

mykosen

Herausgeber und Schriftleiter: Hans Götz, Essen, Heinz Grimmer, Wiesbaden
Detlev Hantschke, Essen, Wolf Meinhof, München, Hans Rieth, Hamburg



1/1970

1. Januar

Aus dem Lehrstuhl für Allgemeine und Kommunale Hygiene
(Komm. Leiter: Doz. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. W. WEUFFEN)
der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Erprobung antimykotisch wirksamer Substanzen am Modell der experimentellen Hahnenkammepidermophytie

2. Mitt.: Vergleich von Ergebnissen des Fungistase-, Fungizidie- und Hahnenkammepidermophytietests

W. WEUFFEN u. A. KRAMER

Mit dem Modell der experimentellen Hahnenkammepidermophytie (Hahnenkammepidermophytietest) steht uns eine In-vivo-Prüfmethode zur Verfügung, die an Stelle einer lediglich alternativen Bewertung, wirksam oder unwirksam, einen Wirkungsvergleich der Prüfsubstanzen untereinander gestattet. Weitere Untersuchungen sollten einer Überprüfung möglicher Korrelationen zwischen den Ergebnissen von 2 In-vitro-Tests, dem Fungistase- und dem Fungizidietest, einerseits, mit dem Hahnenkammepidermophytietest andererseits dienen. Durch diese Testungen haben wir gleichzeitig das Tiermodell weiter erprobt.

Methodik

Beim *Fungistasetest* (WEUFFEN u. HERRMANN, 1967) arbeiten wir mit Pilzkulturen auf festem Nährmedium. Die Wirksamkeit wird sowohl für die Reinsubstanz, als auch für das jeweilige Präparat bestimmt. Bei der Herstellung der Verdünnungsreihen wird die reine Prüfsubstanz bzw. das Präparat selbst (z. B. eine 3%ige Wirkstofflösung) dem Nährmedium in geometrisch abgestuften Konzentrationen zugesetzt. Die verwendeten Lösungsmittel sind in **Tabelle 1** angegeben. Die Kennzahl der fungistatischen Wirksamkeit (KfW_{10}) stellt einen Mittelwert der Prüfungsergebnisse an 10 Testpilzen dar; sie ist als $^{-2} \log$ der Substanzverdünnung, bis zu der im Durchschnitt Fungistase auftritt, angegeben (WEUFFEN, 1966) (s. Fußnote Tab. 1).

Zur Testung der *Fungizidie* wird in Anlehnung an KLEWE u. MITARB. (1959) mit 0,89%iger Kochsalzlösung eine Abschwemmung von einer 10tägigen Trichophyton-mentagrophytes-Kultur, typisch wachsend auf Grütz-III-Nährmedium bei 24° C, hergestellt. 0,1 ml dieser Keimsuspension werden 10 ml der unverdünnten Präparate zugesetzt bzw. zur Kontrolle 10 ml des benutzten Lösungsmittels ohne Substanz sowie 10 ml 0,89%iger Kochsalzlösung. Nach Einwirkungszeiten von 15 und 30 Sek. sowie 1, 2, 4, 8, 16 und 64 Min. wird aus dem Prüfsubstanzen-Keimsuspensions-Gemisch bzw. aus dem Kontrollansatz 1 Öse Material entnommen, bei wasserlöslichen Substanzen in 10 ml Glukose-Pepton-Nährlösung (Glukose 40 g, Pepton 10 g, dest. Wasser 1000 ml), bei wasserunlöslichen in 10 ml des verwendeten Lösungsmittels überimpft. Diese Suspension wird 5 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert, dekantiert, erneut in 10 ml 0,89%iger Kochsalzlösung suspendiert und nochmals zentrifugiert sowie dekantiert. Das gereinigte Sediment wird in 0,5 ml Glukose-Pepton-Nährlösung aufgeschwemmt und auf Grütz-III-Nährmedium ausgestrichen. Nach etwa 7 Tagen Bebrütung (24° C) werden die Kolonien gezählt und die Einwirkungszeit für 50 und > 99%ige Abtötung bestimmt.

Die *Hahnenkammepidermophytie* wird durch eine künstliche Infektion mit einem adaptierten, aus einer menschlichen Dermatomykose isolierten Trichophyton-mentagrophytes-Stamm am Hahnenkamm erzeugt (WEUFFEN, 1967). Das Ergebnis wird in Form des Erfolgskoeffizienten e ausgedrückt, der angibt, wieviel mal rascher die behandelten gegenüber den unbehandelten Tieren ($e = 1$) ausheilen. Dabei wird grundsätzlich das Behandlungsmodell der „akuten Hahnenkammepidermophytie“ von dem der „chronischen“ unterschieden. Im 1. Fall beginnt die Präparaterprobung etwa am 20. Tag p. i., im 2. Fall dagegen erst etwa am 50. Tag. Die Präparate wurden jeweils unverdünnt am Hahnenkamm angewendet.

Bei der Auswahl der *Prüfsubstanzen* (Tab. 1) gingen wir von den Ergebnissen des Fungistasetests aus und nahmen neben fungistatisch gut und sehr gut wirksamen auch praktisch wirkungslose Verbindungen in die Testungen auf. Die den Prüfsubstanzen in Tabelle 1 nachgestellten Prozentangaben bezeichnen den Wirkstoffgehalt im Präparat.

Es handelt sich dabei um:

2 Standardpräparate: Kupfer (II)-sulfat (1) DAB 7 und Actol® (2) (VEB Arzneimittelwerk Dresden),

5-Nitrofurfural-diäthylacetal (3) (WEUFFEN u. TIEDT, 1967),

4-Chlorbenzylisothiocyanat (4) und α -Naphthylisothiocyanat (5) (PROFFT, TEUBNER u. WEUFFEN, 1967),

3,5-Dibenzyl-2-thion-tetrahydro-1,3,5-thiadiazin, Laborbezeichnung D 47 (WEUFFEN, MARTIN u. SCHADE, 1963) in 1,2-Propylenglykol (6), in Dimethylsulfoxid (7) und als Handelspräparat Afungin (8) (VEB Leipziger Arzneimittelwerk) im Lösungsmittelgemisch Benzylalkohol/Cetiolan getestet, „episan antimykotisch“ (9) (VEB EPISAN Zeulenroda), eine flüssige Seife auf der Basis eines Tensidgemisches mit Zusatz von D 47 und hautpflegenden Wirkstoffen und „episan hautpflegend“ (10), das gleiche Präparat, jedoch ohne D 47.

2fungistatisch praktisch unwirksame Substanzen: Salicylamid- β -D-glucosid (11) und Diphenyldisulfid-2,2-dicarbonsäure-bis-(α -naphthyl)-amid (12) freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. G. WAGNER, Direktor des Pharmazeutischen Instituts Leipzig überlassen) und

die verwendeten Lösungsmittel (13—15).

Ergebnisse und Diskussion

Zwischen den Ergebnissen des Fungistase- und des Hahnenkammepidermophytietests besteht eine gute Übereinstimmung (Tab. 1). Nur D 47, in Propylenglykol aufgeschwemmt, bildet eine Ausnahme, es ist im Fungistasetest wirksam, am Hahnenkamm jedoch unwirksam. Diese Inaktivität im Tierversuch dürfte auf die weitgehende Unlöslichkeit des D 47 in Propylenglykol zurückzuführen sein.

Die Erprobung der Standardpräparate Kupfer(II)-sulfat und Actol® am Behandlungsmodell der „akuten Mykose“ bestätigt die bereits in vitro geringe Wirksamkeit des Kupfer(II)-sulfats einerseits bzw. die in vitro gute Wirksamkeit des Actols andererseits.

Bei den Prüfergebnissen an der „chronischen Mykose“ sind die Beziehungen zum Fungistatetest nicht so deutlich. Das 5-Nitrofurfuraldiäthylacetal verkürzt den Krankheitsverlauf nur um das 3fache gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren, trotz guter Wirksamkeit im Fungistasetest. Die Afunginerprobung zeigt noch deutlicher, daß das Behandlungsmodell der „chronischen Mykose“ erhöhte Anforderungen an die Wirkungsentfaltung der Präparate zu stellen scheint. Möglicherweise ist also die Wirksamkeit des 5-Nitro-furfural-diäthylacetals am Modell der „akuten Mykose“ und bei höherer Anwendungskonzentration als nur 1%/ig bedeutend besser, so daß diese Substanz, nicht zuletzt auch auf Grund ihrer hautfreundlichen Eigenschaften, Bedeutung für die Behandlung menschlicher Dermatomykosen erlangen könnte.

Große Beachtung verdient das 4-Chlorbenzylisothiocyanat als 1%/ige Lösung auf Grund seiner hohen antimykotischen Wirksamkeit ($e = 6,5$). Bereits am 5. Tag der Substanzapplikation setzte die Heilung am Hahnenkamm ein und war bei $\frac{1}{3}$ der Versuchstiere am 9. Behandlungstag beendet. Bei den Kontrolltieren war der Spontanheilungsprozeß dagegen z. T. erst am 115. Tag abgeschlossen. Bei der Präparaterprobung traten Hautreizungen in Form von Ödemen und Nekrosen am eigentlichen Mykoseherd auf. Unter Schorfbildung heilte die Epidermophytie jedoch komplikationslos ab. Dagegen war das α -Naphthylisothiocyanat in vitro nur mäßig wirksam, im Tierexperiment, 0,5%/ig angewandt, sogar wirkungslos und verursachte in dieser Konzentration keinerlei Hautreizungen. Werden beide Isothiocyanate in höherer Konzentration (2%/ig) am

Tabelle 1: Ergebnisse des Fungistase-, Fungizidie- und Hahnenkammepidermophytietests

Nr.	Prüfpräparat	Verwendetes Lösungsmittel ^{*)}	Fungistasetest (KfW ₁₀) ^{**)}		Fungizidietest		Hahnenkammepidermophytietest	
			Präparat	Rein- substanz	50 %ige Abtötung nach	> 99%ige ² Abtötung nach	„akut“	„chronisch“
1	Kupfer (II)-sulfat (3 %)	P	5,3	10,4	1 Min.	4 Min.	1,8	∅
2	Actol®: 5-Bromsalicylsäureisopropylamid (10 %) in T	W/u	11,4	14,7	1 Min.	16 Min.	4,5	∅
3	5-Nitrofurfuraldiäthylacetal (1 %)	P	7,2	13,9	∅	∅	∅	3,0
4	4-Chlorbenzylisothiocyanat (1 %)	P	11,4	18,1	< 15 Sek.	30 Sek.	6,5	∅
		P	12,6	18,1	< 15 Sek.	< 15 Sek.	10,3	∅
5	α-Naphthylisothiocyanat (0,5 %)	P	12,5	5,1	30 Sek.	2 Min.	1,6	∅
6	D 47 (3 %)	P	11,2	16,3	< 15 Sek.	1 Min.	0,6	∅
7	D 47 (3 %)	D	8,5	13,6	< 15 Sek.	1 Min.	3,8	∅
8	Afungin®: D 47 (3 %) in BC	W/u	8,3	13,4	< 15 Sek.	< 15 Sek.	4,8	2,7
9	episan antimykotisch: D 47 (2 %)	W/u	11,1	16,2	30 Sek.	2 Min.	9,4	∅
10	episan hautpflegend	W/u	9,0	14,1	8 Min.	> 64 Min.	5,3	∅
11	Salicylamid-β-D-glucosid (3 %)	W	unwirksam	2,8	64 Min.	> 64 Min.	1,1	∅
12	Diphenyldisulfid-2,2-dicarbonsäurebis-(α-naphthyl)-amid	P	1,5	6,6	∅	∅	2,2	∅
13	Propylenglykol	W/u	3,3	3,3	30 Sek.	2 Min.	1,0	∅
14	Dimethylsulfoxid	W/u	4,2	4,2	< 15 Sek.	30 Sek.	2,4	∅
15	Benzylalkohol/Cetiolan 1 : 1	W/u	9,3	9,3	1 Min.	8 Min.	2,9	∅

*) P = Propylenglykol, T = Triäthylenglykol, D = Dimethylsulfoxid, BC = Benzylalkohol/Cetiolan 1 : 1; W/u = im Fungistasetest Wasser, übrige Tests unverdünnt

**) $-\log$ der Substanzverdünnung, z. B. KfW₁₀ 1 = 1 : 2; KfW₁₀ 2 = 1 : 4; KfW₁₀ 10 = 1 : 1024; KfW₁₀ 11 = 1 : 2048; KfW₁₀ 18 = 1 : 262 144

Hahnenkamm eingesetzt, kommt es zu einer erheblichen Steigerung der antimykotischen Wirksamkeit, verbunden mit starker Bläschen- und Nekrosenbildung, die bei einigen Tieren an der ganzen Kammseite, also auch an den gesunden Hautpartien, auftraten

(Abb. 1). Beide Präparate wurden wegen dieser heftigen Hautreaktionen am 4. Behandlungstag abgesetzt. Die nekrotisch veränderten Kammpartien verkrusteten, und die Kruste wurde zwischen dem 9. und 18. Tag nach der letzten Substanzgabe abgestoßen. Die Herde heilten ohne Narbenbildung ab. In einem Fall allerdings war der Hahnenkamm am Ende des Versuches um etwa ein Drittel kleiner (Schrumpfung?) als zu Beginn der Substanzapplikation. Jedoch lag eine 19-tägige Substanzeinwirkung bei einer außerordentlich schwer verlaufenden „chronischen“ Mykose vor (Abb. 2). Sensibilisierungseffekte konnten beim Hahnenkammepidermophytietest dagegen nicht nachgewiesen werden. Die Anwendungskonzentration bestimmt also den antimykotischen Effekt in entscheidendem Maße mit, zugleich auch die Hauttoxizität. Dieser konzentrationsabhängige Wirkungsunterschied, der beim α -Naphthylisothiocyanat besonders ausgeprägt ist, konnte im Fungistasetest nicht erfaßt werden.

Besonders hervorzuheben, weil von großer praktischer Bedeutung, ist die erstaunlich hohe Wirksamkeit von „episan antimykotisch“. Es übertrifft sogar das Handelspräparat „Afungin“ an antimykotischer Aktivität. Die Wirkungsentfaltung des D 47 scheint durch die Kombination mit den Tensiden in besonderem Maße begünstigt zu werden. Aber auch „episan hautpflegend“, also das Tensidgemisch allein, ist antimykotisch hoch wirksam. Diese beachtliche Wirkungsentfaltung beider Präparate dürfte z. T. auf ihre große Oberflächenaktivität zurückzuführen sein. Beide Seifen bildeten einen sichtbaren filmartigen Überzug am Hahnenkamm. Ferner ist zu berücksichtigen, daß nicht dem Waschen entsprechende Gebrauchsverdünnungen, sondern die Originallösungen appliziert wurden. Trotzdem dürfte beiden Präparaten zumindestens eine Präventivwirkung gegen Pilzinfektionen zuzusprechen sein. „Episan antimykotisch“ könnte darüber hinaus vielleicht auch therapeutische Bedeutung erlangen.

Die Wirkungslosigkeit des Salicylamid- β -D-glucosids in beiden Prüfverfahren ist ein weiteres Beispiel für die Übereinstimmung von Fungistase- und Hahnenkammepidermophytietest; sie dürfte durch die entgiftende Funktion der glukosidischen Bindung bedingt sein.

Bei den Behandlungsversuchen mit Salicylamid- β -D-glucosid, mit α -Naphthylisothiocyanat und mit „episan antimykotisch“ wurde die Versuchsanordnung dahingehend modifiziert, daß beide Kammseiten infiziert und behandelt wurden. Der Heilungsverlauf war auf beiden Kammseiten der gleiche. Ob durch beidseitige Infektion des Hahnenkamms die eine Kammseite, indem sie nicht behandelt wird, als Kontrolle zur behandelten anderen Seite dienen kann, wurde noch nicht überprüft.

Auf Grund weitgehender Übereinstimmung der fungistatischen mit der antimykotischen Wirksamkeit dürfte der Fungistasetest u. E. zur Vorauswahl von Substanzen aus größeren Substanzserien durchaus geeignet sein. Der Hahnenkammepidermophytietest stellt im Gegensatz zum Fungistasetest erschwerte und praxisbezogene Bedingungen an die Wirkungsentfaltung einer Substanz. Ihm kommt damit bereits Bedeutung im Hinblick auf die Beurteilung der Einsatzmöglichkeiten einer Substanz als Antimykotikum zu.

Die fungizide Aktivität weicht bei mehreren Prüfsubstanzen von der fungistatischen und auch von der antimykotischen Wirksamkeit ab, sowohl im Sinne einer geringeren Wirksamkeit als auch umgekehrt. Der Fungizidietest liefert also nicht unbedingt Anhaltspunkte für die antimykotische Wirksamkeit einer Substanz und sollte daher der Desinfektionsmittelprüfung vorbehalten bleiben.

Zusammenfassung

Beim Vergleich der Ergebnisse des Fungistasetests mit denen des Hahnenkammepidermophytietests zeigt sich eine recht gute Übereinstimmung. Die Ergebnisse des Fungizidietests korrelieren dagegen mit denen der beiden erstgenannten Prüfverfahren nicht.

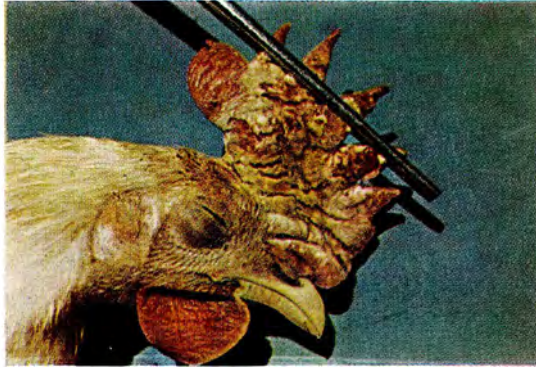


Abb. 1: Bläschen- und Nekrosenbildung nach 2maliger Applikation von α -Naphthylisothiocyanat, 2%ig in Propylenglykol

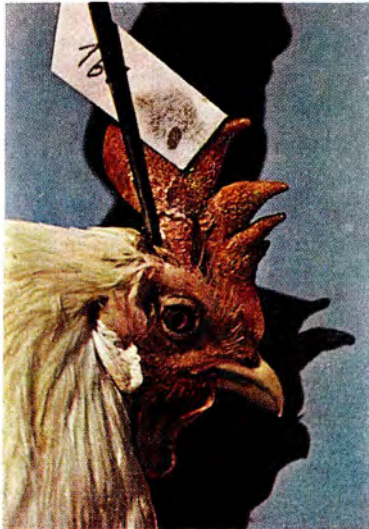


Abb. 2: Mit 4-Chlorbenzylisothiocyanat sanierte chronische Mykose, Schorfreste und Verkleinerung des Kammes auf fast $\frac{1}{3}$ seiner ursprünglichen Größe

Überraschend und von großer praktischer Bedeutung ist die erstaunlich hohe Wirksamkeit der Kombination D 47/Tensidgemisch in „episan antimykotisch“.

Der Hahnenkammepidermophytietest dürfte als ein wertvoller Bestandteil der verschiedenen Prüfmethode für den Siebttest bei der Suche nach einem Antimykotikum anzusehen sein.

Summary

When comparing the results of the fungistasis testings with those of the cockscomb epidermophyty a rather high degree of correspondence is revealed. The results of the fungicidity testings, however, do not correlate with the two test procedures mentioned above.

The surprisingly high effectivity of the combination D 47/tenside mixture in episan antimycotic has not been expected and is of great practical importance.

Cockscomb epidermophyty testings should be regarded as a valuable part of different assay methods for the sifting test when searching for an antimycotic.

Résumé

En comparant les résultats du test de fongistase avec ceux du test d'épidermophytie de crête-de-coq il se montre un assez bon accord. Les résultats du test de fongicide cependant ne sont pas en corrélation avec ceux des deux susdites méthodes d'essai.

L'efficacité extraordinairement haute de la combinaison D 47/mélange de Tensid en episan antimycotique est surprenante et de grande importance pratique.

Le test d'épidermophytie de crête-de-coq devrait former un élément essentiel des diverses méthodes d'essai pour le test de tamis à la recherche d'un antimycotikum.

Резюме

При сравнении результатов теста фунгистаза с результатами теста эпидермофитии петушиного гребня проявляется довольно хорошее соглашение. Зато результаты теста фунгицида не соглашаются с результатами выше-названных проверочных способов.

Поразительным и имеющим большое практическое значение является удивительно высокая эффективность комбинации D 47/смеси тензида в эпизане антимикотическом.

Тест эпидермофитии петушиного гребня должен быть ценной составной частью различных проверочных методов для теста просеивания в поисках антимикотических средств.

Literatur

1. KLIEWE, H., K. HEICKEN, B. SCHMIDT, K. WAGENER, J. WÜSTENBERG, H. OSTER-TAG, L. GRÜN, TH. LAMMERS u. K. MÜL-HENS (1958): Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel. Zbl. Bakteri-ol., Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg. I. Abt., Orig. 173, 307—317.
2. PROFFT, E., H. TEUBNER u. W. WEUFFEN (1967): Zusammenhänge zwischen chemischer Konstitution und keimwidriger Wirkung 15. Mitt.: Herstellung und bakterio-statische Eigenschaften einiger substituierter Benzylisothiocyanate. Arch. exp. Veterinärmed. 21, 225—233.
3. WEUFFEN, W. (1966): Zusammenhänge zwischen chemischer Konstitution und keimwidriger Wirkung 12. Mitt.: Über die fungistatischen Eigenschaften einiger Dithiocarbamidsäureester (Dithiourethane) und dithiocarbamidsaurer Salze. Pharmazie 21, 686—694.
4. WEUFFEN, W. (1968): Erprobung antimy-kotisch wirksamer Substanzen am Modell der experimentellen Hahnenkammepider-phytie. 1. Mitt.: Methodik und Testung von 3,5-Dibenzyl-2-thiontetrahydro-1,3,5-thi-adiazin (D 47). mykosen 11, 33—39.
5. WEUFFEN, W. u. B. HERRMANN (1967): Ein Beitrag zur Methodik des Fungistasetests unter besonderer Berücksichtigung des Pleomorphismus von Dermatophyten. Z. med. Labortechnik 8, 301—314.
6. WEUFFEN, W., D. MARTIN u. W. SCHADE (1963): Zusammenhänge zwischen chemischer Konstitution und keimwidriger Wirkung, 1. Mitt.: Untersuchungen der bakteriostatischen Eigenschaften einiger 2-Thi-on-tetrahydro-1,3,5-thiadiazine. Pharmazie 18, 420—426.
7. WEUFFEN, W. u. H. TIEDT (1967): Unter-suchungen über 5-Nitrofurufuralacetale. 1. Mitt.: Herstellung sowie bakteriosta-tische und fungistatische Eigenschaften der Verbindungen. Arch. exp. Veterinärmed. 21, 267—274.

Anshr. d. Verf.: Doz. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. W. WEUFFEN u. A. KRAMER, Greifswald, Dr.-W.-Külz-Str. 2.