

# Kapitel 1

## Einleitung

Sieht man von der Immunschwäche AIDS einmal ab, so finden Infektionskrankheiten heute bei uns kaum noch Beachtung. Diese Tatsache überrascht, zumal noch vor 150 Jahren allein in Deutschland mehr als 70 000 Menschen aufgrund einer Pockeninfektion starben. Jedes zweite Kind verstarb bereits vor dem 10. Lebensjahr an einer Infektionskrankheit. Inzwischen aber sind die Pocken ausgerottet, die Kinderlähmung ist weitgehend zurückgedrängt und verheerende Seuchen wie Pest, Cholera, Typhus, Lepra und Diphtherie sind durch hygienische und medizinische Errungenschaften bei uns fast völlig verschwunden. Bei der Mehrheit der Bevölkerung hat sich daher die Ansicht durchgesetzt, wonach bereits das 19. Jahrhundert als Zeit des Sieges über die Infektionskrankheiten angesehen werden kann. Man wiegt sich damit aber in falscher Sicherheit und rechnet nicht mit der Möglichkeit, dass in einem subtropischen oder tropischen Land mit anderen Lebensbedingungen auch mit anderen teils vergessenen Infektionskrankheiten zu rechnen ist. Ahnungslos kehren daher immer mehr Menschen malariainfiziert von einer Tropenreise zurück. In Deutschland werden jährlich etwa 1000 Malariafälle registriert, von denen etwa 2 % letal verlaufen.

Diese verhältnismäßig kleine Zahl von Malariafällen gilt natürlich nur für die Industrienationen, die Situation der einheimischen Bevölkerung in den tropischen Regionen der Welt ist eine völlig andere.

Die Malaria ist weltweit eine der häufigsten Infektionskrankheiten überhaupt. Sie stellt in endemischen Gebieten besonders für Kinder unter fünf Jahren eine große Bedrohung dar. In den 60ziger Jahren des letzten Jahrhunderts hatte man angenommen, dass nach den anfänglichen Erfolgen der Eradikationskampagne der WHO die Malaria in nächster Zukunft ausgerottet sein würde. Die Inzidenz der Malaria hat jedoch in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Hauptgründe dafür sind die Insektizidresistenzen der *Anopheles*-Mücken und die sich immer weiter ausbreitenden Medikamentenresistenzen des Malariaerregers. Multiresistente Stämme von *Plasmodium falciparum* haben sich inzwischen von Südostasien aus nach Südamerika und Afrika ausgebreitet. In Anbetracht der Tatsache, dass trotz intensiver Forschung bisher kein wirksamer Impfstoff zur Verfügung steht und die Chemotherapie der Malaria durch die Resistenzen erschwert wird, besteht ein nach wie vor erheblicher Forschungsbedarf (Meyer, 2000; Mockenhaupt et al., 1998/99; Schneider, 1989).

## 1.1 Malaria

Die Malaria, deren Name sich aus dem Spanischen „mal aria“ (= schlechte Luft) ableitet, ist eine tropische Infektionskrankheit, die durch Protozoen der Gattung *Plasmodium* übertragen wird. Die Übertragung erfolgt über den Stich der weiblichen *Anopheles*-Mücke, die das Blut von Warmblütern zur Eireifung benötigt. Von den mehr als einhundert bekannten Spezies der Gattung *Plasmodium* sind *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* humanpathogen. Jährlich sterben 1.5-2.7 Millionen Menschen weltweit an einer Malaria, davon etwa 1 Million Kinder unter 5 Jahren. Die Rate der Neuinfektionen liegt bei 300-500 Millionen pro Jahr (WHO, 1997).

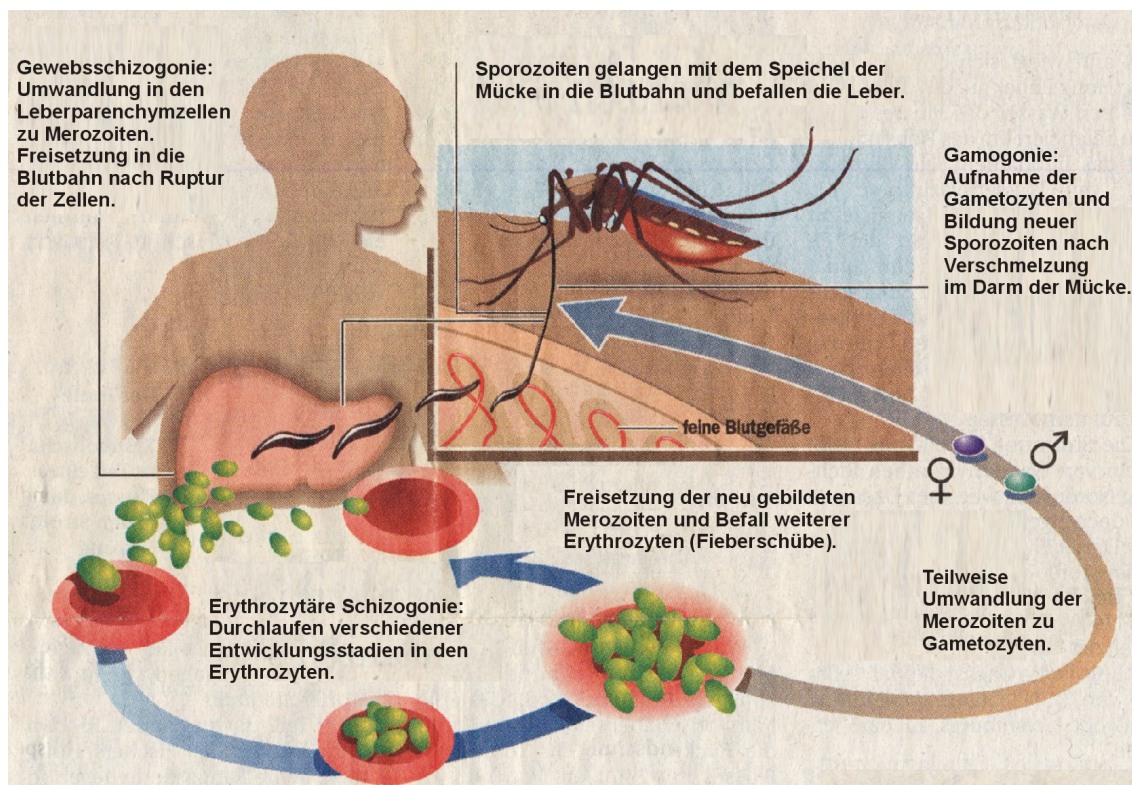
Hier einige historische Eckdaten:

um 460 v. Chr.	Berichte von Hippokrates und seinen Schülern über die Vergrößerung der Milz sowie die Fieberstadien bei Aderntagsfieber (Malaria tertiana) und Dritttagsfieber (Malaria quartana)
um 450 v. Chr.	Empedokles empfiehlt die Trockenlegung einiger sizilianischer Sümpfe und erntet Erfolg
12.-14. Jh.	Dichter wie Pietro da Eboli und Dante erwähnen die Malaria in ihren Werken
1520	der Maler Albrecht Dürer erkrankt in Holland an Malaria
um 1600	der jesuitische Missionar Juan Lopez beschreibt, wie peruanische Indianer die Fieberkrankheit mit Chinarinde kurieren
um 1800	etwa 600 000 kg Chinarinde werden jährlich nach Europa verschifft
1820	die Forscher Pierre Joseph Pelletier und Joseph Bienaimé Caventou isolieren das Hauptalkaloid Chinin aus der Chinarinde
1880	dem französische Militärarzt Charles Louis Alphonse Laveran gelingt der Nachweis des Malariaerregers in menschlichem Blut
1888	Bau des Panama-Kanals muß aufgrund schwerer Verluste durch Malariafälle unter den Arbeitern abgebrochen werden
1897	der amerikanische Militärarzt Ronald Ross weist die Übertragung des Erregers auf den Menschen durch den Stich der weiblichen <i>Anopheles</i> -Mücke nach
1904	Wiederaufnahme des Kanalbaus unter strenger Gesundheitskontrolle und Bekämpfung der Stechmücken
1934	Chloroquin (Resochin <sup>®</sup> ) wird in Deutschland als Antimalariamittel entwickelt
1944	gelingt die vollsynthetische Darstellung des Chinins
1950/1960	Erradikationsprogramme der WHO scheitern nach anfänglichen Erfolgen

- 1934-1990            stetige Resistenzzunahme des Malariaerregers gegenüber Chloroquin
- 1972                chinesische Wissenschaftler isolieren das gegen den Parasiten wirksame Artemisinin aus dem Kraut der chinesischen Heilpflanze *Artemisia annua*

### 1.1.1 Der Malariaerreger und sein Entwicklungszyklus

Protozoen, zu denen die Gattung *Plasmodium* gehört, sind morphologisch einfach strukturierte Mikroorganismen, die gemeinsam mit niederen Algenfamilien und Pilzen zur Gruppe der Protisten gehören. Sie durchlaufen einen komplexen Entwicklungszyklus, wobei eine sexuelle Vermehrung (Gamogonie) in der weiblichen *Anopheles*-Mücke (*A. gambiae* und andere Arten) und eine asexuelle Vermehrung (Schizogonie) im menschlichen Wirt stattfindet (Abb. 1.1).



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von Plasmodien (Berliner Zeitung, 1998).

Innerhalb von 30 Minuten nach einer Infektion befallen die infektiösen Stadien (Sporoziten) Leberparenchymzellen, in denen sich die Gewebeschizonten bilden und die Entwicklung von Merozoiten stattfindet (Gewebsschizogonie). Nach 5-12 Tagen rupturieren die Hepatozyten und es kommt zur Freisetzung von Merozoiten in die Blutbahn. Diese dringen in die zirkulierenden Erythrozyten ein (erythrozytäre Schizogonie) und durchlaufen dort weitere Entwicklungsstadien (Ring, Trophozoit, Schizont). Durch anschließende Ruptur des Erythrozyten werden die neu gebildeten Merozoiten freigesetzt und es kommt

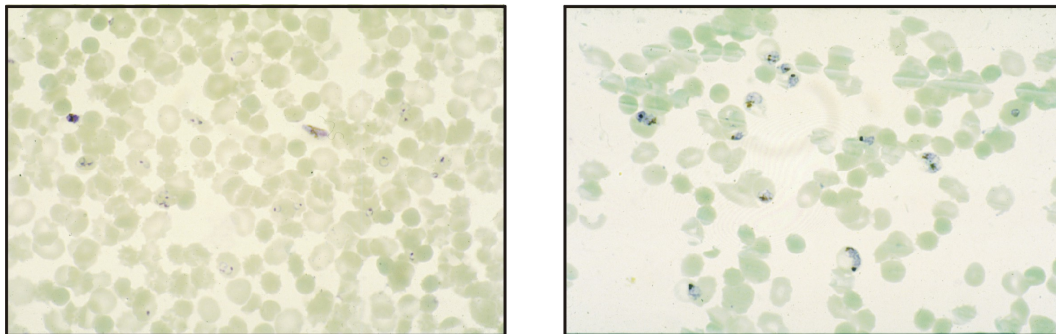
zur erneuten Erythrozyteninvasion. In dieser Phase treten die typischen Krankheitsercheinungen der Malaria auf, die sich entsprechend des Vermehrungszyklus der einzelnen Erreger zunächst als periodische Fieberschübe (Wechselfieber) äußern. Die Dauer der Gewebeschizogonie bestimmt je nach Spezies die unterschiedlichen Inkubationszeiten der Malaria (Tab. 1.1, Seite 6).

Ein kleinerer Teil der Merozoiten wandelt sich im weiteren Verlauf zu männlichen (Mikrogamonten) und weiblichen Geschlechtsformen (Makrogamonten) um, die dann von den Stechmücken während eines erneuten Stiches aufgenommen werden können. Im Darm der Mücke findet der sexuelle Entwicklungszyklus des Parasiten nach Verschmelzung über die Bildung einer Zygote und Oozyste statt (Sporogonie). Nach Ruptur der Oozyste wird eine große Anzahl an Sporozoiten frei, die sich in den Speicheldrüsen der Mücke sammeln und beim nächsten Stich (etwa 2000 Sporozoiten) wieder auf den Menschen übertragen werden. Der Zyklus beginnt von neuem.

Bei einer Infektion durch *P. vivax* und *P. ovale* kann ein Teil der Plasmodien in Form der ruhenden Parasitenstadien (Hypnozoiten) in den Leberzellen verbleiben und erst nach Monaten und Jahren in das erythrozytäre Stadium eintreten. Diese lange Inkubationszeit erschwert erheblich die Diagnosestellung (Meyer, 2000).

### 1.1.2 Morphologische Merkmale von *Plasmodium falciparum*

Die einzelnen Spezies lassen sich diagnostisch im Blutausstrich bzw. im „Dicken Tropfen“<sup>1</sup> morphologisch unterscheiden. Im Folgenden sind die morphologischen Merkmale von *P. falciparum* dargestellt (Abb. 1.2 und 1.3):



**Abbildung 1.2:** *Plasmodium falciparum* im Blutausstrich nach GIEMSA, links überwiegend Ringstadien, rechts überwiegend Schizonten.

Die asexuellen Blutstadien sind gekennzeichnet durch kleine Ringe (junge Trophozoiten) mit einer großen, zentral gelegenen Vakuole und einem randständigen Kern, die etwa 1/5 des Erythrozytendurchmessers ausmachen. Ein Mehrfachbefall ist häufig. Mit zunehmendem Alter vergrößern sie sich zu reifen Trophozoiten, die typische Ringform ist nicht mehr zu erkennen. Im Schizontenstadium wird im Laufe der Entwicklung der gesamte Erythrozyt ausgefüllt und man erkennt 8-24 Schizontenkerne. Das durch Hämoglobinumwandlung entstandene Pigment, das sogenannte Malariapigment, ist verstreut und hellbraun; in klumpiger Anordnung eher schwarz-braun. Gelegentlich ist die sogenannte Maurer-Körnelerung oder -Tüpfelung zu erkennen.

<sup>1</sup>Anhang: Abbildung A5



**Abbildung 1.3:** *Plasmodium falciparum*: schematische Darstellung der Morphologie der Erreger links im Blutausstrich und rechts im „Dicken Tropfen“ (Meyer, 2000).

Darunter versteht man die grobe, unregelmäßige und rote Tüpfelung der von *P. falciparum* befallenen Erythrozyten nach GIEMSA-Anfärbung.

Die sexuellen Formen, die im menschlichen Blut weniger häufig vorkommen, erscheinen sichel- bzw. bananenförmig (*falciparum* = *falx* *<lat.>* Sichel; *par* *<lat.>* gleich). Der Mikrogamont ist 9-11  $\mu\text{m}$  groß und enthält einen großen und diffusen Kern. Das Plasma ist rosa gefärbt und das Pigment diffus zerstreut. Der Makrogamont ist etwas größer (12-14  $\mu\text{m}$ ), der rote Kern liegt zentral und das Plasma ist blau bis violett gefärbt. Das Pigment liegt konzentriert um den Kern (Pschyrembel, 1975).

### 1.1.3 Klinik der Malaria

Zunächst ähneln die Symptome einem grippalen Infekt mit allgemeinem Krankheitsgefühl, Abgeschlagenheit, Kopf- und Muskelschmerzen. Der erste Fieberanfall, Ausdruck der Freisetzung der Merozoiten aus parasitierten Erythrozyten, setzt meist akut mit Schüttelfrost und Kältegefühl ein. Nach 10 bis 60 Minuten löst das Hitzestadium den Schüttelfrost ab. Dabei kann es zu Erbrechen und orthostatischer Dysregulation kommen. Ein akuter Anfall dauert in der Regel 6 bis 12 Stunden. Die differenzierte Symptomatik ist abhängig von der Art des Malariaerregers (Tab. 1.1).

**Tabelle 1.1:** Vergleich der Malariaformen nach ihrem Erreger.

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>
Malaria-Form	Malaria tropica	Malaria tertiana	Malaria tertiana	Malaria quartana
Inkubationszeit	8-15 Tage	10-18 Tage (Monate-Jahre)	10-18 Tage (Monate-Jahre)	18-40 Tage
Fieber	unregelmäßig, ev. alle 36-48 Stunden	unregelmäßig, bis alle 48 Stunden	unregelmäßig, bis alle 48 Stunden	relativ regelmä- ßig, alle 72 Stun- den
Anämie	++++	++	+	++
ZNS- Beteiligung	++++	-/+	-/+	-/+
Nephrotisches Syndrom	+	-/+	-	+++
Rezidive	-	+	+	-
Rekrudeszenzen	-	-	-	+

Typisch für alle Formen ist die Ausbildung einer Anämie. Diese ist die Folge verschiedener pathologischer Prozesse, wie Parasitierung der Erythrozyten, Dyserythropoese, Phagozytose der Erythrozyten und Sequestrierung von Eisen. Auch eine Splenomegalie (pathologische Vergrößerung der Milz) ist im Verlauf einer Malaria so charakteristisch, dass ihre Inzidenz als „Milzindex“ zeitweilig für die epidemiologische Einschätzung der Durchseuchung in Endemiegebieten verwendet wurde. Aufgrund des charakteristischen Krankheitsbildes der Malaria, zeitgleiches Auftreten von periodischen Fieberanfällen, Blutarmut und Milzschwellung, lässt sich die Malaria gut diagnostizieren und ist wie historische Dokumente belegen eine der ältesten bekannten Infektionskrankheiten.

Während eine unkomplizierte Malaria eher als eine fiebrige, grippeartige Erkrankung anzusehen ist und sich eine Infektion mit *P. vivax*, *P. malariae* oder *P. ovale* unbehandelt über Wochen oder Monate ohne schwere gesundheitliche Folgeschäden fortsetzen kann, verursacht eine Infektion mit *P. falciparum* bei weitem die schwerwiegendste klinische Symptomatik. Unbehandelt führt sie, insbesondere bei nicht-immunen Personen, innerhalb weniger Tage zum Tode. Dies hängt mit der Neigung der parasitierten Erythrozyten zusammen, im Kapillarbett zu sequestrieren. Beeinträchtigung der Mikrozirkulation und lokale Ischämien sind die Folge. Dieser Mechanismus ist maßgeblich an der Pathogenese der zerebralen Malaria beteiligt.

Entscheidend für die klinische Relevanz einer Infektion ist die individuelle Immunitätslage. Eine sterile Immunität, die gegen erneute Infektionen vollständig schützt, bildet sich bei der Malaria nicht aus. Allerdings ist bei älteren Kindern und Erwachsenen in Endemiegebieten eine sogenannten Teilimmunität zu beobachten, die durch chronisch-latente Infektion bei geringer Parasitämie, mit einer nur schwachen oder gänzlich fehlenden Symptomatik gekennzeichnet ist. Allerdings ist die Entwicklung der Teilimmunität ein lang andauernder Prozess und bedarf einer kontinuierlichen Reinfektion mit unterschiedlichen Parasitenstämmen. Die hohe Morbidität und Mortalität von Kindern im Alter von 0.5 bis 5 Jahren in Endemiegebieten ist darauf zurückzuführen, dass sich noch keine ausreichende Teilimmunität ausgebildet hat. Dagegen bieten in den ersten Lebensmonaten die mütterlichen Antikörper noch einen partiellen Schutz vor schweren Verläufen der Erkrankung (Meyer, 2000; Mockenhaupt et al., 1998/99).

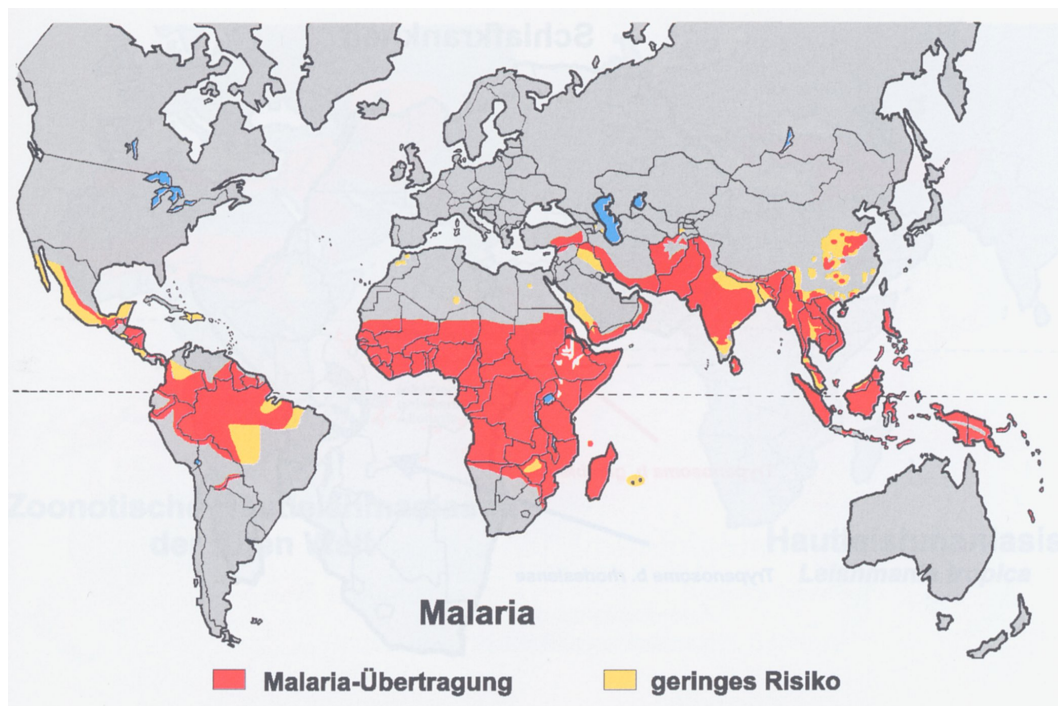
#### 1.1.4 Verbreitung der Malaria

Die Malaria ist in den tropischen und subtropischen Gebieten der Welt verbreitet (Abb. 1.4). Vivax-Infektionen können sogar bis zum Süd-Osten der Türkei auftreten. Mehr als 40 % der Weltbevölkerung (1994 waren es 2.3 Milliarden Menschen) lebt in malariagefährdeten Gebieten. 90 % aller Malariafälle treten im tropischen Afrika südlich der Sahara auf (WHO, 1997). Zu den Hauptverbreitungsgebieten von *P. falciparum* gehören Afrika, Südostasien, Süd- und Mittelamerika, einschließlich die Dominikanische Republik und einige der Pazifischen Inseln. In Europa, Nordamerika und Australien kommt die Malaria nur als eine aus endemischen Gebieten „importierte“ Infektion vor.

#### 1.1.5 Therapie der Malaria

Die Therapie richtet sich zunächst nach der Erregerspezies bzw. nach der aktuellen Medikamentenempfindlichkeit in den Infektionsgebieten. Im Folgenden soll nur auf die Therapie der Malaria tropica eingegangen werden.

Eine unkomplizierte Malaria tropica, die in Gebieten erworben wurde, wo Chloroquinresistenzen nicht bekannt sind, kann mit Chloroquin (Resochin®; Abb. 1.6), einem dem Chinin verwandtem Chinolinderivat, behandelt werden. Im Fall bestehender Resistenzen ist das Mittel der Wahl das strukturähnliche Mefloquin (Lariam®; Abb. 1.6). Die Anfangsdosis liegt bei 750 mg (Mefloquin-Base). Nach 6-8 Stunden werden erneut 500 mg gegeben und anschließend, maximal drei Monate lang, täglich 500 mg. Alternativ kann, z. B. bei Unverträglichkeit gegen Mefloquin, auch mit Halofantrin (Halfan®), einem Phenanthrenderivat, therapiert werden. Dazu werden in sechsstündigem Abstand dreimal 500



**Abbildung 1.4:** Verbreitungsgebiete der Malaria weltweit (Meyer, 2000).

mg Halofantrin verabreicht und das Schema nach einer Woche wiederholt. Darüber hinaus ist in Deutschland (seit 1997) die feste Kombination aus 250 mg Atovaquon, einem Hydroxynaphthochinonderivat (Abb. 1.12) und 100 mg Proguanil, einem Biguanid, zur Therapie der unkomplizierten Form zugelassen (Malarone<sup>®</sup>). Die dreitägige Therapie besteht aus der täglichen Gabe von 1000 mg Atovaquon und 400 mg Proguanil. Die erst kürzlich zur (Notfall-) Behandlung der *Malaria tropica* zugelassene feste Kombination (Riamet<sup>®</sup>; Abb. 1.8) aus 20 mg Artemether, einem Sesquiterpenlaktone, das von Artemisinin, einem Naturstoff aus *Artemisia annua*, abgeleitet ist und 120 mg Lumefantrin, einem Arylaminoalkohol, stellt eine der wichtigsten jüngeren Entwicklungen auf dem Gebiet der Malariatherapie dar. Die dreitägige Therapie setzt sich zusammen aus der initialen Gabe von 4 Tabletten und weiteren 4 Tabletten nach 8 Stunden. An den zwei folgenden Tagen werden zweimal täglich erneut je 4 Tabletten eingenommen.

Die komplizierte und schwere *Malaria tropica* muß stationär behandelt werden. Dazu wird 10 Tage lang Chinin, ein Alkaloid aus der Chinarinde (dreimal 10 mg/kg Körpergewicht, Abb. 1.6), in einer 5 %igen Dextroselösung (Verhinderung von Hypoglykämien) intravenös verabreicht. Um Resistenzen zu verhindern, kombiniert man die Therapie mit einer einmal täglichen Gabe von 3 mg pro Kilogramm Körpergewicht Doxycyclin (Vibramycin<sup>®</sup>), einem Tetracyclinderivat (Meyer, 2000; Mockenhaupt et al., 1998/99).

Für die teilimmune Bevölkerung in den Endemiegebieten ist weiterhin Chloroquin das Mittel der Wahl, da es effektiv und preisgünstig ist. Bei Versagen von Chloroquin weicht man auf die ebenfalls kostengünstige Kombination aus Pyrimethamin und Sulfadoxin, einem Sulfonamid (Fansidar<sup>®</sup>) aus. Diese ist aber in Deutschland nicht mehr zugelassen. Das teils stärker wirksame Mefloquin, das in Gebieten mit Chloroquinresistenz häufig zur Prophylaxe eingesetzt wird, ist kein gleichwertiger Ersatz, da es starke Nebenwirkungen



besonders neuropsychiatrischer Art verursacht und für einen breiten Einsatz in Entwicklungsländern viel zu teuer ist.

Bei Reisen in Endemiegebiete wird je nach der aktuellen Situation im Reiseland (jährliche Informationen der nationalen Tropeninstitute, Apotheker- und Ärztezeitschriften sowie Internet) eine medikamentöse Prophylaxe empfohlen. In Deutschland sind folgende Fertigarzneimittel zur Prophylaxe zugelassen: Lariam<sup>®</sup>, Resochin<sup>®</sup>, häufig kombiniert mit Paludrine<sup>®</sup> und seit 2001 Malarone<sup>®</sup>. Auf die Verwendung von Vibramycin<sup>®</sup> als Prophylaxe sollte bei starker Sonneneinstrahlung (aufgrund der Photosensibilisierung) sowie bei Kindern und Schwangeren (Kontraindikation) verzichtet werden. Die Medikamente werden im Allgemeinen eine Woche vor Reisebeginn und bis zu vier Wochen nach Rückkehr aus dem Endemiegebiet eingenommen. Zusätzlich kann eine strikte Expositionsprophylaxe (z. B. Verwenden von Repellentien, Tragen von heller und langärmeliger Kleidung nach Sonnenuntergang) das Infektionsrisiko um bis zu 90 % reduzieren (Wiedermann et al., 1999; Meyer, 2000).

## 1.2 Ethnobotanik

Gegenstand der Ethnobotanik ist ganz allgemein die Untersuchung der Beziehungen zwischen Pflanzen und Menschen. Dies erkennt man schon an ihrem Namen: „Ethno-“ für das Studium von Völkern und „-botanik“ für die Wissenschaftslehre der Pflanzen. Die wissenschaftliche Ausrichtung ist dabei durchaus verschieden. Sehen die einen darin ähnliche Ziele wie die Kulturanthropologie, nämlich das Verstehen wie andere Völker die Pflanzen in ihre kulturellen Traditionen und Religionen miteinbeziehen, haben die anderen ein rein wirtschaftliches Interesse daran, Pflanzen bzw. deren Inhaltsstoffe, die zuvor nur einer kleinen Volksgruppe bekannt waren, weltweit zu vermarkten. Schätzungsweise 80 % der Weltbevölkerung nutzt die traditionelle Medizin zur Behandlung von Krankheiten (Phillipson und Wright, 1991). Auch die heutige westliche Schulmedizin geht in vielen Bereichen auf das jahrtausendalte Wissen der Volksmedizin zurück. Es konnten immer bessere Heilmethoden und -strategien entwickelt werden. So wurden zunächst verschiedene pflanzliche Zubereitungen verwendet bis man durch Isolierung und Strukturaufklärung die Reinstoffe nutzen konnte, die dann in der weiteren Entwicklung die Grundlage für Partialsynthetika bildeten oder als Leitstruktur für die Synthese neuer Arzneistoffe zur Verfügung standen. Bezogen auf die Malaria sind hier zwei der wohl berühmtesten Entdeckungen zu nennen: das aus der Chinarinde gewonnene Alkaloid Chinin (Abb. 1.6) und das Artemisinin (Abb. 1.9), ein Sesquiterpenlaktone aus dem Kraut von *Artemisia annua*.

### 1.2.1 Naturstoffe mit antiplasmodialer Wirkung

Schon 1947 wurden etwa 600 Pflanzenarten aus 126 Familien, die vorwiegend aufgrund ihrer traditionellen Anwendung gegen Malaria ausgesucht wurden, extrahiert und auf ihre antiplasmodiale Wirkung hin untersucht. Zur Verfügung standen aufwendige *in-vivo*-Testsysteme an Tieren, wie z. B. an mit *Plasmodium gallinaceum* infizierten Hühnern. Ihre Wirkung gegen die humanpathogenen Erreger wie *P. falciparum* ist daher nicht bekannt. Für etwa 30 Gattungen konnten im *in-vivo*-Test gute Ergebnisse erzielt werden (Phillipson und Wright, 1991), wovon viele zur Familie der Simarubaceae (s. a. Kap. 1.11) gehörten.

Seit der Entwicklung der *in-vitro*-Testsysteme (Desjardins et al., 1979; Trager und Jensen, 1976) konnten Pflanzenextrakte und deren Inhaltsstoffe schnell und effizient auf ihre Wirkung gegen *P. falciparum* getestet werden. Eine Vielzahl an Naturstoffen, darunter Alkaloide, Terpenoide, chinoide und phenolische Verbindungen, sind seitdem auf ihre antiplasmodiale Wirksamkeit untersucht worden. Die Mehrzahl wurde hauptsächlich nur auf ihre *in-vitro*-Aktivität, die über die halbmaximale Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ -Wert) definiert ist (s. a. Kap. 5.4.3), hin untersucht, einige wenige auch auf ihre *in-vivo*-Aktivität im Tierversuch.

Der folgende Abschnitt gibt eine Auswahl an Naturstoffen, eingeteilt nach ihren Stoffgruppen, die sich als aktiv gegenüber *P. falciparum* erwiesen haben. Beim Vergleich der Aktivitäten ist darauf zu achten, dass unterschiedliche Stämme bzw. Klone von *P. falciparum* verwendet wurden: Dd2, K1, W2 und V1/S, BHz 26/86 sind resistent gegenüber Chloroquin, während D6, PoW und NF<sub>54</sub> sensibel auf Chloroquin reagieren.

### 1.2.1.1 Alkaloide

#### Chinolinalkaloide

Das wohl bekannteste Chinolinalkaloid Chinin ist Hauptbestandteil der Alkaloidfraktion der Chinarinde (*Cinchonae cortex*). Das Europäische Arzneibuch (1997) beschreibt die Rinde wie folgt: Chinarinde besteht aus der getrockneten Rinde von *Cinchona pubescens* VAHL (*Cinchona succirubra* PAVON) oder von deren Varietäten sowie Hybriden. Die Droge enthält mindestens 6.5 % Gesamtalkaloide, von denen mindestens 30 % und höchstens 60 % Alkaloide vom Typ des Chinins darstellen. Die Droge hat einen schwachen, charakteristischen Geruch und einen bitteren, etwas zusammenziehenden Geschmack. Als Reinstoffe sind sowohl das Hydrochlorid als auch das Sulfatsalz vom Chinin monographiert.

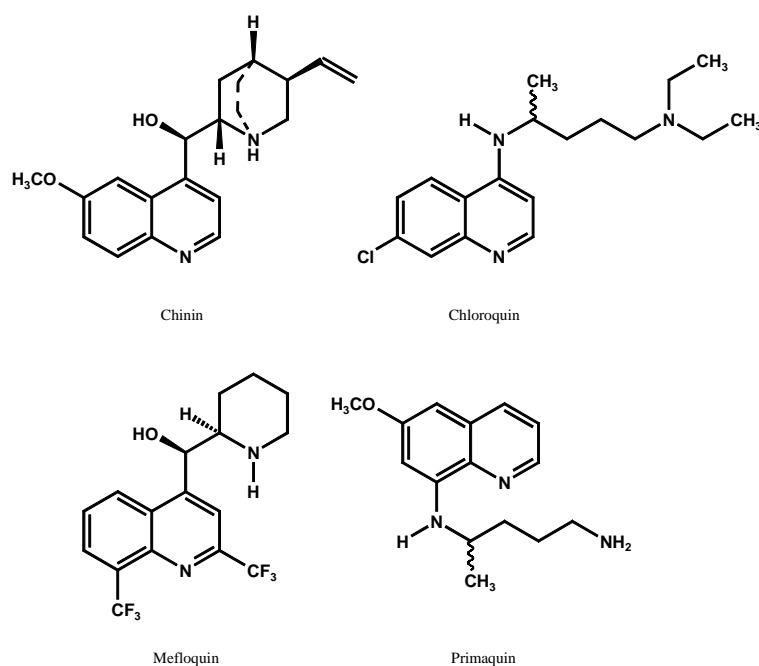
*Cinchona pubescens* ist ein bis zu 25 m hoch werdender Baum aus der Familie der Rubiaceae (Abb. 1.5), der an den Osthängen der Anden von Venezuela im Norden bis Bolivien im Süden beheimatet ist. Die Gattung *Cinchona* benötigt feuchtwarmes Klima und wächst auf einer Höhe von 1500 bis 2500 m über dem Meeresspiegel (Rimpler, 1990).

Die Geschichte der Entdeckung des Chinins beginnt im 16. Jahrhundert während der Eroberung des Inkareiches in Peru. Nach einer der vielen Legenden trank ein Soldat, der in der Wildnis einen Malariaanfall bekam, von dem dunkelbraunen Wasser eines Tümpels, in den *Cinchona*-Bäume gestürzt waren. Daraufhin schlief er ein, und als er erwachte, war das Fieber verschwunden. Der Jesuit Pater Bartolomé Tafur brachte 1645 die Chinarinde nach Rom, wo sie unter den Geistlichen vielfach verwendet wurde. Im weiteren Sinne kann man diese Berichte als erste dokumentierte klinische Prüfung ansehen. Der Botaniker Carl von Linné gab der Gattung ihren Namen, der Legende zufolge nach einer spanischen Gräfin, die von der Rinde geheilt worden sein soll (Balick und Cox, 1996). Der Bedarf an der Rinde bzw. an Chinin wuchs und man begann die *Cinchona*-Bäume auf Plantagen (z. B. auf Java) anzubauen. Chinin stellte lange Zeit das einzige Antimalariamittel dar. Die antiplasmodiale Aktivität von Chininsulfat in unserem *in-vitro*-Testsystem liegt bei  $IC_{50}$ -Werten von  $0.035 \mu\text{g/ml}$  /  $0.051 \mu\text{M}$  [PoW] und  $0.092 \mu\text{g/ml}$  /  $0.133 \mu\text{M}$  [Dd2]. Chinin verursacht aber auch eine Reihe teils schwerer Nebenwirkungen. Dazu gehören neurotoxische Nebenwirkungen, wie Seh- und Hörstörungen, Kopfschmerzen und Verwirrheitszustände, Überempfindlichkeitsreaktionen, die sich in Form von Hautexan-



**Abbildung 1.5:** *Cinchona succirubra* PAVON, Rubiaceae, aus Atlas der Arzneipflanzen der UdSSR, Moskau 1962.

themen, Leberfunktionsstörungen oder Bronchospasmen äußern können, sowie in seltenen Fällen auch Nierenschädigungen und Herzrhythmusstörungen. Aus diesem Grund wuchs der Bedarf an neuen wirksameren und besser verträglichen Arzneistoffen. Von besonderem Interesse waren dabei Vollsynthetika durch die die Versorgung der Bevölkerung besser abgesichert werden konnte. Die Arzneistoffe Chloroquin, Mefloquin und Primaquin sind solche dem Chinin strukturell verwandten Vollsynthetika (Abb. 1.6).



**Abbildung 1.6:** Strukturelle Verwandtschaft einiger Vollsynthetika zum Naturstoff Chinin.

Während Chloroquin und Mefloquin (C-4-substituierte Chinoline) wie das Chinin selbst in der erythrozytären Phase des Entwicklungszyklus der Plasmodien eingreifen, wirkt das Primaquin (C-8-substituiertes Chinolin) hypnozoitozid und wird ausschließlich bei Infektionen mit *P. vivax* eingesetzt. Der Wirkmechanismus der C-4-substituierten Chinoline beruht auf der Hemmung der Häm polymerase. Die Parasiten benötigen dieses Enzym, um eine Anreicherung membranschädigender Häm metabolite wie Ferriprotoporphyryn IX zu vermeiden, die beim Abbau des Hämoglobins freierwerden. Die Polymerase bildet aus den Metaboliten das Hämozoin, das bei der Ruptur der Erythrozyten als kristallines Malaria-pigment freigesetzt wird (Mutschler und Schäfer-Korting, 1996). Seit seiner Entwicklung 1934 nahm allerdings die Resistenz der Parasiten gegenüber Chloroquin so stark zu, dass 1990 mehr als 80 % der Endemiegebiete als chloroquinresistent galten. Multiresistente *P. falciparum*-Stämme haben sich von Südostasien aus nach Afrika und Südamerika ausgebreitet. Darüber hinaus hat auch Mefloquin in Gebieten Südostasiens und in Afrika innerhalb von nur zwei Jahrzehnten deutlich an Wirkung verloren (Mockenhaupt, 1995). Die Bedeutung des Chinins in der Malariatherapie ist somit ungebrochen.

Im Gegensatz zu anderen Alkaloidklassen finden sich in der Gruppe der Chinolinalkaloide, natürlich abgesehen von Chinin und seinen Begleitalkaloiden (z. B. Chinidin), wenig weitere Naturstoffe mit antiplasmodialer Wirkung. Neben dem Hauptalkaloid Echitamin (ein

iridoides Indolalkaloid vom Corynanthean-Typ mit einer Dihydroindolpartialstruktur) aus *Alstonia coriacea* F. MUELL. (Apocynaceae) konnten zwei Alkaloide, die strukturell mit dem Chinin verwandt sind, isoliert werden. Im Gegensatz zu Echitamin, zeigten Coralstonin und Coralstonidin (Abb. 1.7) eine *in-vitro*-Wirksamkeit gegen *P. falciparum* (K1) mit IC<sub>50</sub>-Werten von 2.3 µg/ml / 5.7 µM bzw. 2.2 µg/ml / 5.4 µM. Chininhydrochlorid erwies sich in diesem Testsystem als 10 mal stärker wirksam (Wright et al., 1993).

### Protoberberinalkaloide

Berberin (Abb. 1.7), dessen bakterizide und antimykotischen Eigenschaften lange bekannt sind, wird in vielen Ländern zur Behandlung von Malaria, Amoebiasis und Leishmaniose eingesetzt (Phillipson et al., 1995). Es zeigte in verschiedenen Tests eine *in-vitro*-Aktivität gegen *P. falciparum* (IC<sub>50</sub>-Wert: 0.148 µg/ml / 0.45 µM [W2]). Berberin kommt in insgesamt neun Pflanzenfamilien (Annonaceae, Berberidaceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Ranunculaceae, Rhamnaceae, Rubiaceae, Rutaceae und Papaveraceae) vor und konnte zum Beispiel zusammen mit den strukturell verwandten Verbindungen Palmatin und Jatrorrhizin (Abb. 1.7) aus der Rinde von *Enantia chlorantha* OLIVER, Annonaceae, isoliert werden (Vennerstrom und Klayman, 1988). Die zwei letztgenannten Alkaloide erwiesen sich zwar als etwas schwächer wirksam, waren im Vergleich zu Berberin aber nicht so zytotoxisch gegenüber KB-Zellen (Partridge et al., 1990; Wright et al., 2000). Eine *in-vivo*-Aktivität gegen *P. berghei* in Mäusen wies keine der genannten Verbindungen auf, so dass von dieser Stoffklasse, im Hinblick auf die Arzneistoffentwicklung, zunächst Abstand genommen wurde.

Sanguinarin, ein durch oxidative C-N-Spaltung und erneuten Ringschluß gebildetes *Cheledonium*-Alkaloid, zeigte in unserem Testsystem lediglich eine *in-vitro*-Aktivität von 2.7 µg/ml / 8.13 µM gegen Dd2.

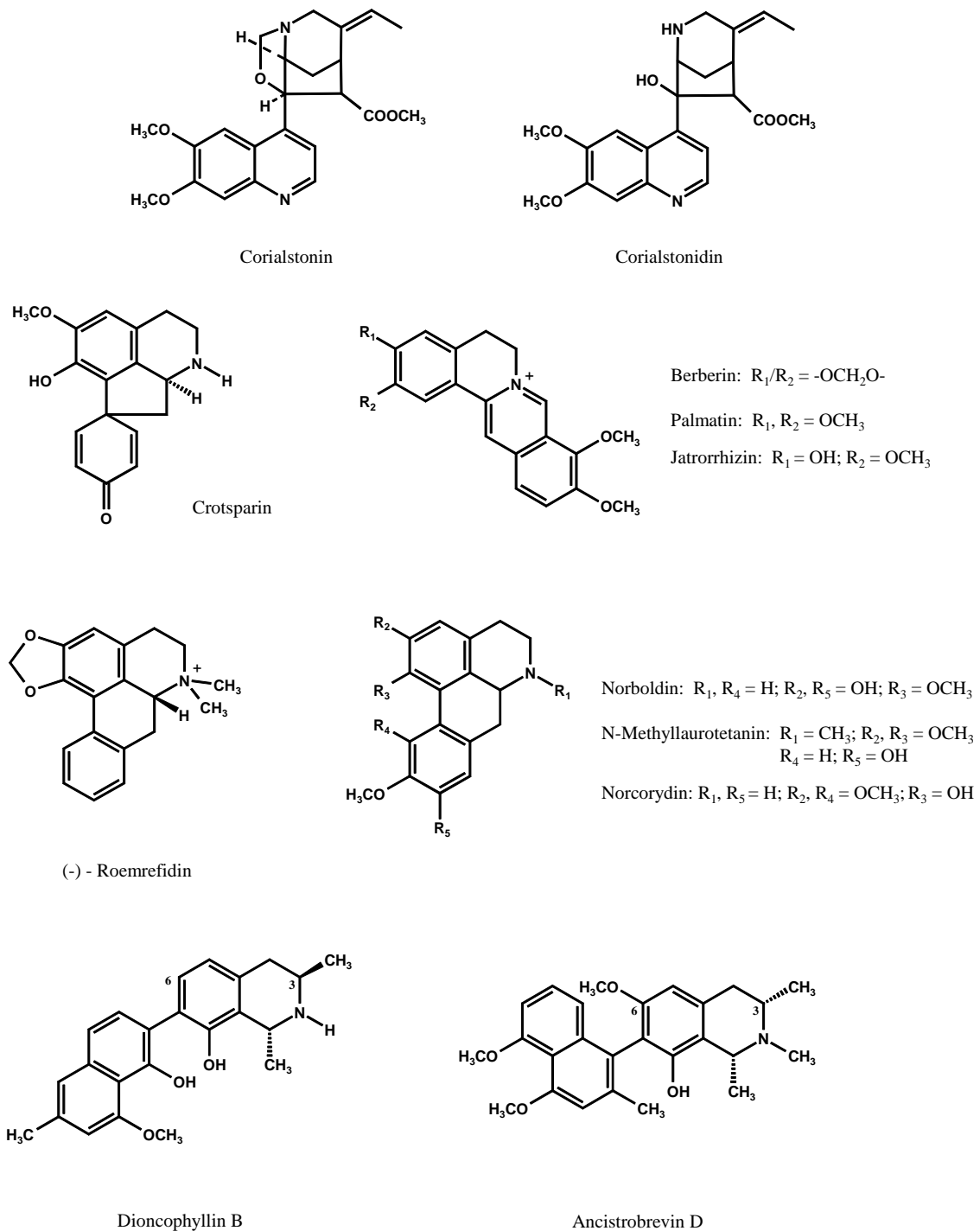
### Naphthylisochinolinalkaloide

Die in den zwei Familien Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae vorkommenden Naphthylisochinolinalkaloide zeigen ebenfalls eine potente antiplasmodiale Wirkung. Einige der im tropischen Afrika und Südostasien beheimateten Arten, wie *Ancistrocladus tectorius* (LOUR.) MERR. und *Triphyophyllum peltatum* HUTCHINSON & DALZIEL sind traditionelle Arzneipflanzen, die gegen Malaria eingesetzt werden.

Im Besonderen zeichnen sich Dioncophyllin B (Abb. 1.7) und Dioncopeltin A aus den Wurzeln von *T. peltatum*, neben anderen biologischen Aktivitäten, wie spasmolytisch oder fungizid, durch eine hohe *in-vitro*-Aktivität gegen *P. falciparum* aus (IC<sub>50</sub>-Werte von Dioncophyllin B: 0.063 µg/ml / 0.175 µM [K1]; 0.224 µg/ml / 0.62 µM [NF 54/64]). Ancistrobevin D (Abb. 1.7) aus den Wurzeln von *A. abbreviatus* AIRY SHAW war dagegen unwirksam. Voraussetzungen für eine Aktivität sind also offenbar eine R-Konfiguration am C-3 zusammen mit einem fehlenden Sauerstoff-Substituenten an C-6 und dem Fehlen der N-Methylierung (Bringmann et al., 1998; François et al., 1994).

### Aporphinalkaloide

Extrakte aus der Zweigrinde der südamerikanischen Heilpflanze *Sparattanthelium amazonum* MARTIUS (Hernandiaceae) wiesen eine *in-vitro*-Aktivität gegen *P. falciparum* auf. Durch aktivitätsgeleitete Fraktionierung der Basenfraktion konnte als aktive Verbindung (-)-Roemrefidin (Abb. 1.7) gewonnen werden, ein Aporphinalkaloid, das auch aus einigen Arten der Papaveraceen (Sariyar et al., 1994) und Menispermaceen (Kanyinda et al., 1989)



**Abbildung 1.7:** Strukturen einiger Alkaloide mit antiplasmodialer Wirkung.

bekannt ist. Es wies gegenüber dem Chloroquin-resistenten Stamm INDO von *P. falciparum* einen IC<sub>50</sub>-Wert von 0.17 µg/ml / 0.58 µM auf. Bemerkenswert ist hierbei die geringe Zytotoxizität (> 50 µM) gegen KB-, HEp-2- und HeLa-Zellen (Muñoz et al., 1999).

Wright et al. (2000) testeten 21 monomere Isochinolinalkaloide auf ihre antiplasmodiale, antiamöbische und zytotoxische Wirkung. Darunter befanden sich neun Aporphinalkaloide, von denen Norcorydin (Abb. 1.7) die stärkste Wirkung aufwies (IC<sub>50</sub>-Wert: 0.91 µg/ml / 3.08 µM). Auch hier konnte keine bemerkenswerte Zytotoxizität gegenüber KB-Zellen nachgewiesen werden. Dieser Alkaloidtyp scheint also eine selektive Toxizität gegenüber *P. falciparum* zu besitzen und bietet somit ideale Voraussetzungen für weitere Untersuchungen.

Auch in unserer Arbeitsgruppe konnten in einem aktiven Basenextrakt aus den Blättern von *Siparuna pauciflora* (BEURL.) A.DC. (Monimiaceae), einem in Mittelamerika beheimateten aromatisch riechenden Strauch oder kleinen Baum, Aporphinalkaloide nachgewiesen werden (Jenett-Siems, 2002). Es handelte sich um die Verbindungen Norboldin, Boldin, Laurotetanin und N-Methylaurotetanin, die zuvor von Böhlke et al. (1996) aus *Nectandra salicifolia* (H.B.K.) NEES (Lauraceae) isoliert wurden. Im *in-vitro*-Test gegen *P. falciparum* erwiesen sich Norboldin und N-Methylaurotetanin (Abb. 1.7) als aktiv (IC<sub>50</sub>-Werte: 1.2 µg/ml / 3.83 µM und 7.2 µg/ml / 21.88 µM [D6]).

In einer neueren Veröffentlichung berichten Akendengue et al. (2002) über Crotsparin (Abb. 1.7), einem aus *Uvaria klaineana* ENGLER AND DIELS (Annonaceae) isolierten Alkaloid, das strukturell den Proaporphinen zuzuordnen ist. Auch hier konnte eine antiplasmodiale Aktivität nachgewiesen werden (IC<sub>50</sub>-Wert: 3.2 µg/ml / 11.31 µM [K1]).

### Sonstige Alkaloide

Im Folgenden werden weitere Alkaloid-Typen mit Pflanzen- und Literaturbeispielen genannt, die im Rahmen von aktivitätsgeleiteten Fraktionierungen oder anderen Screening-Methoden eine antiplasmodiale Wirkung zeigten:

**Bisbenzylisochinoline** aus *Stephania erecta* CRAIB (Likhitwitayawuid et al., 1993b); *Cyclea barbata* (WALL.) MIERS (Lin et al., 1993); *Trichlisia patens* OLIV. (Phillipson et al., 1995); *Abuta grandifolia* (MART.) SANDW., Menispermaceae (Steele et al., 1999).

**Iridoide Isochinolinalkaloide** aus *Cinchona*- und *Strychnos*-Arten, Rubiaceae, Loganiaceae (Phillipson et al., 1995); *Pogonopus tubulosus* (D.C.) SCHUMANN, Rubiaceae (Sauvain et al., 1996).

**Iridoide Indolalkaloide** aus *Cryptolepis sanguinolenta* (LINDL.) SCHLECHTER, Asclepiadaceae (Paulo et al., 2000).

**Iridoide Bisindolalkaloide** aus *Strychnos usambarensis* GILG (Wright et al., 1991; Frédérick et al., 1999), *S. icaja* BAILLON, Loganiaceae (Frédérick et al., 2000); *Alstonia*-Arten, Apocynaceae (Phillipson et al., 1995; Keawpradub et al., 1999).

**Acridonalkaloide** aus verschiedenen Pflanzen der Gattungen *Citrus*, *Glycosmis* und *Severinia*, Rutaceae (Fujioka et al., 1989).

**Aminosteroide** aus *Saracha punctata* RUÍZ AND PAVÓN, Solanaceae (Moretti et al., 1998).

### 1.2.1.2 Terpene

#### Mono- und Sesquiterpene

Artemisinin oder Qinghaosu, ein Sesquiterpenlaktone mit einer Endoperoxidstruktur, das aus den Blättern der chinesischen Heilpflanze *Artemisia annua* L. (Asteraceae, Abb. 2.37) isoliert wurde, gilt als eine der bemerkenswerten Entdeckungen der jüngsten phytochemischen Untersuchungen von traditionell genutzten Pflanzenarten. Die ersten Berichte über diese Pflanze liegen über 2000 Jahre zurück. Die Nutzung als Antimalariamittel wurde als erstes in einem Handbuch (*Zhouhon Beiji Fang* = Rezepte für den Notfall) in der Mitte des vierten Jahrhunderts n. Chr. von Ge Hong beschrieben.

*Man nehme eine Handvoll qing hao, weiche sie in einem shang (ca. 1 l) Wasser ein, siebe die Flüssigkeit ab und trinke sie, um das Fieber zu unterdrücken.*

Der chinesische Pflanzenname ist *Qing hao* und bedeutet gemeines Kraut. Das Suffix „*su*“ steht für die Wirkung, so dass Qinghaosu sinngemäß als „Wirksames Prinzip von *Qing hao*“ übersetzt werden (Rücker, 1995) kann. *A. annua* (*sweet wormwood* = <engl.> süßer Wermut) ist ein einjähriges Kraut, das ursprünglich in den Steppenregionen von Chahar und Suiyan in Nordchina, 1000-1500 m über dem Meeresspiegel, beheimatet ist. Artemisinin wurde 1972 erstmals von einer chinesischen Arbeitsgruppe isoliert und 1979 strukturell aufgeklärt. Aufgrund der schlechten Löslichkeit in Wasser oder Öl wurden viele Derivate ausgehend vom Dihydroartemisinin synthetisiert. Zwei der Derivate, die hier genannt werden sollen, sind das wasserlösliche Hemisuccinat (Artesunat), welches intravenös appliziert werden kann und der Methylether (Artemether). Dieser ist aufgrund seines lipophileren Charakters stärker wirksam als das Artemisinin und kann nach intramuskulärer Applikation gut die Bluthirnschranke überwinden, so dass er auch bei zerebralen Formen der Malaria einsetzbar ist.

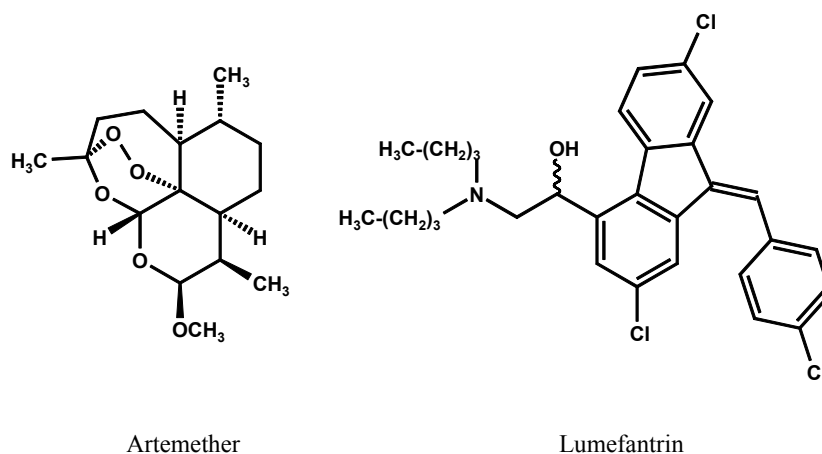
Hauptangriffspunkt des Artemisinins und seiner Derivate ist wie bei den zuvor genannten 4-Aminochinolinen das Häm. Ebenso wirken beide Stoffklassen nur auf die Blutstadien von *P. falciparum*. Allerdings sind die Sesquiterpene aufgrund ihres anderen Wirkmechanismus schon in nanomolaren Konzentrationen toxisch für den Parasiten und greifen schon im frühen Trophozoiten- und Ringstadium an. Für die Wirkung essentiell ist das 1,2,4-Trioxangerüst und die Endoperoxidstruktur. Die Aktivierung erfolgt über zwei Schritte. Zuerst wird das Endoperoxid gespalten, katalysiert durch freie Eisenionen. Die dadurch entstehenden freien Radikale interagieren nun mit Zellbestandteilen des Parasiten, insbesondere der Nahrungsvakuole, dem Zellkern, den Mitochondrien sowie dem endoplasmatischen Retikulum und zerstören diese. In einem zweiten Schritt können gebildete elektrophile Intermediate kovalente Bindungen mit parasiteneigenen Proteinen knüpfen. Die radikalische Wirkung kann durch Zugabe von Radikalfängern, wie z. B.  $\alpha$ -Tocopherol (Krungkrai und Yuthavong, 1987) aufgehoben werden und durch die Zugabe von Doxorubicin (Krungkrai und Yuthavong, 1987) oder der Flavonoide Casticin und Artemetin (Elford et al., 1987) erhöht werden.

Bislang wurden keine ernsthaften toxischen Effekte bei der Anwendung beim Menschen beobachtet. Die letale Dosis ( $LD_{50}$ ) von Artemisinin liegt im Vergleich zu Chloroquin bedeutend höher. Das Auftreten eventueller neurotoxischer Wirkungen bei der Gabe hoher Dosen ist noch nicht abschließend geklärt. In Tierexperimenten konnten neurologische Schädigungen bei Hunden und Katzen nachgewiesen werden.



Bis jetzt sind keine klinisch relevanten Resistenzen aufgetreten, obgleich eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Artemisinin bei isolierten Stämmen von *P. falciparum* beobachtet werden konnte. Da speziell in der Kurzzeittherapie hohe Rückfallraten verzeichnet wurden, werden die Artemisinin-derivate mit synergistisch wirkenden Antimalariamitteln kombiniert (Dhingra et al., 2000; Van Agtmael et al., 1999).

Mit Riamet<sup>®</sup>, einer Kombination aus Artemether und Lumefantrin (Abb. 1.8), steht für Deutschland das erste Artemisininpräparat zur Behandlung der akuten unkomplizierten Malaria tropica zur Verfügung (s. a. Kap. 1.1.5). Das Lumefantrin (syn. Benflumetol) beeinflusst den Polymerisationsprozeß des Häms. Zusätzlich üben beide Stoffe eine sekundäre Hemmwirkung auf die Nukleinsäure- und Proteinsynthese des Malariaparasiten aus. Die wichtigsten Nebenwirkungen sind Schlafstörungen, Kopfschmerzen, Schwindel, Magen-Darm-Störungen und Übelkeit, außerdem kann eine Verlängerung des QT-Intervalls auftreten (DAZ-Beilage, 2001).

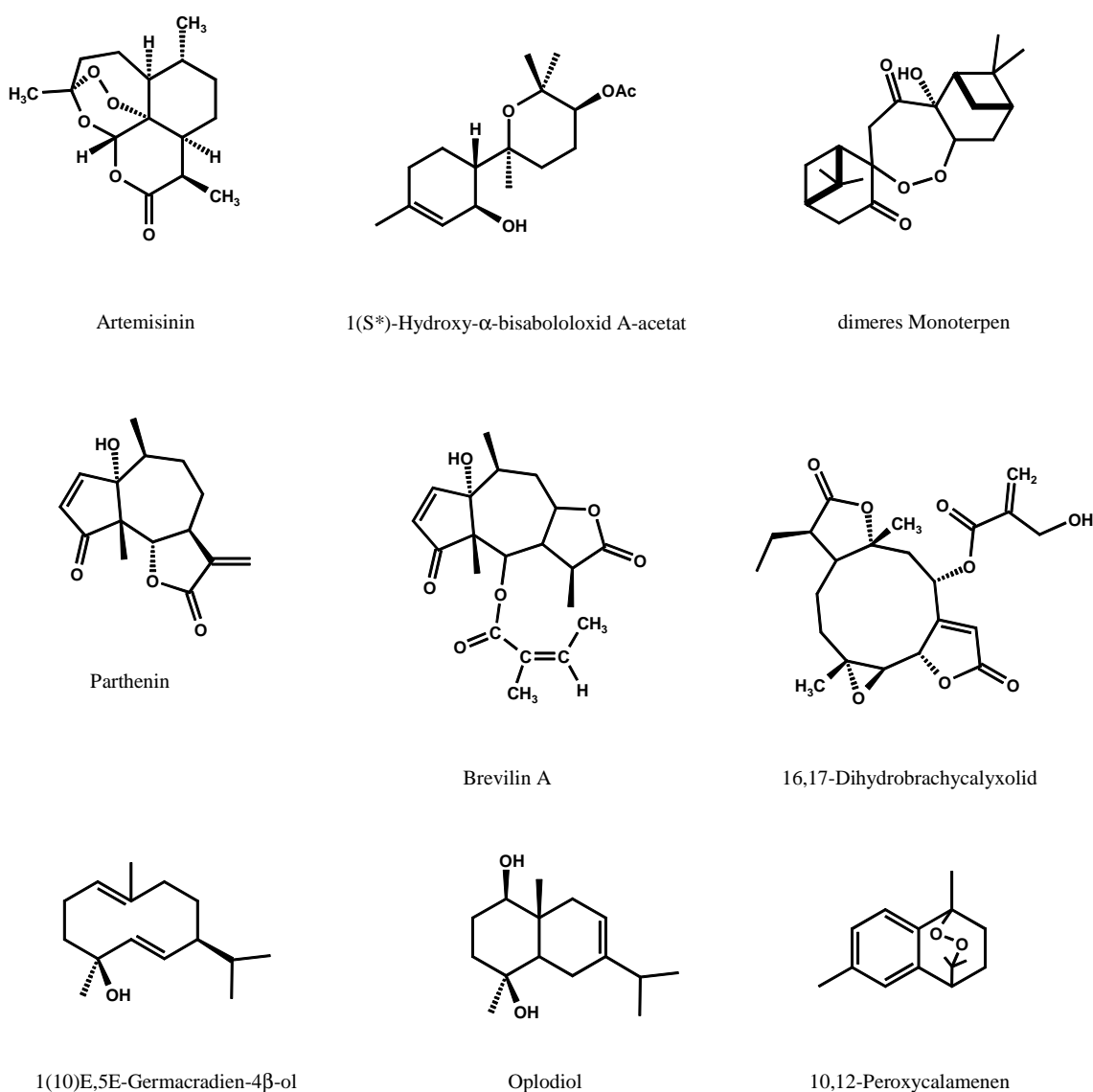


**Abbildung 1.8:** Strukturen von Artemether und Lumefantrin (Riamet<sup>®</sup>).

Während Qinghaosu mittlerweile sehr gut untersucht ist, weiß man über das monozyklische Sesquiterpen Yingzhaosu, das ebenfalls eine Endoperoxidstruktur aufweist, nur wenig. Es konnte zusammen mit strukturverwandten Stoffen aus dem chinesischen Zierstrauch *Artabotrys uncinatus* (L.) MERR. (Annonaceae) isoliert werden (Rücker, 1995). Auch das 10,12-Peroxyalamenen (Abb. 1.9) aus den Knollen von *Cyperus rotundus* LINN. (Cyperaceae), einer thailändischen Heilpflanze, besitzt eine Endoperoxidstruktur. Es weist gegen *P. falciparum* (K1) eine Aktivität von 0.53 µg/ml / 2.28 µM (IC<sub>50</sub>-Wert) auf (Theb-taranonth et al., 1995).

Eine weitere Heilpflanze aus der Gattung *Artemisia* ist *A. abrotanum* L., die in weiten Teilen Europas aufgrund ihrer aromatischen Eigenschaften kultiviert wird. Durch aktivitätsgeleitete Fraktionierung konnte 1(S\*)-Hydroxy- $\alpha$ -bisabololoxid A-acetat (Abb. 1.9) als ein aktiver Inhaltsstoff (IC<sub>50</sub>-Werte: 3.75-5.09 µg/ml [K1]) isoliert werden. Die Aktivität des ethanolischen Rohextraktes (IC<sub>50</sub>-Werte: 0.42-7.0 µg/ml [K1]) variierte jedoch stark je nach Erntezeitpunkt (Cubukcu et al., 1990).

Desweiteren ist an dieser Stelle das Parthenin (Abb. 1.9), ein Sesquiterpen vom Pseudo-guaiianolid-Typ zu nennen, welches aus *Parthenium hysterophorus* L. (Asteraceae) isoliert wurde und eine antiplasmodiale Aktivität mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 1.29 µg/ml / 4.92 µM



**Abbildung 1.9:** Strukturen einiger Sesquiterpene und des dimeren Monoterpens aus *Amomum krervanh* mit antiplasmodialer Wirkung.

(K1) aufwies. Die biologische Aktivität von Parthenin und anderen strukturell verwandten Sesquiterpenlaktonen ist zurückzuführen auf die exozyklische Methylengruppe im Laktoneering. Im Sinne einer Michael-Addition können sich so Addukte mit nucleophilen Gruppierungen bilden, z. B. mit Thiol-Gruppen, wie sie in vielen Proteinen bzw. Enzymen vorkommen. Anhand einer Reihe von synthetisch gewonnenen Partheninderivaten konnten weitere Struktur-Wirkungs-Beziehungen untersucht werden (Hooper et al., 1990). Brevilin A (Abb. 1.9) aus *Centipeda minima* (L.) A. BRAUN ET ASCHERS (Asteraceae) besitzt wie Parthenin einen Cyclopentenonring und weist eine ähnliche Aktivität gegen *P. falciparum* *in vitro* auf. Zusätzlich besitzt Brevilin A allerdings antiamoebische Eigenschaften gegen *Giardia intestinalis* (Yu et al., 1994).

Auch aus der großen Gattung *Vernonia* (Asteraceae) sind einige Heilpflanzen bekannt, die aufgrund ihrer antimikrobiellen und antiparasitären Eigenschaften genutzt werden (Johri und Singh, 1997). *V. amygdalina* DEL. ist sicherlich die bekannteste Pflanze, auf die in Kapitel 2.2.7 näher eingegangen wird. Aus *V. brachycalyx* HOFFM. konnte das Sesquiterpendilakton 16,17-Dihydrobrachycalyxolid (Abb. 1.9) isoliert werden, das allerdings neben seiner antiplasmodialen Wirkung (IC<sub>50</sub>-Werte: 3.0 µg/ml / 5.9 µM [V1/S] bis 16.0 µg/ml / 32.0 µM [Dd2]) auch die Proliferation von humanen Lymphozyten hemmt (Oketch-Rabah et al., 1998).

Weitere antiplasmodiale Sesquiterpene vom Germacren- und Eudesman-Typ (z. B. Oplodiol und 1(10)E,5E-Germacradien-4β-ol; Abb. 1.9) finden sich auch in der Zingiberaceae *Reneilmia cincinnata* (K. SCHUM.) BAK. mit IC<sub>50</sub>-Werten von 1.54-25.5 µg/ml (Tchuendem et al., 1999).

Eine Cardamomart aus Thailand (*Amomoum krervanh* PIERRE, Zingiberaceae) wurde in einem Screeningprogramm auf ihre Antimalariawirkung hin untersucht. Während einige der isolierten Monoterpene wie Myrtenol oder *trans*-Pinocarveol eine moderate antiplasmodiale Aktivität gegen *P. falciparum* aufwiesen, lag der IC<sub>50</sub>-Wert eines dimeren Monoterpens mit Peroxidpartialstruktur (Abb. 1.9) bei 0.059 µg/ml / 0.17 µM (Kamchonwongpaisan et al., 1995).

### Triterpenoide

Quassinoiden stellen biosynthetisch degradierte Triterpene dar, die in vielen Pflanzenarten (z. B. *Ailanthus altissima* (MILL.) SWINGLE, *Brucea javanica* (L.) MERR., *Eurycoma longifolia* JACK, *Simaba cedron* PLANCH.) der Simaroubaceen enthalten und für den bitteren Geschmack dieser Pflanzen verantwortlich sind (Chan et al., 1986; O'Neill et al., 1985, 1987). Die Anzahl der Kohlenstoffatome variiert zwischen 18 und 20. Ihre antiplasmodiale Aktivität hängt von ihrem Oxidationsgrad, dem Substitutionsmuster in Ring A sowie der Art der Veresterung am C-15 ab. Zu den potentesten Quassinoiden zählen solche, die sich durch ein pentazyklisches Grundgerüst, einschließlich eines Laktonringes und einer Methylen-Sauerstoff-Brücke zwischen C-8 und C-11 bzw. C-13 (z. B. Ailanthinon und Bruceantin; Abb. 1.10) auszeichnen (Phillipson et al., 1995). Aufgrund der Tatsache, dass die Quassinoiden im nanomolaren Bereich wirksam sind und einige der potentesten Verbindungen sogar bessere *in-vitro*-Aktivitäten als z. B. Chloroquin, gegen den multiresistenten Stamm K1 von *P. falciparum* aufwiesen (z. B. IC<sub>50</sub>-Werte: Bruceantin 0.008 µg/ml / 0.014 µM; Chloroquin 0.210 µg/ml / 0.41 µM), setzte man große Hoffnung auf die Entwicklung neuer Arzneistoffe ausgehend von dieser Substanzklasse. In *in-vitro*-Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass der Wirkmechanismus auf einer Hemmung der Proteinsynthese beruht (Kirby et al., 1989). Aus Zytotoxizitätsstudien gegenüber KB-Zellen mit 30 Quassinoiden konnte man schließen, dass die zum Teil hohe Zytotoxizität nicht unbedingt parallel mit der antiplasmodialen Wirkung einherging. Die Selektivitätsindizes (SI, Kap. 5.4.5) ausgehend von der toxischsten Verbindung (SI: 0.1) zur schwächsten Verbindung (SI: 284) deckten einen weiten Bereich ab. Die Unterschiede sind eventuell auf verschiedene ribosomale Bindungsstellen im Parasiten und der menschlichen KB-Zelle zurückzuführen. Allerdings wird generell angenommen, dass die Ribosomen von Parasit und Wirtszelle strukturell sehr ähnlich sind, so dass eine selektive Toxizität über diesen Wirkmechanismus auszuschließen ist (Phillipson et al., 1995; Wright und Phillipson, 1990).

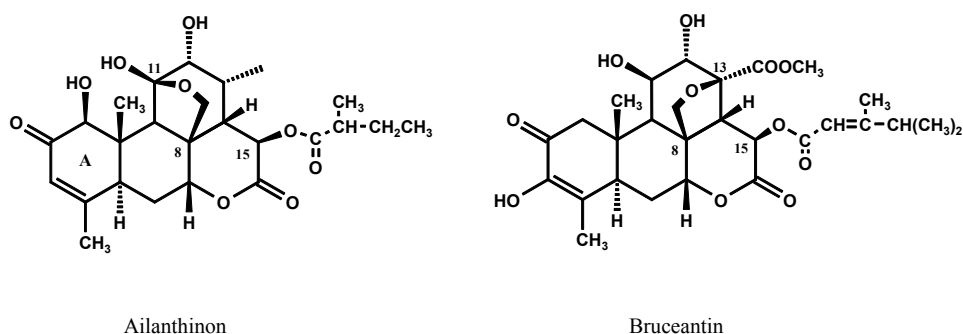


Abbildung 1.10: Strukturen der Quassinoide Bruceantin und Ailanthinon.

Die Familie der Celastraceen ist bekannt für ihre Wirksamkeit gegen Malaria, wofür Inhaltsstoffe aus der Gruppe der Celastroloiden, zu denen etwa 70 Verbindungen zählen, verantwortlich gemacht werden. Tatsächlich erwiesen sich Celastrol, Pristimerin und Isoiguesterol (Abb 1.11), die aus den Wurzeln von *Salacia kraussii* (HARV.) HARV. isoliert wurden, gegen den multiresistenten Stamm K1 und den sensitiven Stamm NF<sub>54</sub> als stark wirksam. Die höchste *in-vitro*-Aktivität fand man für Isoiguesterol mit IC<sub>50</sub>-Werten von 0.022 µg/ml / 0.051 µM (K1) und 0.054 µg/ml / 0.125 µM (NF<sub>54</sub>), das sich im Falle von K1 sogar wirksamer als Chloroquin (IC<sub>50</sub>-Wert: 0.061 µg/ml / 0.12 µM) erwies. Die Aktivitäten der anderen zwei Verbindungen lagen zwischen 0.18 und 0.27 µg/ml. Allerdings konnte für die Celastroloide auch eine Zytotoxizität gegenüber der Krebszelllinie HT-29 nachgewiesen werden. Bezogen auf ihre antiplasmodiale Wirkung waren die Verbindungen 10 bis 100 mal schwächer zytotoxisch, so dass eine gewisse Selektivität vorhanden war (Figueiredo et al., 1998).

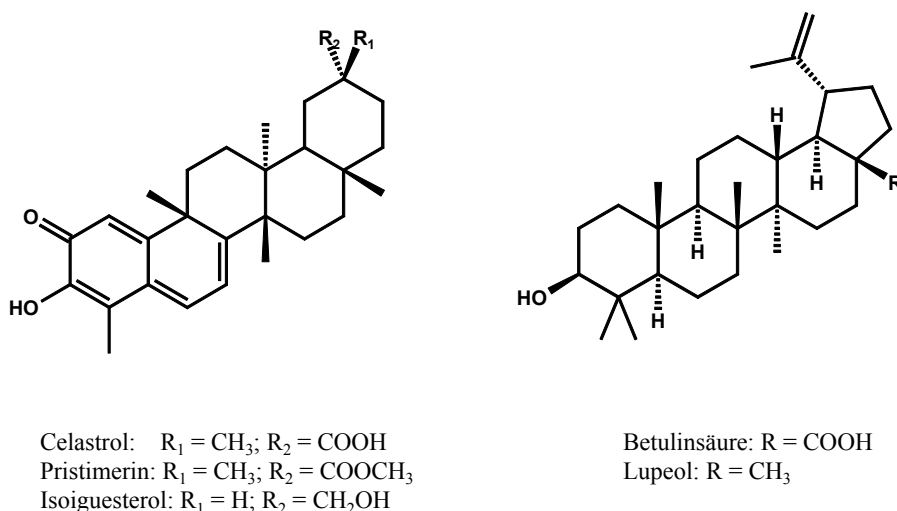


Abbildung 1.11: Strukturen einiger Triterpene mit antiplasmodialer Aktivität.

Betulinsäure (Abb 1.11), ein weitverbreitetes Triterpen vom Lupan-Typ, konnte bei weiteren Untersuchungen aus der Wurzelrinde von *Triphyophyllum peltatum* (s. a. Kap. 1.2.1.1) isoliert werden. Während das eigentliche Wirkprinzip von *T. peltatum* den Naphthylisochinolinalkaloiden zugeordnet wird, konnte für die Betulinsäure im Vergleich nur eine schwache Aktivität (IC<sub>50</sub>-Wert: 10.5 µg/ml / 23.03 µM [NF<sub>54</sub>]) gegen den Malariaerreger nachgewiesen werden (Bringmann et al., 1997).

Auch wurden aus den aktiven Fraktionen des Hexan-Extraktes der Asteraceae *Vernonia brasiliiana* (L.) DRUCE Triterpene isoliert, von denen aber nur Lupeol (Abb 1.11) eine schwache antiplasmodiale Aktivität (45 %ige Wachstumshemmung bei 25 µg/ml [BHz 26/86]) zeigte (De Almeida Alves et al., 1997).

### 1.2.1.3 Chinone, Phenole und andere sekundäre Naturstoffe

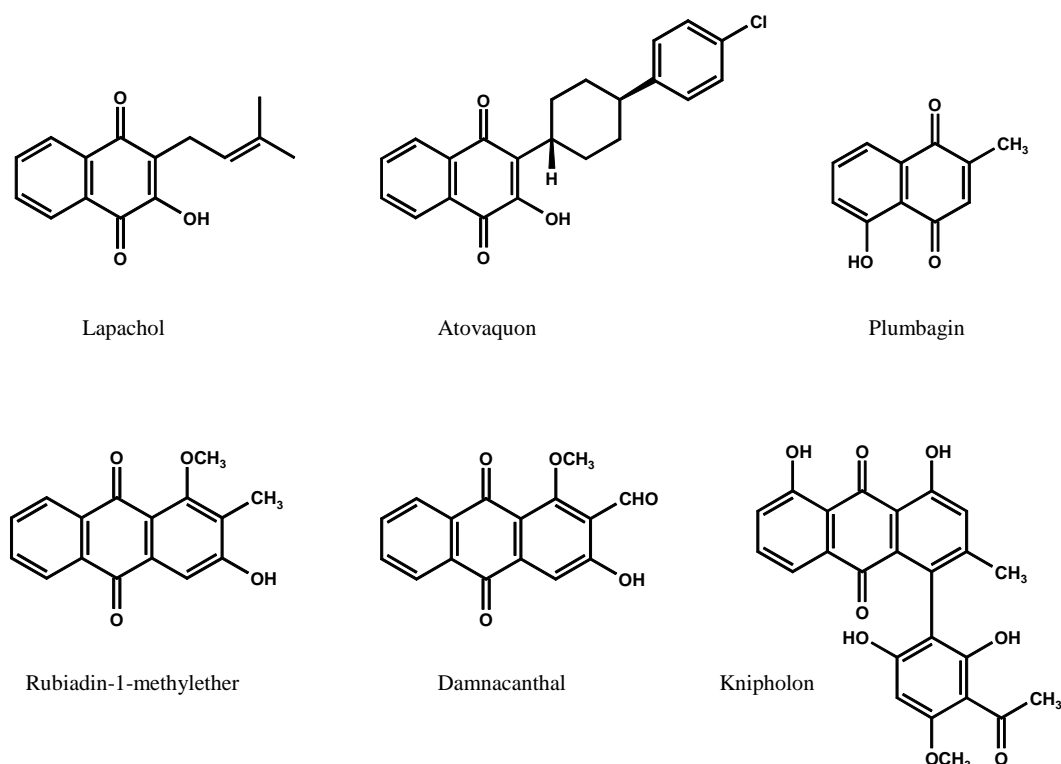
#### Naphthochinone

Viele Naphthochinone bewirken eine Wachstumshemmung von Protozoen. Lapachol (Abb. 1.12), ein Naphthochinon, welches z. B. aus *Kigelia africana* (LAMARCK) BENTHAM (syn. *K. pinnata* (JACQUIN) D.C., Bignoniaceae) isoliert wurde, besitzt nur eine schwache *in-vitro*-Aktivität gegen *P. falciparum* (Carvalho et al., 1988). Ausgehend von dieser Naturstoffklasse konnten durch Semisyntese hochpotente Derivate gewonnen werden. So zeigte 2-(4-t-Butylcyclohexyl)-3-hydroxy-1,4-naphthochinon einen IC<sub>50</sub>-Wert von 1.8 x 10<sup>-5</sup> µg/ml / 5.9 x 10<sup>-5</sup> µM und war somit 650-fach stärker wirksam als Chloroquin. Außerdem konnten sehr gute *in-vivo*-Daten erzielt werden. Als Wirkmechanismus wurde eine selektive Hemmung des Elektronentransportsystems im Parasiten diskutiert (Hudson et al., 1985). Ebenfalls vom Lapachol abgeleitet ist das Atovaquon (Abb. 1.12). Dieses Hydroxynaphthochinonderivat ist wirksam gegen verschiedene Protozoen und wurde bisher zur Behandlung von *Pneumocystis carinii*- und Toxoplasmose-Infektionen bei AIDS-Patienten eingesetzt. Seit 1997 ist es Bestandteil des Kombinationspräparates Malarone® (s. a. Kap. 1.1.5) und wird zur Prophylaxe und Therapie der Malaria eingesetzt. Atovaquon muß mit Proguanil, einem Dihydrofolsäure-Reduktasehemmstoff, kombiniert werden, um die sich rasch bildenden Resistenzen sowie die fast immer vorkommenden Rekrudeszenzen zu verhindern. Auch Atovaquon wirkt selektiv auf den mitochondrialen Elektronentransport des Parasiten und hemmt dadurch die Biosynthese der Pyrimidinbasen sowie die Replikation der Nukleinsäuren (Fachinformation Malarone®, Glaxo Wellcome GmbH & Co.).

Aus den Wurzeln von *Nepenthes thorelii* LEC. (Nepenthaceae) konnten ebenfalls Naphthochinone isoliert werden. Als besonders aktiv erwiesen sich die Hauptkomponente Plumbagin (Abb. 1.12) und der semisyntetisch hergestellte Methylether mit IC<sub>50</sub>-Werten von 0.051 µg/ml / 0.27 µM und 0.18 µg/ml / 0.89 µM (Likhitwitayawuid et al., 1998).

#### Anthrachinone

Die oberirdischen Teile, die Zweigrinde sowie die Wurzeln von *Morinda lucida* BENTH. (Rubiaceae) werden unabhängig voneinander in der traditionellen Medizin Westafrikas gegen Malaria eingesetzt. Koumaglo et al. (1992) isolierten die Anthrachinone Rubiadin-1-methylether und Damnacanthal (Abb. 1.12) aus der Zweigrinde von *M. lucida*. Im *in-vitro*-Test zeigten die Verbindungen eher eine moderate Aktivität (IC<sub>50</sub>-Werte: 8.1 µg/ml / 48.2 µM und 9.2 µg/ml / 32.6 µM), waren im Vergleich zum Rohextrakt aber eine Zehnerpotenz besser wirksam. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Sittie et al. (1999),



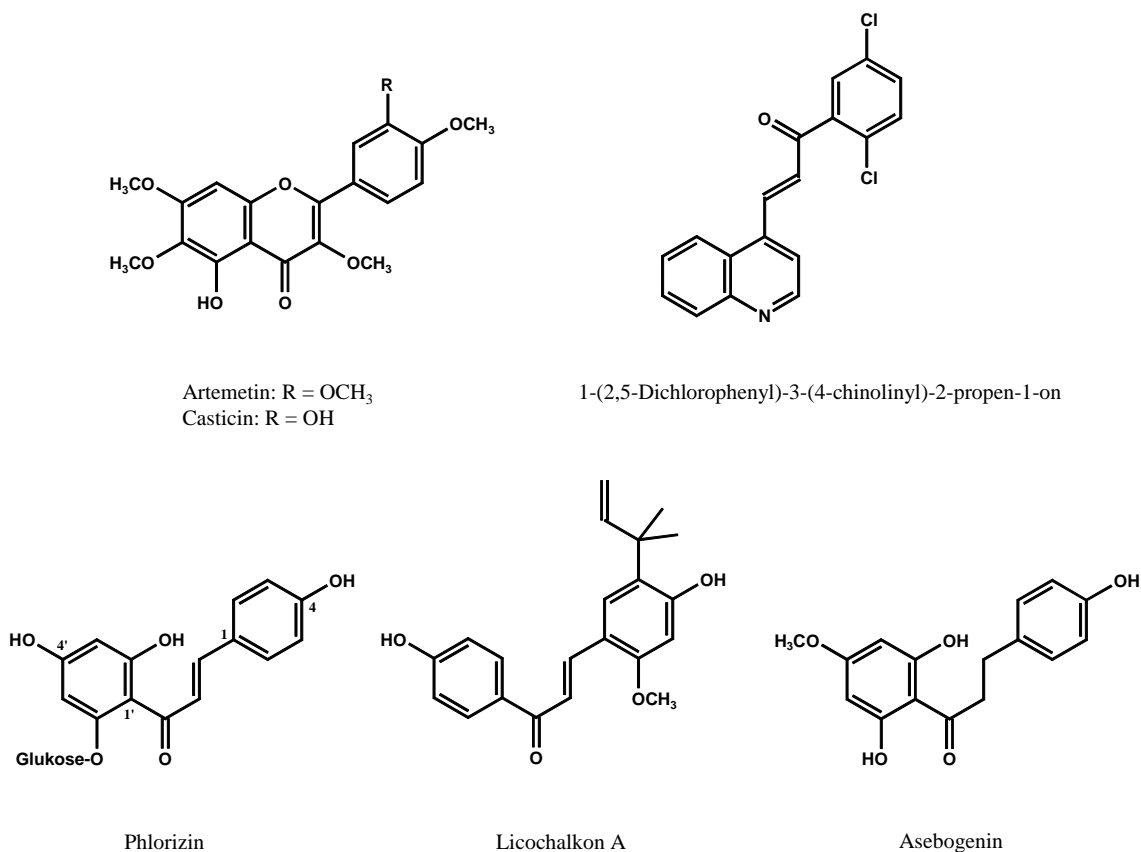
**Abbildung 1.12:** Strukturen einiger Naphthochinone und Anthrachinone mit antiplasmodialer Wirkung.

die aus den Wurzeln die schon genannten und sieben weitere Anthrachinone isolierten und gegen *P. falciparum* (Dd2) und *Leishmania major* testeten. Eine Interkalation mit der DNA aufgrund der zyklisch-planaren Struktur der Anthrachinone wäre eine mögliche Erklärung des Wirkmechanismus, ebenso der durch die chinoide Struktur ausgelöste oxidative Stress.

Bringmann und Mitarbeiter testeten das Phenylanthrachinon Knipholon (Abb. 1.12) und drei natürlich vorkommende Derivate auf ihre antiplasmodiale Aktivität. Knipholon selbst wurde erstmals aus der Asphodelaceae *Kniphofia foliosa* HOCHST. isoliert (Dagne und Steglich, 1984). Dieser Naturstoff ist ein chemotaxonomisches Merkmal dieser Gattung (Berhanu et al., 1986), kommt aber auch in anderen Pflanzenarten, wie z. B. in einigen Arten der Gattung *Bulbine*, Asphodelaceae, oder *Senna didymobotrya* (Fresen.) Irwin & Barneby, Caesalpinaceae, vor (Van Staden und Drewes, 1994; Alemayehu et al., 1996). Der  $IC_{50}$ -Wert lag bei  $0.46 \mu\text{g/ml}$  /  $1.06 \mu\text{M}$  (K1), interessanter Weise war die reduzierte Form (Knipholonanthron) von Knipholon stärker wirksam ( $IC_{50}$ -Wert:  $0.16 \mu\text{g/ml}$  /  $0.38 \mu\text{M}$ ). Bemerkenswert waren auch die Zytotoxizitätsdaten (Ratten-Myoblasten-Zelllinie L - 6). Hier zeigte Knipholon im Gegensatz zum Anthron keine Toxizität. Desweiteren wurden die Aktivitäten der Einzelkomponenten, im Fall von Knipholon waren es Chrysophanol und Xanthoxylin, bestimmt. Diese zeigten in allen Fällen keine Aktivitäten gegen *P. falciparum*, so dass eine Voraussetzung für die Wirkung offensichtlich das intakte Biarylgrundgerüst ist (Bringmann et al., 1999).

## Flavonoide

In intensiven Studien zu *Artemisia annua* untersuchte man Zellkulturen dieser Art, die im Gegensatz zur vollständigen Pflanze nicht in der Lage sind, Artemisinin zu produzieren. Extrakte dieser Kulturen wiesen dennoch eine *in-vitro*-Aktivität gegen *P. falciparum* auf. Als aktive Verbindungen isolierte man polymethoxylierte Flavonoide (Abb. 1.13) wie Artemetin und Casticin (Phillipson et al., 1995), ihre  $IC_{50}$ -Werte lagen bei 9.3-25.2  $\mu\text{g/ml}$  / 24.0-65.0  $\mu\text{M}$ . Die Substanzen waren somit 1000-fach schwächer wirksam als Artemisinin (Tan et al., 1998).



**Abbildung 1.13:** Strukturen einiger Flavonoide und Chalkone mit antiplasmodialer Wirkung.

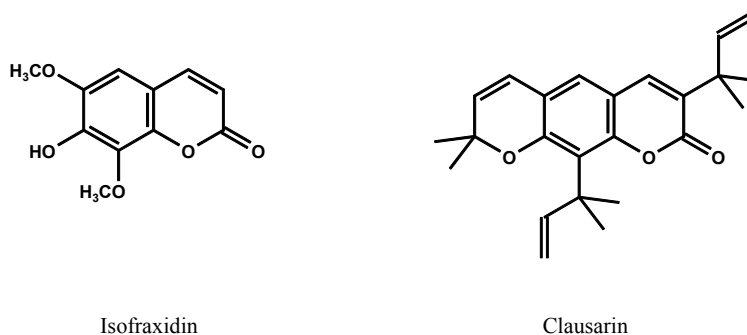
In weiteren Untersuchungen zeigte sich aber, dass diese Flavonoide, in Konzentrationen in denen sie keine *in-vitro*-Hemmung mehr zeigen, synergistisch mit Artemisinin wirken (Elford et al., 1987). Der Wirkort ist die Membran infizierter Erythrozyten. Beim Befall mit den Parasiten kommt es zu einem erhöhten Bedarf verschiedener Substrate, die für die Entwicklung der Plasmodien essentiell sind. Für die Ausbildung der frühen Ringstadien wird insbesondere L-Glutamin und Myo-Inositol benötigt, die durch eine geänderte Permeabilität in der Wirtszellenmembran vermehrt in die Zelle eingeschleust werden. Die methoxylierten Flavonoide hemmen die Zufuhr dieser Substrate und wirken somit über einen anderen Weg als Artemisinin und unterstützen dessen Wirkung (Elford, 1986).

## Chalkone

Das Chalkonglukosid Phlorizin wurde 1835 von dem belgischen Chemiker L. De Konink entdeckt und aufgrund seines bitteren Geschmacks (wie Chinin und andere Antimalariamittel) zur Malaria-Therapie eingesetzt. Auch hier konnte eine Hemmung des durch den Parasiten induzierten Substratinflux in die infizierten Erythrozyten nachgewiesen werden. Der  $IC_{50}$ -Wert lag bei 4.4-8.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  / 10-20  $\mu\text{M}$  (FCR-3T6) (Silfen et al., 1988).

Licochalkon A (Abb. 1.13), welches aus chinesischen Süßholzwurzeln isoliert wurde, wies zum einen eine gute Aktivität gegen *P. falciparum in vitro* ( $IC_{50}$ -Wert: zwischen 0.5 und 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  / 1.5 und 3.0  $\mu\text{M}$  [K1]) aber auch eine *in-vivo*-Aktivität auf (Chen et al., 1994). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden eine Reihe synthetisch hergestellter Chalkone auf ihre *in-vitro*-Hemmung hin untersucht. Während 2,4-Dimethoxy-4'-butoxychalkon keine Wirkverstärkung verglichen mit Licochalkon A *in vitro* zeigte (Chen et al., 1997), konnten Li et al. (1995) nachweisen, dass das Chalkonderivat 1-(2,5-Dichlorophenyl)-3-(4-chinolinyl)-2-propen-1-on (Abb. 1.13) gegen den W2-Stamm von *P. falciparum* eine dem Chloroquin gleichwertige *in-vitro*-Aktivität besitzt ( $IC_{50}$ -Wert: 0.08  $\mu\text{g}/\text{ml}$  / 0.23  $\mu\text{M}$ ).

In unserem Arbeitskreis konnten zwei Dihydrochalkone aufgrund aktivitätsgeleiteter Fraktionierung aus den oberirdischen Teilen von *Piper hispidum* (Sw.) MIQ. (Piperaceae), einem in Mittel- und Südamerika heimischen aromatisch riechenden Strauch, isoliert werden. Nur Asebogenin (Abb. 1.13) erwies sich als mäßig aktiv ( $IC_{50}$ -Wert: 10.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  / 36.1  $\mu\text{M}$  [Dd2]), 2',4',6'-Trihydroxy-dihydrochalkon dagegen war unwirksam. Der relativ gute antiplasmodiale Effekt des lipophilen Extrakts von *P. hispidum* ließ sich anhand der isolierten Verbindungen nicht erklären (Jenett-Siems et al., 1999).



**Abbildung 1.14:** Strukturen einiger Cumarine mit antiplasmodialer Wirkung.

## Cumarine

Obwohl es nur wenige Hinweise in der Literatur zur antiplasmodialen Wirksamkeit von Cumarinen gibt, fanden sich auch in dieser Stoffklasse Substanzen, die eine Aktivität gegen *P. falciparum in vitro* zeigten (Bravo et al., 1999; Oketch-Rabah et al., 1997; Yang et al., 1992; Yenjai et al., 2000). Während Isofraxidin (Abb. 1.14), isoliert aus *Artemisia abrotanum* (s. a. Kap. 1.2.1.2), einen  $IC_{50}$ -Wert von 7.95  $\mu\text{g}/\text{ml}$  / 35.8  $\mu\text{M}$  (K1) aufwies, konnten Yenjai et al. (2000) aus dem Wurzelextrakt von *Clausena harmandiana* PIERRE (Rutaceae) die stärker wirksamen prenylierten Cumarine Clausarin (Abb. 1.14) und sein O-Methylderivat Deutatin isolieren. Clausarin besitzt unter den getesteten Cumarinen die stärkste Wirkung ( $IC_{50}$ -Wert: 0.1-0.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  / 0.26-1.84  $\mu\text{M}$  [K1]) gegen den Malariaparasiten *in vitro*.



Abschließend ist festzuhalten, dass Naturstoffe ein großes Potential auf der Suche nach neuen Antimalariamitteln besitzen. Man findet in höheren Pflanzen eine breite strukturelle Vielfalt. In einigen Fällen ist es möglich den Parasiten selektiv im Wachstum zu hemmen, ohne den Wirt zu schädigen. Eindeutige Aussagen über die Wirksamkeit im menschlichen Organismus sind aufgrund der *in-vivo*-Tiermodelle, die sich anderer Plasmodienarten, wie *Plasmodium berghei*, bedienen, schwer zu treffen. Ebenso stellt sich häufig das Problem der allgemeinen Zytotoxizität bei den hochpotenten Naturstoffen. Sollte es dennoch gelingen potentielle Kandidaten für eine Arzneistoffentwicklung zu selektieren ist dies ein langwieriger Prozeß. Hat doch die Entwicklung des Artemisinin aus dem Kraut von *A. annua* zum partialsynthetischen Arzneistoff Artemether 30 Jahre gedauert.

Aber auch Pflanzenextrakte bzw. Naturstoffe mit nur einer moderaten Wirkung sind von Nutzen, untermauern sie doch die traditionelle Nutzung verschiedenster Heilpflanzen. Gerade für teilimmune Patienten in Endemiegebieten können sich wachstumsverzögernde Eigenschaften auf die Entwicklung der Parasiten positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken. Die Suche nach Substanzen mit antiplasmodialer Wirkung ist bei weitem noch nicht abgeschlossen, was die Spezialisierung von Arbeitsgruppen auch auf mikrobielle oder marine Quellen zeigt (Isaka et al., 1999; König et al., 1994).

### 1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung traditionell genutzter Heilpflanzen, die laut Literatur oder persönlichen Informationen von Wissenschaftlern vor Ort, zur Therapie von Fieberanfällen bzw. gegen Malaria eingesetzt werden. Es wurden in einem Screeningprogramm Extrakte von verschiedenen Pflanzenarten aus Panama, Uganda und Zimbabwe auf ihre *in-vitro*-Aktivität gegen *Plasmodium falciparum* getestet. Die Extrakte, die im Test eine gute Aktivität ( $IC_{50}$ -Werte  $< 50 \mu\text{g/ml}$ ) zeigten, wurden anschließend näher untersucht.

Desweiteren sollten unabhängig von der traditionellen Nutzung verschiedene Lignanoide (z. B. Sesquilignane) auf ihre antiplasmodiale Aktivität hin untersucht werden. Das Kraut von *Bonamia spectabilis* (CHOISY) HALL. F., Convolvulaceae, diente als Lieferant dieser Stoffklasse (Tofern, 1999).

Im Speziellen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Enthalten Pflanzen, die in Endemiegebieten traditionell zur Behandlung der Malaria eingesetzt werden, Substanzen, die das Wachstum von *P. falciparum in vitro* hemmen?
2. Ist eine antiparasitäre Wirksamkeit definierten Einzelsubstanzen zuzuordnen oder liegt ein Zusammenwirken mehrerer Stoffe vor?
3. Inwieweit liegt eine allgemeine Zytotoxizität oder ein spezifischer antiplasmodialer Wirkmechanismus der antiparasitären Aktivität zugrunde?

Über die pharmakologische Fragestellung hinaus, war die phytochemische Untersuchung, d. h. die Strukturaufklärung der isolierten Naturstoffe, insbesondere neuer Verbindungen, von besonderer Bedeutung, um mögliche Leitstrukturen als Basis neuer Antimalariamittel aufzufinden. Die Identifizierung wirksamer Einzelsubstanzen erfolgte, außer bei *B. spectabilis*, nach dem Prinzip der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung. Zur Strukturaufklärung wurden spektroskopische Methoden herangezogen.

Für die Messung der antiplasmodialen Aktivität stand ein Radioisotopen-Inkorporationstest mit Tritium-markiertem Hypoxanthin zur Verfügung. Die Prüfung auf Zytotoxizität erfolgte an der humanen Zelllinie ECV-304 (Tumorzellen mit endothelialen Eigenschaften).