Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI XXXVII, knj. 14.

Stern, Pavao

1969

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/848a1209-c780-416e-9221-a562a7588361

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA XXXVII

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

Knjiga 14.

Urednik

PAVEL ŠTERN,

redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

ANU BiH АНУ БиХ

SARAJEVO
1969

ERNEST I GRIN i KSENIJA KARLOVAC

ISPITIVANJA DJELOVANJA GRISEOFULVINA NA DERMATOFITE *(TR. SCHOENLEINI I TR. VIOLACEUM)* IN VITRO U KOMBINACIJI SA DIMETHYLSULFOXIDOM

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka 16. V 1969. g.)

Poslije prvih publikacija o terapeutskoj vrijednosti dimethyl-sulfoxida (DMSO) u 1964. godini počela su vrlo opsežna klinička i laboratorijska ispitivanja ovoga preparata koji je već nekoliko decenija poznat kao nusprodukt u preradi drveta.

Značaj DMSO u humanoj i veterinarskoj medicini našao je svoj odraz na nedavno održana 2 simpozijuma (New York 1966[1], Beč 1966[2]) na kojima su kritički iznesena dosada poznata farmakološka svojstva toga preparata.

Pored ostalih farmakoloških osobina DMSO-a, među koje na prvo mjesto spada sposobnost penetracije staničnih membrana životinja i bilina, utvrđena je i njegova bakteriostatična i fungistatična sposobnost.

U tom pogledu prve podatke in vitro koji se odnose na bakteriološku i mikološku floru u dermatologiji dao je K l i g m a n[3] 1965. g. On je našao da minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) DMSO-a iznosi oko 10% što se tiče rasta bakterija koje je ispitivao (Staph. albus, β haemol. Streptococci, Corynebacterium sp. i dr.), dok za baktericidno djelovanje potrebne su mnogo veće koncentracije (65—75% djelovanjem od 1 sata).

U pogledu dermatofita koje je ispitivao (Tr. mentagrophytes. M. gypseum, M. canis) Kligman je našao da je za minimalnu inhibitornu koncentraciju potreban oko 10-postotni DMSO u Sabouraduovoj podlozi kod primokulture, a u subkulturi fungicidna koncentracija se kretala više od 50%.

Prema tome, DMSO je relativno slab fungicid, ali se je moglo pretpostaviti da bi DMSO, s obzirom na svoju penetrirajuću sposobnost, i kao odličan solvent mogao doprinijeti intenzivnijem djelovanju drugih fungicidnih sredstava. Ispitivanja koja su dosada vršena u tome pogledu (B e a n[4], M a l e[5] i dr.) dala su naročito u poljoprivredi korisne praktične rezultate.

Naša ispitivanja odnose se na djelovanje antibiotika griseofulvina (kao zasada najboljeg antimikotika za dermatofitske infekcije čovjeka) u kombinaciji sa DMSO-om: da se utvrdi da li i u kom opsegu postoji u takvom slučaju pojačano antimikotično djelovanje. Ispitivanja su vršena in

vitro i odnosila su se prvenstveno na one vrste dermatofita koje se u Bosni pojavljuju u endemskoj raširenosti.

Prije utvrđivanja pojedinosti naših ispitivanja bilo je potrebno da odredimo u kojim granicama se kreće fungistatsko djelovanje samog DMSO-a na dermatofite.

Preliminarno je ispitivana osjetljivost subkultura dermatofita, i to 24 soja speciesa microsporum, trichopyton i epidermophion iz zavodske mikoteke: T. mentagropytes gran. (1046), T. mentagrophytes gran. (7807/64), T. mentagropytes gran. (2424), M. canis (5637/62), M. canis (132—1960). M. audouini (129—1955), M. audouini (127). M. gypseum (1967), M. gypseum (111), T. mentagrophytes interd. (97), T. mentagrophytes interd. (21/68), T. mentagrophytes interd. (2422), T. tonsurans (1417), T. tonsurans (1407), E. floccosum (1818). E. floccosum (2523). T. ferrugineum (5237), T. ferrugineum (5241), T. quinckeanum (78). T. quinckeanum (81), T. verrucosum (2404), T. verrucosum (2438), T. rubrum (2428), T. rubrum (120), zatim svojevi T. violaceuma i T. schoenleini čija osjetljivost je ispitivana kako na saprofitske, tako i na parazitarne oblike. Ova ispitivanja vršena su u tekućoj Sabouraudovoj podlozi sa dodatkom DMSO-a u raznim koncentracijama.

Za ta ispitivanja primijenili smo metodu dilucije u epruvetama. Inokulirana podloga sa dermatofitima ostavljena je na temperaturi od 28° C i nakon 14-dnevne inkubacije čitani su rezultati.

Kontrola rasta svakog soja istodobno je ispitivana na test-podlozi bez fungistatika.

Rezultati rasta obilježeni su: a) kao obilan rast ++ (rast u ispitivanim epruvetama (100%) jednak rastu u kontrolnoj). b) kao + (50% rasta) i c) manje od 50% rasta kao ∓, d) potpuna inhibicija rasta je označavana sa neg. (—).

Preliminarnim ispitivanjem subkultura iz mikoteke utvrdili smo da se inhibicija rasta kretala u rasponu od 5—9% DMSO-a, zavisno o pojedinim sojevima.

Sojevi T. violaceuma (25 sojeva) koje smo ispitivali u parazitarnom i saprofitnom obliku (primokulture) pokazali su inhibiciju rasta u svih sojeva u 6% DMSO-u, a neki sojevi bili su inhibirani i u nešto nižim koncentracijama u rasponu od 5,2—5,8% DMSO-a.

Kontrole su pokazale puni rast u 4% DMSO-u, a rast slabijeg intenziteta utvrđen je u 5% DMSO-u.

Preliminarna ispitivanja T. schoenleini u parazitarnom i saprofitnom obliku pokazala su da u 5% koncentraciji DMSO-a ima dobar rast, u 6% rast slabijeg intenziteta, a na 7 i 8% djelomičnu inhibiciju, dok u 9% DMSO-a postojala je inhibacija rasta u svih ispitivanih sojeva, kako u parazitarnom tako i saprofitnom obliku.

Prema našim ranijim ispitivanjima (Grin, Nadaždin, Ožegović[6]), osjetljivost raznih speciesa dermatofita na griseofulvin nije jednaka; isto tako, neki su speciesi više, a neki manje osjetljiviji na griseofulvin, i to u velikom rasponu.

Srednja vrijednost ispitivanih sojeva T. violaceum kretala se u koncentraciji od 10,4 mcg/ml, a srednja vrijednost T. schoenleini 1,8. Međutim, ispitivana osjetljivost na DMSO pokazala je obrnute rezultate: rast T.

violaceuma bio je inhibiran u nižoj koncentraciji (5,2—5,8%) negoli rast T. schoenleini (9%).

Iz toga jasno proizlazi da se radi o raznim mehanizmima djelovanja griseofulvina, odnosno DMSO-a na fungalne elemente dematofita i da postoji raznolikost u njihovoj osjetljivosti prema ovim fungistaticima. Ta razlika očituje se i u morfološkim promjenama gljivičnih elemenata, o čemu će biti kasnije govora.

Osjetljivost dermatofita na griseofulvin nismo prethodno ispitivali jer nam je njegovo djelovanje bilo poznato iz naših ranijih ispitivanja (Grin, Nadaždin, Ožegović[6]). Za ispitivanje fungistatskog djelovanja obiju fungistatika u njihovim međusobnim kombinacijama odabrali smo 20 primokultura. T. violaceuma i 10 primokultura T. schoenleini. Pri tome smo se služili slijedećom metodologijom:

a) Kao test-podloga služila je tekuća Sabouraud-podloga sa 0.20 mg/ml actidiona.

b) Standardna solucija griseofulvina bila je pripremljena tako da se 1 ml apsolutnog alkohola doda 1 mg griseofulvina da bi se dobila solucija 1000 mcg/ml.

METODOLOGIJA

Razne koncentracije griseofulvina pripremane su dodavanjem odgovarajuće količine standardne solucije u sterilnu tekuću podlogu.

Za ispitivanje osjetljivosti T. violaceuma upotrebljavan je griseofulvin u koncentracijama od 3—18 mcg/ml tekuće podloge (3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18).

Za ispitivanje T. schoenleini upotrebljavali smo griseofulvin u koncentraciji od 0,25—4 mcg/ml tekuće podloge (0,25; 0,5; 1, 2, 3, 4).

c) Za sojeve T. violaceuma služila je u kombinaciji sa griseofulvinom koncentracija 4% DMSO-a, a za T. schoenleini 5% DMSO.

Osim toga, zbog pravilne ocjene djelovanja samog DMSO-a na pojedine sojeve dermatofita služila je kontrola u koncentracijama od 4%, 5% i % DMSO-a u ispitivanju T. violaceuma, a u ispitivanju T. schoenleini kontrola u koncentracijama DMSO-a od 5, 6, 7, 8 i 9%.

d) Tekuća Sabouraud-podloga je inokulirana omčom suspenzije patološkog materijala bilo primokulture kada je ispitivana osjetljivost dermatofita u saprofitnom stadiju, ili dlake inficirane dermatofitima kada je ispitivana osjetljivost u parazitarnom stadiju.

Suspenzija patološkog materijala koja je sadržavala dermatofite pripremljena je u obliku metodom opisanom od strane Grina i Ožegovića[7].

Materijal za inokulaciju pripremao se odnosno usitnjavao u nekoliko kapi sterilne destilovane vode koja je sadržavala 20 jed/ml penicilina i 40 jed/ml streptomycina da se predusretne kontaminacija inokuliranog materijala.

Za kontrolu rasta dermatofita svaki ispitivani soj inokuliran je na test-podlogu bez dodatka griseofulvina i DMSO-a.

e) Rezultati su očitavani 14 dana nakon inkubacije na 28°C.

Najmanja količina fungistatika koja je inhibirala rast dermatofita očitana je kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) i presađivana

s tekuće Sabouraud-podloge na Sabouraud glucosa agar radi provjere rezultata.

Obilan rast dermatofita kao u kontrolnim epruvetama bez fungistatika označavan je kao ++ (100% rast).

Inhibitorni efekt većeg stupnja označavan je kao + (50% rast), a inhibitorni efekt manji od 50% označavan je kao ±.

REZULTATI

Rezultati koje smo dobili ovim ispitivanjem prikazani su na tri tabele.

Tabela 1.

MINIMALNA INHIBITORNA KONCENTRACIJA (MIC) SAMOG GRISEOFULVINA I U KOMBINACIJI SA 4% DMSO NA SAPROFITNI OBLIK T. VIOLACEUMA (20 SOJEVA)

Broj spoja	Griseofulvin mcg/ml	Griseofulvin sa 4% DMSO mcg/ml	Rast T. violaceum na 4% DMSO-u
1	10	6	++
2	10	8	++
3	8	5	++
4	5	6	++
5	8	3	++
6	8	8	++
7	6	4	++
8	10	6	++
9	12	6	++
10	12	8	++
11	12	6	++
12	6	3	++
13	12	5	++
14	15	6	++
15	12	6	++
16	12	5	++
17	10	6	++
18	10	5	++
19	15	6	++
20	15	6	++
20	10,4	5,7	

Na tabeli 1. iznijeti su rezultati koji se odnose na 20 sojeva T. violaceuma u saprofitnom stanju u kojih je ispitivana minimalna inhibitorna koncentracija kako samog griseofulvina, tako i u kombinaciji sa 4% dimethyl-sulfoxidom. Iz te tabele se razabire da su svi sojevi obilno rasli u čistom DMSO-u i da se minimalna inhibitorna koncentracija postiže u nižim koncentracijama kada se griseofulvinu dodaje 4% DMSO.

Statistički, koristeći se t-testom, može se utvrditi da griseofulvin u kombinaciji sa 4% DMSO djeluje gotovo 2 puta intenzivnije fungistično na saprofitne oblike T. violaceuma negoli griseofulvin sam u istoj koncentraciji ($t = 161{,}01$ (19 FD) $P > 0{,}01$).

Tabela 2.

MINIMALNA INHIBITORNA KONCENTRACIJA (MIC) SAMOG GRISEOFULVINA I U KOMBINACIJI SA 5% DMSO NA SAPROFITNI OBLIK T. SCHOENLEINI (10 SPOJEVA)

Broj spoja	Griseofulvin mcg/ml	Griseofulvin + 5% DMSO mcg/ml	Rast T. schoenleini na 5% DMSO-u
1	1	1	++
2	1	1	++
3	2	2	++
4	1	1	++
5	2	2	++
6	2	2	++
7	1	1	++
8	2	2	++
9	3	3	++
10	3	3	++
	1,8	1,8	

Tabela 2. pokazuje analogna ispitivanja sa 10 sojeva T. schoenleini u saprofitnom obliku, ali sa 5% DMSO, u kojoj najnižoj koncentraciji T. schoenleini ne pokazuje više inhibiciju. Za razliku od T. violaceuma, ispitivani sojevi T. schoenleini nisu bili jače inhibirani u kombinaciji sa 5% DMSO negoli samim griseofulvinom ($t = 0$ (9 DF) $P < 0{,}05$).

Daljnja ispitivanja odnosila su se na pitanje da li postoji razlika u fungistatičnom djelovanju ispitivanih fungistatika (griseofulvin, DMSO i njihova kombinacija) na dermatofite s obzirom na njihove biološke razlike u parazitarnom, odnosno saprofitskom stanju.

Rezultati ovih ispitivanja prikazani su na tabelama 3. i 4.

Tabela 3.

MINIMALNA INHIBITORNA KONCENTRACIJA (MIC) SAMOG GRISEOFULVINA I U KOMBINACIJA SA 4% DMSO NA RAST SAPROFITNOG I PARAZITARNOG OBLIKA T. VIOLACEUMA (8 SPOJEVA)

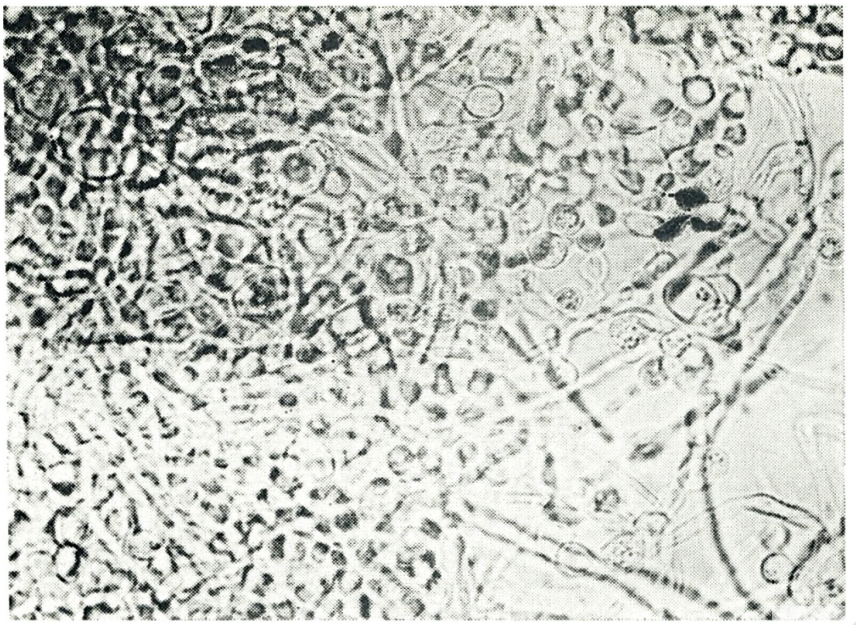
Broj spoja	Parazitarni oblik			Saprofitni oblik		
	griseofulvin mcg/ml	4 % DMSO + griseofulvin mcg/ml	rast na 4 % DMSO-u	griseofulvin mcg/ml	4 % DMSO + griseofulvin mcg/ml	rast na 4 % DMSO-u
1	8	3	++	15	10	++
2	12	3	++	15	10	++
3	12	3	++	15	8	++
4	10	3	++	15	8	++
5	10	3	++	15	10	++
6	10	3	++	15	5	++
7	8	3	++	15	6	++
8	10	3	++	15	10	++
	10	3		15	8,4	

Na osnovu rezultata prikazanih na tab. 3. proizlazi analizom variance da griseofulvin bilo sam ili u kombinaciji sa DMSO-om djeluje jače na parazitarne oblike T. violaceuma nego na saprofitne ($F = 153.7$ (1,28 DF) $P > 0,01$) i da griseofulvin u kombinaciji sa 4% DMSO-om ima jače fungistatsko djelovanje na T. violaceum od samog griseofulvina u istoj koncentraciji ($F = 256,2$ (1,28 DF) $P > 0,01$).

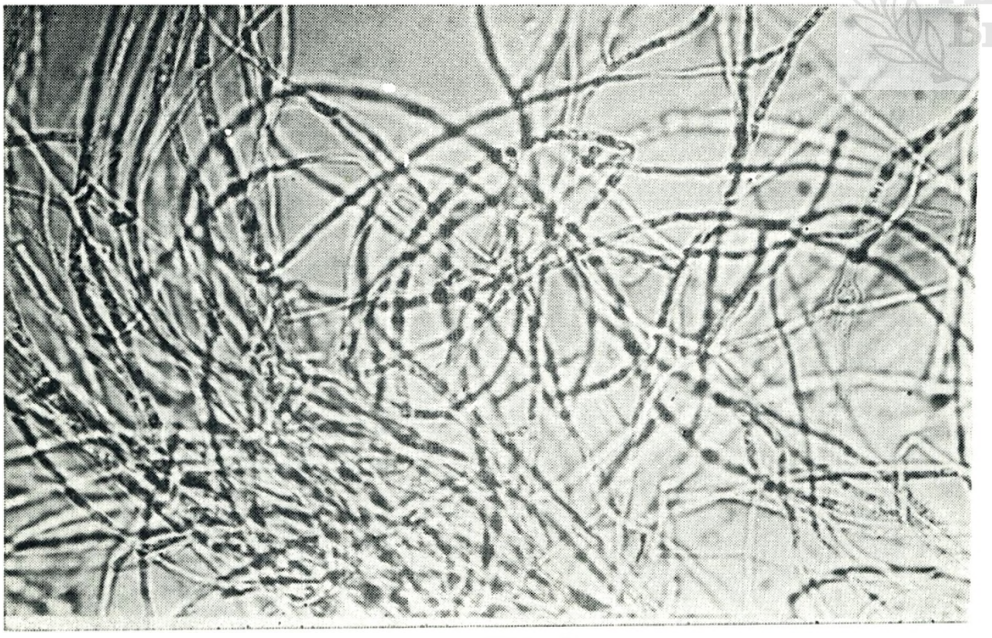
Tabela 4.

MINIMALNA INHIBITORNA KONCENTRACIJA (MIC) SAMOG GRISEOFULVINA I U KOMBINACIJA SA 5% DMSO NA RAST SAPROFITNOG I PARAZITARNOG OBLIKA T. SCHOENLEINI (9 SPOJEVA)

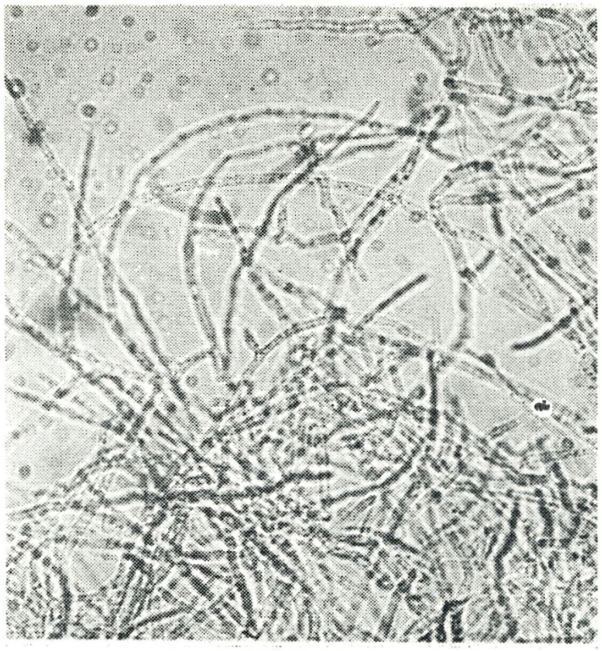
Broj spoja	Parazitarni oblik			Saprofitni oblik		
	griseofulvin mcg/ml	5 % DMSO + griseofulvin mcg/ml	rast na 5 % DMSO-u	griseofulvin mcg/ml	5 % DMSO + griseofulvin mcg/ml	rast na 5 % DMSO-u
1	2	0,5	++	1	1	++
2	2	1	++	2	2	++
3	2	1	++	2	1	++
4	2	1	++	2	2	++
5	2	0,5	++	2	2	++
6	3	1	++	3	2	++
7	2	0,5	++	3	2	++
8	2	1	++	2	2	++
9	1	0,5	++	2	2	++
	2	0,8		2,1	1,8	



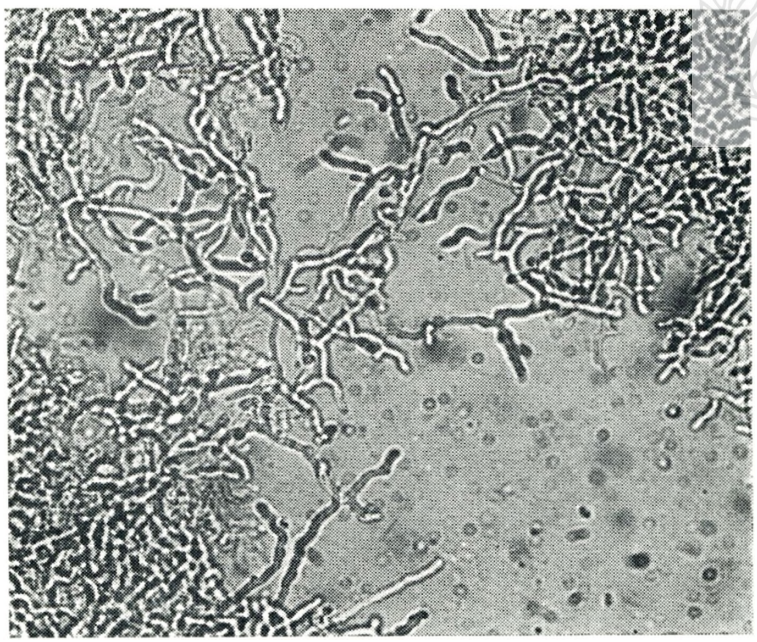
Slika 1.
Nativni preparat iz kulture T. tonsuransa (br. 1417) u Sabouraud tekućoj podlozi s dodatkom 6% DMSO-a. Pojava chlamydospora



Slika 2.
Nativni preparat istog soja T. tonsuransa kao u sl. 1. u Sabouraud tekućoj podlozi bez dodatka DMSO-a

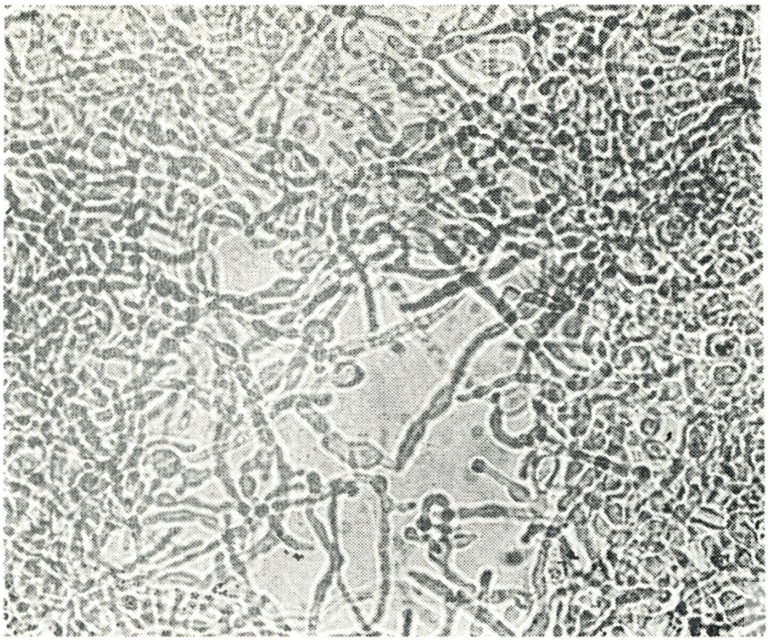


Slika 3.
Nativni preparat T. violaceum-a u Sabouraud tekućoj podlozi bez dodatka fungistatika

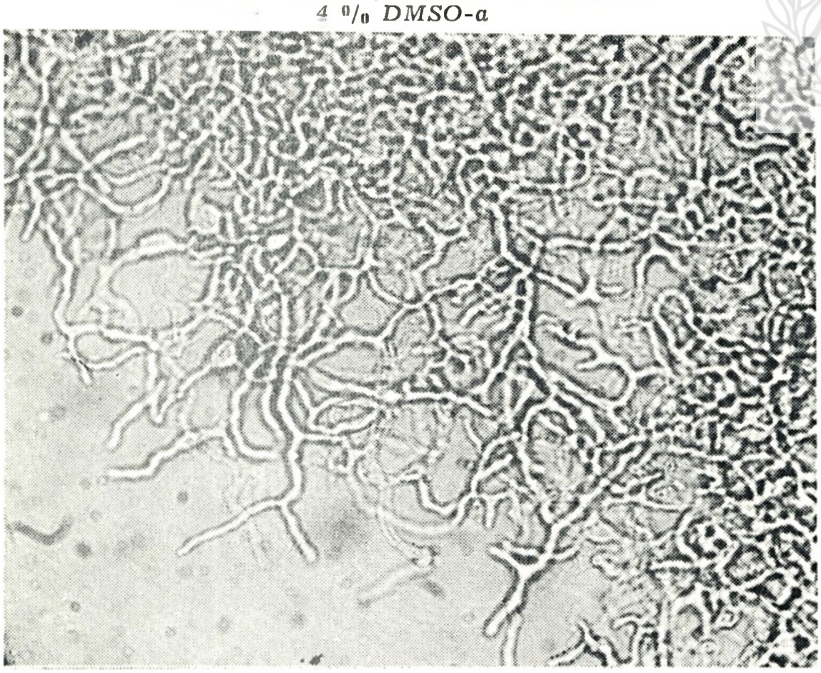


Slika 4.
Nativni preparat kulture T. violaceum-a u Sabouraud tekućoj podlozi s dotatkom 10 mcg/ml griseofulvina.

ANU BiH АНУ БиХ

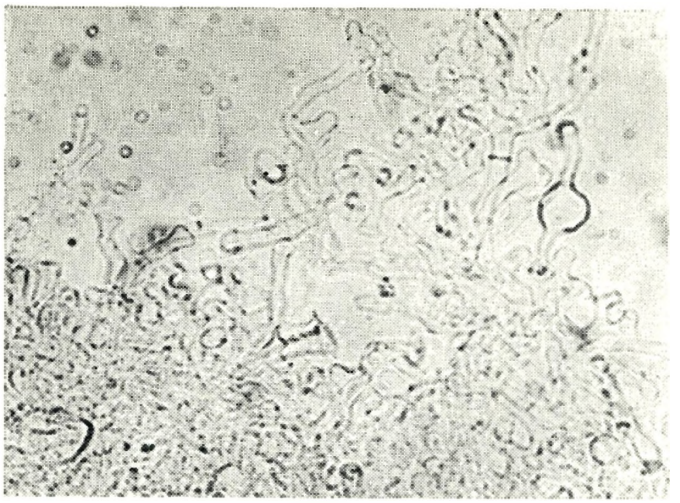


Slika 5.
Nativni preparat kulture T. violaceum-a u Sabouraud tekućoj podlozi s dodatkom 4 % DMSO-a



Slika 6.
Nativni preparat iz kulture T. violaceum-a u Sabouraud tekućoj podlozi s dodatkom 4% DMSO-a i griseofulvina (4 mcg/ml)

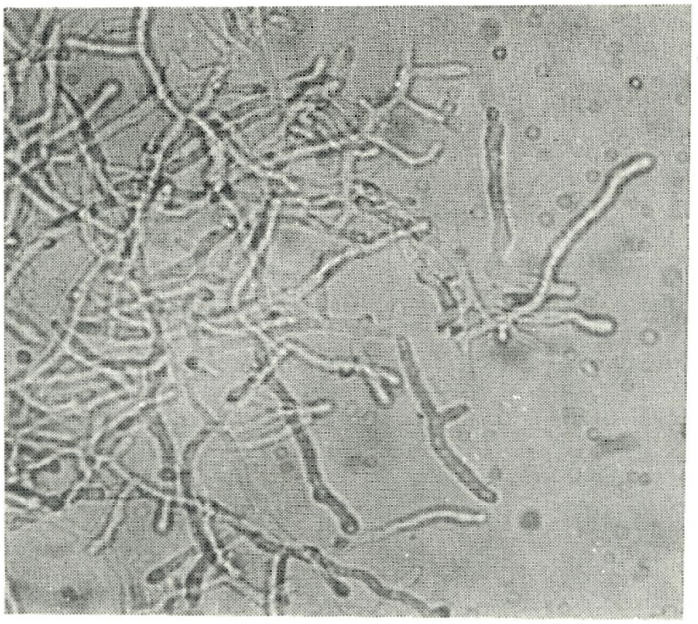
ANU BiH АНУ БиХ



Slika 7.

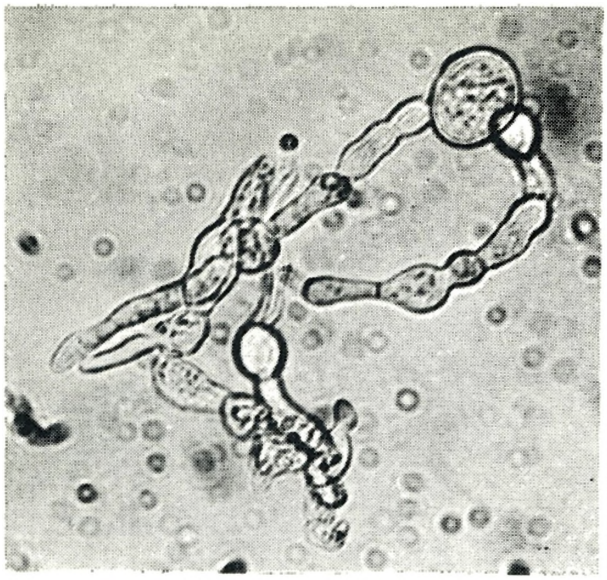
Nativni preparat iz kulture T. schoenleini u Sabouraud tekućoj podlozi s dodatkom 5% DMSO-a. Pojava chlamydospora.

ANU BiH АНУ БиХ

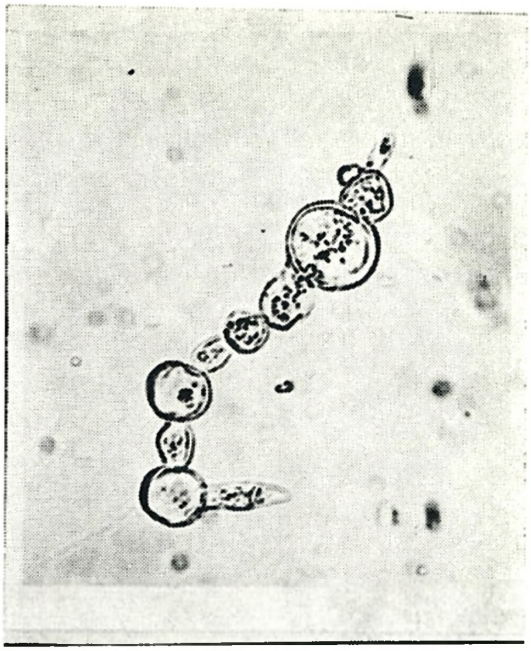


Slika 8.

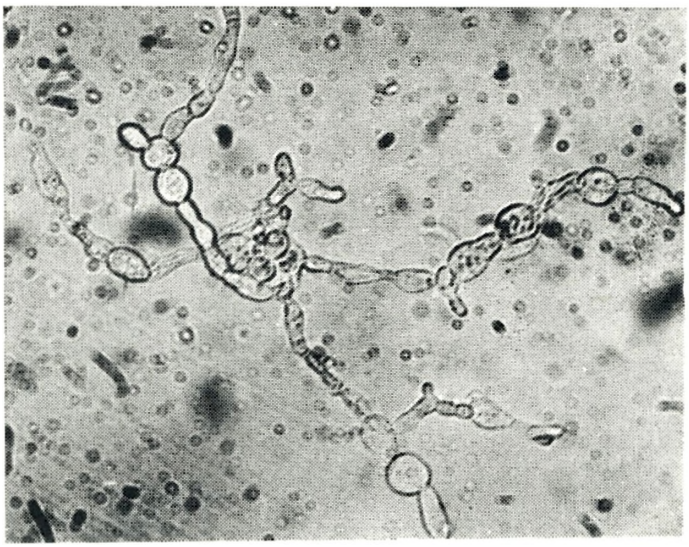
Nativni preparat iz kulture T. schoenleini u Sabouraud tekućoj podlozi s dodatkom 5% DMSO-a i griseofulvina (0,5 mcg/ml)



Slika 9.
Nativni preparat iz kulture T. violaceum-a u Sabouraud tekućoj podlozi s dodatkom 4%/o DMSO-a i griseofulvina (3 mcg/ml). Pojava degenerativnih oblika koji su presadivanjem na Sabouraud agar bez dodatka fungistatika pokazali rast.



Slika 11.
Nativni preparat kulture T. violaceum-a iz Sabouraud tekuće podloge s dodatkom 4% DMSO-a i griseofulvina (5 mcg/ml) s pojavom degenerativnih oblika T. violaceum-a s djelomičnom granuliranom i ispranom citoplazmom koji su izgubili vitalnost. Presadivanjem na Sabouraud agar bez dodatka fungistitika nije postignut rast kulture.



Slika 10.
Nativni preparat kulture T. violaceum-a iz Sabouraud tekuće podloge s dodatkom 4% DMSO-a i griseofulvin (3 mcg/ml). Degenerativni oblici.

Tabela 4. pokazuje rezultate analognih ispitivanja koji se odnose na 9 sojeva T. schoenleini.

Statistički, analizom variance ovih rezultata, može se pokazati da je intenzivnije fungistatsko djelovanje u kombinaciji griseofulvina sa 5% DMSO od čistog griseofulvina ($F = 45,0$ (1,32 DF) $P > 0,01$) i da u toj kombinaciji ima jače fungistatsko djelovanje na parazitarne nego saprofitske oblike T. schoenleini ($F = 31,6$ (1,32 DF) $P > 0,01$).

Mikroskopske promjene koje nastaju na fungalnim elementima pod uplivom DMSO-a i u kombinaciji sa griseofulvinom prikazane su u nativnim mikroskopskim preparatima na slikama br. 1—11.

Pod uplivom DMSO-a u nižim koncentracijama (5—7%) stvara se veliki broj chlamydospora i morfoloških degenerativnih oblika sa izrazitom granulacijom citoplasme koja kod nekih fungalnih elemenata djelomično ili potpuno iščezava. Slika br. 1 prikazuje nativni preparat subkulture T. tonsuransa (br. 1417) iz tekuće Sabouraudove podloge sa dodatkom 5% DMSO poslije 14 dana inkubacije sa stvaranjem obilnih chlamydospora, a na sl. 2 prikazan je radi upotrebe isti soj Tr. tonsuransa (br. 1417) koji je rastao bez dodatka DMSO-a i gdje takve promjene ne postoje.

U kombinaciji DMSO-a sa griseofulvinom dolazi više do izražaja komponenta djelovanja griseofulvina (»curling factor«) nego DMSO-a i ona postaje, čini se, samo intenzivnija dodavanjem DMSO-a.

Slike 3, 4, 5, 6 pokazuju te odnose za T. violaceum. Analogne promjene zapažene su i u T. sohoenleini (sl. 7 i 8).

Inhibicija rasta dermatofita djelovanjem obiju fungistatika koju utvrđujemo makroskopski ne znači da je potpuno prestala i vitalnost glijičnih elemenata.

U takvih kultura mikroskopski se razabiru manje ili više očuvani bizarni morfološki oblici (sl. 9, 10, 11) sa očitim degenerativnim promjenama (ruptura, fragmentacija hifa, isprana citoplasma itd.), ali često još i sa očuvanom sposobnošću vegetacije na odgovarajućoj hranjivoj podlozi bez fungistatika.

Sl. 1—11

ERNEST I. GRIN and KSENIJA KARLOVAC

INVESTIGATIONS IN VITRO ON FUNGISTATIC EFFECT OF GRISEOFULVIN ON DERMATOPHYTES *(TR. SCHOENLEINI AND TR. VIOLACEUM)* IN COMBINATION WITH DIMETHYLSULFOXIDE

SUMMARY

Investigations were performed regarding the fungistatic effect of griseofulvin in combination with dimethyl sulfoxide (DMSO) on different dermatophyte species in various concentrations. It was found that the minimal inhibitory concentration (MIC) of DMSO ranged from 5—9% DMSO. T. violaceum was inhibited in concentrations between 5,2—5,8% of DMSO but for inhibition of T. schoenleini an average concentration of 9% was necessary.

The sensitivity of this two species of dermatophytes to griseofulvin was in opposite order: T. schoenleini strains being more sensitive than those of T. violaceum. It is supposed therefore that a different mode of action is involved by this two fungistatics. This could be also demonstrated in different development of microscopical changes of the fungal elements being influenced by DMSO (producing chlamydospores) or by griseofulvin (curling of hyphae).

The combination of griseofulvin and DMSO enhanced the fungistatic action on T. violaceum strains in both saprophytic and parasitic stage. However, T. schoenleini strains were not enhanced by this combination as saprophytes but as parasites only.

It is assumed that by simultaneous fungistatic action of griseofulvin and DMSO there is in question rather a creation of increased action of griseofulvin than an addition of specific effects of both fungistatics.

LITERATURA

1. Leake C. D.: Ann. N. Y. Acad. Sci., vol. 141, Art. 1, 1 — 671 (1967).
2. Jacob S. W. and Wood D. C.: Current Therapeutic Research, vol. 9; 4 (1967).
3. Kligman A. M.: a) JAMA, vol 193; 11, 923—928 (1965).
   b) JAMA, vol. 193; 10, 796—804 (1965).
4. Bean G. A.: Plant Dis. Rep., vol. 49; 810—811 (1965).
5. Male O.: Arch. klin. exp. Derm., 233; 1, 1—10 (1968).
6. Grin E. I., Nadaždin M. and Ožegović L.: Acta. derm.-venereol., 45; 283—287 (1965).
7. Grin E. I. and Ožegović L.: Higijena, XI; 1, (1965).

ANU БиХ АНУ БиХ