

# 1. Einleitung

Pflanzliche Zubereitungen werden seit Beginn der Menschheitsgeschichte gegen die verschiedensten Krankheiten eingesetzt. In den Entwicklungsländern, in denen die traditionelle Medizin gepflegt wird und moderne Fertigarzneimittel nicht oder nur schwer erhältlich sind, kommt der Verwendung von Arzneipflanzen noch heute eine große Bedeutung zu. Aber auch in Industrienationen besitzt die Phytotherapie einen hohen Stellenwert.

Die medizinische Versorgungslage in den Entwicklungsländern ist besonders schwierig, was die parasitären Erkrankungen anbetrifft. Hier tragen geographische, klimatische und einfache hygienische Bedingungen zu einer hohen Prävalenz bei, hinzu kommt die große Armut der Bevölkerung, die die Eigenversorgung mit Medikamenten erschwert oder unmöglich macht.

Der zunehmende Ferntourismus, krisenbedingte Migrationsbewegung, sowie die globale Klimaveränderung machen manche Tropenkrankheiten aber zunehmend auch für Industrienationen zum Problem. Ein Beispiel hierfür sind die Leishmaniosen.

## 1.1 Leishmaniosen als Weltgesundheitsproblem

Die Gattung *Leishmania* zählt wie die nahe verwandte Gattung *Trypanosoma* zur Familie Trypanosomatidae, eine Gruppe ausschließlich parasitisch lebender Protozoen (Lucius und Loos-Frank, 1997; Handman, 1999; Ashford, 2000). Leishmanien durchleben einen Zyklus, der einen obligaten Wirtswechsel zwischen einer Sandmücke und einem Wirbeltier einschließt (Abb. 1.1).

Als Überträger kommen seitens der Sandmücke die Gattungen *Phlebotomus* (in der alten Welt) und *Lutzomyia* (in der neuen Welt) in Frage (beide Phlebotomidae, Psychodidae). Auf Seiten des Vertebratenwirts spielen im wesentlichen Warmblüter und somit auch der Mensch eine Rolle. (Lucius und Loos-Frank, 1997).

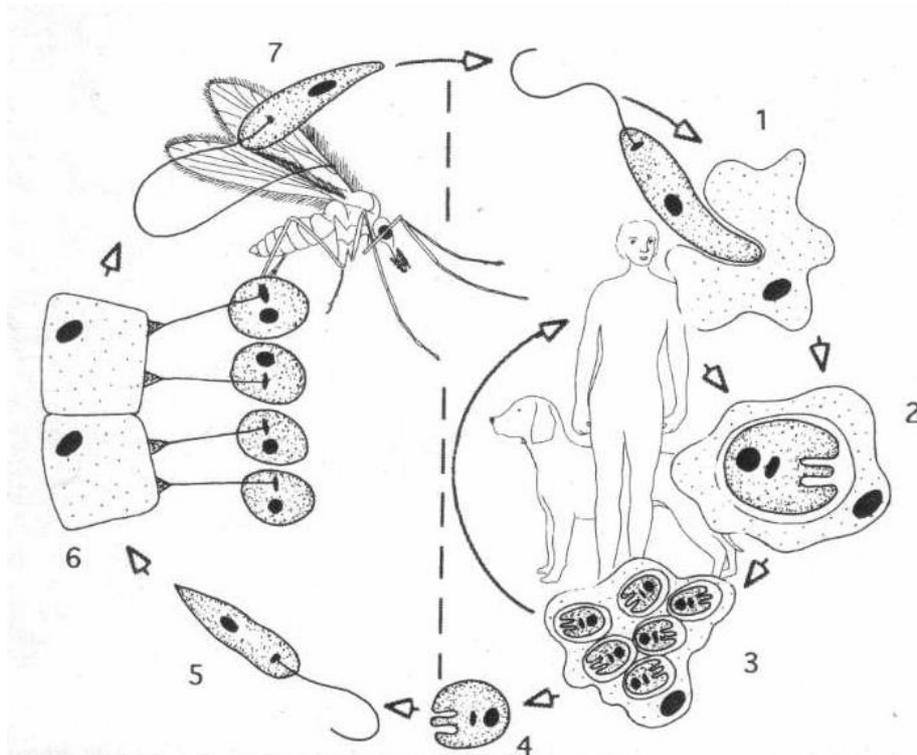


Abb. 1.1: Zyklus von *Leishmania spec.* (nach Lucius und Loos-Frank, 1997)

Der Wirtswechsel ist mit einem Formenwechsel verbunden: In der Sandmücke kommen Leishmanien als promastigotes Stadium vor, das durch gestreckte, etwa 20 µm lange, spindelförmige Zellen mit einer am Vorderpol inserierenden Geißel charakterisiert ist. Weniger als 50 solcher Parasiten werden beim Stich in den Säugerwirt regurgitiert, welche bereits innerhalb einer Stunde von phagozytierenden Zellen aufgenommen werden. Obwohl es Hinweise auf andere involvierte Zellpopulationen gibt, gelten Monozyten und Makrophagen als hauptsächliche Wirtszellen. Innerhalb dieser überleben und vermehren sich die Leishmanien als amastigote Formen in einer parasitophoren Vakuole. Der Prozess des Formenwechsels erfolgt innerhalb der ersten Stunden nach Infektion des Makrophagen und beinhaltet die Ausbildung einer kugeligen Form, die Reduktion der Geißel sowie diverse physiologische Veränderungen. Die mit der Vermehrung der amastigoten Leishmanien einhergehende Vergrößerung der parasitophoren Vakuole führt zur Lyse der Wirtszelle und zum Freiwerden der Amastigoten, die wiederum Makrophagen infizieren können. Erfolgt erneut

der Stich einer Sandmücke, können mit dem aufgenommenen Blut infizierte Makrophagen oder freie Amastigote aufgenommen werden, die sich im Darmlumen des Vektors wieder in Promastigote umwandeln. Der Zyklus ist somit geschlossen (Lucius und Loos-Frank, 1997; Handman, 1999).

Während der Zyklus für alle bekannten *Leishmania*-Spezies gleich verläuft, bestehen artabhängig unterschiedliche Organpräferenzen im Säugewirt. Daraus resultieren für den Menschen unterschiedliche Leishmanioseformen. Bei der Mehrzahl der Arten bleibt die Infektion auf die Einstichstelle und deren unmittelbare Nähe beschränkt, und es erfolgt lediglich eine **kutane Leishmaniose** (Aycicek und Tanyüksel, 1997; Hepburn, 2001). Diese Konzentration des Geschehens auf einem geringen Raum hat allerdings die Ausbildung eines massiven Geschwürs mit narbiger Ausheilung zur Folge, die zumindest ein kosmetisches Problem darstellt (Bonitazi, 1999). In Kleinasien, dem Vorderen Orient und Teilen Afrikas sind derartige Deformationen als „Orient-“ oder „Aleppobeule“ bekannt. Die Erreger kutaner Leishmaniosen sind vor allem *Leishmania major*, *L. tropica* sowie südamerikanische Arten. Eine Sonderform der kutanen Leishmaniose ruft *L. aethiopica* in Nordostafrika hervor, bei der sich vom Primärherd aus unter Bildung von Tochtergeschwulsten eine **diffus-kutane Leishmaniose** entwickelt.

Bei Arten des *L. donovani* - Komplexes bleibt die Infektion nicht auf den Bereich des primären Infektionsherds beschränkt; stattdessen werden Makrophagen des gesamten retikuloendothelialen Systems parasitiert. Eine auffällige Geschwürbildung bleibt daher aus. Innerhalb von Monaten bis zwei Jahren wird der gesamte Wirtsorganismus durchsetzt, und es resultiert die mit massiver Auszehrung und schlechter Heilprognose behaftete **viszerale Leishmaniose** oder Kala-Azar, die in Afrika und Indien durch *L. donovani*, im Mittelmeergebiet durch *L. infantum* hervorgerufen wird (Zijlstra et al., 2003). Als Besonderheit ist zu nennen, dass in mediterranen Arealen streunende Hunde das Hauptreservoir bilden, von dem aus Epidemien auf den Menschen überspringen können (Gállego et al., 2001).

Die viszerale Leishmaniose ist klinisch die schwerwiegendste Krankheitsform. Entsprechend problematisch ist ihr häufiges Auftreten in den Tropen und Subtropen zu sehen. Es wird von einer Infektionsrate von einer halben Million

Menschen jährlich ausgegangen (Boelart et al., 2000; Guerin et al., 2002), wobei insgesamt 200 Millionen in 62 endemischen Ländern ständig dem Risiko einer solchen Erkrankung ausgesetzt sind. Die Verteilung ist, anders als beispielsweise bei der nahezu pantropisch verbreiteten Malaria, ungleichmäßig. So kommen 90 % aller VL-Fälle in Indien, Bangladesh und Nepal (Bern et al., 2000), dem Sudan und dem Nordosten Brasiliens (Werneck et al., 2002) vor. Allerdings werden zunehmend Infektionen in neuen Regionen verzeichnet (Takeuchi, 1995; Carillo et al., 1997; Ashford, 2000; Enserink, 2000; Harms-Zwingerberger und Bienzle, 2000; Ok et al., 2002).

In Nepal wird seit ca. 1980 eine beängstigende Zunahme an VL-Neuinfektionen beobachtet. Zwischen 1995 und 1997 erkrankten jährlich zwischen 1300 und 1800 Menschen, in benachbarten Provinzen Nordindiens waren es im gleichen Zeitraum 80000 (Bern et al., 2000): Als Ursache werden Landflucht, Klimaveränderungen, Verarmung und HIV-Infektion als Risikofaktoren genannt (Desjeux, 2001). Die Nähe zum Mittelmeergebiet, Interkontinentalflüge und Klimaveränderungen machen, ähnlich wie bei anderen Infektionskrankheiten, die Ausweitung nach Mitteleuropa wahrscheinlich (Kurth, 2003; Kampen, 2005).

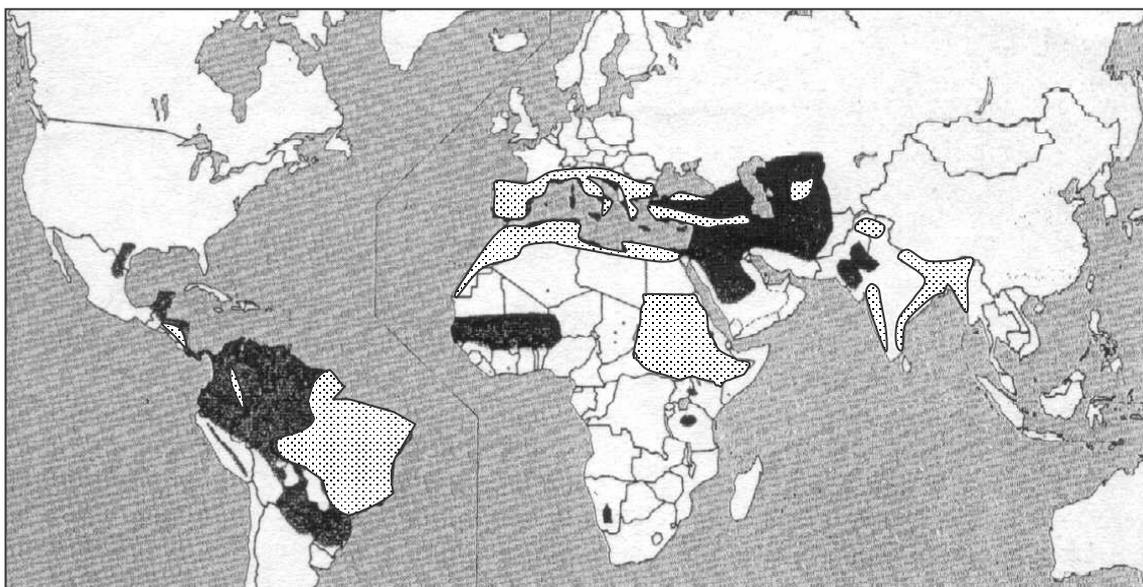


Abb. 1.2: Verbreitung kutaner und viszeraler Leishmaniose

- kutane Leishmaniose
- viszerale Leishmaniose

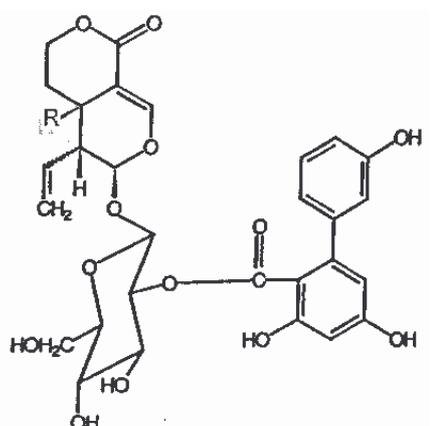
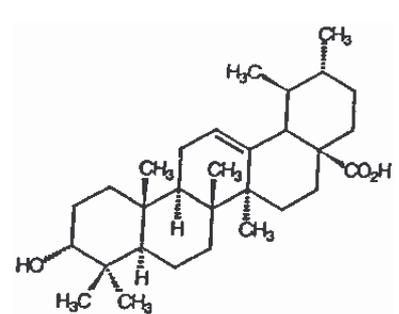
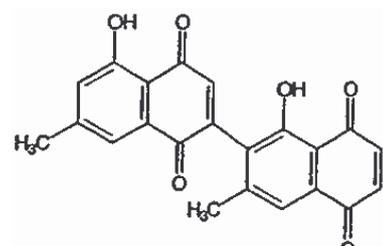
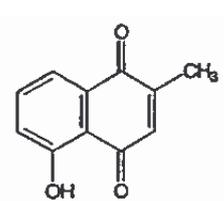
## 1.2 Antiparasitäre Wirkstoffe gegen Leishmanien

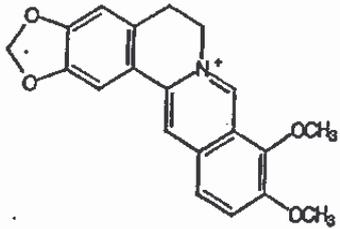
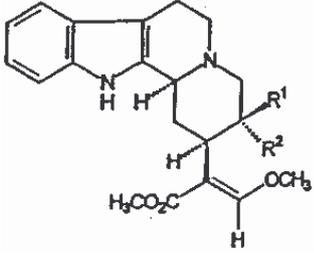
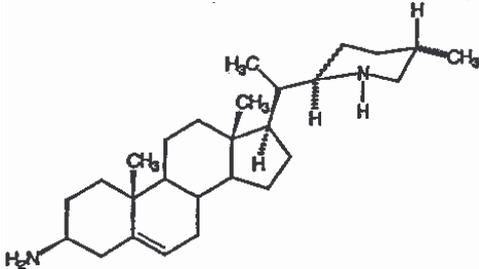
Substanzen, denen eine antileishmanielle Wirkung zugeschrieben wird, sind für nahezu alle natürlichen Quellen und Stoffgruppen beschrieben worden (Chan-Bacab und Pena-Rodriguez, 2001; Rocha et al., 2005). Trotzdem haben sich bisher nur wenige potentielle Kandidaten gefunden, welche therapeutisch eingesetzt werden (Alexander und Knothe, 1988).

So sind als Mittel der ersten Wahl gegen viszerale Leishmaniose nach wie vor antimonhaltige Synthetika wie Pentostam<sup>®</sup> (Natriumstibogluconat) oder Glucantime<sup>®</sup> (Megluminantimonat) zu betrachten. Pentamidindiisethionat, ein Dibenzamidinderivat, und Amphotericin B, ein Polyenantibiotikum, stellen Mittel der zweiten Wahl dar. Das Medikament muss zur Therapie einer viszeralen Leishmaniose systemisch verabreicht werden. Auch möglich ist die Injektion dieser Chemotherapeutika in das Primärgeschwür einer kutanen Leishmaniose (Kayser et al., 1999). Pentostam wird auch als Teil einer Kombinationsbehandlung gegen mukokutane Leishmaniose zusammen mit Pentoxyfyllin verabreicht (Lessa et al., 2001). Alternativ werden einige Chemotherapeutika mit vorwiegend anderen Therapierichtungen als antileishmanielle Wirkstoffe eingesetzt. Das gilt zum Beispiel für das bereits genannte Amphotericin B, das hauptsächlich als Antimykotikum eingesetzt wird. Seit wenigen Jahren sind auch das Antimalariamittel Atovaquon (Suswam et al., 2001) und das aus der Tumorbehandlung stammende Miltefosin (Lux et al., 2000) Bestandteil der Therapie von Leishmaniosen. Neuere Entwicklungen, wie etwa die IFN- $\gamma$ -Therapie oder neue Formulierungen von Amphothericin B, sind kostspielig und daher für Entwicklungsländer kaum finanzierbar.

Die Untersuchung von phenolischen Naturstoffen auf antileishmanielle Wirkung ist Anlass, einen Eindruck über bisherige potentielle Wirkstoffe und die Heterogenität antileishmanieller Naturstoffe tabellarisch wiederzugeben (Tabelle 1.1). Bei der Durchsicht relevanter Übersichtsartikel (Chan-Bacab und Pena-Rodriguez, 2001; Rocha et al., 2005) fällt auf, dass viele Verbindungen mit leishmaniziden Eigenschaften den Sekundärstoffgruppen der Terpene, Chinone oder Alkaloide entstammen; über Vertreter der in der Natur weitverbreiteten Polyphenole ist dagegen aus der gegenwärtigen Fachliteratur nur sehr wenig bekannt.

Tab. 1.1: Übersicht über antileishmanielle Naturstoffgruppen und einige relevante Vertreter

Stoffgruppe	Vorkommen	Strukturformel	Literatur
<b>Iridoidglykoside</b>			
Amarogentin (R = H)	<i>Swertia chirata</i> (Gentianaceae)		Ray et al. (1996)
Amaroswerin (R = OH)			
<b>Triterpene</b>			
Ursolsäure	ubiquitär		Tan et al. (2002)
Brucein A R=COCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<i>Brucea javanica</i> (Simarubaceae)		Rocha et al. (2005)
Bruceantin R = C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O			
<b>Naphthochinone</b>			
Diospyrin	<i>Diospyros montana</i> (Ebenaceae)		Chan-Bacab und Pena-Rodriguez (2001)
Plumbagin	<i>Pera benensis</i> (Euphorbiaceae)		

Alkaloide			
Berberin	Annonaceae Berberidaceae		Chan-Bacab und Pena-Rodriguez (2001)
Corynanthein R <sub>1</sub> = H; R <sub>2</sub> = C <sub>2</sub> H <sub>3</sub>	<i>Corynanthe pachyceras</i> (Rubiaceae)		Hänzel et al., (1999)
Dihydrocorynanthein R <sub>1</sub> = H; R <sub>2</sub> = C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>			
Corynantheidin R <sub>1</sub> = C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ; R <sub>2</sub> = H			
Sarachin	<i>Saracha punctata</i> (Solanaceae)		Urbina, (1991)
Emetin R = CH <sub>3</sub> Cephaelin R = H	<i>Psychotria ipecacuanha</i> (Rubiaceae)		Rocha et al., (2005)

Ähnlich der Situation bei anderen Infektionskrankheiten wird die Therapie von Leishmaniosen auch durch Resistenzen erschwert, die bereits gegen viele potentielle Wirkstoffe auftreten (Borst und Ouellette, 1995; Kündig et al., 1999).

Bekannte Zielstrukturen der antileishmaniellen Wirkung sind zellbiologische und biochemische Besonderheiten, durch die sich Leishmanien als Vertreter kinetoplastidärer Protozoen gegenüber anderen Zellen abgrenzen. Dies gilt zum Beispiel für die Verwendung von Ergosterol als Membransteroid. Daneben sind Leishmanien aber auch über Eingriffe in den Energiestoffwechsel oder die Zellproliferation angreifbar. Einen Überblick liefert Tabelle 1.2

Tabelle 1.2: Wesentliche Targets von antileishmaniellen Wirkstoffen

Zielstruktur	Stoffgruppe	Literatur
Ergosterol (Zellmembran)	Makrolidantibiotica (Amphotericin B)	Kayser et al. (1999)
Sterolbiosynthese	Azole (Ketoconazol, Itraconazol, Voriconazol)	Alexander und Knothe (1988)
	Triterpene, Azasterole	Urbina (1996)
Fumaratreduktase	Aurone und Chalcone	Zhai et al. (1999) Kayser et al. (2001)
Elektronentransportkette	Naphthochinone	Suswam et al. (2001)
Trypanothion-Reduktase	Naphthochinone	Henderson et al. (1998)
DNA-Topoisomerase	Indolalkaloide (Harmin, Harmalin, Camptothecin)	Rocha et al. (2005)
	Naphthochinone	Ray et al. (1998)
Zellmembran	Alkylierte Phospholipide (Miltefosin, Ilmofosin)	Kuhlencord et al. (1992) Lux et al. (2000)

### 1.3 Zelluläre Abwehrmechanismen gegen Leishmanien

Meistens können Mikroorganismen nur durch aktivierte Makrophagen erfolgreich eliminiert werden. Dies geschieht insbesondere durch den Einfluss von IFN- $\gamma$ , das von aktivierten T<sub>H1</sub>- und NK-Zellen produziert wird. Von Vorteil ist es daher, dass allein schon der Phagozytosevorgang zur (Vor)-aktivierung führt (Greenberg, 1995). In diesem Stadium sekretieren Makrophagen vor allem proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  (Titus et al., 1991), sowie IL-12 und IL-18. Daraufhin werden NK-Zellen angeregt, IFN- $\gamma$  zu produzieren, was wiederum zur definitiven Makrophagen-Aktivierung führt (Sadick, 1992). Durch die Präsentation von MHC Klasse II assoziierten Antigenen zusammen mit proinflammatorischen Zytokinen werden T<sub>H1</sub>-Lymphozyten zur Produktion von IL-2 und damit zur Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion angeregt. Der wachsende Einfluss der T<sub>H1</sub>-Umgebung im weiteren

Verlauf der zellulären Immunantwort verstärkt wiederum den geschilderten Aktivierungsprozess des Makrophagen (Stout und Suttles, 1997). In einem von  $T_{H2}$ -Zellen dominierten Milieu wird diese Ausprägung dagegen verhindert zugunsten eines Phänotyps, den Noël et al. (2004) als „alternativ aktiviert“ bezeichnen und der durch die Produktion von TGF- $\beta$  und IL-10 ausgezeichnet ist.

Abgetötet werden die phagozytierten Mikroben letztendlich durch reaktive Sauerstoff ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^\cdot$ )- und Stickstoffmetaboliten ( $NO$ ,  $OONO^-$ ,  $NO_2^\cdot$ ). Die Produktion ersterer kann wiederum durch den Phagozytosevorgang selbst oder durch Signalstoffe induziert werden (Elsbach und Weiss, 1983; Allen, 1986; Adams et al., 1999). Für die Abwehr intrazellulärer Makrophagenparasiten wird heutzutage dem  $NO$  die größere Bedeutung beigemessen. So sind Makrophagen mit Defekten in der  $NO$ -Produktion nicht in der Lage, eine Infektion mit *L. major* abzuwehren; hinzu kommt, dass  $NO$  selbst als Signalstoff auf die IL-12-Expression wirkt (Bogdan et al., 2000). IL-12 ist ein wichtiges Zytokin für die mikrobiell induzierte IFN- $\gamma$ -Produktion, und IFN- $\gamma$  ist wiederum das Schlüsselzytokin für die Aktivierung von Makrophagen.

Zur Genese von  $NO$  steht mit der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) ein Enzym zur Verfügung, das über de-novo-Transkription und Stabilisierung der betreffenden mRNA gut reguliert werden kann (Xie et al., 1993). Die Genese des „Respiratory Burst“ verläuft kompliziert und ist in all seinen Einzelheiten weniger gut untersucht (Janeway et al., 2002). Sowohl das NADPH-abhängige Phagozyten-Oxidase-System als auch die für eine zytotoxische Immunantwort wichtige iNOS werden aber bekanntlich vornehmlich durch IFN- $\gamma$  aktiviert.

IL-10 kann die Makrophagen-Aktivität wieder herabsetzen. Es kann sowohl von Makrophagen selbst als auch von T-Zellen produziert werden.

Einige Mikroorganismen sind in der Lage, den Makrophagen als Wirtszelle zu missbrauchen, indem sie das aggressive intrazelluläre Milieu tolerieren, Abwehrreaktionen inhibieren und sich vermehren. Unter den Protozoen sind als solche in erster Linie Leishmanien zu nennen, wobei es unter den Bakterien und Pilzen weitere intrazelluläre Makrophagenparasiten gibt. Die besondere Affinität von Leishmanien zu Makrophagen drückt sich bereits darin aus, dass

sie nicht einfach wie oben geschildert als körperfremd erkannt und phagozytiert werden; die Bindung zwischen der Wirtszelle und dem Parasiten erfolgt sehr effektiv über verschiedene leishmanieneigene Oberflächenmoleküle, die zu Rezeptormolekülen auf der Oberfläche der Makrophagenzelle komplementär sind, was die Infektion erleichtert.

Zellen, Gewebe und Organe des Immunsystems sind durch eine Vielzahl von Molekülen beeinflussbar. Eine besondere Bedeutung kommt dabei bestimmten körpereigenen Proteinen zu, die als Zytokine bezeichnet werden und die die hauptsächlichen Botenstoffe des Immunsystems sind. Davon abgesehen können exogene Moleküle sehr unterschiedlicher Natur und Herkunft Einfluss auf die physiologischen Leistungen des Immunsystems nehmen.

Tabelle 1.3: Ausgewählte Zytokine mit Bedeutung für Makrophagen

Zytokin	Quellen	Zielzellen	Funktionen	Literatur
IL-1	MΦ	MΦ, viele andere Körperzellen	proinflammatorisch, synergistisch mit IL-6 und TNF-α; chemotaktischer Faktor für andere Immunzellen	Helle et al. (1988) Theze (1999)
IL-6	MΦ	MΦ; Viele andere Körperzellen	proinflammatorisch synergistisch mit TNF-α negativ regulatorisch auf IL-1; Aktivierungsfaktor für B-Lymphozyten	Aarden et al. (1987) Carpenter et al. (1999)
IL-10	MΦ, T <sub>H2</sub>	MΦ	abregulierend auf Herstellung von reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffspezies	Appelberg, (1995) DeWaal-Malefyt et al., (1991) Noel et al, (2004)
IL-12	MΦ	NK, T	Aktivator von NK-Zellen, Differenzierungsfaktor für T-Vorläufer zu T <sub>H1</sub>	Unanue, (1997) Bacellar et al., (2000) Doherty und Coffman (1999)
IL-18	MΦ	NK	Co-Faktor für IL-12 bei der NK- und T <sub>H1</sub> - Aktivierung	Thèze, (1999) Lebel-Binay et al., (2000) Sugawara, (2000)
TNF-α	MΦ, Lymphozyten, NK-Zellen	MΦ, viele andere Körperzellen	Proinflammatorisch, synergistisch mit IL-1 und IL-6, vermittelt Infektabwehr und Apoptose	Theze (1999) Wallach et al. (1999)
IFN-α	MΦ	die meisten Körperzellen (vor allem viral infizierte)	vor allem antivirale Interferenz; Abwehr bakterieller und protozoerer Erreger; steuert LPS-vermittelte NO-Produktion	Theze (1999) Hertzog et al. (2003) Vadiveloo et al. (2000)
IFN-γ	NK, T <sub>H1</sub>	MΦ, viele andere Körperzellen	Potenzierung der TNF-Wirkung, Steuerung der iNOS-Expression	Perussia et al. (1983) Ramana et al., (2002) Sato et al. (2001)

## 1.4 Biologische Aktivität von Polyphenolen

Da der Einfluss von Polyphenolen auf körpereigene Prozesse in den unterschiedlichsten Zusammenhängen erwähnt wird, soll hier auf das Spektrum an biologischen Aktivitäten eingegangen werden. Aus dieser kurzen Darstellung wird ersichtlich, dass Polyphenolen ein breites Wirkungsspektrum zukommt.

Die den Polyphenolen zugeschriebenen biologischen Eigenschaften sind vielfältig: So fangen sie freie Radikale ab und wirken antioxidativ (Haslam, 1996). Darin liegt aus pharmakologischer Sicht die Bedeutung dieser Stoffgruppe in der Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Lauer et al., 1999). Zum Teil geht die Herabsetzung der Konzentration an reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen in Zellüberständen oder Körperflüssigkeiten durch z. B. Flavonoide auf diesen direkten „Scavenger“-Effekt zurück (Wippel et al., 2004). Die Diskussion um gesundheitliche Effekte liegt insofern nahe, als Polyphenole in der Nahrung allgegenwärtig sind und auch zu einem erheblichen Anteil resorbiert werden, der somit systemisch zur Verfügung steht (Bravo et al., 1994; Bhattaram et al., 2002; Tanaka et al., 2003). Allerdings begründet die Datenlage zur Bioverfügbarkeit von Polyphenolen kontroverse Meinungen.

Einige Arbeiten beschäftigen sich mit den immunmodulierenden Eigenschaften, deren Mechanismen auf molekularer Ebene noch unzureichend verstanden werden. Untersuchungen in unserem Arbeitskreis (Kolodziej und Kayser, 1998; Kolodziej et al., 1999, Kolodziej et al., 2003) und anderer (Ignatio et al., 2001; Ganju et al., 2003; Mendonça-Filho et al., 2004; Wu et al., 2005) weisen auf eine Aktivierung der zellulären Immunabwehr, verbunden mit einer Sekretion von TNF und reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffspezies hin. In diesem Zusammenhang ist sicherlich auch die früher erwähnte antiinfektionelle Wirkung von Polyphenolen bei gleichzeitig geringer Toxizität gegenüber Säugerzellen und extrazellulären Bakterien zu sehen (Kolodziej und Kayser, 1998), welche für immunmodulierende Eigenschaften spricht. Die Datenlage über antiparasitäre Aktivitäten von Polyphenolen ist aber spärlich. In Anbetracht der vielfältigen biologischen Aktivitäten, der allgemein akzeptierten guten antimikrobiellen Eigenschaften und den Hinweisen auf immunmodulatorische Eigenschaften von Polyphenolen mag das verwundern. Dies unterstreicht auch ihr Fehlen in der Auflistung antiparasitärer Naturstoffe (siehe Tabelle 1.1).