

DATURA STRAMONIUM ÉS DATURA ARBOREA DNS- ÉS TROPANOID MINTÁZATÁNAK NÉHÁNY JELLEMZŐJE

TÓVÖLGYI ZSUZSA¹, SZABÓ LÁSZLÓ GY.², STRANCZINGER SZILVIA²

¹PTE ÁOK Gyógyszerésztudományi Szak 7624 Pécs, Szigeti út 12.

²PTE TTK Növénytani Tanszék 7624 Pécs, Ifjúság útja 6.

Kulcsszavak: *Datura stramonium*, *Datura arborea*, atropin, mérgezés, vékonyréteg-kromatográfia, PCR, enzim

Összefoglalás: Vizsgálataink során két fajjal, a *Datura stramonium*mal és a *Datura arborea*val dolgoztunk. Az elmúlt években a hazai kábítószer fogyasztás növekedésével párhuzamosan, a klasszikus drogok használata mellett más anyagok kipróbálása is egyre elterjedtebbé vált. Ide sorolhatók a *Datura*-fajok, melyek alkaloid tartalmuk miatt hallucinogének (OSVÁTH et al. 2000). Vékonyréteg-kromatográfiai vizsgálatokkal az alkaloidok mennyiségét hasonlítottuk össze a két fajban. Atropinmérgezés felismerése gyakran nehézséget jelent a mindennapi orvosi gyakorlatban. *D. stramonium* vagy *D. arborea* által okozott mérgezések megállapításához, illetve megkülönböztetéshez molekuláris módszereket használtunk. Első lépésként DNS-t izoláltunk a mintákból, majd az ITS4-ITS5 régiót amplifikáltuk. Ezt követően először a szekvenciák összeillesztésével szekvencia szintű különbségeket, majd ezekre a különbségekre enzimeket kerestünk. Sikert a két fajt mind kromatográfiai, mind molekuláris módszerekkel elkülöníteni. A kapott eredmények további vizsgálatokhoz nyújtanak kiindulási alapot.

Bevezetés

A növények minden része, de főként a levelük és a magjuk tartalmazzák a paraszimpatikus idegrendszer bénító atropin és szkopolamin tropán-vázis alkaloidokat. Magyarországon túladagolás következtében halálesetek is előfordultak, de a hallucinációs tünetek népi élményanyaga is gazdag (KÓCZIÁN 1979). A maszlagot gyakran LSD helyettesítő szerként alkalmazzák, mivel hallucinogén hatása hasonló, de jelentősen olcsóbb és a természetben való elterjedtsége miatt lényegesen könnyebben hozzáférhető (DIGIACOMO 1968). Maszlagmérgezés esetén a helyes diagnózis megállapítását nehezíti, hogy az atropin kimutatása nem szerepel a rutinszerűen végzett toxikológiai tesztek között.

Miklós E-né és mtsai (2001) *Datura arborea* virágában és levelében mérték az atropin és a szkopolamin tartalmat. Somogy és Baranya megye több helységéből gyűjtött levél- és virágminták vékonyréteg-kromatográfiai és denzitometriás alkaloid vizsgálata alapján megállapították, hogy a különböző virágszínű cultivárok közel ugyanabban az időpontban leszedett mintáiban az atropin- és a szkopolamin-tartalom változatos: vannak alkaloidmentesek, de többségük alkaloidban gazdag. Az átlagok ugyan nem tükrözik a szélsőségeket, de arra alkalmasak, hogy megállapítható legyen a növények alkaloid-felhalmozó képessége. A cserjés maszlag levele, különösen pedig virága potenciális hallucinogén, akárcsak a csattanó maszlag levele (MIKLÓSNÉ ÉS MTSAI 2001).

A növény alkaloidjainak antikolinerg hatása miatt a hallucinációk mellett számos egyéb súlyos, gyakran életveszélyes tüneteket is okozhat. A fogyasztók általában nem rendelkeznek megfelelő információkkal a növény veszélyességéről, illetve a magok alkaloid tartalmáról, így felhasználásuk gyakran vezet súlyos mérgezésekhez. Az atropin 2–3 mg-os adagban még csak fizikális tüneteket vált ki, 3–5 mg már pszichés tüneteket

is okoz, 10 mg pedig delirózus tudatzavar kialakulásához vezet (KNOLL 1990, PETHŐ 1989), halálos mérgezés 100–150 mg után következik be. Mivel egy mag kb. 0,1 mg atropint tartalmaz, 100–150 mag elfogyasztása már súlyos mérgezést jelent. Az elfogyasztás, illetve a felhasználás után a tünetek általában 30–60 perc múlva mutatkoznak. Ilyenkor a pszichés és a szomatikus tünetek egymással szövődve alakítják ki a jellegzetes klinikai képet (DiGIACOCO 1968, GOLDSMITH ÉS MTSAI 1968). A növény fogyasztása atropinmérgezést, így antikolinerg delíriumot is okozhat, melynek felismerése gyakran nehézséget jelent a mindennapi orvosi gyakorlatban, és a páciensek intoxikált állapota miatt pedig érdemi anamnézis a szerhasználatra vonatkozóan legtöbbször nem nyerhető. Kis mennyiségű minta – akár gyomortartalomról is – lehetővé teszi, hogy a *D. stramonium* vagy *D. arborea* által okozott mérgezéseket megállapítsuk, ill. megkülönböztessük.

Anyag és módszer

A vizsgálatokat friss és szárított mintákkal végeztük.

Friss minták (2002. szeptember, Pécs): *Datura stramonium* levél (város határán szántóterületről), *D. arborea* levél (házi kertből), *D. arborea* fiatal levél (házi kertből).

Száraz minták és származásuk: *Datura stramonium* levél (1995. Pécs), *D. stramonium* levél (2001. 07. 10. Pécs), *D. arborea* fiatal levél (2000. 08. 30. Kaposmérő), *D. arborea* levél (2000. 09. 12. Kaposmérő).

A DNS izolálásához **Zenogene** kitet használtunk. Az ITS régió amplifikálása ITS4 és ITS5 primerekkel történt PTC-200 GradientCycler™ (MJ Research, INC.) készülékkel. A PCR reakció 50 µl végtérfogat volt, mely tartalmazott 2 µl-t mindkét primerből (10 pmol/µl), 8 µl templát DNS-t, 13 µl 4xPCR mixet (4x Taq puffer, 0,8 mM dNTP, 6mM MgCl₂) és 1 Unit Taq polimerázt. Az amplifikációs reakció tartalmazott egy kezdeti 94°C-os denaturációt 2.30 percig, melyet 35 ciklus követett: denaturáció 94°C-on 45 sec, elongáció 72°C-on 7 perc, extensio 72°C-on 1.45 perc. A PCR terméket 1%-os agaróz gélen választottuk el és etidium bromiddal tettük láthatóvá. A géleképeket UVP BioDoc It videokamerával felszerelt rendszer segítségével fotóztuk és tároltuk.

A polimeráz láncreakciót követően a minta DNS-fragmentjeit agaróz gélelektroforézissel választottuk szét. Az izolálni kívánt fragment elé a gélbe Whatman DE 81 papírt helyeztünk és 20 perces 60 V feszültségre beállított elektroforézis után az izolálandó fragment a papírra került. A papírt Eppendorf csőbe tettük, és a DNS-t 100 µl 1M nátriumklorid oldattal mostuk le kétszer egymás után. A DNS kicsapására 20 µl 3M nátriumacetát oldatot és 120 µl izo-propanolt használtunk. 20 perces -20°C-os inkubálás, és az azt követő centrifugálást, majd szárítást követően 20 µl desztillált vízben oldottuk fel a csapadékot.

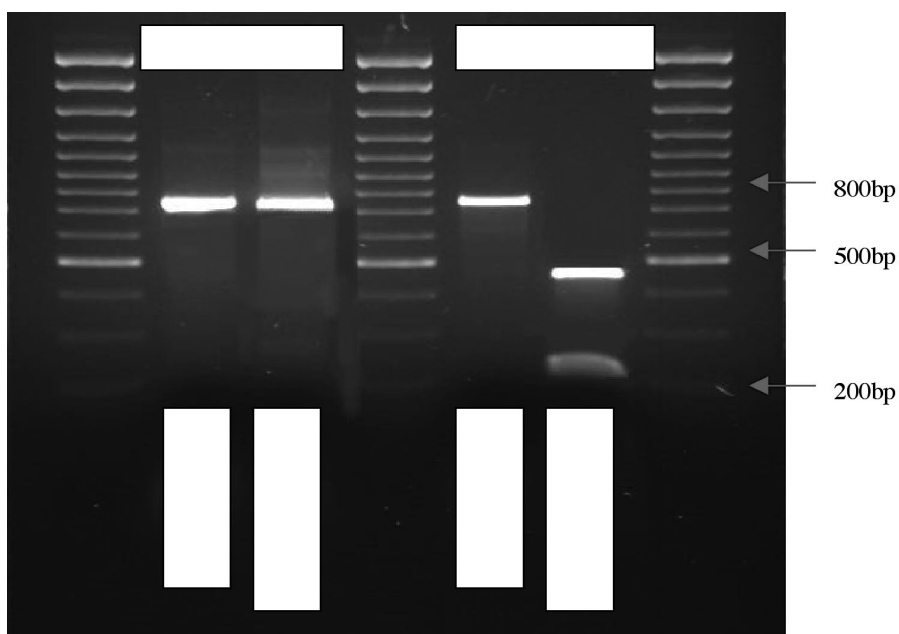
A direkt szekvenáláshoz a PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, pontos nagyságukat mólsúlymarker segítségével határoztuk meg. A szekvenálási reakciót ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit-tel és Ampli-taq DNA Polymerase FS (Applied Biosystems) állítottuk elő. A vizsgált DNS szakaszok szekvenálásához az amplifikálásuknál használt primereket használtuk. Az elektroforézis ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) géppel a Gödöllő-i Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetben történt a gyártó intézet leírása szerint.

A két faj szekvenciáját számítógépes programok segítségével összeillesztettük, és szekvenciaszintű különbségeket kerestünk. Ezt követően pedig olyan enzimet kerestünk, melynek a hasítási helyében szerepel a szekvenciaszintű különbség. Az emésztési reakció a kiválasztott enzim tulajdonságai alapján tervezhető meg. Az enzimhez speciális puffer és emésztési körülmények (hőmérséklet, időtartam, mennyiségek) szükségesek. Az emésztési reakciók lejátszódása után a mintákat agaróz gélben megfuttattuk, hogy az emésztés eredményét ellenőrizhessük.

A fitokémiai vizsgálatok a hatóanyagok kivonásával kezdődtek. Az alkaloidok kivonása lúgos feltárással történt. A vékonyréteg-kromatográfiai elválasztás előtt a kivonatot tisztítottuk. A mintákat és a referenciaoldatokat (atropin-szulfát: 1mg/ml, szkopolamin-bromid: 1mg/ml) 10x20 cm-es szilikagél abszorbensű üveglapos rétegre (Pre-Coated TLC Plates SILICA GEL 60 F-254) vittük fel 5 µl-es osztott jelű üveg kapillárisal. A kromatografáló kamrába (12x4x12 cm belső méretű) 20 ml 0,2 M nátrium-acetát – metanol – kloroform 1:6:3 arányú elegyét töltöttük, és ebbe helyeztük a réteglapot. A szobahőmérsékleten megszáradt réteglapot 5 percre 90 °C-os szárítószekrénybe raktuk, majd Dragendorff-előhívóoldat segítségével láthatóvá tettük az elválasztást. A pontos mennyiségi kiértékelést CAMAG SCANNER II V3. 15 típusú készülékkel kapott denzitogram segítségével végeztük.

Eredmények és megvitatásuk

Mindkét fajtól kb. 750 bp nagyságú DNS-szakaszt kaptunk a PCR segítségével. A szekvenálást követően a szekvenciákat tisztítottuk, ismertté vált a fajok ITS- régiójának pontos bázissorrendje: a *D. stramonium* fragment hossza 600 bázispár, a *D. arborea* fragment hossza 623 bázispár. A két faj szekvenciájának összeillesztésével kapott szekvencia-szintű különbségek a fragment első és utolsó harmadában találhatóak, ezek az ITS szekvenciák. A fragment középső részében az 5S rDNS kódoló régió erősen konzerválódott, itt az eltérések valószínűsége csekély. Az enzimkeresés során a DraI enzim (hasítási helye: TTTAAA) megfelelőnek bizonyult, mert: az enzim hasítási helyét tartalmazó szekvencia szintű különbség a fragmentek ρ -e és α -e közé esik, a *D. stramonium* fragmentben két hasítási hely található: 25–30 és a 221–226 bázisok, a *D. arborea* fragmentben ugyanitt a bázissorrend eltérő, ezért a DraI enzim nem hasítja, a *D. arborea* fragmentben a DraI enzimnek egyetlen hasítási helye sincsen. Az emésztési reakciók után agaróz gélben megfuttatott minták gélfotója a várt eredményt mutatta. A *D. arborea* fragment ez emésztést követően egészben maradt, az emésztett *D. stramonium* fragmentből kettő darabot látunk (a fragmentben szereplő két hasítási hely (25–30 és 221–226 bp), három emésztett darabot eredményez, de az első 25 bázispárnyi szakasz (kis mérete miatt) az alkalmazott agaróz gélelektroforézissel nem kimutatható), a két darab hasítási helyeknek megfelelően egy kb. 220 és egy kb. 450 bp nagyságú. (1. ábra)



1. ábra A *Datura* fajok emésztés előtti és utáni ITS régiója
Figure 1. S

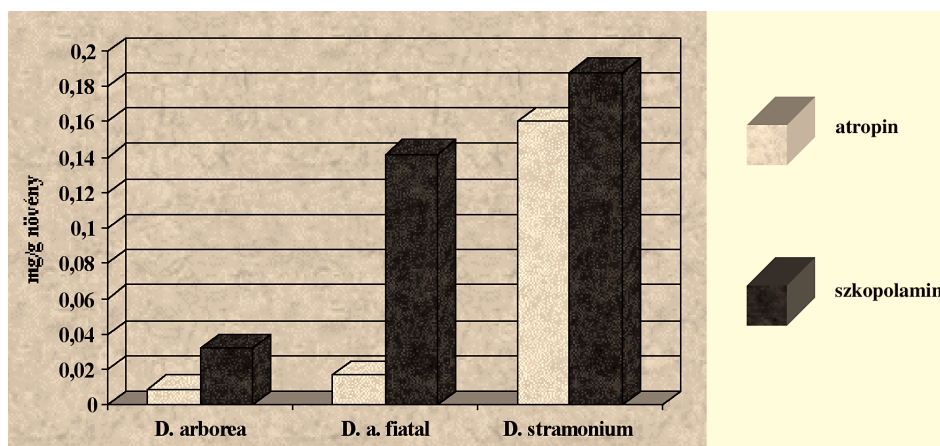
A vékonyréteg-kromatográfias vizsgálatok értékelése: a *D. stramonium*ban az alkaloidok mennyisége többszöröse a *D. arborea*ban találhatóénál. A *D. arborea* levelek közül a fiatalban magasabb a hatóanyag tartalom. A szkopolamin és az atropin aránya a *D. stramonium*ban és a *D. arborea*ban közel azonos, a fiatal *D. arborea* levélben a szkopolamin mennyisége nagyobb. A *D. arborea* fajokban jelentős a társ-alkaloidok jelenléte is.

A korábbi és a saját vizsgálatok alapján is megállapítható, hogy a hatóanyag-tartalom és a megoszlás is számottevő szórást mutat mind a fajokon belül, mind a fajok között, de mindenképpen potenciális veszélyt jelentenek toxikológiailag. A szórásnak rendkívül sok oka lehet, pl.: a növény fejlettségi stádiuma, a begyűjtés időpontja és helye, ökológiai hatás stb. A következtetés egyszerűbb a szélső értékek és az átlagok (1. táblázat) figyelembe vételével.

1. táblázat: A vizsgált minták alkaloid-tartalma
Table 1.

	<i>D. arborea</i>	<i>D. arborea</i> fiatal levél	<i>D. stramonium</i>
Atropin (mg/g növény)	9,2228*10 ⁻³ 1,75*10 ⁻³ –1,67*10 ⁻²	1,74*10 ⁻² 0–3,48*10 ⁻²	1,605*10 ⁻¹ 6,19*10 ⁻² –0,26
Szkopolamin (mg/g növény)	3,247*10 ⁻² 0–6,49*10 ⁻²	1,4178*10 ⁻¹ 1,06*10 ⁻² –0,27	1,8793*10 ⁻¹ 7,5*10 ⁻² –0,39
Összalkaloid (mg/g növény)	4,1693*10 ⁻²	1,5918*10 ⁻¹	3,4843*10 ⁻¹

Az alkaloidok egymáshoz viszonyított arányát oszlopdiaagramokkal szemléltettük. (2. ábra)



2. ábra Alkaloidok eloszlása
Figure 2. S

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk Szentpéteri L. Józsefnek a fotózásban és Horváthné Mészáros Máriának a kromatográfiás vizsgálatokban nyújtott segítségével. Köszönjük a KVVM, Persányi Miklós miniszter úrnak, az Ifjú Botanikusok Előadói versenyén szereplők részére a publikálásban is nyújtott anyagi segítségét.

Irodalom

- DI GIACOMO J. N. 1968: Toxic effect of stramonium stimulating LSD trip. *JAMA*, 204: 265–267.
- GOLDSMITH S. R., FRANK I., UNGERLEIDER J. T. 1968: Poisoning from ingestion of a stramonium-belladonna mixture. *JAMA*, 204: 167–168.
- KNOLL J. (szerk.) 1990: Gyógyszertan I. Medicina, Budapest, p. 94, 99.
- KÓCZIÁN GÉZA 1979: Egyes *Solanaceae* fajok pszichotomimetikumként való használata a népgyógyászatban. *Communications de Historia Artis Medicinae Supplementum* 11–12: 155–160.
- MIKÓS E. J., BOTZ L., HORVÁTH GY., FARKAS Á., DEZSŐ GY. ÉS SZABÓ L. GY. 2001: Atropine and scopolamine in leaf and flower of *Datura arborea* L. *Intern. J. Hort. Sci.* 7: 61–64.
- OSVÁTH P., NAGY A., FEKETE S., TÉNYI T., TRIXLER M. ÉS RADNAI I. 2000: Csattanómaszlag-mérgezés esete – a differenciáldiagnózis gyakorlati kérdései. *Orvosi Hetilap* 141: 133–136.
- PETHŐ B. (szerk.) 1989: Részletes pszichiátria I. Magyar Pszichiátriai Társaság, Budapest, p. 259.

SOME CHARACTERISTICS OF DNA AND TROPANOID PATTERN IN *DATURA STRAMONIUM* AND *DATURA ARBOREA*

ZSUZSA TÓVÖLGYI¹, LÁSZLÓ GY. SZABÓ², SZILVIA STRANCZINGER²

¹: University of Pécs Medical School Faculty of Pharmacy 7624 Pécs Szigeti út 12.

²: University of Pécs Institute Biology Department of Botany 7624 Pécs Ifjúság útja 6.

Keywords: *Datura stramonium*, *Datura arborea*, atropine, poisoning, thin layer chromatography, PCR, enzyme

Summary: The investigations covered two species *Datura stramonium* and *Datura arborea*. In recent years parallel to increasing drug consumption in Hungary, besides using classical drugs alternative substances are becoming wide-spread. The latter category includes also *Datura* species, which are hallucinogens due to their alkaloid content. The amount of alkaloids was compared with thin layer chromatography in the two species. Recognising an atropine poisoning is often difficult in routine medical practice. Molecular methods were used to determine and distinguish poisonings caused by *Datura stramonium* and *D. arborea*. The first step was DNA isolation from the samples then ITS4-ITS5 region was amplified. Afterwards sequence level differences were established with aligning sequences and finally enzymes were specified. The distinction was successful both with chromatographic and molecular methods. The results serve as a basis for further studies.