

4 Antileishmanielle Wirkung ausgewählter Polyphenole

In diesem Kapitel wurden Substanzen aus verschiedenen Stoffgruppen der Polyphenole auf ihre antileishmanielle Wirkung getestet. Als Kriterium für die antileishmanielle Wirkung wurde der IC_{50} -Wert, bestimmt; dieser gibt diejenige Konzentration an der Testsubstanz an, bei der 50 % Inhibition eintritt. Es wurde auf Leishmanizidität gegenüber Promastigoten und antileishmanielle Aktivität gegenüber Amastigoten getestet.

4.1 Wirkung gegenüber Promastigoten

Die Wirkung von Testsubstanzen auf einen Infektionserreger, der wie *Leishmania* verschiedene Stadien durchläuft, kann durchaus stadienspezifisch sein. Zur Untersuchung einer direkten Toxizität auf promastigote Formen wurde auf Mikrotiterplatten eine Verdünnungsreihe der Testsubstanzen hergestellt, eine Promastigoten-Zellsuspension in konstantem Titer hinzugegeben und nach 96 h die Viabilität der Promastigotenpopulation bestimmt. Durchgeführt wurden diese Untersuchungen mit *Leishmania major*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. killicki*, *L. amazonensis* und *L. guyanensis*.

Keines der getesteten Polyphenole zeigte eine starke Toxizität gegenüber Promastigoten (siehe Tab. 4.1), in den meisten Fällen war bis zur eingesetzten Maximalkonzentration kein Effekt auf die Lebens- oder Vermehrungsfähigkeit promastigoter Formen erkennbar. Lediglich unter den einfachen Phenolen zeigten sich Catechin (ca. 100 μ M), 3-Galloylshikimisäure und 3,5-Digalloylshikimisäure (100 μ M bzw. 110-130 μ M) äußerst moderat toxisch im Vergleich zur Positivkontrolle Amphotericin B mit 0,03 μ M gegenüber den eingesetzten Leishmanienspezies.

Ergebnisse

Tabelle 4.1: Toxizität getesteten Polyphenole gegenüber Promastigoten [µM]

	<i>L. major</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>	<i>L. killicki</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. guyanensis</i>
Einfache Phenole							
Gallussäure	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
3-Galloyl-shikimisäure	91,7	88,2	101,9	87,2	95,6	106,4	92,3
3,5-digalloyl-shikimisäure	111,4	128,6	115,2	126,5	131,7	114,5	121,3
Proanthocyanidin-hexamer	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Catechin	103,2	99,6	117,2	89,7	94,1	105,9	97,0
Epigallocatechin-3-gallat	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Galloylierte Flavonoidglykoside							
Kämpferol-3-O-β-glucopyranosid	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
Quercetin-3-O-β-glucopyranosid	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
Quercetin-3-O-β-galactopyranosid	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
Kämpferol-3-O-(2"-O-galloyl)-β-glucopyranosid	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
Quercetin-3-O-(2"-O-galloyl)-β-glucopyranosid	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
Quercetin-3-O-(2",3"-di-O-galloyl)-β-glucopyranosid	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
Kämpferol-3-O-(2",3"-di-O-galloyl)-β-glucopyranosid	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
B-Typ-Proanthocyanidine							
Epifisetinidol (4β,8)-catechin	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Epifisetinidol (4β,8)-epicatechin	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Epifisetinidol (4β,6)-catechin	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Epifisetinidol (4β,6)-epicatechin	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Epicatechin (4α,8)-catechin	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Fisetinidol (4α,6)-catechin	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Catechin (4α,8)-catechin	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Depside							
Kaffeensäure	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
Rosmarinsäure	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
Salvianolsäure I	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
Salvianolsäure I – methylester	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
Salvianolsäure K	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
Salvianolsäure L	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
Sagerinsäure	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
Hydrolysierbare Gerbstoffe							
Tellimagrandin-I	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
Tellimagrandin-II	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
Phyllanthusiin-B	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
Phyllanthusiin-C	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
Geraniin	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
Ascorgeraniin	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
Corilagin	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
Castalagin	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
Casuarinin	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
Elaeagnatin-A	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
Kontrolle: Amphotericin B	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

4.2 Wirkung gegenüber Amastigoten

Analog war die stadienspezifische Wirkung gegenüber Amastigoten von Interesse. Hinzu kommt für therapeutische Überlegungen, dass es sich bei den intrazellulär in der Wirtszelle parasitierenden Amastigoten um das für die Pathogenese verantwortliche wesentliche Stadium handelt. Promastigoten sind nur in der Sandmücke sowie unmittelbar nach dem Einstich lediglich für kurze Zeit im Bereich der Inokulationsstelle auszumachen.

Infizierte und nicht infizierte RAW 264.7-Zellen wurden in Mikrotiterplatten ausgesät. Nach einer 18 stündigen Ruheperiode wurde über den Zellen eine Verdünnungsreihe der Testsubstanzen hergestellt und für 72 h inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Wirtszellen lysiert und durch Zugabe von Post-Lysis-Medium den freigesetzten Amastigoten ermöglicht, sich wieder in Promastigoten umzuwandeln. Durch Messen der Viabilität mittels MTT-Test konnte die Wirkung der Testsubstanzen bestimmt werden.

Im Gegensatz zur ausbleibenden Wirkung gegenüber Promastigoten wiesen zahlreiche Polyphenole eine antileishmanielle Wirkung gegenüber den Amastigoten auf. Diese war nicht auf eine Schädigung der Wirtszellen zurückzuführen, was durch eine Zytotoxizitätskontrolle der Testsubstanzen gegenüber den RAW 264.7-Zellen ausgeschlossen wurde.

Unter den einfachen Phenolen zeigte sich Gallussäure als nur moderat antileishmaniell wirksam. Die sehr hoch erscheinende Stoffmengenkonzentration für den IC_{50} -Wert liegt allerdings auch im geringen Molekulargewicht begründet. Potenter sind die galloylierten Shikimisäurederivate, innerhalb derer 3,5-Digalloylshikimisäure ca. zehnfach potenter war als 3-Galloyl-Shikimisäure. Ähnliche IC_{50} -Werte wie 3-Galloyl-Shikimisäure zeigten das Proanthocyanidin-Hexamer und EGCG. Catechin war nur moderat aktiv und besaß relativ dazu eine hohe Toxizität gegenüber den Wirtszellen.

Die galloylierten Flavonoidglykoside zeigten schon in geringen Konzentrationen antileishmanielle Wirkung mit IC_{50} -Werten zwischen 1,5 – 6,5 μ M. Etwas schwächer wirksam waren Quercetin-3-O-(2'',3''-di-O-galloyl)- β -glucopyranosid und Quercetin-3-O-(2'',3''-di-O-galloyl)- β -glucopyranosid (8,3-24 μ M). Die Wirkung gegenüber den verschiedenen *Leishmania* – Spezies war uneinheitlicher als in anderen Substanzgruppen. Zusätzliche Galloylgruppen

zeigten sich für die antileishmanielle Potenz nachteilig, was beim Vergleich der IC_{50} -Werte von Quercetin-3-O- β -glucopyranosid, Quercetin-3-O- β -galactopyranosid, Quercetin-3-O-(2"-O-galloyl)- β -glucopyranosid, und Quercetin-3-O-(2",3"-di-O-galloyl)- β -gluco-pyranosid deutlich wird. Bei den Kämpferolderivaten kann eine analoge Beziehung nicht ausgemacht werden (Ercil et al., 2005).

Die antileishmanielle Potenz der Kaffeesäurederivate reichte von den stark wirksamen Vertretern Kaffeesäure (3,8 – 7,2 μ M), Salvianolsäure I –methylester (9 - 19 μ M), Salvianolsäure K (13 – 21 μ M) und Salvianolsäure L (12,7 - 26 μ M) über die moderate Rosmarinsäure (60 - 84 μ M) bis zu der schwach wirksamen Salvianolsäure I und Sagerinsäure (> 120 μ M) (Radtke et al., 2003). Im großen und ganzen war die antiparasitäre Aktivität gegenüber allen Spezies ähnlich; allerdings zeigten Kaffeesäure, Rosmarinsäure und Sagerinsäure gegenüber den neotropischen Arten *Leishmania amazonensis* und *Leishmania guyanensis* geringfügig höhere IC_{50} -Werte.

Besonders potente Substanzen fanden sich unter den hydrolysierbaren Gerbstoffen mit IC_{50} -Werten < 5 μ M, so beispielsweise bei Elaeagnatin-A (2,2 – 2,7 μ M), Castalagin (ca. 3 μ M), sowie sogar Vertreter mit einem IC_{50} –Wert zwischen 0,1 – 0,9 μ M (Corilagin, Geraniin, Casuarinin).

Was die selektive Schädigung des amastigoten Stadiums bei niedrigen Konzentrationen anbetrifft, so ist die Wirkung der Polyphenole im Hinblick auf den potentiellen Einsatz als günstig zu bewerten. Hinzu kommt die sehr geringe Zytotoxizität gegenüber den Wirtszellen. Der große Unterschied in den Wirkungen gegenüber den beiden Stadien ist in der beobachteten Größenordnung überraschend und bei antileishmaniell wirksamen Substanzen aus anderen Stoffklassen in dieser Form nicht bekannt. Nicht einmal das hochwirksame Pentostam[®] kann mit dieser Selektivität aufwarten. Dass Promastigoten trotz direkten Kontakts mit dem Polyphenol erst bei extrem hohen Konzentrationen geschädigt werden, wogegen die in der Wirtszelle geschützt liegenden Amastigoten bereits durch niedrige Konzentrationen an der Vermehrung und Pathogenese gehindert werden, überrascht. Zwar schließen diese Befunde eine direkte selektive Toxizität gegenüber den Amastigoten nicht aus; wahrscheinlicher ist allerdings, dass der antiparasitäre Effekt auf einer Immunstimulation beruht, bei der das Polyphenol eine Makrophagenaktivierung induziert.

Ergebnisse

Tabelle 4.2: Antileishmanielle Wirkung ausgewählter Polyphenole gegenüber Amastigoten [µM]

	Cytotoxizität gegenüber RAW	RAW, infiziert mit <i>L. major</i>	RAW, infiziert mit <i>L. donovani</i>	RAW, infiziert mit <i>L. tropica</i>	RAW, infiziert mit <i>L. aethiopica</i>	RAW, infiziert mit <i>L. killicki</i>	RAW, infiziert mit <i>L. amazonensis</i>	RAW, infiziert mit <i>L. guyanensis</i>
Einfache Phenole								
Gallussäure	>1000	256,3	243,9	237,4	221,6	265,3	245,3	234,6
3-Galloyl-shikimisäure	72,7	11,1	11,5	9,7	13,4	9,3	16,4	15,7
3,5-digalloyl-shikimisäure	81,4	1,8	2,0	2,5	1,7	2,2	2,8	2,6
Proanthocyanidin-hexamere	> 200	13,6	14,2	9,9	12,7	13,1	16,4	15,8
Catechin	93,2	52,7	53,1	49,6	55,3	47,6	53,9	48,6
Epigallocatechin-3-gallat	> 200	12,3	12,5	11,9	12,7	12,0	12,7	12,1
Galloylierte Flavonoidglykoside								
Kämpferol-3-O-β-glucopyranosid	> 500	6,3	1,5	3,7	2,6	4,4	3,8	3,0
Quercetin-3-O-β-glucopyranosid	> 500	3,9	3,0	3,5	4,3	5,7	4,1	3,6
Quercetin-3-O-β-galactopyranosid	> 500	6,4	3,9	5,2	5,4	6,1	3,4	3,0
Kämpferol-3-O-(2"-O-galloyl)-β-glucopyranosid	> 500	2,8	2,5	2,9	3,6	3,2	5,2	4,8
Quercetin-3-O-(2"-O-galloyl)-β-glucopyranosid	> 500	12,5	12,8	9,6	13,2	8,7	17,6	15,0
Quercetin-3-O-(2",3"-di-O-galloyl)-β-glucopyranosid	> 500	8,7	24,2	14,1	17,5	12,5	17,7	20,6
Kämpferol-3-O-(2",3"-di-O-galloyl)-β-glucopyranosid	> 500	3,2	3,0	4,4	2,6	4,1	2,8	3,1
B-Typ-Proanthocyanidine								
Epifisetinidol-4β,8-catechin	> 200	6,2	6,7	5,9	6,4	5,8	7,3	7,0
Epifisetinidol-4β,8-epicatechin	> 200	2,7	2,5	2,3	2,3	2,4	3,6	3,7
Epifisetinidol-4β,6-catechin	> 200	6,4	6,3	5,8	6,1	5,9	7,2	7,6
Epifisetinidol-4β,6-epicatechin	> 200	7,3	7,2	6,8	7,4	6,9	7,8	7,9
Epicatechin-4α,8-catechin	> 200	7,1	6,8	7,7	7,4	6,5	7,7	7,1
Fisetinidol-4α,6-catechin	> 200	2,3	1,9	2,5	1,8	2,5	3,1	3,3
Catechin-4α,8-catechin	> 200	1,2	1,1	1,3	1,3	1,0	1,2	1,3
Depside								
Kaffeensäure	> 500	4,4	6,1	6,4	3,8	3,9	7,2	6,6
Rosmarinsäure	> 500	59,2	74,4	61,6	65,3	69,4	92,7	84,2
Salvianolsäure I	> 500	160,4	175,8	137,9	151,8	167,8	156,2	151,5
Salvianolsäure I – methylester	> 500	10,8	18,6	9,3	16,3	13,6	12,9	15,2
Salvianolsäure K	> 500	18,3	18,2	21,7	14,8	14,5	10,7	13,3
Salvianolsäure L	> 500	20,3	15,4	12,7	16,1	13,0	26,4	22,6
Sagerinsäure	> 500	128,7	122,1	132,7	120,5	154,8	146,2	141,5
Hydrolysierbare Gerbstoffe								
Tellimagrandin-I	> 250	1,1	0,9	1,3	1,5	0,9	0,9	0,8
Tellimagrandin-II	> 250	0,5	0,7	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3
Phyllanthusiin-B	> 250	0,6	0,6	0,8	0,6	0,7	0,8	0,7
Phyllanthusiin-C	> 250	2,5	2,7	2,5	3,1	2,7	3,3	3,5
Geraniin	> 250	0,4	0,3	0,8	0,2	0,3	0,9	0,4
Ascorgeraniin	> 250	0,6	0,4	0,2	0,5	0,4	0,6	0,4
Corilagin	> 250	0,7	0,6	0,8	0,6	0,5	0,9	0,9
Castalagin	> 250	3,3	3,6	3,1	3,3	3,4	3,2	3,4
Casuarinin	> 250	0,6	0,8	0,5	0,9	0,8	0,9	0,9
Elaeagnatin-A	> 250	2,4	2,4	2,7	2,6	2,2	2,5	2,3
Kontrolle: Pentostam	124,6	10,7	9,9	11,4	12,3	9,8	10,6	10,1