

DIAGNOSTIK UND THERAPIE
DER PILZKRANKHEITEN
UND
NEUERE ERKENNTNISSE IN DER
BIOCHEMIE DER PATHOGENEN PILZE

VORTRÄGE DER
6. WISSENSCHAFTLICHEN TAGUNG DER
DEUTSCHSPRACHIGEN MYKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT
IN WIEN
VOM 15. BIS 17. JULI 1966

HERAUSGEGEBEN VON
PROF. DR. HANS GÖTZ
KLINIKUM ESSEN DER RUHRUNIVERSITÄT BOCHUM
UND
DR. HANS RIETH
HAMBURG

UNTER MITARBEIT VON
DR. OTTO MALE
I. UNIVERSITÄTS-HAUTKLINIK IN WIEN
UND
UNIV.-DOZ. DR. JOSEFINE THURNER
II. UNIVERSITÄTS-HAUTKLINIK IN WIEN

MIT 178 TEXTABBILDUNGEN

1970
GROSSE VERLAG
BERLIN

I. Universitäts-Hautklinik in Wien
(Vorstand: Prof. Dr. J. TAPPEINER)

Fermenthistochemische Untersuchungen zur Wirkungsweise des Griseofulvins auf Dermatophyten

O. MALE und K. HOLUBAR, Wien

Mit 7 Abbildungen

Eine der in praktischer Hinsicht wichtigsten offenen Fragen in der Mykologie stellt die Pharmakodynamik des Griseofulvins dar. Bekanntlich vermittelten zwar umfangreiche biochemische, elektronenoptische und biologische Forschungen zahlreicher Autoren*) einen gewissen Einblick in den Wirkungsmechanismus, jedoch gelang bisher nicht dessen genaue Abklärung. Im wesentlichen beschränkt sich unser Wissen darauf, daß das Griseofulvin im Keratohyalin angereichert wird und dieses gegen Pilze gewissermaßen imprägniert, sowie daß die mycotrope Wirkung fungistatisch bzw. „semifungicid“ (RIETH) ist und über eine Beeinflussung des RNS-Stoffwechsels zustandekommen soll, wie Untersuchungen von McNALL ergaben. Da speziell die letztere Frage besondere Bedeutung besitzt, darüber aber auf herkömmlicherem Wege seit längerem keine neuen Aufschlüsse gewonnen werden konnten, schien es aussichtsreich, enzymhistochemische Methoden, die sich in neuerer Zeit auf den verschiedensten Gebieten der Biologie bei der Erforschung von Stoffwechselfvorgängen erfolgreich erwiesen hatten, heranzuziehen. Auch in der Mykologie wurden derartige Verfahren bereits angewandt. Grundlegende Arbeiten, die vor allem wertvolle Aufschlüsse über die Enzymhistotopie an verschiedenen dermatotropen Pilzen lieferten, stammen u. a. von POLEMAN und JANSEN, NOGUCHI und KATO, STEIGLEDER, JUNG und GERHARDT, THIANPRASIT und BRAUN-FALCO, THIANPRASIT, MEINHOF, KNOTH.

Entsprechend unserer Problemstellung erschien folgende Vorgangsweise zweckmäßig:

1. Feststellung der Histotopie einiger wichtiger, hydrolytischer und oxydativer Enzyme in den häufigsten Erregern von Dermatophyten;
2. Prüfung des Einflusses von Griseofulvin auf den Ausfall der enzymatischen Reaktion.

Material und Methoden

Die in vitro-Untersuchungen wurden an folgenden Myzeten vorgenommen:

Tr. rubrum

Tr. mentagr. var. interdigitale

Tr. mentagr. var. gypseum

Tr. verrucosum

M. gypseum

M. canis

E. floccosum

*) Ausführlichere Literaturübersichten bei 2 und 12.

Die Züchtung der Pilze erfolgte auf GRÜTZ-KIMMIG-Medium ohne Zusatz von Antibiotica und Cycloheximid nach der Agarblockmethode von RIDDELL. In weiteren analogen Versuchsreihen wurde Griseofulvin in den Konzentrationen von 1 γ /ml, 2,5 γ /ml oder 5 γ /ml in wässriger, alkoholischer oder acetonischer Lösung, bzw. unter Verwendung von einprozentigem Dimethylformamid entweder direkt dem Medium zugesetzt oder zwischen Objektträger und Deckglas der bereits ausgekeimten Mikrokulturen eingebracht. Die Einwirkungszeit betrug zwischen 24 h und 10 Tagen bei einer Temperatur von 35 °C.

An Enzymen wurden bei Durchführung entsprechender Kontrollen nachgewiesen:

1. NADH-Tetrazoliumreduktase
2. Succinodehydrogenase (SDH)
3. Nucleosidtriphosphatase mit ATP als Substrat (ATP-ase)
4. 5-Nucleotidase (AMP-ase)
5. alkalische Phosphatase
6. saure Phosphatase
7. β -Glucuronidase
8. Phosphorylase
9. unspez. Esterase
10. Aminopeptidase
11. Monoaminoxidase (MAO)

Untersuchungsergebnisse

Zunächst zu den Verhältnissen an den unbehandelten Myzeten:

Lokalisation, Anordnung und Aktivität sind zwar weitgehend konstant, jedoch müssen folgende Besonderheiten, die Anlaß für Fehlbeurteilungen geben können, berücksichtigt werden.

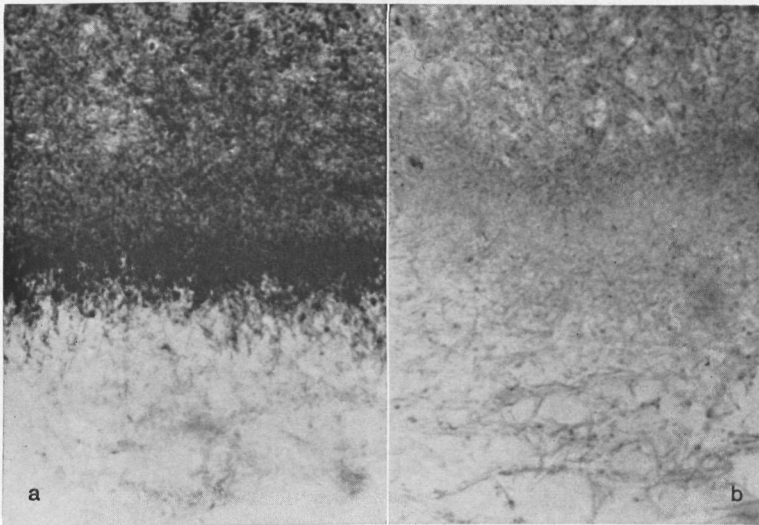


Abb. 1: Kryostatschnitt durch Kultur von *Tr. granulosem*.
Darstellung a) der NADH-Tetrazoliumreduktase
b) der Aminopeptidase

1. Unterschiede innerhalb der Kolonie in ihrer Eigenschaft als biologischer Funktionsapparat. Die höchste Fermentaktivität findet sich

- a) am Übergang vom vegetativen zum reproduktiven Anteil — offenbar als Ausdruck der hier vorliegenden stärksten Nährstoffkonzentration — und
- b) in den (prä-)distalen Myzelanteilen als der Zone der stärksten Vegetationspotenz (Abb. 1 a und b).

2. Weitere Unterschiede im Verhalten bestehen zwischen frisch isolierten Kulturen und solchen, die bereits mehrere N.B.-Passagen durchgemacht haben.

3. Schließlich finden sich häufig Unterschiede, die offenbar auf Besonderheiten der Ultrastruktur (worauf u. a. BLANK, TAPLIN und ROTH hingewiesen haben), bzw. auf bestimmte Funktionsstadien oder -muster (MEINHOF), zurückgehen.

Ganz allgemein gilt noch, daß nur die Summe der Merkmale, aber keineswegs Einzelercheinungen zur Beurteilung herangezogen werden dürfen, da trotz exakter Technik und sorgsamster Vorgangsweise zufolge ungleichmäßiger Diffusion unterschiedliche Reaktionsausfälle vorkommen können.

Nach Darlegung dieser allgemeinen Belange wird das spezielle ferment-histochemische Verhalten der einzelnen Myzeten an Hand von Illustrationen erläutert. (Worauf in der vorliegenden Druckfassung jedoch nur auszugsweise eingegangen werden kann; Abb. 2, 3, 4 u. 5 a).

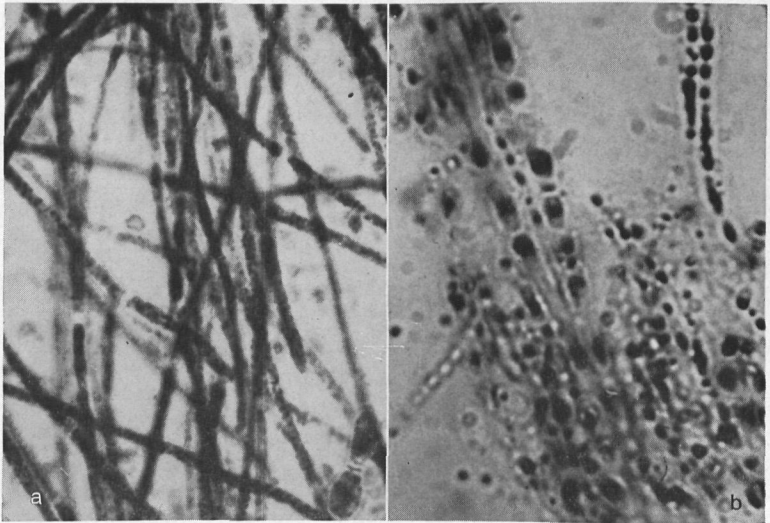


Abb. 2: Mycel von a) *Tr. verrucosum* (unspezifische Esterase)
b) *Tr. rubrum* (saure Phosphatase)

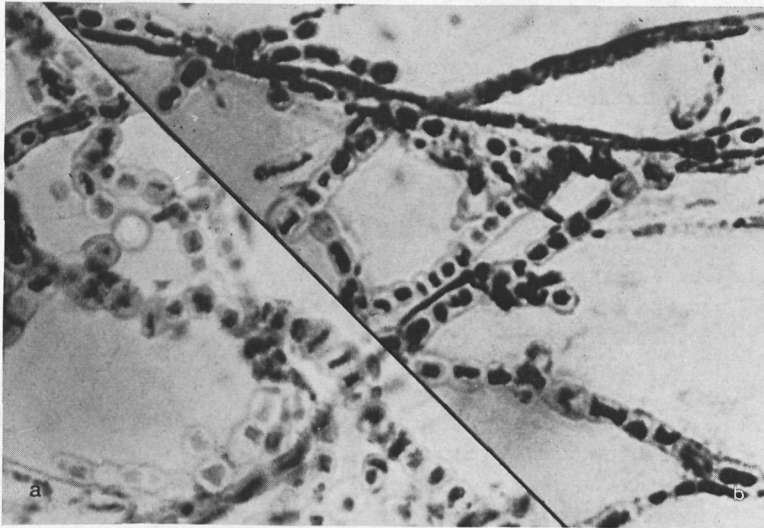


Abb. 3: Arthrosporenketten von *Tr. verrucosum*

- a) ATP-ase
- b) unspezif. Esterase

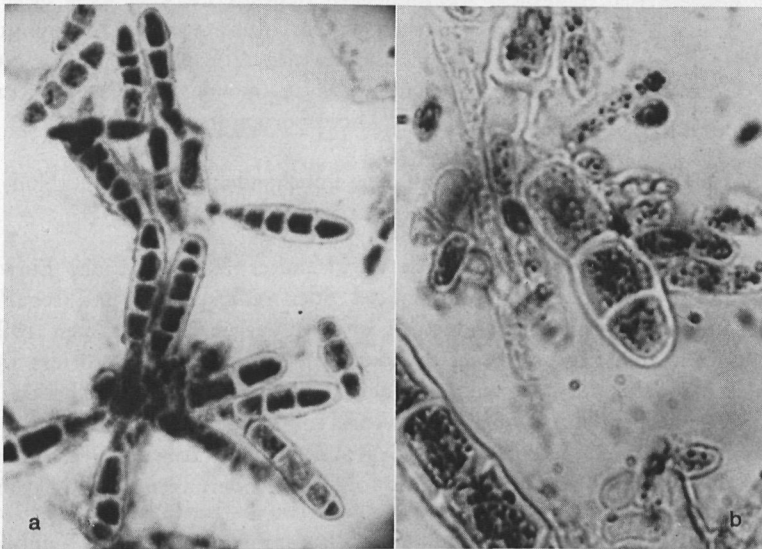


Abb. 4: Darstellung der 5-Nucleotidase in

- a) *Epidermophyton floccosum*
- b) *Tr. mentagrophytes* var. *gypseum*

Bei *Zusammenfassung* der wichtigsten Untersuchungsergebnisse zeigt sich folgendes:

1. Phosphorylase, β -Glucuronidase und Monoaminoxidase ließen keine nennenswerten Aktivitäten erkennen, die übrigen geprüften Enzyme waren hingegen durchwegs in höherer Intensität nachweisbar. Von diesen darstellbaren Enzymen wiesen die unspez. Esterase, die 5'Nucleotidase und die ATP-ase die höchsten, SDH und LAP die niedrigsten Aktivitäten auf.
2. Das Verhalten der einzelnen darstellbaren Fermente erwies sich an ein und demselben Pilz unterschiedlich, während verschiedene Pilze *derselben Art* oder *Gattung* einen weitgehend gleichen Reaktionsausfall zeigten.
3. Neben Unterschieden in der *Intensität* des Reaktionsausfalles bestanden auch Differenzen in der *Verteilung* und *Anordnung* der fermentaktiven Strukturen, d. h. gleiche Enzyme ergaben an verschiedenen Myzeten ein oft weitgehend differentes Muster (**Abb. 4 a, b**).
4. Von den untersuchten Myzeten wiesen *M. canis* und *gypsum* die stärksten, *Tr. rubrum* und *interdigitale* die schwächsten Aktivitäten auf. Während sich innerhalb der einzelnen Arten und Gattungen keine sicheren Unterschiede im fermentativen Verhalten erkennen ließen, bestanden solche jedoch deutlich zwischen den Genera. Und zwar vor allem zwischen *Microsporum* und *Epidermophyton* einerseits und *Trichophyton* andererseits. Eine Ausnahme machten die gypsig-granulären Varianten des *Tr. mentagroph.*, deren Reaktionstyp eher dem der Gattung *Microsporum* ähnelte.

Soviel über die Verhältnisse an den unbehandelten Myzeten. Nun zu den nach Griseofulvinexposition faßbaren Veränderungen:

Naturgemäß sind diese je nach angewandter Konzentration, Einwirkungsdauer, verwendetem Lösungsmittel oder Nährsubstrat und sogar je nach Inkubationstemperatur verschieden. Im gegebenen Rahmen sollen hauptsächlich die Ergebnisse des Standarduntersuchungsganges erörtert werden. Es handelte sich dabei um 14 Tage alte Mikroulturen, die bei 35 °C durch 24 Stunden einer wäßrigen Griseofulvinlösung von 1 Gamma/ml ausgesetzt wurden. Die vergleichende Gegenüberstellung der dabei erhobenen Befunde mit den Normalwerten läßt folgende Änderungen des Reaktionsausfalles erkennen:

Am augenfälligsten ist ein Absinken der SDH-Aktivität. Die normalerweise feingranulär pleiochrome Farbreaktion ist abgeblaßt, erscheint wie eluiert, wobei axial ein spärlicher Rest fermentativer Aktivität erhalten

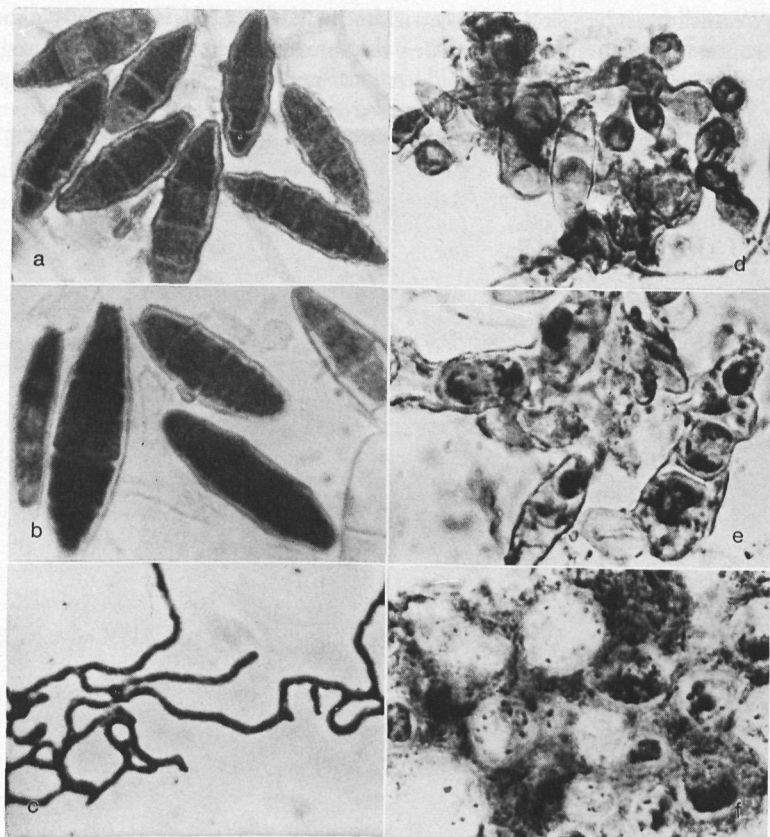


Abb. 5: *Microsporium gypseum*. Unspezif. Esterase-Reaktion

- a) Makrokonidien unbehandelt
 b) Makrokonidien } nach 24 h Einwirkung von 1 μ GF/ml wässriger
 c) Hyphen } Lösung. Fermentaktivität leicht gesteigert

Pathologische Formveränderungen nach Einwirkung von

- d) 2,5 μ GF/ml in acetonischer Lösung durch 5 Tage } Intensität der
 e) 5,0 μ GF/ml in Methanol gelöst, durch 5 Tage } Reaktionen weit-
 f) 5,0 μ GF/ml in DMF gelöst, durch 8 Tage } gehend erhalten

bleiben kann. Ein ähnliches Verhalten zeigt die alkalische Phosphatase, deren Extinktion allerdings meist diffus erfolgt. (Abb. 6 a). 5'Nucleotidase, ATP-ase und saure Phosphatase lassen keine Intensitätsabnahme der Farbreaktion erkennen, zeigen aber deutlich eine fein- bis grobschollige Entmischung oder sogar Verklumpung der fermentaktiven Strukturen (Abb. 6 b). Die unspezif. Esterase-Reaktion erfuhr bei einzelnen Myzeten eine leichte Verstärkung (Abb. 5 b, c), an den übrigen geprüften Enzymen war unter den angegebenen Bedingungen kein Griseofulvineffekt feststellbar.

Wesentlich anders sind die Auswirkungen von höheren Griseofulvinkonzentrationen. Es kommt dabei zu den bekannten Wuchsanomalien, zur sogenannten Totkeimung der Pilze, wobei nach unseren bisherigen Erfahrungen

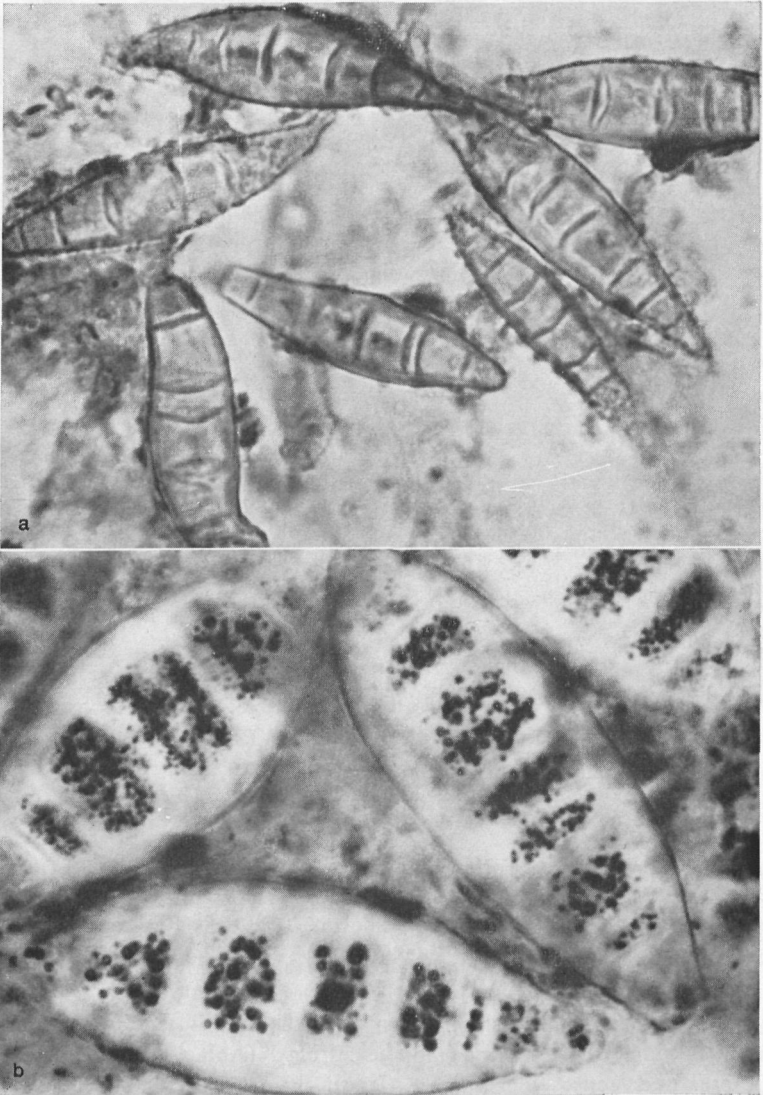


Abb. 6: *M. canis* (Makrokonidien)

- a) alkalische Phosphatase. Diffuse Ausbleichung nach 48stündiger Einwirkung von 1 γ GF/ml wässriger Lösung
- b) 5-Nucleotidase. Grobtropfige Entmischung bei erhaltener Fermentaktivität nach 72stündiger Einwirkung von 2,5 γ GF/ml acetonischer Lösung

aber eine starke Abhängigkeit von Art und Menge der verwendeten Nährsubstrate besteht. Interessant ist, daß trotz bizarrster Formveränderung meist noch Fermentaktivitäten erhalten bleiben (**Abb. 5 b, c, d**). In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß dieses Verhalten prinzipiell andersartig ist als nach Netzmittelexposition, denn diese führt bei unbeeinflusster Morphe zu einer „fettigen“ Degeneration mit überwiegendem Verlust der enzymatischen Funktionstüchtigkeit (**Abb. 7**).

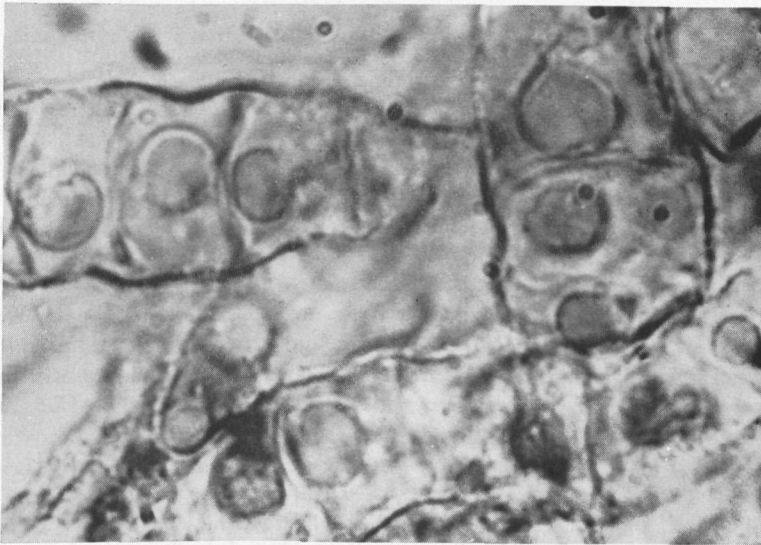


Abb. 7: „Fettige“ Degeneration nach Netzmittelexposition

Zusammenfassend ergibt sich, daß es auf fermenthistochemischem Wege gelingt, eine Reihe metabolischer Potenzen aus verschiedenen Stoffwechselzyklen nachzuweisen. Ebenso gelingt es, einen enzyblockierenden Effekt des Griseofulvins sichtbar zu machen. Die Interpretation und Nutzenanwendung dieser Befunde bleibt zwar weiteren Arbeiten vorbehalten, immerhin läßt sich aber schon jetzt sagen, daß die angeführten Verfahren eine erfolgversprechende methodische Bereicherung zur Erforschung des Biochemismus der Pilze, aber auch ihrer Antibiose zu werden versprechen.

Literatur

- BLANK, H., D. TAPLIN und F. J. ROTH: Electron microscopic observations of the effects of griseofulvin on dermatophytes. Arch. Derm. (Chic.) 81, 667—680 (1960).
- GÖTZ, H. und H. RIETH: Die Griseofulvinbehandlung der Dermatomykosen. (Arbeitstagung anlässlich der Gründung der deutschsprachigen mykologischen Gesellschaft, 15. Januar 1961, Essen.) Berlin-Göttingen-Heidelberg; Springer (1962.)

- JUNG, H. D. und H. GERHARDT: Die Darstellung der Redoxfermente bei Dermatophyten und Saprophyten durch Kaliumtellurit. *Derm. Wschr.* **147**, 663 bis 668 (1963).
- JUNG, H. D. und H. GERHARDT: Darstellung der Redoxfermente bei Dermatophyten und Saprophyten durch Triphenyltetrazoliumchlorid II., *Derm. Wschr.* **148**, 16—19 (1963).
- JUNG, H. D. und H. GERHARDT: Die Einwirkung von Griseofulvin auf die Funktion reduzierender Fermente bei Dermatophyten und Saprophyten III., *Derm. Wschr.* **148**, 257—264 (1963).
- JUNG, H. D. und H. GERHARDT: Verhalten und Hemmung reduzierender Ferment-systeme unter Griseofulvin-Einwirkung bei verschiedenen Dermatophyten, fakultativ pathogenen Myzeten, Hefen und Saprophyten. IV., *Derm. Wschr.* **148**, 310—318 (1963).
- KNOTH, W., R. C. KNOTH-BORN und H. RANFT: Über die unterschiedliche Wirkung von Griseofulvin in vitro auf verschiedene Pilze. In „Die Griseofulvinbehandlung der Dermatophyten“. Arbeitstagung anlässlich der Gründung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft. Essen, 15. 1. 1961. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962).
- MCNALL, E. G.: Biochemical studies on the metabolism of griseofulvin. *Arch. Derm. (Chic.)* **81**, 657—661 (1960).
- MEINHOF, W.: Histochemische Untersuchungen an Dermatophyten. Vortrag, gehalten bei der Tagung der Deutsch. Ges. mediz. Mykologie 13.—15. 5. 1966. Leipzig (in Druck).
- POLEMAN, G. und N. JANSEN: Untersuchungen zur Phosphatase-Aktivität bei *Mikrosporum gypseum*. *Mykosen* **1**, 63—70 (1957).
- NOGUCHI, Y. und Y. KATO: Effect of ethylmercurithiosalicylate on succinic dehydrogenase of *Candida albicans* and its clinical use in dermatomycoses. *Yokohama med. Bull.* **4**, 204—208 (1958).
- RIETH, H.: Antimycotica — unter besonderer Berücksichtigung des Griseofulvins. *Hautarzt* **12**, 193—207 (1961).
- STEIGLEDER, G. K.: Histochemistry of plantar hyperkeratoses. A contribution to the physiology of the skin surface. *J. invest. Derm.* **31**, 29—34 (1958).
- THIANPRASIT, M.: Enzyme activities in *Candida albicans*. 1st Congr. Int. Soc. Trop. Derm., 8.—13. 6. 1964 Neapel. *Minerva dermat.* **39**, Suppl. zu No. 1 (1964).
- THIANPRASIT, M. und O. BRAUN-FALCO: Zum histochemischen Enzymnachweis in hautpathogenen Pilzen. *Arch. Klin. exp. Derm.* **221**, 175—183 (1965).
- ZIEGLER, H.: Untersuchungen über die Wirkung von Griseofulvin auf *Mikrosporum canis*. II. Mitteilung. *Mykosen* **4**, 19—29 (1961).
- ZIEGLER, H.: Untersuchungen über die Wirkung von Griseofulvin auf *Mikrosporum canis* (4. Mitteilung). *Zschr. allg. Mikrobiol.* **3**, 211—224 (1963).

OA Dr. O. MALE
I. Universitäts-Hautklinik
Alserstr. 4
A-1090 Wien
Österreich