyphae of *Candida albicans* strain they can be influenced by an antifungal compound (fluconazole). This method (SEM) can be used for detection of bacteria on TLC plates as well.

### **3.4 Our new method (MDD: Microbiologically Detected Dissolution) is suitable to follow changes of biological activity in delivery system of antibiotics**

As we know this is the first study for determination of dissolved antibiotic and fungicidal drug in vitro dissolution tests. This optimized MDD method [49, 50] is a new one for studying of drug delivery system.

We studied the advantages of this new test method in a model system using test compounds: ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline, nystatin. They were chosen from different microbiologically active antibiotic groups (fluoroquinolones, macrolides, tetracyclines, fungicides).

This method can be extended to other antibacterial and even to antifungal compounds used in clinical practice.

### **3.5 BioAréna™ : realization of optimized TLC (OPLC) and optimized bioautography**

BioAréna™ is a complex bioautographic system combining results of direct bioautography and professional TLC (OPLC) [8, 51-54]. This method can follow metabolic activity of testmicrobes and antimicrobial effects on TLC layer.

Our results were summarized in book chapters, published by **Springer [18]** and by **Elsevier: Encyclopedia of Analytical Science, 2005, Bioassays: Bioautography [55]**.

### **Acknowledgements**

The author is grateful to Dr. Jobst Kázmér, Dr. Kellermayer Miklós, Dr. Botz Lajos, Dr. Dévay Attila, Dr. Mózsik Gyula, Dr. Kocsis Béla, Dr. Kőszegi Tamás, Dr. Miseta Attila, Dr. Tyihák Ernő, Dr. Mincsovics Emil, Dolgos Béla, Dr. Seress László, Martos Veronika, Dr. Ludány Andrea, Györgyi Zsóka, Orosz Ibolya, Dr. Mayer Klára, Haskó Diana, Bodor Attila, Pál Szilárd, Rattig László and Varga Tamás for their unselfish and effective help.

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

**Articles**(see p.7)

**Book chapters** (see p.7)

**Abstracts published in journals with impact factors** (see p.8)

**Oral presentations, posters related to the thesis** (see p.8)

**Other publications** (see p.8)

### **IRODALOM – REFERENCES**

- [1] D.N. Bailey és J.R. Bove, Transfusion **15** (1975) 244-249.
- [2] K. Nakao, T. Wada, T. Kamiyama, M. Nakao, K. Nagano, Nature **4831** (1962) 877-878.
- [3] Y. Marikovskiy, Mechanisms of Ageing and Development **86** (1996) 137-144.
- [4] N.S. Gov and S.A. Safran, Biophys. J. **88** (2005) 1859-1874.
- [5] C.F. Poole, J. Chromatography A **1000** (2003) 963-984.
- [6] J. L. Rios, M. C. Recio, A. Villar, J. Ethnopharmacol. **23** (1988) 127 - 149.
- [7] V. Betina, J. Chromatography **78** (1973) 41 - 51.
- [8] L. Botz, S. Nagy, B. Kocsis, L.Gy. Szabó, Fundamental & Clin. Pharm. **13/** Suppl 1 (1999) 359s
- [9] E. Tyihák, Á.M. Móricz, P.G. Ott, Gy. Kátay, Zs. Király-Véghelyi, J. Planar Chrom. **18** (2005) 67-72.
- [10] H. Nakayama, R. Hayashi, J. Bacteriology **112** (1972) 1118-1126.
- [11] S.L. Naylor, R.J. Klebe, T.B. Shows, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS) **75**(1978) 6159-6162.
- [12] S.L. Naylor, R.J. Klebe, Biochem. Genet. **15** (1977) 1193-1211.
- [13] A. Balinova, Anal. Chim. Acta **311** (1995) 423-427.
- [14] I.M. Choma, A. Choma, K. Staszczuk, J.Liq.Chrom.& Rel.Technol. **25** (2002) 1579-1587.
- [15] I.M. Choma, A. Choma, I. Komaniécka, K. Pilorz, K. Staszczuk, J.Liq.Chrom.& Rel.Technol. **27** (2004) 2071-2085.
- [16] J.N. Eloff, D.R.P. Katerere, African J. of Biotechnology **4** (2005) 1167-1171.
- [17] F. Aqil, M.S.A. Khan, M. Owais, I. Ahmad, J. Basic Microbiol. **45** (2005) 106-114.
- [18] L. Botz, S. Nagy, B. Kocsis, Detection of microbiologically active compounds: in Planar Chromatography (Ed.: Sz. Nyiredy) Springer, Budapest, 2001, pp. 489-516.

- [19] Y. Maehara, H. Anai, R. Tamada, K. Sugimachi, *Eur J Cancer Clin Oncol* **23** (1987) 273 – 276.
- [20] F.R. Ahmann, H.S. Garewal, R. Schiffman, A. Celniker and S. Rodney, *In Vitro Cellular and Developmental Biol* **23** (1987) 474 – 480.
- [21] B.L. Strehler, J.R. Totter, *Arch Biochem Biophys* **40** (1952) 28 – 41.
- [22] A. Lundin, A. Thore, *Anal Biochem* **66** (1975) 47-63.
- [23] W.D. McElroy, M. DeLuca, *Chemical and Enzymatic Mechanisms of Firefly Luminescence*, pp. 285-311, eds. M.J.Cormier, D.M.Hercules, J. Lee, Plenum Press, New York, 1973.
- [24] J.G. Gibson, S.B. Rees., T.J. McManus, W.A Scheitlin, *Am.J.Clin.Pathol* **28** (1957) 569-578.
- [25] T. Kőszegi, *Clin.Chem.* **34** (1988) 2578.
- [26] T. Kőszegi, M. Kellermayer, F. Kövecs., K. Jobst, *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* **26** (1988) 599 - 604.
- [27] G.K. Turner, in: *Bioluminescence and chemiluminescence: instruments and applications* (Van Dyke K. ed.), Boca Raton, Florida: CRC Press 1985: 56.
- [28] P.E. Stanley, *J.Bioluminescence and Chemiluminescence* **4** (1989) 375 – 380.
- [29] A.S. Bagnara, L.R. Finch, *Anal. Biochem.* **45** (1972) 24 – 34.
- [30] G. Guinn, M.P. Eidenbock, *Anal. Biochem.* **50** (1972) 89 – 97.
- [31] A. Lundin, A. Thore, *Appl. Microbiology* **30** (1975) 713 – 721.
- [32] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248 - 254.
- [33] M. Hoppert and A. Holzenburg, *Electron Microscopy in Microbiology*, Handbooks 43. Bios Scientific Publishers, page 79 – 82, 1998.
- [34] T. Fujita, J. Tokunaga, H. Inoue, *Atlas of Scanning Electron Microscopy in Medicine*, Ikgu Shoin Ltd. Tokyo, Elsevier Publishing Company, Amsterdam – London – New York, page 2, 1971
- [35] S.Nagy, M.Paál, T.Kőszegi, A.Ludány, M.Kellermayer, *Phys.Chem.Phys.Med.NMR* **30**(1998)141-148.
- [36] G.C. Leitner, M. Neuhauser, G. Weigel, S. Kurze, M.B. Fischer, P.Höcker, *Vox Sanguinis* **81** (2001) 113-118.
- [37] G.C. Leitner, I. Rach, M. Horvath, P. Hoecker, *British J. Anaesthesia* **94** (2005) 249-250.
- [38] G.N. Ling, *Physical Theory of the Living State: the Assotiation-Induction Hypothesis*, Blaisdell Publishing Company, New York, London (1962) 253-254.
- [39] M. Kellermayer, A. Ludány, K. Jobst, Gy. Szűcs, K. Trombitás, C.F. Hazlewood, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **83** (1986) 1011-1015.
- [40] M. Kellermayer, A. Ludány, A. Miseta, T. Kőszegi, G. Berta, P. Bogner, C.F. Hazlewood, I.L. Cameron, D.N. Wheatley, *J. Cell. Physiol.* **159** (1984) 197-204.
- [41] T.Kőszegi, J.Petrik, S. Valdimir-Knezevic, S. Nagy, *J.Biol.Chem.Lumin* (in press)
- [42] M.O. Hamburger and G.A. Cordell, *J. Natural Products* **50** (1987) 19 - 22.
- [43] R. Eymann, H.E. Hauck, *Chrom Biodip® Antibiotics – A High-Performance Bioautographic Test Kit*, Proceedings of the International Symposium on Planar Separations, Planar Chromatography 2000, 67 - 75, Lillafüred, Hungary
- [44] D.W. Armstrong, *J. Liq. Chromatogr.* **3** (1980) 895-900.
- [45] S. Nagy, T. Kőszegi, L. Botz, B. Kocsis, *J. Planar Chrom.* **16** (2003) 121-126.
- [46] S. Nagy, B. Kocsis, T. Kőszegi, L. Botz, *J.Planar.Chrom.2007* (sent for publications)
- [47] S. Nagy, B. Kocsis, T. Kőszegi, L. Botz, *J. Planar Chrom.* **15** (2002) 132-137.
- [48] C.F. Poole, *J. Chromatography A* **1000** (2003) 963-984.
- [49] J. Sherma, *Planar Chromatography*, *Anal.Chem.* **76** (2004) 3251-3262.
- [50] A. Dévay, B. Kocsis, Sz. Pál, A. Bodor, K. Mayer, S. Nagy, *Eur.J. Pharm. Sci.* **25** (2005) S81-S83.
- [51] 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, 2007 (sent for publications)
- [52] E. Tyihák, L. Botz, S. Nagy, B. Kocsis, E. Mincsovcis, *BioArena™ as a Complex Bioautographic System*, Proceedings of the International Symposium on Planar Separations, Planar Chromatography 2001, 3 - 13, Lillafüred, Hungary
- [53] E. Tyihák, P. Ott, Á. Móricz, Gy. Kátay,, Zs. Király-Véghelyi, *Antibiosis, Antibiotics, and Formaldehyde Cycle: Unique Importance of Planar Chromatographic Techniques in Progress Direction International Symposium on Planar Separations, Planar Chromatography 2003*, 61 - 70, Budapest, Hungary
- [54] E. Tyihák, L. Botz, P. Ott, S. Nagy, B. Kocsis, Zs. Király-Véghelyi, E. Mincsovcis, *Chem Anal (Warsaw)* **48** (2003) 543-553.
- [55] E. Tyihák, L. Trézl, B. Szende, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **851** (1998) 259-270.
- [56] 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.