

**UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS DER
WIRKSAMKEIT AFRIKANISCHER ARZNEIPFLANZEN
GEGEN TRYPANOSOMEN**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

BIRGIT ADERBAUER
aus Chieming am Chiemsee

2010

Die Arbeit wurde im Zeitraum von März 2005 bis September 2009 angefertigt unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. M. F. Melzig am Institut für Pharmazie des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin und
Herrn PD Dr. P.-H. Clausen am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

1. Gutachter: Prof. Dr. M. F. Melzig

2. Gutachter: PD Dr. P.-H. Clausen

Disputation am: 05. Januar 2010

Den Betroffenen

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	xi
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Schlafkrankheit.....	2
1.1.1 Verbreitung und Entwicklung der Krankheit	2
1.1.2 Infektion und Krankheitsbild	6
1.1.3 Diagnose	8
1.1.4 Risiko für Reisende	13
1.1.5 Abgrenzung zur amerikanischen Schlafkrankheit	13
1.2 Die Tsetsefliege	14
1.2.1 Klassifizierung	15
1.2.2 Beschreibung der Tsetsefliege	15
1.2.3 Infektion mit Trypanosomen.....	16
1.3 Die Nagana	18
1.3.1 Verbreitung und wirtschaftliche Auswirkung der Krankheit	18
1.3.2 Infektion und Krankheitsbild	19
1.3.3 Diagnose	20
1.4 Der Erreger	22
1.4.1 Systematische Einordnung.....	22
1.4.2 Beschreibung des Erregers.....	24
1.4.3 Entwicklungszyklus.....	28
1.4.4 Kultivierung	30
1.5 Bekämpfung der Trypanosomen.....	31
1.5.1 Arzneistoffe gegen die Schlafkrankheit.....	31
1.5.2 Arzneistoffe gegen die Nagana	39
1.5.3 Entwicklungsansätze für neue Wirkstoffe	44
1.5.4 Phytotherapie	47
2 ARBEITSHYPOTHESE.....	51

3	MATERIAL UND METHODEN.....	54
3.1	Geräte	54
3.2	Material	55
3.2.1	Pflanzenmaterial	55
3.2.2	Trypanosomenstamm	58
3.2.3	Fibroblasten-Zelllinie	58
3.2.4	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	58
3.2.5	Lösungen und Medien für die Zellkultur und den <i>in vivo</i> Test	59
3.2.6	Material für die Chromatographie.....	61
3.2.7	Chemikalien, Reagenzien und Fertigmedien	63
3.3	Methoden.....	65
3.3.1	<i>In vitro</i> Testsystem	65
3.3.2	<i>In vivo</i> Testsystem.....	71
3.3.3	Phytochemische Methoden	74
3.3.4	Strukturaufklärung von Reinsubstanzen.....	76
4	ERGEBNISSE	77
4.1	<i>In vitro</i> Screening der Arzneipflanzen aus Mali.....	77
4.2	Studie zur Dosisfindung <i>in vivo</i>.....	79
4.2.1	Symptome der Versuchsmäuse nach Verabreichung der Extrakte	80
4.2.2	Histopathologische Untersuchung der Mäuse.....	81
4.3	Bestimmung der <i>in vivo</i> Wirksamkeit ausgewählter Extrakte	81
4.3.1	Entwicklung der Parasitämie	82
4.3.2	Statistische Auswertung	84
4.4	Immunsuppressiver Effekt der Stammrinde von <i>Acacia nilotica</i>	85
4.4.1	Entwicklung der Parasitämie	85
4.4.2	Statistische Auswertung	86
4.5	Phytochemische Charakterisierung der Wurzel von <i>Securidaca</i>	
	<i>longepedunculata</i>	87
4.5.1	Wirksamkeit bekannter Inhaltsstoffe <i>in vitro</i>	87
4.5.2	Aktivitätsgeleitete Fraktionierung.....	87
4.5.3	Alkaloid-Rohextrakt.....	89
4.5.4	Saponin-Rohextrakt.....	98
4.6	<i>In vitro</i> Screening von Saponinen gegen Trypanosomen	99

5	DISKUSSION.....	101
5.1	Aktivität der Pflanzenextrakte	101
5.1.1	Bezug zur Untersuchung von Bizimana <i>et al.</i> (2006).....	101
5.1.2	Verwendung von Dichlormethanextrakten bei ethnopharmakologischem Hintergrund	101
5.1.3	Diskussion der Ergebnisse des <i>in vitro</i> Versuchs.....	102
5.1.4	Diskussion der Ergebnisse der <i>in vivo</i> Versuche.....	102
5.1.5	Korrelation der <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Ergebnisse.....	103
5.1.6	Vergleich der Ergebnisse mit in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen.....	104
5.2	<i>Securidaca longepedunculata</i>.....	108
5.2.1	Systematische Einordnung.....	108
5.2.2	Beschreibung der Pflanze	109
5.2.3	Phytochemische Charakterisierung der Droge	110
5.2.4	Anwendung in der traditionellen afrikanischen Medizin	113
5.2.5	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Untersuchungen	116
5.2.6	Eigene Untersuchungen	117
5.3	Wirksamkeit von Saponinen gegen Trypanosomen.....	119
5.3.1	Wirkung von Saponinen allgemein	119
5.3.2	Literatur zur Wirksamkeit von Saponinen gegen Trypanosomen	122
5.3.3	Wirksamkeit von Saponinen gegen andere Protozoen.....	122
5.3.4	Beurteilung der Wirkung der getesteten Saponine	125
5.4	Immunsuppressiver Effekt von <i>Acacia nilotica</i>.....	128
5.4.1	Anwendungsgebiete der Rinde.....	128
5.4.2	Bekannte Verbindungen aus der Droge	128
5.4.3	Immunsuppressiv wirkende Verbindungen aus der Droge.....	129
6	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	132
	ZUSAMMENFASSUNG	134
	SUMMARY	135
	TABELLENVERZEICHNIS.....	137
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	139
	LITERATURVERZEICHNIS	143
	EIGENE PUBLIKATIONEN	174

DANKSAGUNG176

LEBENS LAUF178

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....179

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BCT	Buffy Coat Technik
CATT	Card Agglutination Test for Trypanosomes
COSY	Zweidimensionale Protonen-Korrelation / Correlation Spectroscopy
CS	Rinderserum/Cattle serum
DB289	Pafuramidinmaleat
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DFMO	Difluormethylornithin/Eflornithin
DMSO	Dimethylsulfoxyd
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest/Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EtOAc	Ethylacetat
F254	Fluoreszenzindikator
FAB	Fast Atom Bombardement
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FBS	Fötales Rinderserum/Fetal Bovine Serum
HCT	Mikrohämatokrit Zentrifugationstechnik/Haematocrit Centrifugation Technique
HDL	High Density Lipoprotein
HR	Hoch auflösende/High Resolution
I.E.	Internationale Einheiten
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration/half maximal Inhibitory Concentration
kDNA	Kinetoplastische DNA
LD ₅₀	Menge eines Stoffs/Letale Dosis, bei der 50 Prozent einer Population sterben
LILIT	Long Incubation Low Inoculation Test
LTVA	Long-term Viability Assay

MEF-Zellen	Fibroblastenähnliche Zellen, die aus 15 Tage alten <i>Microtus montanus</i> -Embryonen gewonnen wurden/ <i>Microtus montanus</i> Embryonal Fibroblast-like Cells
MEM	Minimum Essential Medium nach Eagle
MeOH	Methanol
MHK	Minimale Hemmkonzentration, definiert als die Konzentration, bei der nach zehn Tagen kein Trypanosom mit normaler Gestalt und Beweglichkeit mehr vorhanden ist
MS	Massenspektroskopie
MTK	Minimale toxische Konzentration, die Konzentration, bei der sichtbare Schädigung an den Feederlayer Zellen (MEF-Zellen) festzustellen ist
NMR	Kernresonanzspektroskopie/Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
PAAT	Programme Against African Trypanosomiasis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion/Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
PS	Pferdeserum
QBT	Quantitative Buffy Coat Technik
RP	Umkehrphase/Reversed Phase
SI	Selektivitätsindex
Spp.	Art/species
TH1	T-Helferzelle 1
TH2	T-Helferzelle 2
TLF	Trypanosomen lysierender Faktor/Trypanosome-lytic-factor
VSG	Variables Oberflächenglykoprotein/Variable Surface Glycoprotein
$\delta^1\text{H}$	Chemische Verschiebung der Protonensignale

1 EINLEITUNG

Die afrikanische Trypanosomosis, die in Form der Schlafkrankheit den Menschen und in Form der Nagana den Viehbestand betrifft, stellt eine bedeutende Hürde für Afrikas Kampf gegen die Armut dar. 37 Länder Afrikas südlich der Sahara sind von der Infektionskrankheit betroffen, darunter die ärmsten der Welt. Die Schlafkrankheit bedroht die Gesundheit der Menschen und deren Arbeitskraft. Vor allem die produktivste Altersgruppe zwischen 15 und 45 Jahren ist von der Krankheit betroffen. Darüber hinaus beschränkt die Infektion bei den Nutztieren die Verfügbarkeit von Fleisch und Milch und die Möglichkeit, die Tiere als Zugkraft einzusetzen. Die landwirtschaftliche Produktion, die ländliche Entwicklung insgesamt und damit auch die Bekämpfung der Armut sind durch diese Krankheit bedroht (WHO, 2005; Simarro *et al.*, 2008; FAO, 2009).

Die Kontrolle der Tsetsefliege, die die Krankheit überträgt, ist bisher noch nicht flächendeckend erfolgreich. Die Entwicklung eines Impfstoffes ist wegen der schnellen Antigenvarianz des Erregers erschwert und die Verwendung trypanotoleranter Rinder stößt auf geringe Akzeptanz bei den Bauern. Deshalb stützt sich die Bekämpfung der Erreger der Schlafkrankheit und der Nagana hauptsächlich auf die wenigen verfügbaren Medikamente, die zum großen Teil schon seit 50 bis 90 Jahren im Einsatz sind. Sie führen oft zu schweren Nebenwirkungen und in den letzten Jahren ist die zunehmende Resistenzentwicklung zum Problem geworden. Neue Medikamente sind deshalb dringend erforderlich. Für moderne Pharmakonzerne ist der Markt nicht groß genug, um die Kosten von Entwicklung und Zulassung eines neuen Wirkstoffes zu decken. Deshalb sind alternative Wege nötig.

In den betroffenen Regionen spielt die traditionelle Behandlung mit Heilpflanzen nach wie vor eine bedeutende Rolle. Kann die Wirksamkeit dieser Pflanzen experimentell bestätigt werden? Ist es möglich, durch Aufklärung der für die Wirkung verantwortlichen Prinzipien, die traditionelle Anwendung zu verbessern oder Leitstrukturen für neue trypanozide Wirkstoffe zu finden?

Im Folgenden sollen die Grundlagen der Schlafkrankheit und der Nagana aufgezeigt und dabei die Problematik der Krankheiten in unterschiedlichen Bereichen deutlich gemacht werden. Auf die verfügbaren Arzneistoffe und die Entwicklungsmöglichkeiten für neue Arzneistoffe wird dabei besonderes Augenmerk gelegt.

1.1 Die Schlafkrankheit

Die Schlafkrankheit ist eine parasitäre Erkrankung, die durch den Stich einer infizierten Tsetsefliege auf den Menschen übertragen wird. Unbehandelt verläuft die Krankheit tödlich. Die Schlafkrankheit kommt in zwei Ausprägungen vor, der ostafrikanischen Schlafkrankheit mit dem Erreger *Trypanosoma brucei rhodesiense* und der westafrikanischen Schlafkrankheit mit dem Erreger *Trypanosoma brucei gambiense*. Die Krankheit ist eine Zoonose, das heißt, sie kann auf natürliche Weise zwischen Mensch und anderen Wirbeltieren übertragen werden. Als Reservoirwirte spielen vor allem bei der erstgenannten Form Haus-, Nutz- und Wildtiere eine große Rolle (Welburn *et al.*, 2004).

1.1.1 Verbreitung und Entwicklung der Krankheit

Die Schlafkrankheit ist eine alte Krankheit. Sie war bereits den Sklavenhändlern bekannt, die jene Afrikaner ablehnten, die charakteristisch geschwollene Lymphknoten aufwiesen, weil sie wussten, dass diese frühzeitig sterben werden (Janssens und Burke, 1992).

1.1.1.1 Geographische Verbreitung

Das Verbreitungsgebiet der afrikanischen Schlafkrankheit liegt im tropischen Afrika zwischen dem 15. nördlichen und dem 20. südlichen Breitengrad. Dies betrifft das Gebiet vom Norden Südafrikas bis zum Süden Algeriens, Libyens und Ägyptens. 37 Länder werden als endemisch für die eine oder andere Form der Schlafkrankheit angesehen. Der Erreger *T. b. gambiense* tritt in West- und Zentralafrika auf, der Erreger *T. b. rhodesiense* in Ost- und Südafrika (WHO, 2006; Moore, 2008; Simarro *et al.*, 2008). Uganda ist das einzige Land, in dem es endemische Brennpunkte beider Formen der Erkrankung gibt (Welburn *et al.*, 2001). Aber auch hier gibt es eine klare

geographische Abgrenzung zwischen dem Auftreten von *T. b. gambiense*- und *T. b. rhodesiense*-Infektionen (Welburn *et al.*, 2004).

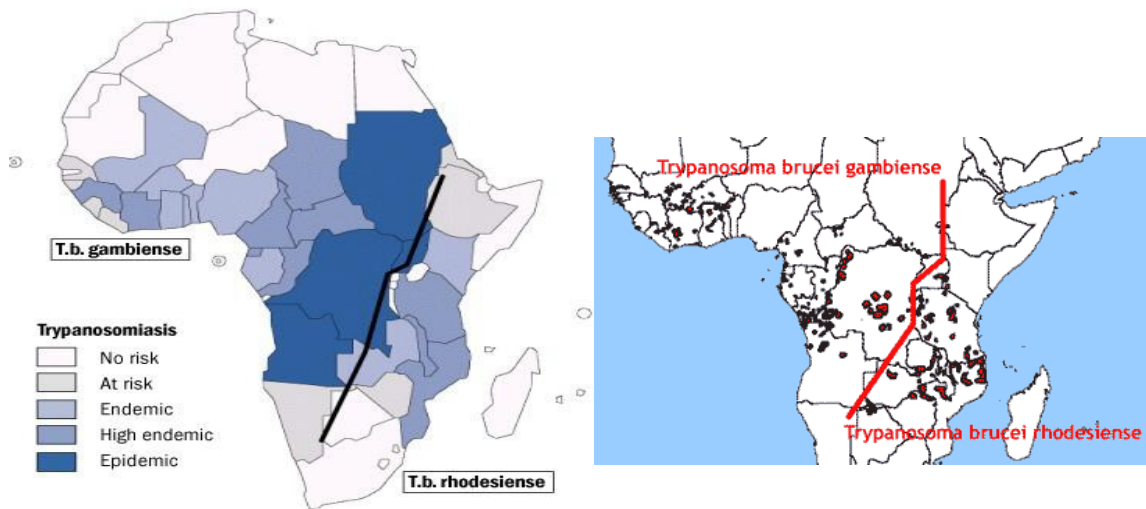


Abbildung 1-1 Links: Länder, in denen die Schlafkrankheit auftritt, Stand 1999 (WHO, 2009c), Rechts: betroffene Gebiete (Weiss *et al.*, 2006)

1.1.1.2 Risikogruppen

Die Schlafkrankheit betrifft vor allem die arme Bevölkerungsschicht in abgelegenen ländlichen Regionen, wo die Menschen bei Ackerbau, Viehhaltung, Jagd und Fischfang der Tsetsefliege besonders ausgesetzt sind und die Gesundheitssysteme nur schwach oder gar nicht entwickelt sind. Durch Völkerwanderung und Kriege ist die Infektionsrate zusätzlich erhöht (WHO, 2006).

1.1.1.3 Geschichtliche Entwicklung

Während des letzten Jahrhunderts gab es drei große Epidemien. Die erste war in den Jahren 1896-1906, die zweite 1920 und die dritte begann 1970 und dauert bis heute an (WHO, 2006). Bei der ersten Epidemie um 1900 wurden ganze Landstriche entvölkert. Damals starben zirka 750.000 Menschen an der Krankheit (Lucius und Loos-Frank, 2008).

Den kolonialen Verwaltungen war der negative Einfluss der Krankheit auf ihre Territorien bewusst. Deshalb gab es ab den 1930er Jahren gezielte Programme, um die Krankheit zu bekämpfen. Mobile Teams wurden eingerichtet, um Millionen von Menschen auf Krankheitserreger zu untersuchen (WHO, 2006; Simarro *et al.*, 2008). 1960 war die Krankheit fast verschwunden. Die Kontrollen wurden vernachlässigt, weil

zum einen die Zahl der Fälle und damit das Bewusstsein für die Krankheit nur noch gering waren und zum anderen die mittlerweile unabhängig gewordenen Staaten andere Prioritäten setzten (WHO, 2006; Simarro *et al.*, 2008). Hinzu kommt, dass durch Bürgerkriege und wirtschaftlichen Niedergang die Gesundheitsversorgung zusammengebrochen ist (Stich und Steverding, 2002).

1.1.1.4 Zahl der Fälle

Die Auswirkung des Aussetzens der Kontrollmaßnahmen um 1960 zeigt Abbildung 1-2. Angegeben sind die von der WHO neu registrierten Fälle. Die tatsächlichen Fallzahlen müssen nach allgemein akzeptierten Schätzungen noch einmal um den Faktor zehn nach oben hin korrigiert werden (Stich und Steverding, 2002).

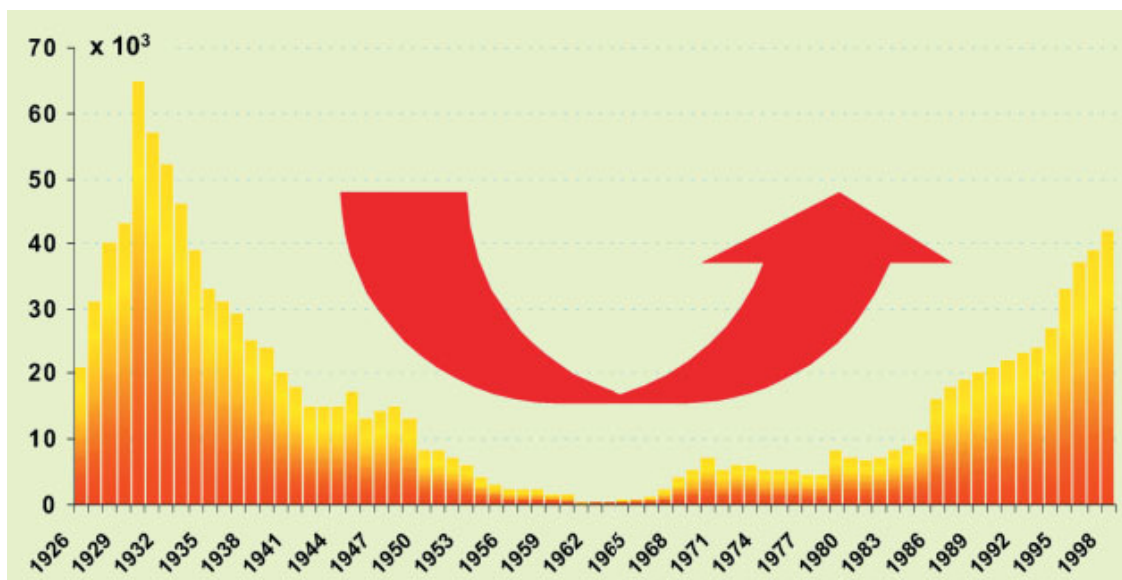


Abbildung 1-2 Registrierte Schlafkrankheitsfälle von 1926-1998 nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (Stich und Steverding, 2002)

Rund 60 Millionen Menschen aus 37 der 52 Länder Afrikas stehen unter dem Risiko der tödlich verlaufenden Krankheit (WHO, 2006). 1998 wurde laut WHO von 40.000 Fällen berichtet, wobei die tatsächlichen Zahlen auf 300.000 bis 500.000 geschätzt werden. Bis 2005 ging durch verstärkte Kontrollen die Zahl der geschätzten Fälle auf 50.000 bis 70.000 zurück (WHO, 2006; Simarro *et al.*, 2008).

1.1.1.5 Aktuelle Situation

1997 setzte die WHO in einer offiziellen Erklärung die Wiedereinführung von Überwachungs- und Kontrollmaßnahmen auf ihr Programm. In vielen Ländern, in

denen die Schlafkrankheit endemisch war, gab es zudem einen Rückgang sozialer Umbrüche und Bürgerkriege, so dass der Zugang zu Diagnose und Behandlung einfacher wurde. Die WHO gab finanzielle und technische Unterstützung und stellte die Produktion und die kostenlose Verteilung von Medikamenten sicher (WHO, 2005).

1997 wurde das PAAT (Programme against African Trypanosomiasis) ins Leben gerufen. Dieses Programm ist ein internationales Bündnis der FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), der WHO, der IAEA (International Atomic Energy Agency) und dem AU-IBAR (African Union/Interafrican Bureau of Animal Resources). Es wurde geschlossen, um den afrikanischen Mitgliedstaaten dabei zu helfen, diese verheerende Krankheit zu kontrollieren und schließlich eliminieren zu können. Weitere UN-Partner des PAAT sind UNIDO (United Nations Industrial Development Organization) und IFAD (International Fund for Agricultural Development). Der private Sektor arbeitet durch die IFAH (International Federation for Animal Health) mit dem PAAT zusammen. Kürzlich wurde auch eine Zusammenarbeit mit ALive (African Livestock Partnership) vereinbart (WHO, 2005). Dadurch wurde es möglich, die Zahl der Fälle genauer zu erfassen und die Maßnahmen im Feld zu verstärken. Insgesamt konnte dadurch ein Rückgang der zwischen 1995 und 2006 berichteten neuen Fälle um 68 Prozent verzeichnet werden (WHO, 2005). Die Zahl der Infektionen mit dem Erreger *T. b. rhodesiense* ging dabei jedoch nur leicht zurück (Simarro *et al.*, 2008).

2005 gab es große Ausbrüche der Schlafkrankheit in Angola, in der Demokratischen Republik Kongo und im Sudan (WHO, 2006). Diese stehen in Zusammenhang mit politischen Unruhen und dem damit verbundenen Einbruch der medizinischen Überwachung und Versorgung. In mehreren Dörfern der Demokratischen Republik Kongo, Angolas und des Südsudan wurde eine Prävalenz der Krankheit von 50 Prozent gemeldet. Die Schlafkrankheit gilt dort als häufigste oder zweithäufigste Todesursache noch vor AIDS (WHO, 2006).

1.1.1.6 Probleme und Herausforderungen

Noch immer stehen einer effektiven Kontrolle der Schlafkrankheit einige Probleme im Weg. Finanzielle Mittel und geschultes Personal sind knapp. Krankheitsbrennpunkte sind oft in abgelegenen Regionen, wo das Bewusstsein der Bevölkerung für die

Krankheit und die Beteiligung an Kontrollmaßnahmen nur gering sind. Die Gesundheitsinfrastruktur in den betroffenen Regionen ist mangelhaft und die vorhandenen Diagnose- und Behandlungsverfahren sind schwer auf einfachem Niveau durchzuführen. Dazu kommen schwere Medikamentennebenwirkungen und zunehmende Resistenz gegen die verfügbaren Medikamente (WHO, 2005).

Die Herausforderung für die Zukunft ist es, spezialisierte Teams in enge Zusammenarbeit mit der medizinischen Grundversorgung in den betroffenen Regionen zu bringen, um nachhaltige und kosteneffiziente Kontrolle und Überwachung zu ermöglichen. Dabei gibt es zwei große Engpässe. Es fehlen ein sensitiver und spezifischer diagnostischer Test und ein Wirkstoff, der billig, sicher und leicht anzuwenden ist (Simarro *et al.*, 2008).

In den Gebieten, die von *T. b. rhodesiense* betroffen sind, konnte durch verstärkte Kontrolle und Behandlung der Menschen kein großer Rückgang der Neuinfektionen erreicht werden. Da für diese Form der Schlafkrankheit das Erregerreservoir in Nutz- und Wildtieren eine große Rolle spielt, muss die Veterinärmedizin und die Entomologie (Insektenkunde) mit einbezogen werden (Simarro *et al.*, 2008).

1.1.2 Infektion und Krankheitsbild

Bereits seit dem Mittelalter kursieren Berichte von Patienten in Afrika, die nach langem Krankenlager in ein seltsames Stadium der Lethargie eintraten, das unweigerlich zum Tode führt. Vor etwas mehr als 100 Jahren entdeckte dann Sir David Bruce (1855-1931) in Südafrika den Erreger, der heute seinen Namen trägt: *Trypanosoma brucei* (Stich und Steverding, 2002).



Abbildung 1-3 *Trypanosoma brucei* mit Erythrozyten, Rasterelektronenmikroskop (Eye of Science/Reutlingen, 2008)

Die Infektion erfolgt durch den Stich einer infizierten Tsetsefliege (*Glossina*-Spezies). Dabei werden bis zu 20.000 Erreger von den Speicheldrüsen der Fliege in das

Bindegewebe der Haut abgegeben. Dort entsteht eine lokale Entzündung, die sich zu einer handtellergroßen Hautrötung, dem so genannten Trypanosomenschanter ausprägen kann. Die Trypanosomen vermehren sich zunächst im subkutanen Gewebe und befallen dann die regionalen Lymphknoten, die stark anschwellen und die Erreger nach zwei bis vier Wochen über Lymphe und Blut in den gesamten Körper leiten. Nach einer gewissen Zeit überqueren sie die Blut-Hirn-Schranke und befallen das Zentralnervensystem (Stich und Steverding, 2002; WHO, 2006).

Die Krankheit verläuft somit in zwei Stadien. Das erste Stadium, die hämolymphtische Phase, in der sich der Erreger vermehrt und ausbreitet, ist charakterisiert durch malariaähnliche Symptome. Fieberschübe, Kopf- und Gelenkschmerzen und Müdigkeit sind die auffälligsten Zeichen (WHO, 2005, 2006).



Abbildung 1-4 Schlafkrankheitspatientin (August Stich, Missionsärztliches Krankenhaus Würzburg)

Ein klinisches Leitsymptom ist zudem die Lymphknotenschwellung im seitlichen Halsdreieck, das nach dem Kolonialarzt Thomas Winterbottom als „Winterbottom-Zeichen“ bezeichnet wird (Stich und Steverding, 2002).

Das zweite Stadium, auch als meningoenzephalitische oder neurologische Phase bezeichnet, zeigt sich durch das Vordringen des Parasiten in das Zentralnervensystem. Damit beginnt der geistige Verfall. Es erscheinen die Symptome, die der Krankheit ihren Namen geben. Das sind Störungen des Schlafzyklus mit Wachphasen in der Nacht und Schlafphasen am Tag, Verwirrung mit Sinnesstörungen, mangelnde Koordination und Wesensveränderungen. Die fortgeschrittene Krankheit macht den Menschen abhängig von Anderen, führt zu schwerem Verlust an Körpergewicht und schließlich zu Koma und Tod (WHO, 2005, 2006). Eine wichtige Rolle dabei spielt eine sich entwickelnde generalisierte Gefäßentzündung, die auch den Herzmuskel betrifft. Oft

tritt der Tod durch Herzversagen ein. Die zentralnervösen Störungen entstehen vor allem durch Entzündungsprozesse in der Umgebung der Blutgefäße des Gehirns (Lucius und Loos-Frank, 2008).

Außer der Blut-Hirn-Schranke können Trypanosomen auch die Plazentaschranke überwinden und den Fötus infizieren. Eine iatrogene Übertragung durch infiziertes Blut ist ebenfalls möglich (WHO, 2006).

1.1.2.1 Westafrikanische Schlafkrankheit

Bei der *Gambiense*-Form der Schlafkrankheit, auch westafrikanische Schlafkrankheit genannt, kann ein Mensch über Monate oder sogar Jahre hinweg infiziert sein ohne größere Symptome der Krankheit zu zeigen. Dann erfolgt eventuell eine Zwischenphase mit subakuten fiebrigen Symptomen, die in die Spätphase mit chronisch verlaufender Meningoenzephalitis übergeht. Das hat zur Folge, dass infizierte Menschen oft erst dann über Symptome klagen, wenn sie bereits das zweite Stadium mit ZNS-Schädigung erreicht haben. Unbehandelt sterben die Menschen meist durch Defekte im Zentralnervensystem oder durch Sekundärinfektionen (Pentreath und Kennedy, 2004; WHO, 2006). Aktuell macht die *Gambiense*-Form der Schlafkrankheit einen Anteil von 97 Prozent aus, die *Rhodesiense*-Form nur einen Anteil von 3 Prozent (Simarro *et al.*, 2008).

1.1.2.2 Ostafrikanische Schlafkrankheit

Bei Infektion mit *T. b. rhodesiense* ist der Krankheitsverlauf viel rascher. Es erfolgt eine akute Infektion mit Krankheitszeichen schon in den ersten Wochen oder Monaten. Die Erreger treten oft bereits nach wenigen Wochen in das ZNS über. Die meisten Todesfälle treten innerhalb von sechs Monaten auf, als Folge von Schädigungen des Herzens oder der Eingeweide (Pentreath und Kennedy, 2004; WHO, 2006).

1.1.3 Diagnose

Um festzustellen, ob bei einem Menschen eine Infektion mit dem Erreger *T. b. gambiense* oder *T. b. rhodesiense* vorliegt, wird der Erreger durch mikroskopische Darstellung des Parasiten direkt nachgewiesen. Außerdem gibt es Möglichkeiten der indirekten Darstellung des Erregers durch klinische und biologische Merkmale oder durch serologische und molekulare Tests.

In der Erstdiagnose muss festgestellt werden, ob die Krankheit überhaupt vorliegt. Dann wird untersucht in welchem Stadium der Krankheit sich der Patient befindet und nach der Behandlung wird kontrolliert, ob der Erreger tatsächlich eliminiert werden konnte.

Da die Kosten und Risiken für die Behandlung der Schlafkrankheit sehr hoch sind, wird eine Behandlung nur dann eingeleitet, wenn die Erstdiagnose sicher ist, das heißt, wenn der Erreger durch direkten Nachweis dargestellt werden konnte. Die Bestimmung des Stadiums kann auch durch indirekte Methoden bestimmt werden und ist nötig, weil nicht alle Arzneistoffe die Blut-Hirn-Schranke passieren können. Nach der Behandlung wird empfohlen, dass der Patient zwei Jahre unter Beobachtung bleibt, was in der Praxis fast unmöglich ist.

Die frühe Diagnose ist wichtig für den Patienten selbst, da mit dem Erreichen des zweiten Stadiums das Risiko für schwere Medikamentennebenwirkungen und Folgeerkrankungen steigt. Und sie ist auch wichtig für den Schutz Anderer. Da jeder unbehandelte Patient ein Erregerreservoir darstellt, können sich neue Tsetsefliegen infizieren und die Infektion verbreiten.

Solange Neuerkrankungen weder durch Impfung noch durch Prophylaxe oder effektive Vektorkontrolle verhindert werden können, stellt die Diagnose einen Grundpfeiler der Kontrolle der Krankheit dar. In der Praxis muss die angewandte Technik kosteneffizient und schnell und einfach durchführbar sein (Büscher und Lejon, 2004).

1.1.3.1 Klinische Diagnose

Die klinischen Symptome der Erkrankung vor allem im ersten Stadium sind so unspezifisch, veränderlich und unbeständig, dass sie zur Diagnose nicht ausreichen. Um festzustellen, ob der Erreger bereits das ZNS erreicht hat, beziehungsweise um zu entscheiden, ob eine Behandlung angeschlagen hat oder wiederholt werden muss, können klinische Zeichen ausreichen. Typische klinische Zeichen sind in Kapitel 1.1.2 beschrieben.

1.1.3.2 Parasitologische Diagnose

Die parasitologische Diagnose kann aus frischen Schankeraspiraten erfolgen, aus der Lymphe, die durch Punktion vergrößerter Lymphknoten gewonnen wird, aus dem Blut oder aus der Zerebrospinalflüssigkeit, die durch Lumbalpunktion gewonnen wird. Leider sind die in der Praxis anwendbaren Verfahren immer noch wenig sensitiv und

dennoch aufwändig durchzuführen, so dass überhaupt nur Personen untersucht werden können, die klinisch oder serologisch verdächtig sind. Darüber hinaus bedeutet ein negativer direkter Nachweis noch nicht, dass man eine Infektion ausschließen kann, da die Parasitämie starken Schwankungen unterworfen ist und häufig unter der mikroskopischen Nachweisgrenze liegt. Um die Sensitivität der parasitologischen Diagnose zu verbessern werden Konzentrations- oder Kultivierungsverfahren oft kombiniert mit optimierten Visualisierungssystemen angewendet (Büscher und Lejon, 2004).

Blutfilme

Die einfachste parasitologische Nachweismethode ist das Nativpräparat auch *wet blood film* genannt. Eine kleine Menge Blut aus der Fingerbeere wird dabei auf einem Objektträger mit einem Deckgläschen bedeckt und unter dem Mikroskop untersucht. Die Trypanosomen erkennt man vor allem an ihrer Bewegung zwischen den roten Blutkörperchen. Die Methode ist nicht besonders sensitiv mit einem Detektionslimit von 10.000 Trypanosomen pro Milliliter. Aufgrund der geringen Kosten, einfachen Anwendung und des sofortigen Ergebnisses wird die Methode in der Praxis jedoch immer noch verwendet (Büscher und Lejon, 2004).

Mit einem Detektionslimit von ungefähr 5.000 Trypanosomen pro Milliliter ist die Methode des dicken Tropfens oder *thick blood film* die bevorzugte Methode, wenn keine Zentrifuge für noch sensitivere Verfahren zur Hand ist. Dabei wird ein kleiner Tropfen Fingerblut auf einem Objektträger verteilt, durch die Ecke eines anderen Objektträgers defibriniert und an der Luft getrocknet. Der Tropfen kann fixiert werden oder ohne Fixierung mit einfachen Färbemethoden wie der Giemsa-Färbung angefärbt werden. Unter dem Mikroskop werden dadurch die DNA des Zellkerns und des Kinetoplasten der Trypanosomen zwischen den ungefärbten Erythrozyten gut sichtbar (Büscher und Lejon, 2004).

Anreicherungsverfahren

Um die Erreger auch bei geringer Parasitendichte erfassen zu können, sind zum Teil aufwändige Anreicherungsverfahren nötig. Durch die HCT (Mikrohämatokrit Zentrifugationstechnik) können Trypanosomen aus einem Tropfen Fingerblut durch Hochgeschwindigkeitszentrifugation in einem Kapillarröhrchen angereichert werden. Die Trypanosomen erscheinen dabei aufgrund ihrer Dichte zwischen dem Plasma und

den Erythrozyten auf einem Level mit den weißen Blutkörperchen. Die sich bewegenden Parasiten können mit einer speziellen Halterung direkt in dem Röhrchen unter dem Mikroskop nachgewiesen werden (Woo, 1970).

Diese Methode wurde weiterentwickelt zu der Quantitativen Buffy Coat Technik (QBT), die ursprünglich zur Diagnose von Malaria entwickelt wurde. Diese Technik kombiniert die Konzentration der Parasiten durch Zentrifugation mit einer Fluoreszenzmethode, bei der die DNA des Kerns und des Kinetoplasten durch Acridinorange angefärbt wird. Diese Methode wurde mit Erfolg zur Diagnose der Schlafkrankheit eingesetzt (Bailey und Smith, 1992). Leider hat die Firma Becton-Dickinson die Produktion der speziell beschichteten Kapillarröhrchen eingestellt (Büscher und Lejon, 2004).

Eine weitere Methode zur Aufkonzentrierung des Erregers ist die Mini-Anionenaustausch-Zentrifugationstechnik (*mini anion exchange centrifugation technique* mAECT), die durch Lumsden *et al.* (1979) beschrieben wurde. Dabei werden die Trypanosomen von den Bestandteilen venösen Blutes durch Anionenchromatographie getrennt. Blutzellen bleiben gebunden, während die Trypanosomen im Eluat erscheinen und anschließend durch Zentrifugation aufkonzentriert werden. Durch die Verwendung von großen Blutvolumina (300 µl) können dadurch weniger als 100 Trypanosomen pro Milliliter detektiert werden, die Sensitivität ist also sehr hoch.

Detektion nach Vermehrung der Erreger

Man kann Trypanosomen auch durch *in vitro* Kultur detektieren, indem man aseptisch ein großes Volumen venösen Blutes in Zellkultur inokuliert und über mehrere Wochen auf Trypanosomen untersucht. Die Trypanosomen im Kulturmedium vermehren sich und sind dadurch leichter zu detektieren. Leider ist die Methode sehr aufwändig und die Erfolgsraten gering.

Die Xenodiagnose ist eine weitere Methode zur Diagnose von Trypanosomen. Dabei wird das zu untersuchende Blut einem Labornager inokuliert oder man lässt eine Tsetsefliege an dem vermeintlichen Wirt Blut saugen. In diesen Tieren soll sich der Erreger dann vermehren und detektiert werden. Diese Methode wird ebenfalls selten verwendet, weil Tiere benötigt werden, die Erfolgsraten gering sind und die Inkubationszeiten sehr lange sind (Büscher und Lejon, 2004).

1.1.3.3 Serologische Diagnose

Eine Infektion mit Trypanosomen kann indirekt festgestellt werden über die Entzündungsreaktion des Körpers oder durch die Detektion von spezifischen Antikörpern oder Parasitenantigenen.

Der 1978 entwickelte CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomes) ist ein einfacher Agglutinationstest zur Detektion von spezifischen Antikörpern und der einzige serologische Test, der in der Praxis Anwendung findet (Magnus *et al.*, 1978). Für diesen Test werden diejenigen Varianten von Antigenen verwendet, die häufig zu Beginn einer Infektion vorkommen. An diese relativ konstant vorkommenden Antigene binden Antikörper aus dem Blut des infizierten Patienten und agglutinieren damit. Die Rate der positiv diagnostizierten Patienten konnte durch diesen Test bei einer Infektion mit *T. b. gambiense* im Vergleich zu den konventionellen Tests verdoppelt werden (Smith *et al.*, 1998). Der Test brachte große Erleichterung für breit angelegte Untersuchungen, da er schnell und einfach durchführbar ist. Zur Diagnose von *T. b. rhodesiense* Infektionen ist er nicht anwendbar, weil die Antigenvarianz dieses Erregers zu hoch ist (Büscher und Lejon, 2004). Positive Ergebnisse dieses Antikörpertests sind jedoch nicht sensitiv und spezifisch genug, um die Diagnose einer Infektion zu stellen. Antikörper können auch nach behandelter Krankheit bis zu drei Jahre im Blut nachweisbar sein, ohne dass eine erneute Infektion stattgefunden hat (Paquet *et al.*, 1992). Deshalb sind bei seropositiven Personen zusätzlich parasitologische Tests nötig. (Büscher und Lejon, 2004; Simarro *et al.*, 2008). Es gibt einige weitere serologische Tests, die in Kapitel 1.3.3.3 kurz beschrieben und von Büscher und Lejon (2004) näher dargestellt werden.

1.1.3.4 Molekulare Diagnose

Neue molekulare Diagnoseverfahren wie DNA- und RNA- Detektion mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) sind bereits verfügbar und wurden in mehreren Ländern für epidemiologische Studien eingesetzt. Für die flächendeckende Untersuchung der Bevölkerung sind diese Methoden jedoch unter den derzeitigen Bedingungen im Feld nicht einsetzbar.

1.1.4 Risiko für Reisende

Infektionen bei internationalen Reisenden sind mit drei bis neun Fällen pro Jahr selten und betreffen vor allem Reisende in ländliche Regionen (Moore, 2008). Die meisten Infektionen wurden in den Wildparks Ostafrikas erworben und stammen von dem Erreger *T. b. rhodesiense*. Reisende erinnern sich oft an den Stich, da dieser sehr schmerzhaft ist. Es ist keine Impfung verfügbar. Als einzige prophylaktische Maßnahme kann man sich vor dem Stich der Tsetsefliege schützen. Tsetsefliegen werden durch Repellentien nicht abgeschreckt, sie stechen durch leichte Kleidung und werden von dunklen oder kontrastreichen Farben und von sich bewegenden Fahrzeugen angezogen. Es wird deshalb empfohlen, sich durch entsprechend feste und für die Überträger unauffällige Kleidung, beispielsweise in tarnfarbengrün, zu schützen und Gegenden mit hohem Befall zu meiden. Stark betroffene Gebiete sind der örtlichen Bevölkerung meist bekannt (Moore, 2008). Kürzlich gab es zwei Fälle von ostafrikanischer Schlafkrankheit bei Touristen in der Serengeti, dem Tarangire National Park und dem Ngorongoro-Krater in Tansania, die für Aufregung sorgten (Zentrum für Reisemedizin, 2009).

1.1.5 Abgrenzung zur amerikanischen Schlafkrankheit

Neben der afrikanischen Trypanosomosis gibt es auch die amerikanische Trypanosomosis oder amerikanische Schlafkrankheit, die auch als Chagas Krankheit bezeichnet wird. Sie wird durch den Erreger *Trypanosoma cruzi* hervorgerufen und unterscheidet sich in Verlauf und Übertragungsart von der afrikanischen Schlafkrankheit (WHO, 2006).

1.2 Die Tsetsefliege

Die Erreger der Schlafkrankheit und der Nagana werden übertragen durch den Stich einer blutsaugenden Tsetsefliege (Moore, 2008).



Abbildung 1-5 Die Tsetsefliege (WHO, 1994)

Das Wort „Tsetse“ hat seinen Ursprung in der Sprache Tswanas (Botswana) und bedeutet „Fliege, die den Viehbestand tötet“ (WHO, 2005). Der Lebensraum der Tsetsefliege beschränkt sich auf das tropische Afrika und nimmt eine Fläche ein, die etwa ein Drittel des gesamten Kontinents ausmacht. Diese Fläche wird auch als „Tsetse-Belt“ bezeichnet. Sie liegt zu beiden Seiten des Äquators und erstreckt sich von West- und Zentralafrika bis hin nach Ostafrika. Früher muss die Tsetsefliege auch in anderen Gebieten vorgekommen sein. In Colorado wurden fossile Exemplare gefunden, die bis in das Miozän zurückdatiert werden können (WHO, 2005).

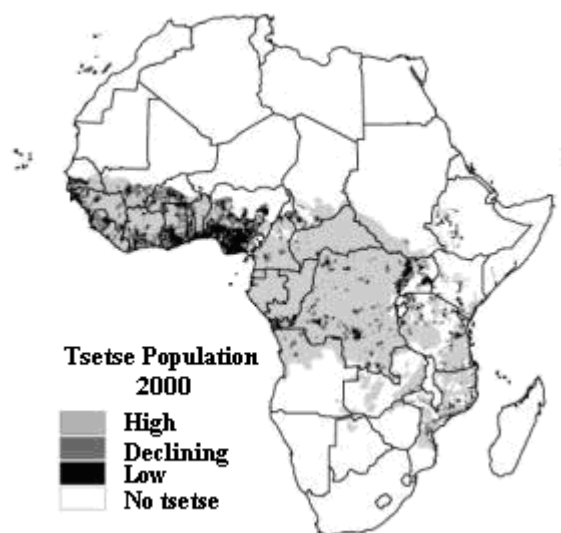


Abbildung 1-6 Verbreitung der Tsetsefliege (Michel et al., 2001)

1.2.1 Klassifizierung

Die Tsetsefliege gehört zur Familie der Glossiniden in der Ordnung Diptera. Es gibt 31 Arten und Unterarten von Tsetsefliegen aufgeteilt in drei Gruppen. Die Fliegen der *Fusca*-Gruppe, auch Waldfliegen genannt, leben vor allem in den Tieflandregenwäldern West- und Zentralafrikas. Die Unterarten der *Palpalis*-Gruppe, auch Flussnahe Fliegen genannt, leben in Tieflandregenwäldern über Afrika verteilt, in feuchten Gebieten entlang der Flussläufe oder in anderen gewässernahen Gebieten. Die Fliegen der *Morsitans*-Gruppe, auch Savannenfliegen genannt, kommen in den unterschiedlichen Savannenregionen vor, die zwischen Waldrändern und Wüsten liegen (Rogers und Robinson, 2004). Die *Glossina morsitans*-Gruppe hat als Savannenfliege die größte Bedeutung für die Rinderhaltung (Seifert, 1992). Zur *Palpalis*-Gruppe zählen wichtige Überträger der Schlafkrankheit.

1.2.2 Beschreibung der Tsetsefliege

Die Tsetsefliege ist ein meist braun bis grau-braun gefärbtes Insekt, das mit 8-17 mm in der Größe den europäischen Hausfliegen ähnelt. Die Flügel sind in Ruhestellung übereinander gelegt, und nicht in einem Winkel über den Körper hervortretend wie bei den Hausfliegen. Dadurch erscheint der Körper sehr schmal (FAO, 1992; WHO, 2009b). Ein weiteres charakteristisches Merkmal ist der lange, direkt nach vorne gerichtete Saugrüssel (Proboscis) (WHO, 2009b).



Abbildung 1-7 Tsetsefliege, Flügel übereinander gelegt (FU Berlin, Archiv)

Hinsichtlich der Fortpflanzung nimmt die Tsetsefliege eine Sonderstellung unter den Insekten ein. Sie legt keine Eier, sondern ist lebend gebärend. Ein einzelnes befruchtetes Ei entwickelt sich im Uterus der Fliege. Daraus schlüpft die Larve, die weiterhin im Uterus ernährt wird bis sie das dritte larvale Stadium erreicht hat. In diesem Stadium

kann die Larve bereits schwerer sein als das Weibchen selbst. Nach zehn bis zwölf Tagen im Uterus wird die Larve auf die Erde abgesetzt. Sie vergräbt sich im Boden, verpuppt sich innerhalb kurzer Zeit und schlüpft nach ungefähr 34 Tagen als erwachsene Fliege, ohne in dieser Zeit auf Flüssigkeit oder Nahrung angewiesen zu sein. Sowohl die erwachsenen Weibchen als auch die Männchen ernähren sich ausschließlich von Blut. Auch der Flüssigkeitsbedarf wird durch Blut gedeckt, so dass die Tsetsefliege in allen Entwicklungsstadien perfekt an eine trockene Umgebung angepasst ist. (Seifert, 1992; Hargrove, 2004). Tsetsefliegen haben eine Lebensdauer von durchschnittlich ein bis sechs Monaten (WHO, 2009c).

1.2.3 Infektion mit Trypanosomen

Bei der Blutmahlzeit an einem ihrer Wirte, zu denen Wildtiere, Nutztiere und der Mensch gehören, nimmt die Tsetsefliege gleichzeitig die Erreger des infizierten Tieres oder Menschen auf. Diese wandern vom Kropf der Fliege in den Mitteldarm und von dort aus durch mehrere Gewebe in die Speicheldrüsen. Durch den Speichel der Fliege werden die infektiösen Formen beim nächsten Stich der Fliege weitergegeben. Die Zeit von der Aufnahme infizierten Blutes bis zum Auftreten infektiöser Formen in der Speicheldrüse variiert zwischen einer und drei Wochen. Während dieser Zeit laufen im Trypanosom eine Reihe von Veränderungen ab (siehe Kapitel 1.4.3). Die Fliege bleibt dann für den Rest ihres Lebens infektiös (FAO, 2009).

Frühere Annahmen gingen davon aus, dass sich Tsetsefliegen, die sich nicht am ersten oder zweiten Tag ihres Lebens mit Trypanosomen infizieren, später nicht mehr infizieren können. Der Grund dafür ist, dass der Erreger *T. brucei* etwa eine Stunde braucht, um von der anaeroben Energiegewinnung der Blutstromformen auf die aerobe Energiegewinnung der Insektenformen umzustellen. Die peritrophische Membran, durch die die Trypanosomen vom Kropf der Fliege in den Mitteldarm übergehen, liegt bei frisch geschlüpften Fliegen als kurzes Säckchen vor, das erst langsam in die Länge wächst. Somit kann das Blut nur langsam in den Mitteldarm übergehen und den Trypanosomen bleibt genug Zeit für ihre Umwandlung. Bei älteren Fliegen ist diese Membran so entwickelt, dass das Blut sehr schnell in den Darm übernommen wird (Lucius und Loos-Frank, 2008). Nach neuen Erkenntnissen können sich auch ältere Fliegen infizieren, wenn sie vorher über längere Zeit hungern. Das Immunsystem der

Fliegen ist dann so geschwächt, dass die Empfänglichkeit gegenüber den Erregern erhöht ist (Akoda *et al.*, 2009).

Nicht jede Tsetsefliege trägt den Erreger und nicht jeder Stich einer infizierten Fliege führt zwangsläufig zur Infektion (Rogers, 1988). Studien zufolge sind etwa fünf Prozent der Tsetsefliegen mit einem der Erreger infiziert (Tarimo *et al.*, 1985; Woolhouse *et al.*, 1993), zitiert nach Torr *et al.* (2008). Nur auf menschenpathogene Erreger bezogen liegt der Prozentsatz wahrscheinlich nur bei etwa 0,1 Prozent (Weiss *et al.*, 2006).

Auch mechanische und dann acyclische Übertragung der Schlafkrankheitserreger beispielsweise über Tabaniden (Bremsen) ist theoretisch möglich, scheint aber keine große Bedeutung zu haben (WHO, 2006). Eine mechanische Übertragung durch afrikanische Stomoxys-Arten (Stechfliegen, Wadenstecher) ist experimentell nachgewiesen (Mihok *et al.*, 1995).

1.3 Die Nagana

Trypanosomen werden durch die Tsetsefliege aber nicht nur auf Menschen, sondern auch auf Rinder, Schafe, Ziegen und Pferde übertragen. Die Krankheit, die bei Tieren durch Trypanosomen ausgelöst wird, wird Nagana genannt, aus der Zulu-Sprache für „Zustand des bedrückten Geistes“ (Cook, 1994).

1.3.1 Verbreitung und wirtschaftliche Auswirkung der Krankheit

Nagana kommt in allen Verbreitungsgebieten der Tsetsefliege vor. Deshalb können über neun Millionen Quadratkilometer, das heißt etwa die Hälfte des kultivierbaren Landes in Afrika südlich der Sahara, nicht für intensive Viehzucht genutzt werden (Abbildung 1-8). Nagana ist damit die wirtschaftlich bedeutendste Viehseuche des afrikanischen Kontinents (Chizyuka, 1992; Lucius und Loos-Frank, 2008).

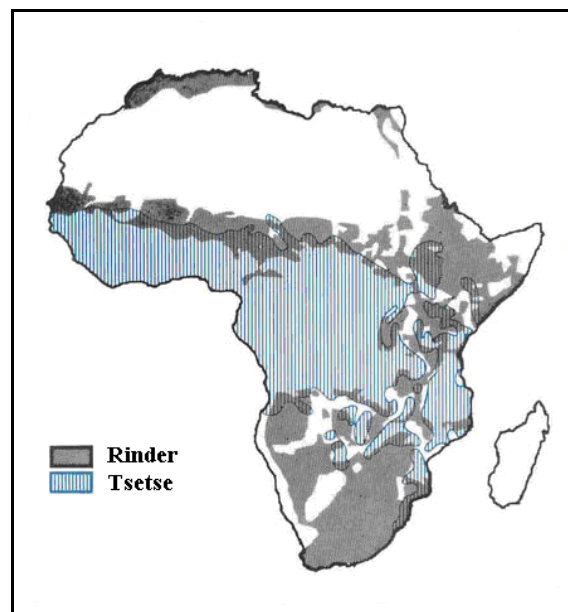


Abbildung 1-8 Verbreitung der Tsetsefliege/Gebiete, in denen Rinder gehalten werden (ILRI, 1989)

Nach aktuellen Zahlen der FAO stehen zwischen 40 und 60 Millionen Rinder unter dem Risiko einer Infektion (FAO, 2009). Bei einer Gesamtzahl von 259 Millionen Rindern auf dem gesamten afrikanischen Kontinent sind in etwa 19 % aller Rinder betroffen (FAOSTAT, 2007). Jedes Jahr sterben rund drei Millionen Nutztiere. Das bedeutet einen wirtschaftlichen Schaden von 1,0 bis 1,2 Milliarden US Dollar, wenn man nur die Tierproduktion betrachtet und einen geschätzten Gesamtverlust bezüglich des

Bruttoinlandsprodukts für die betroffenen Länder von 4,75 Milliarden US Dollar pro Jahr (FAO, 2009).

Durch die Nagana kommt es zu erheblichen Produktionsverlusten. Die Milchleistung, die Fleischproduktion, die Zugleistung der Ochsen und die Reproduktionsleistung fallen wesentlich geringer aus (Clausen, 2005). Es gibt einige westafrikanische Rinderrassen, die schon seit langer Zeit in den von der Tsetsefliege betroffenen Gebieten leben und trypanotolerant sind. Die Bevölkerung bevorzugt dennoch die größeren trypanosensiblen Zeburinder, da diese einen höheren Marktpreis, größere Milchleistung und eine bessere Eignung zur Zuganspannung haben (Clausen, 2005).

Die afrikanische Trypanosomosis der Tiere beschränkt die landwirtschaftliche Produktion in Gegenden Afrikas, die die größte Entwicklungsmöglichkeit in der landwirtschaftlichen Produktion hätten. In den von der Tsetsefliege betroffenen Gebieten ist die Rinderpopulation um 30 bis 50 Prozent reduziert, die Fleisch- und Milchproduktion um mindestens 50 Prozent. Fast noch wichtiger als der Einfluss auf die Fleisch- und Milchproduktion ist darüber hinaus der Einfluss auf die Entwicklung eines integrierten Ackerbau-Viehwirtschafts-Produktionssystems. Eine Studie, die in Äthiopien durchgeführt wurde zeigt, dass ein Gespann von Ochsen in einer Tsetse-infizierten Gegend 40 Prozent weniger Land bestellen kann als in einer Gegend, die Tsetse-kontrolliert ist (Swallow, 1997).

1.3.2 Infektion und Krankheitsbild

Alle Arten von Haussäugetieren sind für eine oder mehrere Arten von Trypanosomen empfänglich, siehe Tabelle 1-2. Die Nagana bei Rindern wird durch die Erreger *T. congolense*, *T. vivax* und *T. b. brucei* verursacht. Die Infektion kann akuten oder chronischen Verlauf nehmen. Faktoren, die dabei eine Rolle spielen sind der Infektionsdruck, die Widerstandskraft der betroffenen Rinderrasse und die Belastung durch andere Infektionen, die die Rinder zu tragen haben (Seifert, 1992). Bei der akuten Form der Erkrankung ist die Parasitämie sehr hoch. Die Tiere leiden unter hohem Fieber sowie großer Erschöpfung und sterben innerhalb weniger Wochen, meist infolge einer fortgeschrittenen Anämie. Der chronische Verlauf zeigt sich durch sporadisches Fieber, raues Haarkleid, Abmagerung und moderater bis starker Anämie (Clausen, 2005).

1.3.3 Diagnose

Wenn diagnostische Mittel sinnvoll sein sollen, müssen sie für die Viehhalter gemacht werden, die sie einsetzen werden. Die betroffenen Viehhalter arbeiten normalerweise unter sehr widrigen physischen und ökonomischen Umständen. Ein Grund dafür ist, dass endemische Krankheiten wie die Trypanosomosis in die Kategorie Produktionskrankheit (production disease) fallen, für deren Kosten die Bauern selbst aufkommen müssen. Hochansteckende epidemische Krankheiten wie die Maul- und Klauenseuche oder die Rinderpest sind grenzüberschreitend und betreffen den Handel, deshalb gibt es für die Kontrolle dieser Krankheiten große Investitionen auf nationaler und internationaler Ebene. Der Fokus bei der Entwicklung und der Auswahl diagnostischer Instrumente im Bereich der Nagana muss jedoch klar bei einfach anwendbaren und kostengünstigen Tests liegen (Eisler *et al.*, 2004).

1.3.3.1 Klinische Diagnose

Die Bauern und Viehhalter, die sich um die Rinder kümmern und somit für die Behandlung und Prävention der afrikanischen Trypanosomosis bei ihren Tieren zuständig sind, haben derzeit außer der physischen Untersuchung meist keinen Zugang zu diagnostischen Methoden. Deshalb kommt dem Erkennen der klinischen Zeichen eine besondere Bedeutung zu. Klinische Zeichen der akuten Trypanosomosis bei Rindern sind Anämie, Gewichtsverlust, raues Haarkleid, Vergrößerung der peripheren Lymphknoten, Fieber, Fehlgeburten und reduzierte Milchleistung. Ohne Behandlung führt die Infektion zum Tod. In den meisten Fällen wird allein auf der Basis klinischer Symptome eine mutmaßliche Diagnose gestellt. Daraufhin werden trypanozide Arzneistoffe verabreicht und ein Ansprechen darauf als eine Bestätigung der Diagnose interpretiert (Eisler *et al.*, 2004).

1.3.3.2 Parasitologische Diagnose

Die älteste Methode, den Erreger sichtbar zu machen, ist der bereits erwähnte *wet blood film*. Dabei wird ein Tropfen Blut mithilfe eines Lichtmikroskops direkt auf Erreger untersucht. Wird das Blut mit Methanol oder Aceton fixiert und mit Giemsa-Lösung gefärbt, erscheinen die Zellkerne farbig und man kann die Erreger besser erkennen und differenzieren. Die Erregerzahlen sind jedoch meist zu gering, um sie mit dieser

Methode erfassen zu können. Zur besseren Detektierbarkeit können zunächst mit einer größeren Menge Blut Aufkonzentrierungsverfahren wie die HCT (siehe Kapitel 1.1.3.2) oder die BCT (Buffy Coat Technik) verwendet werden. Die BCT ist ähnlich wie die bereits vorgestellte QBT eine Weiterentwicklung der HCT. Dabei wird das Kapillarröhrchen aufgeschnitten und die Erreger werden auf einem Objektträger unter dem Mikroskop untersucht (Murray *et al.*, 1977). Bei der BCT ist es möglich, die unterschiedlichen Erreger anhand ihres charakteristischen Bewegungsmusters zu differenzieren. Außerdem kann der Grad der Anämie abgeschätzt werden (Paris *et al.*, 1982). Darüber hinaus gibt es, wie in Kapitel 1.1.3.2 beschrieben, die Möglichkeit, den Erreger zu vermehren und daraufhin zu detektieren, durch Sub-Inokulation in andere Tiere, durch Xenodiagnose oder durch Vermehrung in Kultur (Eisler *et al.*, 2004).

1.3.3.3 Serologische und molekulare Diagnose

Die beschriebenen Methoden haben ihre Grenzen was die Sensitivität und die Praktikabilität betrifft. Serologische Methoden haben in der Kontrolle von viralen und bakteriellen Infektionen einen unschätzbaren Beitrag geleistet. Diese Erkenntnisse führten auch in der Diagnose der Trypanosomenerkrankungen zu vermehrter Forschung im immunologischen Bereich. Daraus entstanden sind mehrere Tests, bei denen ein direkter Nachweis der Trypanosomen-Antigene oder ein indirekter Nachweis der gebildeten Antikörper erfolgt. Ein wichtiger Test ist dabei der ELISA (Enzymgekoppelter Immunsorptionsstest) in Form eines Antigen-ELISA und eines Antikörper-ELISA. Zum Nachweis oder Ausschluss von Trypanosomen-Infektionen bei Rindern sind die meisten dieser Tests in dreifacher Ausführung durchzuführen, um auf die drei möglichen Erreger zu testen (Eisler *et al.*, 2004). Der CATT, der bei *T. b. gambiense*-Infektionen des Menschen eingesetzt wird, findet auch Anwendung bei der Diagnose von *T. evansi*-Infektionen bei Tieren. Bei den Erregern *T. congolense* und *T. vivax* ist es schwer, geeignete Antigene für diesen Test zu finden (Luckins, 1992). Durch molekularbiologische Methoden ist eine exakte Speziesdiagnose auch bei niedrigen Erregerkonzentrationen möglich. Die PCR ist zwar mittlerweile gut automatisierbar und im Labor schnell und relativ einfach durchzuführen, als Routineuntersuchung im Feld wird sie jedoch in nächster Zeit noch nicht zum Einsatz kommen (Eisler *et al.*, 2004).

1.4 Der Erreger

1.4.1 Systematische Einordnung

Trypanosomen gehören zu den Protozoen, auch Urtierchen genannt. Diese sind einzellige Lebewesen, die oft parasitär leben. Sie gehören zu den Eukaryoten und sind im Prinzip wie eine normale eukaryotische Zelle aufgebaut. Medizinisch wichtige Stämme der Protozoen sind Apicomplexa und Sarcomastigophora.

Zu den Apicomplexa gehören Plasmodien, die Erreger der Malaria und Babesien, die Erreger einer durch Zecken übertragenen Krankheit. Zu den Sarcomastigophora gehören neben Trypanosomen auch Leishmanien, die den Trypanosomen sehr ähnlich sind und die Leishmaniose hervorrufen, Trichomonaden, die urogenitale Erkrankungen hervorrufen und Amöben wie der Erreger der Amöbenruhr *Entamoeba histolytica*. Die systematische Einordnung der Trypanosomen gibt Tabelle 1-1 wieder.

Tabelle 1-1 Systematische Einordnung der Trypanosomen

Unterreich	Protozoa
Stamm	Sarcomastigophora
Unterstamm	Mastigophora
Klasse	Zoomastigophorea
Ordnung	Kinetoplastida
Familie	Trypanosomatidae
Gattung	Trypanosoma

Die Kinetoplastida werden bezeichnet nach den Kinetoplasten, mikroskopisch sichtbare DNA-Strukturen der Mitochondrien, die für diese Gruppe der Protozoen typisch sind. Zur Familie der Trypanosomatidae gehören auch die Leishmanien.

Die Trypanosoma-Arten werden aufgeteilt in die Sektion der Salivaria und der Stercoraria. Die Arten der Salivaria werden durch die Mundwerkzeuge oder über den Speichel blutsaugender Insekten übertragen. Bei den Trypanosomenarten der Stercoraria findet eine kontaminative Übertragung über die Fäzes der Vektoren statt (Lucius und Loos-Frank, 1997). Die Gruppe der Salivaria-Trypanosomen werden nach Hoare (1972) in fünf Gruppen unterteilt (siehe Tabelle 1-2).

Tabelle 1-2 Trypanosomenarten, Krankheiten, die wichtigsten Wirte und Überträger nach Taylor und Authié (2004)

Subgenus	Spezies	Krankheit	Vertebratenwirte	Überträger
Gruppe der Salivaria				
Duttonella	<i>T. vivax</i>	Nagana	Rinder , Ziegen, Schafe, Pferde, Esel, Kamele	Tsetsefliege, mechanisch
Nannomonas	<i>T. congolense</i>	Nagana	Rinder , Ziegen, Schafe, Pferde, Esel, Kamele , Schweine, Hunde	Tsetsefliege
	<i>T. simiae</i>	Nagana	Ziegen, Schafe, Schweine	Tsetsefliege, mechanisch
Trypanozoon	<i>T. b. brucei</i>	Nagana	Rinder, Ziegen, Schafe, Pferde, Esel, Kamele , Schweine, Hunde	Tsetsefliege
	<i>T. b. rhodesiense</i>	Schlafkrankheit Ost-/Zentralafrika	Mensch , Rinder, Schweine, Ziegen	Tsetsefliege
	<i>T. b. gambiense</i>	Schlafkrankheit Zentral-/Westafrika	Mensch, Schweine, Schafe	Tsetsefliege
	<i>T. evansi</i>	Surra Nord- u. Ostafrika, Eurasien	Rinder, Ziegen, Schafe, Wasserbüffel, Pferde , Esel, Kamele , Schweine, Hunde	mechanisch, u.a. Tabaniden
	<i>T. equiperdum</i>	Beschälseuche weltweit	Pferde , Esel	beim Deckakt
Pycnomonas	<i>T. suis</i>	Nagana	Schweine	Tsetsefliege
Gruppe der Stercoraria				
	<i>T. cruzi</i>	Chagaskrankheit	Mensch , andere Säugetierarten	Raubwanzen

Fettgedruckt sind die Wirte, bei denen der Erreger stark pathogen ist und bei denen die Erkrankung in akuter Form auftreten kann. Bei den anderen Wirten ist der Erreger leicht oder moderat pathogen.

Die weiteren Ausführungen beziehen sich in erster Linie auf die Nagana bei Rindern, die vor allem hervorgerufen wird durch *T. vivax*, *T. congolense* und *T. b. brucei* und auf die Schlafkrankheit beim Menschen, die hervorgerufen wird durch die Erreger *T. b. rhodesiense* und *T. b. gambiense*. Die Erreger dieser Krankheiten werden in der Regel beim Stich durch Tsetsefliegen übertragen und entwickeln sich im Vektor weiter.

1.4.2 Beschreibung des Erregers

Trypanosomen bestehen aus einer einzigen Zelle, die je nach Art und Stadium 8 bis über 50 µm groß sein kann. Sie sind in ihrer Form stromlinienförmig gestreckt und besitzen eine Geißel, mit der sie sich fortbewegen. In folgender Abbildung dargestellt sind die Strukturen, die bei einem fixierten Blutpräparat unter dem Lichtmikroskop zu sehen sind.

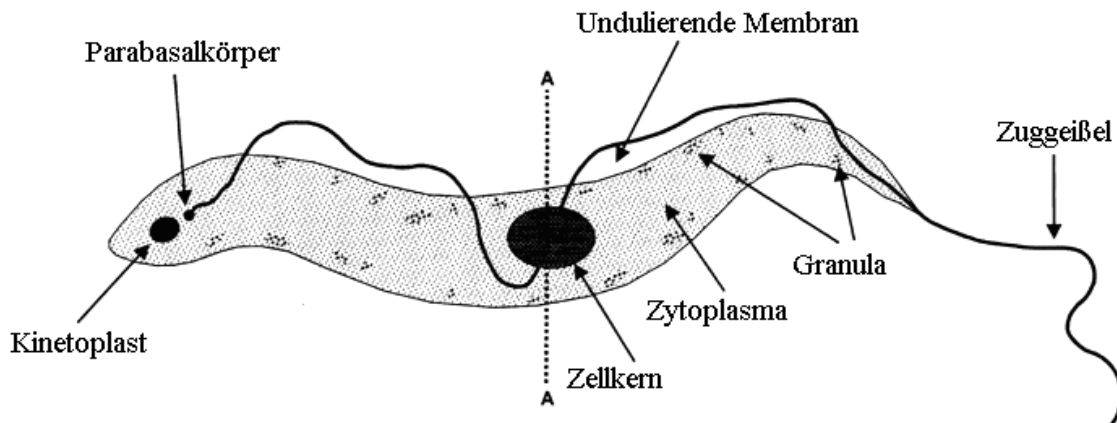


Abbildung 1-9 Morphologie eines Trypanosoms, schematische Darstellung nach Uilenberg (1998)

In der Mitte liegt der große Zellkern, der DNA in Form von Chromosomen enthält. In der Nähe des hinteren Endes befindet sich der Kinetoplast. Dieser stellt eine Besonderheit der Trypanosomen dar. Er enthält die kDNA (kinetoplastische DNA). Diese hat wichtige Funktionen bei der Fortpflanzung und dem Stoffwechsel und ist wahrscheinlich essentiell für die zyklische Übertragung durch Tsetsefliegen (Uilenberg, 1998). An den Kinetoplasten angrenzend befindet sich der Parasasalkörper, von dem die Geißel ausgeht. Die Geißel fungiert als so genannte Zuggeißel und kann über das vordere Ende hinausragen. Mit dieser Zuggeißel können sich die Erreger im Blut fortbewegen, deshalb werden Trypanosomen auch Hämoflagellaten (Hämo = Blut, Flagellum = Geißel) genannt. Der hintere Teil der Geißel haftet an der Oberfläche, die in wellenförmige Bewegungen versetzt wird. Dadurch entsteht der Eindruck einer undulierenden Membran. Des Weiteren kann man mehrere Granula im Zytoplasma erkennen, die unterschiedlichen Ursprungs sein können. Sie können Nahrungs- oder Nukleinsäurereservoir darstellen oder aus einer Immunreaktion zwischen Trypanosom und dem Immunsystem des Wirtes stammen.

Nicht unter dem Lichtmikroskop zu erkennen sind der Golgiapparat, das endoplasmatische Retikulum und ein einzelnes großes Mitochondrium, das den

Kinetoplasten enthält. Darüber hinaus existiert ein weiteres besonderes Organell, das Glykosom, in dem Enzyme für die Glykolyse bereitgestellt werden. Die Abgrenzung dieser Enzyme in einem eigenen Organell ist einzigartig unter den Eukaryoten (Clayton und Michels, 1996).

Die Trypanosomenarten *T. congolense*, *T. vivax* und *T. brucei* unterscheiden sich anhand der Größe, dem Geißelende, der undulierenden Membran, der Größe und Lage des Kinetoplasten und am Bewegungsmuster. Die drei Unterarten von *T. brucei* sind morphologisch nicht zu unterscheiden (Stevens und Brisse, 2004).

Die afrikanischen Trypanosomenarten leben extrazellulär. Dadurch sind sie der ständigen Immunabwehr ihres Wirtes ausgesetzt. Wie gelingt es den Trypanosomen dennoch sich in Blut und Lymphe zwischen Antikörpern, Makrophagen und Zytokinen zu behaupten? Sie haben einen Weg gefunden, um das Immunsystem ihres Wirtes zu überlisten. Sie verändern ständig ihre Oberflächenantigene. Bei den Blutstromformen der *T. brucei*-Gruppe sowie bei *T. congolense* und *T. vivax* ist die Zelle von einer zirka 15 nm dicken Schicht (englisch *surface coat*) ummantelt. Diese besteht aus veränderlichen Glykoproteinen, die als VSG (Variables Oberflächenglykoprotein) bezeichnet werden. Wenn sich die Erreger im Blut oder der Lymphe ihres Wirtes vermehren, werden sie zunächst vom Immunsystem erkannt. Es werden Antikörper gegen die VSG-Moleküle gebildet und die Erreger werden durch Makrophagen und das Komplementsystem eliminiert. Bei Trypanosomen entstehen vor allem Immunantworten durch IgM (Immunglobulin M). Durch diese Antikörper werden die Trypanosomen opsoniert und die so markierten Trypanosomen von Effektorzellen phagozytiert, vor allem durch Kupffer'sche Sternzellen der Leber (Lucius und Loos-Frank, 2008). Doch inzwischen haben sich bereits Erreger mit einer anderen Antigenvariante gebildet, die zu einer neuen Population heranwachsen (Cross, 1975), (Abbildung 1-10). Diese Entwicklung der schubweisen Vermehrung der Erreger setzt sich fort bis zur Erschöpfung des Wirtes. Früher dachte man, dass die Trypanosomen rund 1000 unterschiedliche Gene für neue VSG-Moleküle besitzen. Neue Erkenntnisse aus der Untersuchung des Genoms zeigen, dass davon nur sieben Prozent funktional sind. Aus den restlichen Pseudogenen oder Genfragmenten könnten sich jedoch neue Gene entwickeln (Lucius und Loos-Frank, 2008). Durch diesen Weg, das Immunsystem zu umgehen, wird die Entwicklung von Impfstoffen sehr schwierig.

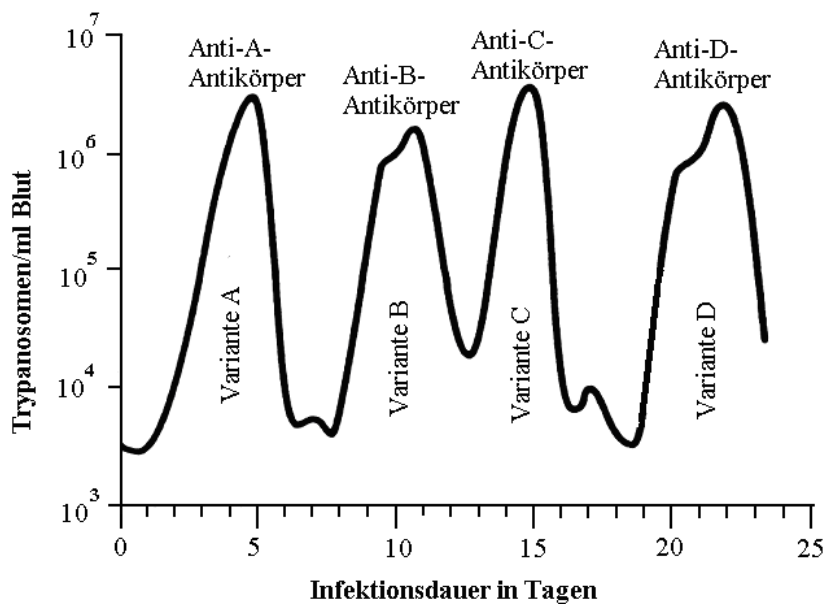


Abbildung 1-10 Darstellung der Antigenvariation bei Trypanosomen anhand einer Blutspiegelkurve, modifiziert nach Ziegelbauer (1994)

Der für die Schlafkrankheit charakteristische wellenförmige Fieberverlauf geht einher mit der schubweisen Vermehrung der Erreger beziehungsweise mit der Toxinbildung, die nach deren Eliminierung durch das Immunsystem entsteht.

Die Vermehrung der Trypanosomen erfolgt durch einfache Längsteilung wie in folgender Abbildung dargestellt. Die Verdopplungszeit der teilungsaktiven Blutstromformen beträgt dabei zirka sechs Stunden. Die Teilung kann man unter dem Mikroskop gut beobachten.

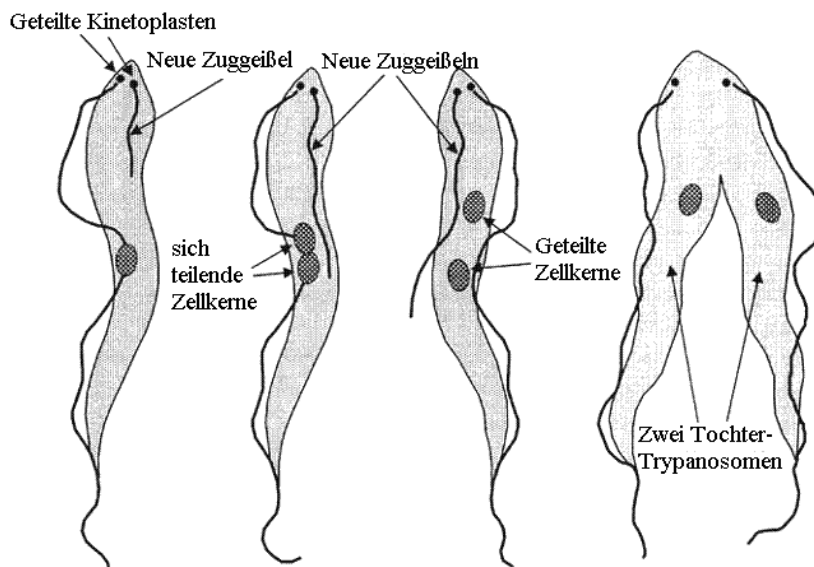


Abbildung 1-11 Vermehrung der Trypanosomen durch Längsteilung nach Uilenberg (1998)

Im Lebenszyklus der Trypanosomen gibt es keinen klassischen sexuellen Vorgang. Aber es konnte gezeigt werden, dass es in den Speicheldrüsen der Tsetsefliegen manchmal einen Austausch genetischen Materials gibt. Dabei spielen Meiose ähnliche Vorgänge eine Rolle, deren Bedeutung noch nicht geklärt ist (Uilenberg, 1998; Lucius und Loos-Frank, 2008).

Eine Besonderheit am Stoffwechsel der Blutstromformen ist, dass die Energieversorgung ausschließlich durch Glykolyse mit Pyruvat als Endprodukt erfolgt. Dies ist ein relativ energieaufwändiges Verfahren, zu dem die Trypanosomen täglich bis zum zehnfachen ihres Eigengewichtes an Zucker benötigen. Die ersten sieben Enzyme dieses Stoffwechselweges sind in den Glykosomen kompartimentiert (Opperdoes und Borst, 1977). Das Mitochondrium der Blutstromformen ist nur wenig aktiv. Die Insektenformen dagegen haben einen oxidativen Stoffwechsel, der im Mitochondrium abläuft. Deshalb ist das Mitochondrium in der Insektenform hoch aktiv und stark vergrößert. Als Energiequelle dient den Insektenformen vor allem Prolin (Lucius und Loos-Frank, 2008).

Die Erreger der *Brucei*-Gruppe sind untereinander sehr ähnlich. Der Erreger *T. b. brucei* ist jedoch nur für Tiere pathogen. Menschen und bestimmte am Boden lebende Primaten sind resistent gegen Infektionen mit *T. b. brucei*. Dies liegt an einem Serumfaktor im Blut, der diese Trypanosomen lysiert (Raper *et al.*, 2001). Dieser Faktor wird TLF (Trypanosomen lysierender Faktor) genannt und ist wohl Teil der HDL (High Density Lipoprotein)-Fraktion beziehungsweise einer VHDL (Very High Density Lipoprotein)-Subfraktion des HDL. Die lytische Aktivität wird dadurch erklärt, dass der Faktor TLF durch rezeptorvermittelte Endozytose in den Parasiten aufgenommen wird und zu säurehaltigen intrazellulären Organellen befördert wird. Die säurehaltigen Organellen werden dadurch zerstört und führen zur Selbstverdauung und Auflösung der gesamten Zelle (Hajduk *et al.*, 1994). Es wurden rund 350 hoch affine Bindungsstellen für den Serumfaktor TLF gefunden, die sich in der Geißeltasche befinden. Serum resistente Parasiten scheinen TLF im selben Maße zu binden als sensitive aber internalisieren den Ligand-Rezeptor-Komplex nicht (Hager und Hajduk, 1997).

In den vergangenen 20 Jahren wurden Trypanosomen in vielen Laboratorien zur Grundlagenforschung in Zellkulturen gehalten. Am Trypanosomenmodell wurden neue biochemische, immunologische und molekularbiologische Erkenntnisse gewonnen,

mehr als über irgendeinen anderen einzelligen Organismus (Stich und Steverding, 2002).

1.4.3 Entwicklungszyklus

Die Blutparasiten durchlaufen während der Wanderung durch die Tsetsefliege und durch Mensch oder Wirbeltier morphologisch unterschiedliche Entwicklungsstadien, die sich durch die Länge der Geißel, Ausprägung der undulierenden Membran und die Lage des Kinetoplasten unterscheiden (Stevens und Brisse, 2004).

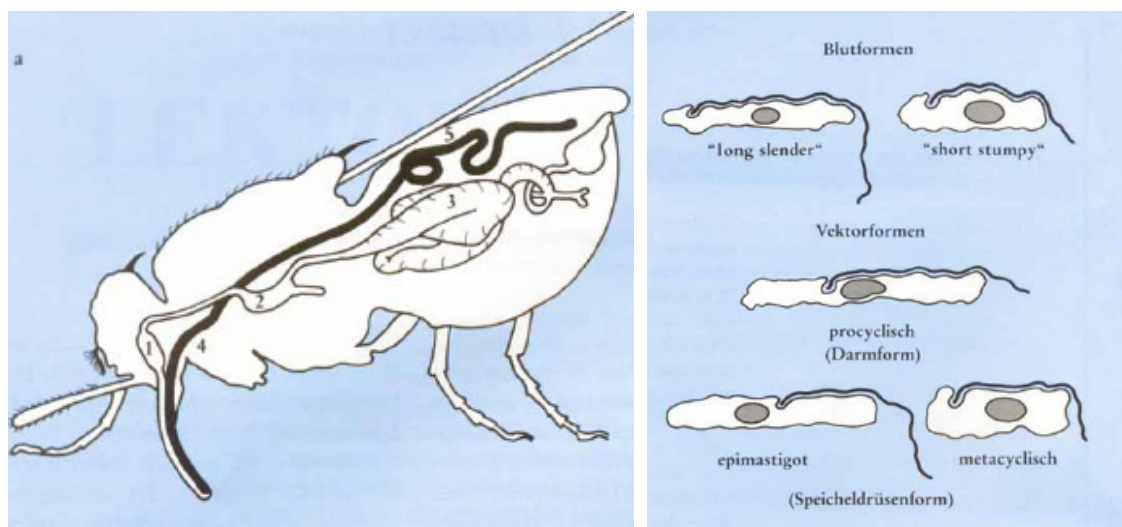


Abbildung 1-12 Links: Blutsaugende Fliege mit 1 Speicheldrüse, 2 Proventriculus, 3 Darm, 4 Speicheldrüsenangang, 5 Speicheldrüse, Rechts: morphologische Varianz von *T. brucei*, nach Duszenko (1984).

Am Beispiel wird im Folgenden der Entwicklungszyklus von *T. brucei* genauer beschrieben. Bei *T. congolense* und *T. vivax* treten die gleichen Vektorformen auf, diese entwickeln sich jedoch in anderen Organen der Tsetsefliege (Stevens und Brisse, 2004). Mit dem Stich einer infizierten Tsetsefliege gelangen infektiöse Trypanosomen in der metazyklischen Form (MF) in die Haut. Diese wandern in lokale Lymphknoten und verteilen sich von dort aus im ganzen Körper. Dabei wandeln sie sich in eine lebhaft bewegliche, teilungsaktive schlanke Form (SF oder long slender) um, die jedoch nicht infektiös für Tsetsefliegen ist. Wenn die Zelldichte ein gewisses Niveau überschreitet, wandeln sich die schlanken in intermediate Formen und schließlich in gedrungene Trypanosomenformen (GF oder short stumpy) um.

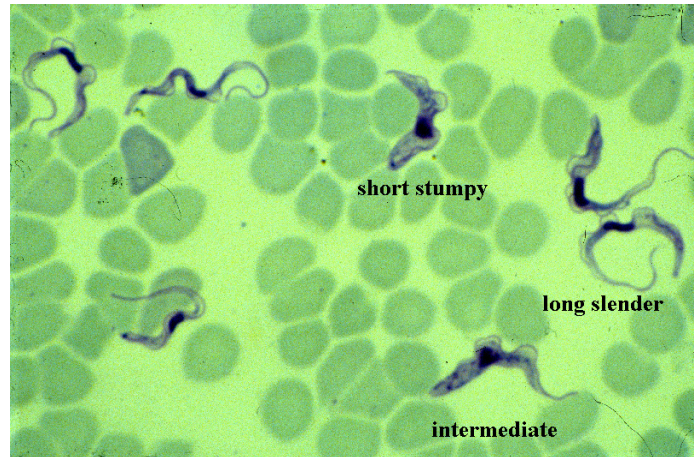


Abbildung 1-13 Giemsa gefärbter Blutaussstrich mit *T. b. brucei* (FU Berlin, Archiv)

Diese können sich nicht mehr teilen, sind aber infektiös für Tsetsefliegen, in denen sie sich weiter entwickeln können (Lucius und Loos-Frank, 2008). Die gedrungenen Formen wandern in den Mitteldarm der Fliege und wandeln sich in prozyklische Formen (PF) um. Dabei verlieren sie die vor der Abwehr des Wirtes schützende Schicht veränderlicher Glykoproteine. Prozyklische Trypanosomenformen teilen sich sehr aktiv, wandern in die Speicheldrüse, entwickeln sich dort weiter in epimastigote Formen (EF) und vermehren sich weiterhin stark. Am Ende des Zyklus wandeln sie sich in die für Mensch und Tier infektiösen metazyklischen Trypanosomen (MF) zurück, die auch wieder den veränderlichen Außenmantel tragen. Dieser Zyklus ist schematisch in folgender Abbildung dargestellt (Stich und Steverding, 2002).

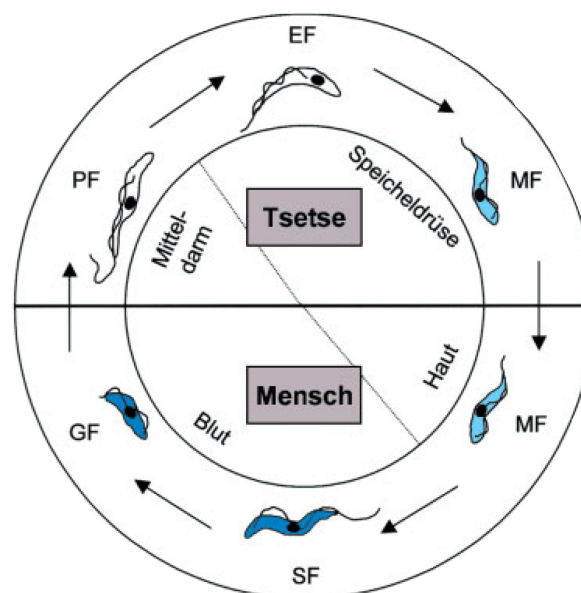


Abbildung 1-14 Entwicklungszyklus von *T. brucei* nach Stich und Steverding (2002); Blau gezeichnete Trypanosomenformen tragen den VSG-Mantel

1.4.4 Kultivierung

Trypanosomen durchlaufen in der Natur einen relativ komplizierten Lebenszyklus, der auch einen Wirtswechsel beinhaltet. Unter experimentellen Bedingungen lässt sich dieser nur schwer aufrechterhalten. Es ist jedoch möglich, die Erreger auf Labortiere zu übertragen und dort faktisch unbegrenzt in Passage zu halten. Verwendet werden vor allem Ratten und Mäuse. *T. b. brucei*, *T. b. rhodesiense* und *T. congolense* können leicht in Labornagern kultiviert werden. Bei *T. b. gambiense* ist das nur nach Immunsupprimierung und langer Adaptationszeit möglich. *T. vivax* kann nicht ohne weiteres auf Labornager übertragen werden. Es gibt jedoch einzelne infektiöse Stämme, bei denen eine Übertragung möglich ist und Stämme, die adaptiert worden sind (Stevens und Brisse, 2004).

In Kultur überleben die Blutstromformen nur wenige Stunden, ohne sich zu vermehren. 1977 gelang es Hirumi *et al.* (1977) durch Verwendung von fibroblastoiden Rinderzellen als Feederlayer Zellen, Trypanosomen auch in Kultur zu halten. Zunächst konnten dadurch aber nur monomorphe Formen gehalten werden. Durch Verwendung von fibroblastoiden Embryonalzellen können auch pleomorphe Trypanosomen in Kultur gehalten werden (Duszenko, 1984). Nach vielfachen Passagen werden die Erreger jedoch monomorph. Die ursprünglich vorhandene Umwandlung von der lang gestreckten Form in die gedrungene Form, die auch infektiös für die Tsetsefliege ist, findet nicht mehr statt. Parallel dazu nimmt auch die Virulenz gegenüber den Labortieren ab. Es gibt zwei Möglichkeiten, die Virulenz trotzdem zu erhalten. Erstens können in regelmäßigen Abständen Passagen mit Tsetsefliegen durchgeführt werden und zweitens können Dauerkulturstabilate in flüssigem Stickstoff bei -198°C angelegt werden, die nur wenige Labortierpassagen hinter sich haben.

Im Grunde ist es möglich alle wichtigen Trypanosomenarten in Kultur zu halten. Baltz *et al.* (1985) fanden ein halbdefiniertes Medium, in dem infektiöse Formen von *T. b. brucei*, *T. b. rhodesiense*, *T. b. gambiense*, *T. evansi* und *T. equiperdum* kultiviert werden können. Brun *et al.* (1982) kultivierten infektiöse Formen von *T. vivax*.

1.5 Bekämpfung der Trypanosomosen

Die entscheidende Rolle bei der Bekämpfung der Schlafkrankheit spielt die Kontrolle der unter dem Risiko stehenden Bevölkerung und die umgehende Behandlung infizierter Menschen. Besonders bei der *Rhodesiense*-Form der Krankheit kommt darüber hinaus der Kontrolle der Tsetsefliegen eine entscheidende Bedeutung zu.

Die Bekämpfung der Nagana stützt sich im Wesentlichen auf drei Säulen. Das sind der Schutz vor Tsetsefliegen, die Züchtung trypanotoleranter Nutzierrassen und der prophylaktische und therapeutische Einsatz von Trypanoziden. Der Anteil an trypanotoleranten Rindern macht weniger als 20 Prozent aus und auf weniger als ein Prozent der von der Tsetsefliege befallenen Fläche wird aktiv Vektorkontrolle betrieben. Die weitaus größte Bedeutung hat der Einsatz von trypanoziden Wirkstoffen. 70 Prozent der unter dem Risiko stehenden Rinder werden mit Trypanoziden behandelt (Allsopp, 1998; Agyemang und Rege, 2004), zitiert nach Grace (2005).

Die antitrypanosomalen Wirkstoffe gegen die Schlafkrankheit haben mit schwerwiegenden Nebenwirkungen, hohen Behandlungskosten und ungewisser Bereitstellung durch die Firmen zu kämpfen. Bei der Tierkrankheit Nagana ist die Resistenz gegen die verfügbaren Wirkstoffe ein Hauptproblem.

1.5.1 Arzneistoffe gegen die Schlafkrankheit

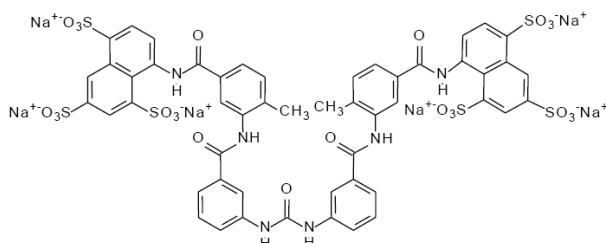
Im Jahre 1906, als Robert Koch (1843-1910) im Auftrag des Deutschen Kaisers seine Viktoriaseeexpedition durchführte, war die Schlafkrankheit noch unheilbar. Während dieser Reise schrieb er mehrere Telegramme an seinen Freund Paul Ehrlich (1854-1915), in denen er verzweifelt darum bat, er solle doch alles daran setzen, eine Arznei gegen diese schreckliche Krankheit zu entwickeln. Nur einige Jahre später entstanden die ersten Wirkstoffe der Firma Bayer, unter anderen Bayer 205, das Suramin, das bis heute wichtiger Bestandteil der Behandlung ist (Stich und Steverding, 2002).

Fünf Medikamente werden gegenwärtig zur Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit eingesetzt, wovon zwei nur in der ersten Phase der Krankheit wirksam sind, in der der Erreger noch nicht die Blut-Hirn-Schranke überquert hat. Für den Wirkstoff Eflornithin ist der Hauptwirkmechanismus geklärt. Die Wirkungsweise der vier anderen Wirkstoffe ist noch weitgehend unbekannt (Krauth-Siegel *et al.*, 2005).

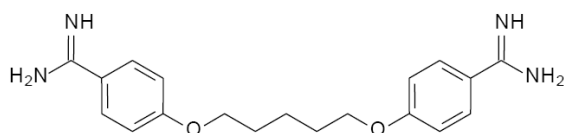
Die folgende Abbildung zeigt die Strukturen der derzeit verwendeten Arzneistoffe gegen die Schlafkrankheit.

(a) Early-stage African trypanosomiasis

(i) Suramin (1916)

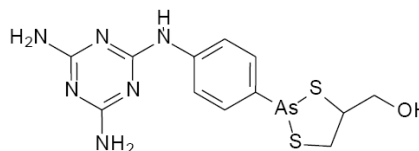


(ii) Pentamidine (1937)

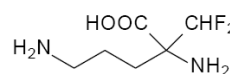


(b) Late-stage African trypanosomiasis

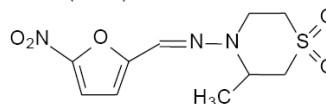
(i) Melarsoprol (1946)



(ii) Eflornithine (1977)



(iii) Nifurtimox (1964)



TRENDS in Parasitology

Abbildung 1-15 Strukturen der Arzneistoffe gegen die frühe und die späte Phase der Schlafkrankheit mit dem Jahr der erstmaligen Synthese nach Fairlamb (2003)

Neue Medikamente sind im Moment nicht in Sicht, obwohl sie dringend nötig wären. Im Mai 2001 schloss die WHO mit dem Pharmahersteller Aventis und später auch mit Bayer ein Abkommen, in dem die Firmen die kostenlose Versorgung des afrikanischen Marktes mit Schlafkrankheitsmedikamenten für die nächsten fünf Jahre zusichern. Ohne diesen Einsatz der WHO, der seitens der Firmen von internationalem Druck und Angst vor Prestigeverlust begleitet war, wäre nicht einmal die Versorgung mit den alten Medikamenten gesichert (Sehnert, 2001; Stich und Firmenich, 2001). Im Oktober 2006 gab es in Genf eine neue Vereinbarung zwischen der WHO und Aventis. Sie umfasst eine Investition von 25 Millionen Dollar über weitere fünf Jahre und stellt dadurch weiterhin die kostenlose Verfügbarkeit der Medikamente Pentamidin, Melarsoprol und Eflornithin sicher (Sanofi-Aventis, 2006). Auch das Unternehmen Bayer, mittlerweile Bayer Schering Pharma, hat den Vertrag um fünf Jahre verlängert und stellt Suramin und Nifurtimox für den afrikanischen Kontinent kostenlos zur Verfügung (Bayer Schering Pharma, 2007).

1.5.1.1 Suramin

Der Wirkstoff Suramin (Germanin[®]) wird von der Firma Bayer hergestellt und wurde bereits 1920 zur Behandlung der Schlafkrankheit eingeführt. Da Suramin aufgrund des hohen Ionisierungsgrades keine therapeutisch wirksame Konzentration in der Zerebrospinalflüssigkeit erreicht, kann es nur in der ersten Phase der Krankheit eingesetzt werden. Der Arzneistoff Suramin ist Mittel der Wahl bei der frühen Phase der *Rhodesiense*-Form der Schlafkrankheit (Burri *et al.*, 2004).

Suramin ist ein polysulfonierter Naphthylharnstoff, der chemisch verwandt ist mit Paul Ehrlichs Trypan Rot. Unter physiologischen Bedingungen trägt er sechs negative Ladungen. Dadurch entsteht eine große Proteinbindung, die verhindert, dass der Stoff aus dem Gastrointestinaltrakt aufgenommen werden kann. Intramuskulär gegeben verursacht Suramin starke lokale Irritationen, deshalb ist eine intravenöse Applikation nötig. Nach intravenöser Applikation erfolgt im Blut eine starke Plasmaproteinbindung, aus der der Wirkstoff nur langsam dissoziiert. Die Plasmahalbwertszeit von Suramin ist eine der längsten von allen Arzneistoffen, die dem Menschen verabreicht werden. Sie beträgt 44-54 Tage (Burri *et al.*, 2004). Noch drei Monate nach Applikation ist Suramin unverändert im Blut feststellbar. Dies erklärt auch die prophylaktischen Eigenschaften dieses Stoffes (Delespoux und De Koning, 2007; WHO, 2009a). Die Heilungsrate von Suramin liegt Berichten zufolge bei 95 Prozent (Apted, 1980).

Es ist noch nicht vollständig aufgeklärt, wie es zur Abtötung der Trypanosomen durch Suramin kommt. Ein Abriss der Literatur deutet darauf hin, dass Suramin viele Enzyme und Rezeptoren inhibiert wie die Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, die RNA-Polymerase und -kinasen, die Thymidinkinase, die Hexokinase, die Reverse Transkriptase und viele mehr (Burri *et al.*, 2004). Dies würde auch erklären, dass bisher keine signifikanten Resistenzen festzustellen sind (Fairlamb, 2003).

Sofort auftretende lebensbedrohliche Nebenwirkungen sind Kollaps mit Übelkeit, Erbrechen und Schock. Gravierende Spätreaktionen sind Nierenschäden, exfoliative Dermatitis, Agranulozytose, hämolytische Anämie, Gelbsucht und schwere Durchfälle, wobei jede Nebenwirkung für sich tödlich ausgehen kann (Fairlamb, 2003). Nach dem typischen Behandlungsprotokoll bekommen Patienten 5 mg/kg KG an Tag eins, 10 mg/kg KG an Tag drei und 20 mg/kg KG an den Tagen fünf, elf, dreiundzwanzig und dreißig, gegeben durch langsame intravenöse Injektion (Legros *et al.*, 2002).

Suramin wird auch zur Behandlung der Onchozerkose (Flussblindheit) verwendet, die durch Filarien (Fadenwürmer) ausgelöst wird (Rougemont *et al.*, 1984; McGeary *et al.*, 2008).

1.5.1.2 Pentamidin

Pentamidin (Lomidin[®]), wird durch die Firma Aventis hergestellt und ist seit 1940 im Einsatz. Es wird nur in der ersten Phase der Schlafkrankheit verwendet, da in der Zerebrospinalflüssigkeit nur geringe Konzentrationen des Wirkstoffes erreicht werden können. Pentamidin ist das Standardmittel bei der *Gambiense*-Form der Schlafkrankheit (Burri *et al.*, 2004).

Pentamidin wird in Form von Pentamidinisethionat verwendet. Es ist eine aromatische Diamidinverbindung, die bei physiologischem pH-Wert stark protoniert vorliegt und deshalb eine schlechte Resorption über den Gastrointestinaltrakt aufweist. Da bei intravenöser Gabe schwere hypotensive Reaktionen auftreten können, wird es intramuskulär verabreicht. Bei der Behandlung mit Pentamidin wird über Heilungsraten von 98 Prozent berichtet (WHO, 1986).

Der Wirkmechanismus von Pentamidin ist noch weitgehend unbekannt. Bekannt ist, dass Pentamidin an negativ geladene zelluläre Bestandteile, wie Phospholipide und Nukleinsäuren bindet und die Struktur der kDNA zerstört. Es werden auch viele weitere Mechanismen diskutiert (Fairlamb, 2003).

Ein nachweisbarer Anteil an Pentamidin verbleibt nach Applikation über mehrere Monate in Leber und Niere. Im Pankreas kann Pentamidin Schaden anrichten, der zu Diabetes führen kann (Fairlamb, 2003). Im Vergleich zu Suramin wird Pentamidin jedoch normalerweise gut vertragen. Abfall des Blutdrucks und des Blutzuckerspiegels sind die häufigsten Nebenwirkungen.

Das derzeit vorgeschlagene Behandlungsmuster besteht aus sieben bis zehn Dosen von 4 mg/kg pro Tag durch intramuskuläre Gabe, die täglich oder jeden zweiten Tag verabreicht werden (Legros *et al.*, 2002).

Gegen Pentamidin wurden noch keine Resistenzen festgestellt, obwohl der Arzneistoff seit über 60 Jahren bei der häufiger vorkommenden *Gambiense*-Form der Schlafkrankheit verwendet wird. Dies ist umso erstaunlicher, als es in den 1950er und 1960er Jahren ein Prophylaxeprogramm mit Pentamidin gab, bei dem Millionen von

Menschen über zwei Jahrzehnte alle sechs Monate mit geringen Dosen behandelt wurden. Pentamidin wird auch zur Therapie der Leishmaniose verwendet (Delespoux und De Koning, 2007; WHO, 2009a).

1.5.1.3 Melarsoprol

Melarsoprol (Mel B, Arsobal[®]), hergestellt von der Firma Aventis wurde 1949 eingeführt und löste in der Behandlung der Spätphase der beiden Formen der Schlafkrankheit andere Arsenpräparate ab, die aufgrund von Resistenzen unwirksam geworden waren (Delespoux und De Koning, 2007). Melarsoprol ist unlöslich in allen üblichen Lösungsmitteln, deshalb muss auf Propylenglykol zurückgegriffen werden. Weil dieses Lösungsmittel stark gewebereizend wirkt, wird es streng intravenös injiziert und ein Austreten ins Gewebe muss verhindert werden. Die Applikation ist sehr schmerzhaft und gefährlich. Über eine orale Verabreichung des Stoffs wurde berichtet, sie wurde allerdings nie entsprechend dokumentiert (Burri *et al.*, 2004). Melarsoprol ist ein Prodrug, das im Körper schnell in Melarsenoxid umgewandelt wird. Im Blut bindet es schnell und reversibel an Serumproteine. Innerhalb weniger Tage wird es im Körper zu nichttoxischen Metaboliten abgebaut.

Die selektive Wirkung von Melarsoprol ist wahrscheinlich durch die Aufnahme in den Parasiten über den trypanosomalen P2-Purintransporter bedingt. Melarsoprol ist eine trivalente Arsenverbindung, Verbindungen wie diese können mit benachbarten Thiolgruppen wechselwirken und so viele Enzyme oder Substrate innerhalb der Zelle inhibieren. Melarsoprol hemmt dadurch eine Reihe von wichtigen metabolischen Funktionen und Transportfunktionen, weitere Mechanismen werden diskutiert (Fairlamb, 2003).

Als gravierende Nebenwirkung zeigt sich in 5-10 Prozent der Fälle eine reaktive Enzephalopathie mit Kopfschmerzen, Zittern und Krämpfen. Bei 10-70 Prozent der Patienten mit dieser Komplikation kommt es zu schwerem Verlauf, der zu Koma und Tod führt (Pepin *et al.*, 1989; WHO, 1998). Die Applikation erfolgt deshalb nur unter Überwachung im Krankenhaus (WHO, 2009a). Andere häufige Nebenwirkungen sind Erbrechen, Bauchkoliken, periphere Neuropathie, Gelenkschmerzen und Thrombophlebitis, als Folge des Durchsickerns von Propylenglykol in Gewebsschichten an der Injektionsstelle (Fairlamb, 2003).

Dennoch bleibt Melarsoprol das wichtigste Medikament in der Behandlung der Spätphase der beiden Formen der Schlafkrankheit und bei der *Rhodesiense*-Form sogar das einzige. Es kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden und Erreger, die bis ins Zentralnervensystem vorgedrungen sind, vernichten (WHO, 2009a). Aus Blut und Lymphe kann Melarsoprol die Erreger bei den meisten Patienten innerhalb von 24 Stunden abtöten (Burri *et al.*, 2004).

Das lange Zeit verwendete Therapieregime wurde entwickelt über die so genannte Versuchs-und-Irrtums-Methode. Es bestand aus drei bis vier Serien von drei oder vier Injektionen in Form einer intravenösen Injektion pro Tag (Legros *et al.*, 2002). Kürzlich durchgeführte pharmakokinetische Studien eines verkürzten Zehntagesverlaufs statt des Programms über 21-35 Tage waren erfolgreich. Dieses verkürzte Behandlungsschema führt zu höherer Patientencompliance und senkt Krankenhauskosten (Croft *et al.*, 2005). Auf anderer Ebene war diese Studie jedoch enttäuschend. Die Häufigkeit einer reaktiven Enzephalopathie ist durch die neue Behandlungsart nicht geringer geworden (Fairlamb, 2003).

Nach Behandlung der Spätphase der *Gambiense*- oder *Rhodesiense*-Form der Schlafkrankheit gibt es nur in fünf Prozent der Fälle einen Rückfall (WHO, 2009a). Aufgrund von zunehmender Resistenzbildung nahmen jedoch in den letzten zehn Jahren Behandlungsausfälle mit Melarsoprol auf bis zu 20 Prozent zu (WHO, 2009a), besonders bei der *Gambiense*-Form in hoch endemischen Gebieten (Delespaux und De Koning, 2007).

1.5.1.4 Eflornithin

Der 1990 eingeführte Wirkstoff Eflornithin (α -Difluoromethylornithin, DFMO, Ornidy1[®]), hergestellt von Aventis ist der einzige neuere Wirkstoff in der Therapie der Schlafkrankheit. Eflornithin überquert relativ leicht die Blut-Hirn-Schranke und wird sowohl für die frühe als auch für die späte Phase der westafrikanischen Schlafkrankheit eingesetzt. Es wirkt sogar wenn die Therapie mit Melarsoprol versagt und ist für diese Indikation, das einzig zugelassene Medikament (Delespaux und De Koning, 2007). Im Vergleich zur konventionellen Therapie mit Melarsoprol sind die Häufigkeit und der Schweregrad der Nebenwirkungen viel geringer. Jedoch treten auch bei Eflornithin therapiebedingte Todesfälle auf. Deren Häufigkeit liegt bei unter vier Prozent. Da durch

Eflornithin auch denjenigen Menschen geholfen werden kann, die bereits im Koma liegen, gab man dem Wirkstoff den Namen Auferstehungsmedikament (Stich und Firmenich, 2001).

Eflornithin wirkt durch spezifische irreversible Inhibition des Enzyms Ornithindecaboxylase, das den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Polyamin-Biosynthese katalysiert, die Bildung von Putrescin aus Ornithin (Grishin *et al.*, 1999). Da viele Protozoen auf den Polyaminstoffwechsel angewiesen sind, erklärt sich so die Wirkung oder zumindest das Primärtarget. Wie genau es zum eigentlichen zytostatischen Effekt im Trypanosom kommt, ist nicht geklärt (Krauth-Siegel *et al.*, 2005). Die Spezifität von Eflornithin beruht auf der unterschiedlichen *in vivo* Halbwertszeit des Enzyms Ornithindecaboxylase. Während das Enzym im Säuger in 10-20 Minuten umgesetzt wird, weist das Enzym in *T. b. gambiense* eine Halbwertszeit von 18-19 Stunden auf. Das Versagen von Eflornithin bei der ostafrikanischen Schlafkrankheit kann durch die kürzere Halbwertszeit in *T. b. rhodesiense* von 4 Stunden erklärt werden (Iten *et al.*, 1997).

Trotz der Verbesserung der Situation, die Eflornithin offensichtlich mit sich bringt, gibt es in der Praxis einige Schwierigkeiten. Es müssen sehr hohe Dosen eingesetzt werden, zur Verabreichung ist eine Dauerinfusion notwendig und das Arzneimittel ist sehr teuer (Croft *et al.*, 2005). Für eine Behandlung benötigt man täglich eine Menge von 400 mg/kg KG, die in Form von vier Infusionen in einem sechsstündigen Intervall gegeben werden. Jede Infusion dauert vier Stunden. Diese Behandlung muss in der Form über einen Zeitraum von 7 oder 14 Tagen durchgeführt werden (Fairlamb, 2003). Die Geschichte der Einführung von Eflornithin zeigt eindrucksvoll die Schwierigkeiten aber auch einen möglichen Weg zu einem neuen Wirkstoff gegen die Schlafkrankheit. Ursprünglich war Eflornithin für die Therapie des Mammakarzinoms entwickelt worden, hat dort aber nur ungenügende Wirkung gezeigt. 1980 wurde zum ersten Mal die Wirkung gegen Trypanosomen vorgestellt (Bacchi *et al.*, 1980). Auch in den folgenden Studien zeigten sich gute Erfolge, so dass es daraufhin von der Firma Merrell produziert wurde (Stich und Firmenich, 2001). Mitte der 1990er fand eine große Firmenfusion statt, die zur Folge hatte, dass die Produktion von Eflornithin mangels Rentabilität wieder eingestellt wurde. Das Patent wurde an die WHO weitergegeben, die seitdem vergeblich auf der Suche nach einem neuen Produzenten war. Denn zum einen

ist der Grundstoff aufgrund der Fluorchemie aufwändig und teuer herzustellen und zum anderen ist für ein Antischlafkrankheitsmittel zwar ein großer Bedarf, aber aufgrund der wirtschaftlichen Lage in den betroffenen Ländern kein profitabler Markt zu erwarten. Endlich war ein besserer Arzneistoff entdeckt worden, aber es gab keinen Produzenten. Im Jahr 2000 kam in den USA eine neue Enthaarungscreme zur Therapie des Damenbartes auf den Markt. Der Name der Creme ist Vaniqua[®] und der Wirkstoff Eflornithin. Damit war völlig unerwartet eine neue Produktionsstätte für Eflornithin entstanden. Jedoch scheiterten die Verhandlungen mit dem Hersteller an der Übernahme der Kosten, die für die wenigen notwendigen Schritte zur Aufreinigung des Produktes für die intravenöse Gabe nötig gewesen wären (Stich und Firmenich, 2001). Ohne den Nutzen einer Enthaarungscreme in Abrede stellen zu wollen, war somit eine paradoxe Situation entstanden. Zum einen scheitert die Behandlung von Menschen, die an der tödlichen Schlafkrankheit leiden am Mangel eines Produzenten für Eflornithin, zum anderen verwenden Frauen in der westlichen Welt den gleichen Stoff als Lifestyle-Medikament für mehr oder weniger kosmetische Zwecke. Durch diese Situation wuchs der öffentliche Druck auf die Hersteller so stark, dass der durch Fusionen aus der Firma Merrell hervorgegangene Konzern Aventis sich glücklicherweise bereit erklärte, das Medikament wieder zu produzieren und zur Verfügung zu stellen (Stich und Firmenich, 2001).

1.5.1.5 Nifurtimox

Die 5-Nitrofuranderbindung Nifurtimox (Lampit[®]), produziert von Bayer, wurde in den 1960er Jahren zur Behandlung der Chagaskrankheit eingeführt (Wegner und Rohwedder, 1972). Der Mangel an Medikamenten zur Behandlung der Spätphase der Schlafkrankheit, vor allem bei melarsoprolrefraktären Fällen, lenkte die Aufmerksamkeit auf diese Substanz und auch auf andere Nitroheterocyclus. In den 1980er und 1990er Jahren wurden mehrere kleinere Studien mit Nifurtimox zur Behandlung von *T. b. gambiense* durchgeführt, die widersprüchliche Ergebnisse zeigten (Legros *et al.*, 2002). Nifurtimox hat jedoch die beiden großen Vorteile, dass es relativ preiswert herzustellen und oral zu verabreichen ist (Delespaux und De Koning, 2007). Die Wirkung von Nifurtimox hängt wahrscheinlich mit der Produktion von Superoxid, Wasserstoffperoxyd und freien Radikalen zusammen, die durch zyklische Reduktion

und Oxidation der Nitrogruppe entstehen. Der dadurch entstehende oxidative Stress könnte zelluläre Bestandteile des Erregers wie DNA, Membranlipide und Proteine zerstören (Docampo, 1990; Fairlamb, 2003).

Als Nebenwirkungen sind Anorexie und neurologische Ausfälle extrem verbreitet. Dies führt bei der Behandlung der Chagaskrankheit dazu, dass 50 Prozent der Patienten nicht den ganzen Behandlungszyklus abschließen können (Legros *et al.*, 2002; Fairlamb, 2003).

Für die Monotherapie ist Nifurtimox nicht geeignet. In Kombination mit anderen Wirkstoffen ist es jedoch sehr wirksam.

1.5.1.6 Kombinationstherapien

Die Kombinationstherapie aus niedrig dosiertem Melarsoprol mit Nifurtimox, die über einen Zeitraum von 10 Tagen verabreicht wird, hat sich als effektiver herausgestellt als die Monotherapie mit Melarsoprol (Bisser *et al.*, 2007). In der Demokratischen Republik Kongo ist die Kombination aus Melarsoprol und Nifurtimox zur Behandlung der melarsoprolrefraktären Schlafkrankheit in das Kontrollprogramm aufgenommen worden (Bisser *et al.*, 2007; Delespaux und De Koning, 2007).

Eine Kombinationstherapie von Nifurtimox, das oral verabreicht wird und Eflornithin, das intravenös gegeben wird, wurde in einer groß angelegten klinischen Studie Phase III positiv untersucht und im Mai 2009 von der WHO in die Essential Medicines List aufgenommen. Seitdem ist diese Kombinationstherapie verfügbar zur Behandlung von Patienten in der zweiten Phase der *gambiense*-Form der Schlafkrankheit. Im Vergleich zur Monotherapie mit Eflornithin ist die Kombinationstherapie genauso effektiv aber sicherer. Darüber hinaus reduziert sich die Anzahl der Eflornithininfusionen pro Patient von 56 auf 14 und die Behandlungsdauer von 14 auf 10 Tage. Außerdem können die Kosten pro Patient von 446,50 Euro auf 222,50 Euro reduziert werden. Das Risiko einer Resistenzentwicklung ist bei einer Kombinationstherapie mit zwei Wirkstoffen mit unterschiedlichem Wirkmechanismus geringer, was einen zusätzlichen Vorteil darstellt (NECT, 2009; Priotto *et al.*, 2009).

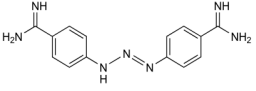
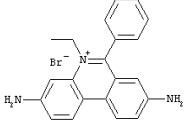
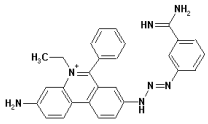
1.5.2 Arzneistoffe gegen die Nagana

Drei Wirkstoffe spielen bei der Bekämpfung der Nagana bei Wiederkäuern eine zentrale Rolle: Diminazenaceturat, Homidium in Form des Bromids sowie des Chlorids und

Isometamidiumchlorid (Holmes *et al.*, 2004). In betroffenen Gebieten, in denen 40-60 Millionen Rinder unter dem Risiko einer Infektion mit Nagana stehen, haben sowohl Bauern als auch Tierärzte eine ständige Nachfrage nach trypanoziden Wirkstoffen. Jedes Jahr werden rund 35 Millionen Dosen der Medikamente verabreicht. Der Gesamtwert des Marktes übersteigt 30 Millionen US Dollar. Für große Pharmakonzerne ist der Markt dennoch nicht groß genug, um die Kosten von Entwicklung und Zulassung eines neuen Wirkstoffes zu decken, der 250 Millionen US Dollar übersteigen kann (FAO, 2009). Deshalb ist gegen die Nagana leider auch in naher Zukunft nicht mit einem neuen Arzneistoff zu rechnen.

Angesichts der zunehmenden Resistenzentwicklung gegen die vorhandenen drei Wirkstoffe, spitzt sich die Lage immer mehr zu. Aus mindestens 13 Ländern stammen Berichte über die Resistenz gegenüber einem oder mehreren trypanozider Wirkstoffe. Besonders betroffen sind Gegenden mit hoher Übertragungsrate und hohem Arzneimittelgebrauch (Geerts und Holmes, 1998). Untersuchungen zum Vorkommen und der Verbreitung von Medikamentenresistenzen sind wichtig, um die vorhandenen Medikamente strategisch besser einsetzen zu können (Clausen, 2005). Folgende Tabelle zeigt die drei wichtigsten Arzneistoffe gegen die Nagana und deren Anwendungsgebiete.

Tabelle 1-3 Wirkstoffe gegen Nagana und ihre Anwendungen, abgewandelt nach Peregrine (1994)

Wirkstoff	Struktur	Verwendung	Wirkung	Tier
Diminazen -aceturat		Therapie	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i> (<i>T. brucei</i>)	Rinder kl. Wiederkäuer [Hunde]
Homidium -chlorid bzw. -bromid		Therapie/ Prophylaxe	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i>	Rinder kl. Wiederkäuer Schweine [Pferde]
Isometamidium -chlorid		Therapie/ Prophylaxe	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i> <i>T. brucei</i>	Rinder kl. Wiederkäuer Pferde

() eingeschränkte Aktivität, [] geringer therapeutischer Index, kl. = kleine

Bei Infektionen mit *T. congolense* und *T. vivax* ist das Zentralnervensystem nicht beteiligt. Deshalb ist die Überquerung der Blut-Hirn-Schranke für diese Wirkstoffe

nicht nötig (Barrett *et al.*, 2004). Die Behandlung von Infektionen mit *T. brucei*, bei denen das ZNS beteiligt ist, gestaltet sich etwas schwieriger und es gibt häufig Rückfälle, weil keines der verfügbaren Medikamente die Erreger im Gehirn vollständig beseitigen kann (Steuber und Kroker, 2006).

Bei Tierarzneimitteln gibt es generell niedrigere Standards der Qualitätskontrolle als bei Arzneimitteln, die für den Menschen bestimmt sind. In den letzten 40 Jahren wurden die drei Wirkstoffe vor allem von drei großen europäischen Pharmaunternehmen angeboten. In letzter Zeit erschien eine Reihe von generischen Formen dieser Stoffe von Nachahmerfirmen auf dem afrikanischen Markt, zum Teil mit zweifelhafter Qualität. Neben dem Verlust an Wirksamkeit wird damit auch das Vertrauen der Bauern in Trypanozide untergraben (Holmes *et al.*, 2004). Geringe Wirkstoffmengen in diesen Präparaten fördern außerdem die Resistenzentwicklung der Trypanosomen (Barrett *et al.*, 2004).

Außer den bisher genannten drei Wirkstoffen werden Quinapyramin in Form zweier Salze, Suramin und Melarsomin bei Trypanosomen-Infektionen von Tieren verwendet (Peregrine, 1994). Sie spielen jedoch keine Rolle bei Rindern und werden deshalb hier nur erwähnt.

1.5.2.1 Diminazenaceturat

Diminazen in Form seines Aceturats ist der am häufigsten zur Therapie der Nagana eingesetzte Arzneistoff. Er wurde 1955 von den Farbwerken Hoechst unter dem Namen Berenil[®] eingeführt (Jensch, 1955). Präparate von Nachahmerfirmen tragen die Namen Azidin[®], Ganasag[®], Ganaseg[®], Veriben[®] oder Pirocide[®]. Diminazenaceturat ist relativ preiswert, breit verfügbar und gut wirksam. In der Phase II ist auch Diminazen nicht mehr stark genug. Die Applikation erfolgt intramuskulär, Anwendungsgebiete sind in Tabelle 1-3 wiedergegeben (Delespaux und De Koning, 2007).

Der Wirkmechanismus der Diamidinverbindungen ist noch nicht vollständig geklärt. Die Wirkung beruht wohl auf der Bindung an die kDNA. Dadurch wird die Transkription behindert und die Bildung DNA-abhängiger Enzyme beeinträchtigt. Andere Targets können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Der Wirkstoff erreicht nach 15-45 Minuten seine Maximalkonzentration im Plasma und wird relativ schnell

aus dem Organismus abgebaut. Diminazenaceturat kann deshalb nur zur Therapie und nicht zur Prophylaxe eingesetzt werden (Peregrine und Mamman, 1993).

Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Berichten über Resistenzen gegen Diminazenaceturat. Diese stammen aus vielen Teilen Afrikas und betreffen mehrere Trypanosomenspezies. Große Probleme treten vor allem in hoch endemischen Gebieten auf, wo die Resistenzbildung besonders groß ist und Kreuzresistenzen zu den Alternativmedikamenten bestehen (Clausen *et al.*, 1992; Afewerk *et al.*, 2000; Delespaux und De Koning, 2007).

Diminazenaceturat wird auch gegen die durch Zecken übertragene Babesiose eingesetzt (Delespaux und De Koning, 2007).

1.5.2.2 Homidiumbromid/-chlorid

Die trypanozide Wirkung der Homidiumverbindungen wurde bereits Ende der 30er Jahre entdeckt. Handelsnamen sind Novidium[®] für Homidiumchlorid und Ethidium[®] für Homidiumbromid. Der Wirkstoff wird speziell gegen die beiden Erreger *T. congolense* und *T. vivax* bei Rindern, kleinen Wiederkäuern und bei Schweinen eingesetzt. Die Anwendung erfolgt intramuskulär (Peregrine, 1994).

Homidium gehört zur Gruppe der Phenanthridine. Der Wirkmechanismus ist noch nicht genau bekannt. Es wurde gezeigt, dass die Verbindungen glycosomale Funktionen, die Funktion eines ungewöhnlichen AMP (Adenosin-Monophosphat)-Bindungsproteins, des Trypanothion-Metabolismus und die Replikation von *kinetoplast minicircles* stört (Holmes *et al.*, 2004). Die beiden Homidiumverbindungen werden nur zur Therapie eingesetzt. Die prophylaktischen Eigenschaften des Stoffes sind eingeschränkt (Holmes *et al.*, 2004). Der extensive Einsatz des Arzneistoffs in den 1960er und 1970er Jahren hat zu Resistenzen geführt (Kinabo 1993).

Homidiumbromid wird auch als Ethidiumbromid bezeichnet. Als fluoreszierender Phenanthridin-Farbstoff wird es in der Molekularbiologie zum Nachweis von DNA und RNA, verwendet. Obwohl seit langem bekannt ist, dass die Verbindungen Homidiumchlorid und vor allem Homidiumbromid mutagene Wirkung haben, sind die Substanzen gegen die Nagana nach wie vor im Einsatz (Holmes *et al.*, 2004).

1.5.2.3 Isometamidiumchlorid

Isometamidiumchlorid ist seit 1961 zugelassen und wird seit vielen Jahrzehnten prophylaktisch und therapeutisch für Nutzvieh verwendet. Handelspräparate tragen die Namen Samorin[®], Trypamidium[®] oder Veridium[®]. Hauptsächlich wird es zur Prophylaxe eingesetzt und kann einen sechsmonatigen Schutz gegen eine Infektion mit Trypanosomen gewähren (Holmes *et al.*, 2004). Es ist ein amphiphiles kationisches Phenanthridin, das durch Kopplung von Homidium mit einem Teil des Diminazenmoleküls entstand. Das breite Anwendungsspektrum der Verbindung zeigt Tabelle 1-3.

Isometamidiumchlorid wird tief intramuskulär appliziert, wobei an der Injektionsstelle eine Art Depot entsteht, aus der der Wirkstoff nur langsam ins Blut gelangt. Die maximale Konzentration im Blut wird bereits nach einer Stunde erreicht. Geerts *et al.* (1997a) stellten bei intramuskulärer Applikation eine Schutzperiode von durchschnittlich vier bis sieben Monaten fest. Zur Verlängerung der prophylaktischen Wirkung wurden so genannte Sustained Release Devices (SRD) entwickelt, Isometamidiumimplantate, die unter der Haut platziert werden (Geerts *et al.*, 1997b). Die durchschnittliche Schutzperiode konnte dadurch auf 20 Monate erhöht werden (Geerts *et al.*, 1997a).

Der wichtigste angenommene Wirkmechanismus ist die Teilung von kDNA-Topoisomerase Komplexen, die den Abbau des *minicircle* Netzwerkes innerhalb des Kinetoplasten bewirkt. Isometamidiumchlorid wird seit mehreren Jahrzehnten gegen *T. congolense*, *T. vivax* und *T. brucei* therapeutisch und prophylaktisch eingesetzt. Bereits 1967, wenige Jahre nach den ersten dokumentierten Behandlungen, wurden die ersten Resistenzen festgestellt (Na'Isa, 1967) und es gibt immer mehr Berichte über Therapieversager (Clausen *et al.*, 1992; Geerts und Holmes, 1998; Gall *et al.*, 2004; Awa und Ndamkou, 2006; Mamoudou *et al.*, 2008). Resistenzen entstehen dort, wo ein großer Teil der Trypanosomenpopulation dem Wirkstoff häufig ausgesetzt wird oder dort wo es häufig zu einer Unterdosierung kommt. Meist besteht Kreuzresistenz zu dem Alternativmedikament Homidium (Delespaux und De Koning, 2007).

1.5.3 Entwicklungsansätze für neue Wirkstoffe

Die pharmazeutische Industrie hat sich von der Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Tropenkrankheiten zurückgezogen. Seitdem liegt die Hoffnung auf dem öffentlichen Sektor. Trypanosomen waren in den letzten 20 Jahren beliebtes Objekt für die Grundlagenforschung. Solche Arbeiten führten jedoch bislang nicht zu einer greifbaren Verbesserung in Diagnose, Therapie und Kontrolle der Schlafkrankheit (Stich und Steverding, 2002). Bis auf die Einführung von Eflornithin gab es in den letzten 25 Jahren keine neuen chemotherapeutischen Wirkstoffe (Croft *et al.*, 2005). Wenn die pharmazeutische Industrie nicht aktiv in gut finanzierte öffentlich-private Forschungszusammenschlüsse einbezogen werden kann, könnte es weitere hundert Jahre dauern, bevor neue Arzneistoffe auftauchen, die die existierenden ersetzen können (Fairlamb, 2003).

Trotz dieser schlechten Prognosen für ein neues Medikament auf dem Markt, gibt es mehrere Ansätze zur Entwicklung neuer Wirkstoffe. Drei Richtungen sind dabei derzeit bestimmend. Die erste ist die Untersuchung von traditionell eingesetzten Pflanzen mit dem Versuch der Aufklärung von Wirkprinzipien. Zum zweiten werden Medikamente, die bereits zur Behandlung anderer Krankheiten zugelassen sind als Quelle für neue Wirkstoffe in der Therapie der Trypanosomen genutzt. Untersucht werden aktuell die Bisphosphonate, die zur Behandlung von Osteoporose auf dem Markt sind (Dove, 2001; Ferella *et al.*, 2008). Ein dritter Weg besteht in der Aufklärung selektiver Ziele für ein passgerechtes Wirkstoffdesign. Einige dieser Targets werden im Folgenden aufgeführt.

Trypanosomen besitzen ein starkes antioxidatives System, um der Immunabwehr in Form von reaktiven Sauerstoffspezies zu entgehen. Im Zentrum dieses Hydroperoxid-Entgiftungssystems steht neben weiteren Thiol- und Dithiolproteinen das parasiten-spezifische Dithiol Trypanothion. Enzyminhibitoren könnten dieses antioxidative System blockieren und der Erreger wäre der Abwehr ausgesetzt (Krauth-Siegel und Comini, 2008).

Afrikanische Trypanosomen sind im Säugetierblut absolut abhängig von Glukose, um ATP aufzubauen (Opperdoes, 1987). Der Glukoseabbau endet bei Pyruvat, das der Parasit ausscheidet. Die Strukturen der glykolytischen Enzyme, die in den Glykosomen kompartimentiert sind, unterscheiden sich von denen der Säuger. Diese Enzyme zu inhibieren ist ein Weg, der verfolgt wird (Verlinde *et al.*, 2001). Da Pyruvat

ausgeschieden wird und nicht zu Laktat reduziert wird oder in den Krebszyklus eingeschleust wird, ist ein alternatives System nötig, um das NADH, das in der Glykolyse produziert wird, zu reoxidieren (Tielens und Van Hellemond, 1999). Von diesem alternativen oxidativen Stoffwechselweg sind die Blutstromformen von *T. brucei* zur Zellatmung vollkommen abhängig (Clarkson *et al.*, 1989; Chaudhuri *et al.*, 2006). Dieser metabolische Unterschied zwischen dem Parasiten und seinem Wirt macht die trypanosomale alternative Oxidase (TAO) zu einem attraktiven Target für das Wirkstoffdesign (Nihei *et al.*, 2002).

Trypanosomen sind auxotroph für Purine, das heißt, die Fähigkeit, Purine herzustellen, ging verloren, so dass sie auf deren Aufnahme von außen angewiesen sind. Die Mechanismen der Purin-Aufnahme gelten deshalb ebenfalls als aussichtsreiche Targets (Carter *et al.*, 2001).

T. b. brucei beziehungsweise *T. b. rhodesiense* besitzen Cysteinproteasen mit den Namen Brucipain und Rhodesain. Diese Enzyme sind für die proteolytische Aktivität der Trypanosomen verantwortlich und sind in den Lysosomen lokalisiert. In mehreren Untersuchungen an Trypanosomen in Zellkultur und in Mäusen hat sich herausgestellt dass diese Proteasen ein wertvolles Target für die Entwicklung neuer Wirkstoffe sein können. Sowohl Peptidylinhibitoren als auch peptidomimetische Inhibitoren wurden dabei getestet (Caffrey *et al.*, 2000).

Wissenschaftler der britischen Universität Lancaster haben herausgefunden, dass die Geißel der Blutstromform dem Trypanosom nicht nur der Fortbewegung dient, sondern auch essentiell für die Teilung und damit für das Überleben des Parasiten ist. Durch Abschalten von Geißelproteinen wurden zwar weiterhin Geißeln erzeugt, das Erbgut vervielfältigt und die Zellkerne geteilt, aber die Teilung in Tochterzellen war nicht mehr möglich, so dass Monsterzellen mit mehreren Geißeln und Zellkernen entstanden, die nach kurzer Zeit abstarben (Broadhead *et al.*, 2005).

Forscher aus der Max-Planck-Gesellschaft in München stellen einen Zusammenhang her zwischen dem Überleben der Erreger zwischen der großen Menge an Antikörpern und der schnellen und unabweichlichen Vorwärtsbewegung der Trypanosomen. Sie konnten zeigen, dass Antikörper, die an der Zelloberfläche andocken wollen, durch diese schnelle Bewegung zum hinteren Ende transportiert werden und in der Geißeltasche von den Zellen aufgefressen und verdaut werden. Könnte man die

Bewegung der Trypanosomen hemmen, wären sie der Immunabwehr ausgesetzt (Engster *et al.*, 2007).

Durch die Entschlüsselung des Genoms der Trypanosomen wird es möglich, auf diesem Weg weitere Targets aufzuzeigen. Das Genom von *T. b. brucei* ist bereits aufgeklärt (Berriman *et al.*, 2005) und es bestehen bereits Genomprojekte zur Aufklärung von *T. b. gambiense*, *T. congolense* und *T. vivax* (Sanger Institute, 2009).

Bis vor kurzem befand sich nur eine Substanz zur Behandlung der Schlafkrankheit in klinischen Studien. Das oral verfügbare Prodrug DB289 (Pafuramidinmaleat) mit der chemischen Bezeichnung 2,5-Bis(4-amidinophenyl)-furan-bis-O-Methylamidoxim (Rahmathullah *et al.*, 1999). Der potentielle Arzneistoff erhält umfangreiche finanzielle Unterstützung von der Bill und Melinda Gates Stiftung und befindet sich bereits in der klinischen Phase III (Delespaux und De Koning, 2007). Eine kürzlich veröffentlichte Studie die an Affen durchgeführt wurde, die mit *T. b. rhodesiense* infiziert wurden, deutet darauf hin, dass DB289 die Blut- Hirn- Schranke nur eingeschränkt passieren kann (Mdachi *et al.*, 2009). Aber allein die Verfügbarkeit eines oral anwendbaren Stoffes für die erste Phase der Krankheit wäre eine erhebliche Erleichterung in der Behandlung (Croft *et al.*, 2005). Kürzlich wurde auf dem Kongress des International Scientific Council for Trypanosomiasis Research and Control (ISCTRC) über eine Leber- und Nierenschädigung durch den Stoff berichtet. Welche Konsequenzen sich daraus für die Zukunft des Wirkstoffs ergeben bleibt abzuwarten (Pohlig *et al.*, 2009).

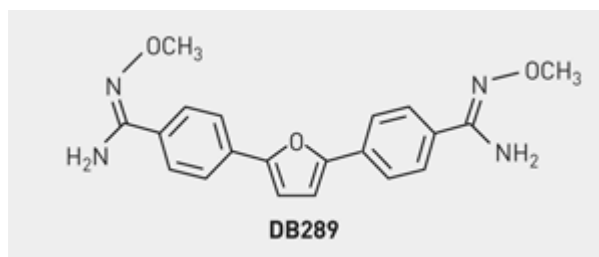


Abbildung 1-16 Struktur der Verbindung DB289

Inzwischen gibt es bereits viel versprechende Untersuchungen zu zwei Aza-Analoga von DB289 als neue Kandidaten zur Behandlung der Phase II der Schlafkrankheit (Wenzler *et al.*, 2009).

Ein anderes Diamidin, das Diminazenaceturat (Berenil[®]), das in der Veterinärmedizin im Einsatz ist (siehe Kapitel 1.5.2.1), ist auch oral aktiv und wurde *off label* schon am Menschen angewendet. Jedoch entwickelt Diminazenaceturat bei Infektionen im Labor

schnell eine Kreuzresistenz gegenüber Melarsoprol. Eine Melarsoprolresistenz könnte für die klinische Situation verheerende Konsequenzen haben, was den Einsatz von Diminazenaceturat beim Menschen beschränkt (Barrett und Fairlamb, 1999; Fairlamb, 2003; De Koning, 2008).

Seit September 2009 befindet sich eine neue Verbindung in der klinischen Phase I zur Behandlung der Schlafkrankheit, die 5-Nitroimidazol-Verbindung Fexinidazol. Die Verbindung kann oral verabreicht werden und ist sowohl gegen *T. b. gambiense* als auch gegen *T. b. rhodesiense* aktiv. In Tierexperimenten hat sie ausgezeichnetes Sicherheitsprofil gezeigt und konnte die Blut-Hirn-Schranke überwinden, das heißt die Verbindung könnte auch für die Phase II der Schlafkrankheit wirksam sein (DNDi, 2008; ClinicalTrials, 2009; NECT, 2009).

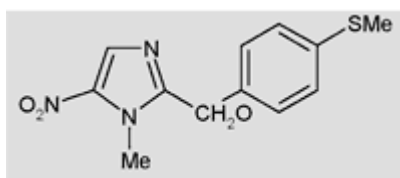


Abbildung 1-17 Fexinidazol (DNDi, 2008)

Die Bill und Melinda Gates Stiftung hat 1,2 Millionen Dollar für die Entwicklung eines Impfstoffes gegen die Schlafkrankheit gestiftet (Welt Online, 2005). Die ständige Antigenvariation des Erregers im Säugetierwirt macht die Entwicklung eines Impfstoffes jedoch sehr schwierig.

1.5.4 Phytotherapie

In der Zeit von 1981 bis 2002 waren 61 Prozent der 162 neuen chemischen Verbindungen pflanzlichen Ursprungs. In den letzten beiden Jahrzehnten wechselte der Fokus zur kombinatorischen Chemie, die Pharmazeutische Industrie rückte von der Forschung an Naturprodukten ab. Mit Hilfe der kombinatorischen Chemie kann man riesige Stoffdatenbanken erstellen und mit hoher Durchlaufleistung Screenings auf neu entdeckten molekularen Targets durchführen. Durch diesen Ansatz konnte jedoch weder die Produktivität vergrößert werden noch führte er zu einem Anstieg der Zahl neuer Arzneistoffe. Die Anzahl neuer chemischer Verbindungen erreichte 2001 mit 37 den geringsten Zuwachs seit zwanzig Jahren (Newman *et al.*, 2003). Diese Statistik spricht für die weiterhin große Bedeutung der Forschung an Naturprodukten für den Prozess der Wirkstofffindung. Vor allem für den Bereich der Infektionskrankheiten sind

Naturprodukte wieder eine wichtige Quelle chemotherapeutischer Verbindungen geworden (Salem und Werbovetz, 2006).

In Afrika nutzen bis zu 80 Prozent der Bevölkerung noch heute die traditionelle Heilkunst als medizinische Grundversorgung (WHO, 2008). Die Anwendung von Arzneipflanzen spielt dabei eine große Rolle und hat eine sehr lange Tradition. Diese Pflanzen mit ihren überlieferten Einsatzgebieten bieten ein interessantes Reservoir für neue Arzneistoffe. Einige Pflanzen aus dieser langjährigen afrikanischen Medizin sind bereits wissenschaftlich gut untersucht und Bestandteil der modernen europäischen Phytotherapie geworden. Beispiele dafür sind die Wurzeln der Teufelskralle (*Harpagophytum procumbens*), die seit langer Zeit im südwestlichen Afrika gegen Fieber und Schmerzen verwendet werden, oder der Wurzelsud der Kapland-Pelargonie (*Pelargonium sidoides*), der bei den südafrikanischen Zulu-Stämmen bereits seit Jahrhunderten zur Behandlung von Atemwegsinfekten eingesetzt wird.

1.5.4.1 Pflanzenextrakte

Nur wenige der ausgewählten Pflanzen wurden bereits in anderen Arbeitsgruppen gegen Trypanosomen getestet (Asuzu und Chimene, 1990; Freiburghaus *et al.*, 1996; Freiburghaus, 1997; Youan *et al.*, 1997; Adewunmi *et al.*, 2001; Atawodi *et al.*, 2003; Abubakar *et al.*, 2005; Ogbadoyi *et al.*, 2007). Auf einige wichtige Studien wird im Diskussionsteil in Kapitel 5.1.6 näher eingegangen.

1.5.4.2 Naturstoffe

In der Literatur findet man relativ wenige Studien, die Naturstoffe gegen Trypanosomen evaluieren, speziell solche mit Aktivität gegen die afrikanischen Trypanosomen. Und viele der Verbindungen mit trypanozider Aktivität wiesen unakzeptable Zytotoxizität gegenüber Säugern oder Säugetierzellen auf, was deren Aussicht für die therapeutische Verwendung minimiert. Generell wurden viele der potentiellen Leitstrukturen in der Literatur nicht weiter untersucht, entweder aufgrund von Toxizität, ungenügender *in vivo* Bioverfügbarkeit oder -Wirksamkeit oder einfach aus ökonomischen Gründen. Um wirklich aussichtsreiche Verbindungen mit guten *in vivo* Profilen zu finden, die zudem in großem Maßstab ökonomisch produziert werden können, ist ein interdisziplinärer Einsatz nötig (Salem und Werbovetz, 2006).

Zwei ausführliche Review Artikel mit den Titeln „Natural products active against African trypanosomes: a step towards new drugs“ von Hoet *et al.* (2004) und „Natural Products from Plants as Drug Candidates and Lead Compounds Against Leishmaniasis and Trypanosomiasis“ von Salem *et al.* (2006) geben einen Überblick über die Literatur der letzten 30 Jahre. Die wirksamen Naturstoffgruppen waren Alkaloide, phenolische Stoffe, Chinone und Terpene. Einige isolierte Verbindungen konnten das Wachstum von Trypanosomen *in vitro* im submikromolekularen Bereich hemmen. In der Gruppe der Alkaloide waren das die Ancistrocladane A und B aus *Ancistrocladus tanzaniensis*, das Chinolinalkaloid Chinidin aus der Chinarinde, das Emetin, ein Isochinolinalkaloid aus der Ipecacuanhawurzel, das quaternäre Benzylochinolinalkaloid Berberin und das Fascaplysin, ein quaternäres Indolalkaloid aus dem Schwamm *Hyrtios erecta*.

Aus der Gruppe der phenolischen Derivate war das 7,8-Dihydroxyflavon und das Quercetagenin im submikromolekularen Bereich trypanozid, auch das Curcumin aus dem Rhizom von *Curcuma longa* und das Justicidin B aus *Phyllanthus piscatorum*.

Die wirksamsten Chinone waren das 2-(1-Hydroxyethyl)-naphtho-[2,3-b]furan-4,9-dichinon und das Isopinnatal aus *Kigelia pinnata*.

Die wirksamsten Terpene waren das Monoterpen Terpinen-4-ol und die Sesquiterpenlactone Helenalin und Mexicanin I aus den Pflanzen der Gattungen *Arnica* und *Inula*.

Wenige Stoffe konnten bei *in vivo* Versuchen infizierte Mäuse heilen. Eine Fraktion des öligen Extraktes der Knoblauchknolle, die vor allem Diallyldisulfide enthält, konnte in einer Dosis von 120 mg/kg KG pro Tag bei intraperitonealer Verabreichung Mäuse, die mit *T. b. brucei* infiziert wurden, nach vier Tagen heilen. Die Substanz Sinefungin, ein natürliches Nukleosid, das von *Streptomyces griseolus* und *S. incarnatus* produziert wird, ist ein strukturelles Analogon von S-Adenosylmethionin. Sie inhibiert *in vitro* das Wachstum von *T. b. brucei* mit einer IC₅₀ (mittlere inhibitorische Konzentration) von 0,0004 µM und heilt bei intraperitonealer Gabe Mäuse, die mit *T. b. brucei*, *T. congolense* oder *T. vivax* infiziert wurden. Für Mäuse war die Substanz sehr gut verträglich, jedoch zeigte sie in Ziegen eine starke Nephrotoxizität (Hoet *et al.*, 2004). Eine interessante Leitstruktur ist das phenolische Derivat Ascofuranon, eine antibiotische Substanz, die von dem Pilz *Ascochyta visiae* produziert wird. Ascofuranon

ist ein Inhibitor der alternativen trypanosomalen Oxidase, einem einzigartigen mitochondrialen Elektronentransportsystem der Trypanosomen. Ascofuranon kann mit *T. brucei* infizierte Mäuse heilen, wenn der Stoff intraperitoneal vier Tage lang in einer Dosierung von 100 mg/kg KG gegeben wird oder oral, acht Tage lang in einer Dosierung von 400 mg/kg KG (Yabu *et al.*, 2003; Steverding und Tyler, 2005).

2 ARBEITSHYPOTHESE

Ziele

In meiner Arbeit sollte gezeigt werden, dass die Wirkung von ausgewählten traditionell gegen die Schlafkrankheit und die Nagana angewandten Heilpflanzen unter objektivierten Bedingungen im Labor nachweisbar ist.

Ziel der Arbeit war, die Wirksamkeit dieser Pflanzen sowohl im Vergleich untereinander als auch im Vergleich zu chemischen Trypanoziden besser beurteilen zu können.

In einer vorhergehenden Untersuchung konnten Bizimana *et al.* wirksame hydrophile Extrakte identifizieren (Bizimana *et al.*, 2006). In dieser Arbeit lag nun der Fokus auf den lipophilen Extrakten, unter denen Auszüge mit hoher Aktivität vermutet wurden.

Darüber hinaus sollte bei einer ausgewählten Pflanze, die besonders hohe Aktivität gegen Trypanosomen aufweist, analysiert werden, ob die Wirkung an einer oder mehreren Einzelsubstanzen oder bestimmten Stoffgruppen festzumachen ist oder ob ein Zusammenwirken mehrerer Stoffe vorliegt. Dadurch könnte die Verwendung der traditionellen Zubereitung besser beurteilt und eventuell für den therapeutischen Einsatz optimiert werden. Aus dem Extrakt könnten auch Substanzen isoliert werden, die als Leitstrukturen für neue Trypanozide dienen können.

Durch Beobachten und Festhalten von Nebeneffekten vor allem bei den *in vivo* Versuchen sollten interessante Aspekte für die Untersuchung auf anderen Gebieten zugänglich gemacht werden.

Grundlagen

Die Arbeit von Bizimana *et al.* (2006) diente dieser Arbeit als Grundlage. Das ausgewählte Pflanzenmaterial und teilweise auch die daraus gewonnenen Extrakte standen dabei für die Untersuchungen zur Verfügung.

Des Weiteren wurde von einem etablierten *in vitro* Testsystem ausgegangen, in dem die Auswirkungen des direkten Kontakts der Pflanzenextrakte mit dem Erreger über einen längeren Zeitraum untersucht werden konnten und auch eine gute Korrelation mit *in vivo* Ergebnissen festgestellt wurde.

Einer ersten Abschätzung der Zytotoxizität der Pflanzenextrakte diene die visuelle Beobachtung der als Nährzellen für die Trypanosomen verwendeten Fibroblastenschicht. Durch zusätzliche Anwendung eines ebenfalls am Institut etablierten *in vivo* Tests an Labornagern konnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob die antitrypanosomale Wirkung sich auch im komplexen Geschehen eines lebendigen Organismus realisieren lässt.

Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Verwendung des Erregers *Trypanosoma brucei brucei* als Testorganismus unter Laborbedingungen eine Aussage über die Aktivität gegen die Schlafkrankheit zulässt, deren Erreger dem Testorganismus sehr ähnlich sind. Darüber hinaus wurde angenommen, dass ein Bezug zu der Tierseuche Nagana hergestellt werden kann, die unter anderem durch den verwendeten Testorganismus ausgelöst wird.

Voraussetzung beziehungsweise Ausgangspunkt für die phytochemischen Untersuchungen waren standardisierte Extraktions- und Isolierungswege, die zum Teil der Literatur entnommen wurden und zum Teil aus der Erfahrung von Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Melzig und Frau Priv.-Doz. Dr. Jenett-Siems aus dem Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin stammte. Dabei kamen von der DC (Dünnschichtchromatographie) über die Säulenchromatographie bis hin zur HPLC verschiedene Verfahren zur Anwendung.

Umsetzung

47 Dichlormethanextrakte von Pflanzenteilen aus 37 traditionell verwendeten Pflanzenarten wurden im *in vitro* Testsystem auf ihre trypanozide Aktivität hin untersucht. Die Extrakte mit hoher Aktivität im *in vitro* Testsystem wurden zur besseren Abschätzung einer geeigneten Dosis für den *in vivo* Test einem Dosisfindungstest an Mäusen unterzogen, der bisher nicht etabliert war. Die Extrakte, die in diesem Test an Mäusen geringe Toxizität zeigten, wurden anschließend in einem *in vivo* Wirksamkeitstest unter Verwendung einer Kontrollgruppe untersucht. Dabei wurden auch interessante Nebenaspekte aus dem Screening festgehalten und deren mögliche Bedeutung durch Literaturstellen dargestellt.

Der Extrakt mit dem größten antitrypanosomalen Effekt im *in vivo* Test wurde anschließend phytochemisch auf wirksame Inhaltsstoffe beziehungsweise Stoffgruppen untersucht. Dabei wurde im Zuge einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung durch

verschiedene Methoden zunächst der Gesamtextrakt in Teilfraktionen aufgeteilt, deren Aktivität jeweils im *in vitro* Testsystem untersucht wurde. Anschließend wurden durch geeignete Verfahren gezielt bestimmte Inhaltsstoffgruppen isoliert und auf ihre antitrypanosomale Wirksamkeit im *in vitro* Test untersucht. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden schließlich weiter aufgetrennt und nach Möglichkeit auf Einzelkomponenten mit hoher Wirksamkeit untersucht.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte

Zellbiologie

Brutschrank	Haeraeus Holding GmbH, Hanau
Laminar Air Flow-Werkbank	Typ HF 7.18, BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Hämatokritzentrifuge	Hämafuge A, Hämatokrit, Model 2010, Hettich GmbH, Tuttlingen
Kühlzentrifuge	Rotanta R, Hettich GmbH, Tuttlingen
Wasseraufbereitung	TKA GenPure Reinstwassersystem, TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert
Isopropanol-Einfrierbox	Nalgene, Nalge Company, Rochester, USA
Mikroskop 1	Mikroskop Axiostar plus, Carl Zeiss AG, Oberkochen Okular 10 x, Carl Zeiss AG, Oberkochen Objektiv F 40/0,65; Spitzobjektiv Ph 3, 40/0,85 Öl, Carl Zeiss AG, Oberkochen Immersionsöl 515 N, Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop 2	Hund Inverses Mikroskop Wilovert S, Helmut Hund GmbH, Wetzlar Okular 10x, Helmut Hund GmbH, Wetzlar Invertobjektive 10x (10/0,25); 20x (20/0,35), Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	Carl Zeiss AG, Oberkochen

Drogenvorbereitung/Extraktion

Pulvermühle	Retsch SM 2000, Retsch GmbH, Haan
Gefriertrocknungsanlage	Christ LOC-1m, ALPHA 2-4, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode

Chromatographie

DC	H-Trennkammern 5x5 und 10x10, Desaga GmbH, Wiesloch
----	---

Säulenchromatographie	Fraktionssammler Büchi 660, Büchi Labortechnik GmbH, Essen
Mitteldruckflüssigkeitschromatographie	Pumpe Duramat, ProMinent Dosiertechnik GmbH, Heidelberg
Hochleistungsflüssigkeitschromatographie Anlage 1	HPLC Pump K-1001, Wellchrom DAD K-2700, Knauer GmbH, Berlin
Hochleistungsflüssigkeitschromatographie Anlage 2	Smartline Pump 1000, Variable wave length monitor, Knauer GmbH, Berlin
Spektroskopie/-metrie	
¹ H-NMR-Spektren (¹ H-Kernresonanzspektroskopie)	Bruker DPX 400 (400 MHz), Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten
EI-MS (Elektronenstoß-Ionisations-Massenspektroskopie)	Varian MAT CH ₇ A, 70 eV, Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
HR-EI-MS (High Resolution-EI-MS)	Finnigan MAT 711, 80 eV, Thermo Finnigan MAT GmbH, Bremen
FAB (Fast Atom Bombardement)-MS	Varian MAT CH ₅ DF, (Methanol, Glycerin, Xenon), Varian Deutschland GmbH, Darmstadt

3.2 Material

3.2.1 Pflanzenmaterial

Die untersuchten Pflanzen werden seit langer Zeit in der traditionellen Heilkunde gegen die Schlafkrankheit und/oder Nagana verwendet und spielen nach wie vor eine große Rolle. Die Auswahl wurde nach den bereits vorliegenden Untersuchungen von Diallo vorgenommen (Institutsbericht, Diallo, 1996). In Zusammenarbeit mit dem Département de Médecine Traditionnelle in Bamako, Mali wurden die untersuchten Pflanzenteile im November 2001 von Nsekuye Bizimana im südlichen Teil von Mali (Siby, Kalassa, Dankorodalaba, Tienfala, Moribabougou, Mandio, Bandiangara, Kalibombo, Sido, Blendio and Sikasso) gesammelt und von Coulibaly Djibril und Drissa Diallo identifiziert (Bizimana *et al.*, 2006). Herbarbelege werden im Département de Médecine Traditionnelle in Bamako, Mali und am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin an der Freien Universität in Berlin aufbewahrt. Tabelle 3-1 zeigt eine Liste der untersuchten Pflanzen und Pflanzenteile mit

den Lokalnamen, den Herbarbelegnummern und den Zubereitungen in der traditionellen Medizin nach Bizimana *et al.* (2006).

Tabelle 3-1 Arzneipflanzen aus Mali/Burkina Faso, gesammelt von Herrn Bizimana im November 2001

Pflanzenart und Familie	Lokalnamen in Bambara	Beleg nr.	Tradit. Zuber.	Pflanzenteil/e
<i>Acacia nilotica</i> (L.) Delile (Mimosaceae)	Buwanan, Bogonan	M2a	D, I	Stammrinde Wurzelrinde
<i>Afzelia africana</i> Pers. (Leguminosae)	Lingué, Dankan	L1a	D	Stammrinde
<i>Ampelocissus grantii</i> (Baker) Planch. (Vitaceae)	Kongho forokofaraka	Via	M	Oberird. Teile
<i>Annona senegalensis</i> Pers. (Annonaceae)	Mondé- Sounsoun	A2	D, I, M	Wurzel Blätter
<i>Anogeissus leiocarpa</i> Guill. & Perr. (Combretaceae)	Ngalama	C5a	D	Wurzelrinde Blätter
<i>Balanites aegyptiacus</i> Delile (Balanitaceae)	Nsègènè	SI	D, I, P	Wurzel Stammrinde Triebe
<i>Bauhinia reticulata</i> DC. (Leguminosae)	Niaman	Lib	D	Zweige/Blätter
<i>Boscia angustifolia</i> A. Rich. (Capparaceae)	Berecè	C2	P, D	Stammrinde
<i>Cassia sieberiana</i> DC. (Leguminosae)	Sinja	Lie	D, I, M	Wurzel
<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn. (Bombacaceae)	Banan	B2	D	Stammrinde Wurzelrinde Blätter
<i>Celtis integrifolia</i> Lam. (Ulmaceae)	Kamaua, Gamyà	U1	D	Zweige/Blätter
<i>Cochlospermum tinctorium</i> Perr. (Cochlospermaceae)	N'tiribara	B1	P, D, I	Wurzel
<i>Combretum glutinosum</i> Guill. & Perr. (Combretaceae)	Diangara, Tiagara	C5b	D, I	Stammrinde
<i>Combretum micranthum</i> G. Don (Combretaceae)	Ngolobè	C5c	D	Blätter
<i>Diospyros mespiliformis</i> Hochst. ex A.DC. (Ebenaceae)	Sounsounfing	E1	D	Blätter
<i>Entada africana</i> Guill. & Perr. (Leguminosae)	Samanèrè	M2b	D, I, M	Wurzel
<i>Erythrophleum guineense</i> G. Don (Leguminosae)	Tali, Teli	Lid	D	Blätter
<i>Ficus iteophylla</i> Miq. (Moraceae)	Nsèrèninjè, Jatigifaga-yiri	M3	D	Blätter

<i>Gardenia triacantha</i> DC. (Rubiaceae)	Burencè	R1a	P, M	Wurzel
<i>Guiera senegalensis</i> J.F.Gmel. (Combretaceae)	Nkunjè	C5d	D	Wurzel Blätter
<i>Holarrhena floribunda</i> T.Durand & Schinz (Apocynaceae)	Bassira, Bassoro	A3	D	Zweige/Blätter
<i>Khaya senegalensis</i> A. Juss. (Meliaceae)	Jala	Mia	D, M	Stammrinde
<i>Lannea microcarpa</i> Engl. & K.Krause (Anacardiaceae)	Npeguba	A1	D	Stammrinde Blätter
<i>Lawsonia alba</i> Lam. (Lythraceae)	Jabi	L4	I	Zweige/Blätter
<i>Leptadenia hastata</i> Decne. (Asclepiadaceae)	Nsoyin	A4	D, I	Oberird. Teile
<i>Loranthus pentagonia</i> DC. (Loranthaceae)	Si-ladon	L3	D	Ganze Pflanze
<i>Maytenus senegalensis</i> (Lam.) Exell (Celastraceae)	Ngeke	C3	D, I	Zweige/Blätter
<i>Mitragyna inermis</i> (Willd.) Kuntze (Rubiaceae)	Jun	Rib	D, I	Blätter Stammrinde
<i>Opilia celtidifolia</i> Endl. ex Walp. (Opiliaceae)	Korongoyin, Sogèn	O1	I, D, M	Zweige/Blätter
<i>Pterocarpus erinaceus</i> Lam. (Leguminosae)	Gòni, Gouéni	F1	I, D	Triebe
<i>Securidaca longepedunculata</i> Fresen. (Polygalaceae)	Joro, Diro	P1	M, D, I	Wurzel
<i>Spilanthes oleracea</i> Jacq. (Asteraceae)	Farimani	A5	D	Blüten
<i>Sterculia tomentosa</i> Guill. & Perr. (Sterculiaceae)	Kènyèkoro, Kungosira	S2	D, M	Wurzel
<i>Strychnos spinosa</i> Lam. (Loganiaceae)	Nkantroni	L2	M, D	Wurzel
<i>Tamarindus indica</i> L. (Caesalpiniaceae)	Ntomi	C1	D, M, I	Blätter
<i>Terminalia avicennioides</i> Guill. & Perr. (Combretaceae)	Wolocè, Wòlòbugun	C5e	D, I, M	Stammrinde
<i>Trichilia emetica</i> Vahl (Meliaceae)	Sulafinsan	M1b	D, I, M	Stammrinde

D = Dekokt; *I* = Infus; *M* = Mazeration; *P* = Pulver

Bezeichnung der Pflanzen nach "The International Plant Names Index" (IPNI, 2009)

3.2.2 Trypanosomenstamm

Sowohl für den *in vitro* als auch für den *in vivo* Test wurde der Trypanosomenstamm STIB 345 des Erregers *T. b. brucei* verwendet, der sich gut für die Zellkultur eignet und auch infektiös für die verwendeten Versuchsmäuse (*Mastomys coucha*) ist. Der Erreger *T. b. brucei* STIB 345 RA ist 1969 in Kiboko, Kenia aus einer Tsetsefliege isoliert worden, war dann bei der East African Trypanosomiasis Research Organisation als EATRO 1529 registriert und wurde im Schweizerischen Tropeninstitut in Basel in STIB 345 umbenannt. Der Trypanosomenstamm ist sensitiv gegenüber den kommerziellen Trypanoziden Diminazenaceturat und Isometamidiumchlorid (Brun *et al.*, 1979).

3.2.3 Fibroblasten-Zelllinie

Als Nährzellen für den *in vitro* Test diene eine Primärzelllinie von MEF-Zellen (fibroblastenähnliche Zellen, die aus 15 Tage alten *Microtus montanus*-Embryonen gewonnen wurden). Durch diese Feederlayer Zellen wird das Wachstum von *T. b. brucei*-Blutstromformen in Kultur unterstützt und die Infektiösität gegenüber Versuchstieren bleibt über einen langen Zeitraum erhalten.

3.2.4 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstier diene die rotäugige Variante der *Mastomys coucha*, die afrikanische Vielzitzenmaus. Diese Mäuseart hat sich als empfänglich für Trypanosomen herausgestellt und sich für den verwendeten Versuch am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität Berlin bewährt. Der Vorteil dieser Mäuse für den Vergleich der Parasitämie bei ersten *in vivo* Untersuchungen ist, dass sich die Mäuse kurze Zeit nach der Infektion mit *T. b. brucei* erholen und nicht unter dem Infektionsdruck sterben. Die Tiere werden am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität Berlin gezüchtet und gehen zurück auf eine Zuchtlinie des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin in Hamburg. Durch Verwendung von Tieren unterschiedlichen Alters, Gewichts und Geschlechts wurden die Bedingungen in der Natur möglichst nachgeahmt. Auf die gleichmäßige Verteilung dieser Parameter unter den Versuchsgruppen wurde besonders geachtet. Das Alter der Tiere lag zwischen 8 und 20 Wochen, das Gewicht betrug 47 bis 100 g. Die Tiere waren beiderlei Geschlechts.

Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 20-22 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von durchschnittlich 60 Prozent in Makrolonkäfigen auf Labortierstreu gehalten. Sie wurden unter einem konstanten zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten mit der Lichtphase zwischen 5 Uhr und 17 Uhr. Während des Versuches saßen die Tiere in Gruppen von maximal fünf Tieren in Makrolonkäfigen der Standardgröße vier (38 cm x 20 cm x 59 cm) und erhielten Wasser und pelletiertes Standardfutter *ad libitum*.

Versuchstiergenehmigung: Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin, Reg 0071/03 Genehmigung vom 30.04.2003, Ausnahmegenehmigung für Birgit Aderbauer gem. § 9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes vom 07.06.2005.

3.2.5 Lösungen und Medien für die Zellkultur und den *in vivo* Test

3.2.5.1 Pufferlösung

Eine EBSS (Earl's Balanced Salts Solution) wurde mit 5 Normaler Natronlauge auf einen pH-Wert von 7,5 bis 8 eingestellt und nach Zugabe von Phenolrot steril filtriert.

3.2.5.2 Trypsinlösung

50 mg Trypsin wurden in 100 ml Pufferlösung aufgelöst, steril filtriert, in Eppendorff-Gefäße portioniert und bei -20 °C gelagert.

3.2.5.3 Maeser Mix Stammlösung

Lösung 1	60 mg	Penicillin G
	100 mg	Kanamycin
	50 mg	Fluorcytosin
	9,9 ml	Aqua destillata
Lösung 2	10 mg	Chloramphenicol
	100 µl	Ethanol

Die Lösungen 1 und 2 wurden getrennt voneinander hergestellt, anschließend gemischt, steril filtriert, portioniert und bei -20 °C gelagert.

3.2.5.4 MEM modifiziert nach Baltz

Das Kulturmedium wurde nach Baltz *et al.* (1985) mit einigen Modifikationen wie folgt hergestellt und im Folgenden „MEM komplett“ genannt

Lösung 1	10 ml	MEM (Minimum Essential Medium)
	5 ml	MEM Nichtessentielle Aminosäuren
	146 mg	L-Glutamin
	800 mg	Glucose
	91 mg	L-Cystein
	550 mg	Natrium Pyruvat
	20 mg	Thymidin
Lösung 2	34 mg	Hypoxanthin
	250 µl	1N NaOH

Lösungen 1 und 2 wurden getrennt voneinander hergestellt, gemischt, steril filtriert und mit 490 ml MEM ergänzt. Für die Kultivierung von Trypanosomen beziehungsweise Fibroblasten wurde dieses Medium kurz vor Verwendung mit Seren und Antikontaminierungsmischung (Mäser Mix) ergänzt und steril filtriert.

3.2.5.5 Kulturmedium für Fibroblasten

90 ml	MEM komplett
10 ml	FBS (fötales Rinderserum)
1 ml	Mäser Mix

3.2.5.6 Kulturmedium für Trypanosomen

75 ml	MEM komplett
20 ml	PS (Pferdeserum)
5 ml	CS (Rinderserum/Cattle serum)
1 ml	Maeser Mix

3.2.5.7 Einfriermedium für Fibroblasten

65 ml	MEM komplett
25 ml	FBS
10 ml	Glycerin 99 %

3.2.5.8 Einfriermedium für Trypanosomen

70 ml	EBSS
30 ml	Glycerin 99 %

Trypanosomen aus dem Blut beziehungsweise aus Kultur wurden 1:1 mit Einfriermedium gemischt. Die Glycerinkonzentration im Stabilat betrug 15 Prozent.

3.2.5.9 Walker-Lösung

9,0 g	Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O
0,1 g	TRIS [Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan]
9,0 ml	Glycerin
100 ml	Aqua destillata
Bis zum Umschlag	Phenolrot

3.2.5.10 Heparin-Lösung

1 ml	Liquemin [®] [1 ml = 5000 I.E. (Internationale Einheiten) Heparin-Natrium]
99 ml	EBSS mit 25 mM HEPES [2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure]

3.2.6 Material für die Chromatographie

3.2.6.1 Stationäre Phasen für die Chromatographie

Analytische DC	DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (Fluoreszenzindikator), Schichtdicke 0,2 mm, 20 x 20, Merck, Darmstadt
	DC-Fertigplatten Kieselgel 60, F254, Schichtdicke 0,25 mm, 20 x 20, Merck, Darmstadt
	DC-Fertigplatten Adamant, Kieselgel 60, 0,25 mm, 5 x 10, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Präparative DC	DC-Alufolien Kieselgel 60 ohne Fluoreszenzfaktor, 0,2 mm, 20 x 20 Merck, Darmstadt
	DC-Fertigplatten SILG-50, 0,5 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

Säulenchromatographie	Kieselgel 60, Korngröße 0,063-0,200 mm, 70-230 mesh, Merck, Darmstadt Sephadex [®] LH-20, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala Celite [®] 545, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten LiChroprep [®] RP-18, Korngröße 24-40 µm, Merck, Darmstadt
HPLC	Säule 1: Ultra sep ES Pharm RP 18 E, 7 µm, Col. 250 x 8 mm Säule 2: Eurogel PRP 100, 8 µm, Col. 125 x 4 mm

3.2.6.2 Lösungsmittel und Detektionsmittel

Lösungsmittel

Lösungsmittel entsprachen alle der Qualität „zur Analyse“, für die HPLC wurden Lösungsmittel von spezieller HPLC-Qualität verwendet. Wenn Wasser genannt ist, wurde Reinstwasser verwendet.

Dragendorff's Reagenz nach Munier

Detektion klassischer Alkaloide und anderer stickstoffhaltiger Verbindungen (Krebs *et al.*, 1967);

Lösung A	1,7 g basisches Bismutnitrat und 20 g Weinsäure wurden in 80 ml Wasser gelöst.
Lösung B	16 g Kaliumjodid wurde in 40 ml Wasser gelöst.
Vorratslösung	Gleiche Volumina der Lösungen A und B wurden gemischt. Die Vorratslösung ist im Kühlschrank mehrere Monate haltbar.
Sprühlösung	10 g Weinsäure wurde in 50 ml Wasser gelöst und 5 ml der Vorratslösung zugegeben.

Van Urk-Reagenz

Darstellung von Indolderivaten, die in 2-Stellung unsubstituiert sind, insbesondere Ergolin-Alkaloide (Wagner *et al.*, 1983);

0,2 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wurde in 100 ml Salzsäure (25 %) unter Zugabe von einem Tropfen zehnpromzentiger Eisen-III-chloridlösung gelöst. Nach dem Besprühen wurden die DC-Platten zur Farbentwicklung mit dem Bunsenbrenner abgeflammt.

Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz

Universalreagenz zum Beispiel für Terpenoide, Phenylpropanderivate und Phenole (Wagner und Bladt, 1996);

Lösung 1 Ethanolische Vanillinlösung 1%

Lösung 2 Ethanolische Schwefelsäure 10%

Die beiden Lösungen wurden kurz vor dem Besprühen 1:1 gemischt. Anschließend wurde die DC-Platte bis zur Farbentwicklung 5-10 Minuten bei 110 °C unter Beobachtung erhitzt und im VIS ausgewertet.

Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz

Detektion von Flavonoiden (Wagner und Bladt, 1996);

Auf die DC-Platte wurden nacheinander eine einprozentige methanolische Lösung von Naturstoffreagenz A (Diphenylborsäure- β -aminoethylester Komplex) und eine fünfprozentige ethanolische PEG (Polyethylenglykol)-4000-Lösung aufgesprüht. Sofort oder nach 15 Minuten entstanden im UV-Licht bei 365 nm intensive Fluoreszenzfarben. Der Zusatz von PEG führte zu einer Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit. Das Reagenz musste vor Gebrauch frisch angesetzt werden.

3.2.7 Chemikalien, Reagenzien und Fertigmedien

Berenil [®]	Hoechst AG, Frankfurt
CS	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
EBSS	Gibco Life Technologies, Eggenstein
FBS	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Fluorcytosin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Glucose	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Glycerol 99 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Hypoxanthin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Kanamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten

L-Cystein	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
L-Glutamin	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzen, mit 25 mM HEPES, ohne L-Glutamin	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Natriumpyruvat	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
MEM Nichtessentielle Aminosäuren, ohne L-Glutamin	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Penicillin G	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
PS	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Thymidin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Trypsin 1:250 (Rinderpankreas)	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
HEPES	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Elymoclavin	Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin
α -Hederin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Hederacosid C	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Hederagenin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Glycyrrhizinsäure	Merck KGaA, Darmstadt
β -Aescin	Merck KGaA, Darmstadt
Kaffeesäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Saponinum album	Merck KGaA, Darmstadt
Salicylsäure	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Na-Salicylat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Salicylsäuremethylester	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Sinapinsäure	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

3.3 Methoden

3.3.1 *In vitro* Testsystem

Voraussetzung für die Durchführung des LTVA (Long-term Viability Assay) (Kaminsky *et al.*, 1989) war die Kultivierung der Trypanosomen in Blutstromform. Dafür wurden Trypanosomen auf Nährzellen (MEF-Zellen) kultiviert. Diese unterstützen das Wachstum von *T. b. brucei*- Blutstromformen in Kultur und erhalten ihre Infektiosität für Versuchstiere über einen längeren Zeitraum. Die Nährzellen wurden zunächst als eigene Kulturen angelegt. Alle Arbeiten wurden unter der Laminar-Air-Flow-Werkbank durchgeführt. Wenn Wasser genannt wird, wurde Reinstwasser verwendet.

3.3.1.1 Anzüchten von MEF-Zellen aus Stabilat

- Das Stabilat wurde bei 37°C zügig aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt.
- Tropfenweise, damit die Zellen nicht platzen, wurde 3 ml Kulturmedium zugegeben.
- Anschließend wurde 10 Minuten lang bei 200 g zentrifugiert.
- Der Überstand wurde bis auf 1 ml verworfen.
- Die Fibroblasten, die sich als Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens abgesetzt hatten, wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert, gezählt und eingesät. Die optimalen Zelldichten werden in folgender Tabelle angegeben.

Tabelle 3-2 *Optimale Zelldichten der MEF-Zellen vor dem Einsäen in Kulturplatten/-flaschen*

Zelldichte/ml Medium	
5 x 10 ⁴ Zellen	Mikrotiterplatte 200 µl
10 ⁵ Zellen	Multiwellplatte 1 ml
2,5 x 10 ⁵ Zellen	Kulturflasche 4 ml
2,5 x 10 ⁵ Zellen	Kulturflasche 12 ml

- Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert, zur Belüftung wurde der Schraubverschluss der Kulturflaschen um eine viertel Umdrehung geöffnet.

- Nach zirka 36 Stunden bildete sich ein konfluenten Zellrasen.

3.3.1.2 Trypsinierung der MEF-Zellen

Nach dem Ausbilden eines konfluenten Zellrasens konnten die MEF-Zellen umgesetzt werden. Dabei wurden sie enzymatisch von dem Flaschenboden abgelöst und neu ausgesät.

- Das Medium wurde komplett abgesaugt.
- Die Zellen wurden zweimal mit je 4 ml Pufferlösung gespült, um Serumreste zu entfernen, die Trypsin hemmen würden.
- Die Pufferlösung wurde abgesaugt.
- 2 ml Trypsin 0,05 % wurde zur enzymatischen Ablösung der MEF-Zellen in die Kulturflasche pipettiert.
- Anschließend wurde im Brutschrank für zwei bis drei Minuten bei 37 °C inkubiert.
- Sobald sich die Zellen abgerundet hatten und noch bevor sie sich abgelöst hatten wurde der Großteil des Trypsins abgesaugt.
- Die Zellen wurden anschließend für weitere 5-10 Minuten im Brutschrank inkubiert bis sie sich leicht ablösen ließen.
- Durch leichten Schlag wurden auch die noch haftenden Zellen von der Kulturfläche gelöst und durch Spülen in 5 ml Kulturmedium aufgenommen. Der Serumanteil im Kulturmedium diente als Inhibitor des Trypsins.
- Die Zellsuspension konnte jetzt in neue Kulturflaschen oder –platten eingesät werden oder als Stabilat eingefroren werden.

Da MEF-Zellen einem Alterungsprozess unterliegen, mussten sie spätestens nach sieben Tagen passagiert werden.

3.3.1.3 *In vitro* Zytotoxizitätstest

Während der gesamten Testdauer des *in vitro* Tests (siehe Kapitel 3.3.1.9) wurden die MEF-Zellen, die als Feederlayer dienten, beobachtet und Veränderungen beziehungsweise eine Ablösung vom Plattenboden registriert. Zum einen konnte dadurch gewährleistet werden, dass ein Absterben der Trypanosomen nicht an der Schädigung der Feederlayer Zellen lag. Zum anderen konnte dadurch für alle Extrakte

und Substanzen eine erste Einschätzung der Zytotoxizität auf tierische Zellen gewonnen werden.

3.3.1.4 Einfrieren der MEF-Zellen

- Die Zellen wurden wie in Kapitel 3.3.1.2 beschrieben trypsinisiert.
- Die Zellsuspension wurde anschließend in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt.
- Durch zehnmütiges Zentrifugieren wurden die MEF-Zellen bei 200 g sedimentiert.
- Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen.
- Das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert,
- in ein 1 ml Kryoröhrchen gegeben, über Nacht in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -80 °C tiefgefroren, und anschließend in flüssigen Stickstoff von -196 °C umgelagert.

3.3.1.5 Isolierung von *Trypanosoma brucei brucei* aus Mäuseblut

Während der ansteigenden Phase der Parasitämie reichern sich die Trypanosomen (*T. b. brucei*) vor allem im zentralen Blut an. Durch sterile Herzpunktion konnte in dieser Phase unter Zugabe von 25 I.E. Heparin als Antikoagulans trypanosomenhaltiges Blut gewonnen werden.

- Das durch Herzpunktion gewonnene Heparinblut der Maus wurde mit Kulturmedium im Verhältnis ein Teil Blut, zwei Teile Medium gemischt.
- Durch 20-minütiges Zentrifugieren bei 150 g, setzten sich die zellulären Bestandteile ab.
- Der Bodensatz wurde verworfen, der Überstand abgenommen, in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben und bei Bedarf durch Medium ergänzt.
- Durch Zentrifugieren, 10 Minuten bei 250 g reicherten sich nun die Trypanosomen am Boden des Zentrifugenröhrchens an.
- Der Überstand wurde bis auf ~1 ml abgesaugt.

Aus hoch parasitämischem Blut einer Maus konnten nach Isolierung der Trypanosomen mehrere Stabilate angefertigt werden und diese zu einem späteren Zeitpunkt für die *in vitro* Kultivierung verwendet werden.

3.3.1.6 Einfrieren von Trypanosomen

Aus Blut

- Das Heparinblut einer infizierten Maus beziehungsweise das durch Zentrifugation gewonnene Trypanosomenpellet wurde 1:1 mit Einfriermedium gemischt.
- Diese Mischung wurde in 1 ml Kryoröhrchen gegeben, über Nacht in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -80 °C tiefgefroren, dann in flüssigen Stickstoff (-196 °C) umgelagert.

Aus Kultur

- Durch 10-minütige Zentrifugation bei 250 g wurden die Trypanosomen eventuell im Medium angereichert. Der Überstand wurde bis auf ~1 ml verworfen.
- Das Pellet wurde 1:1 mit Einfriermedium gemischt und in ein 1 ml Kryoröhrchen gegeben.
- Über Nacht wurde das Stabilat in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -80 °C tiefgefroren, dann in flüssigen Stickstoff (-196 °C) umgelagert.

3.3.1.7 Auftauen und Anzüchten von *Trypanosoma brucei brucei*

Zum Anzüchten von *T. b. brucei* auf einem vorbereiteten Zellrasen aus zirka 36 Stunden alten konfluenten MEF-Zellen wurden aus Mäuseblut isolierte Trypanosomen verwendet. Dies war sowohl mit isolierten Trypanosomen aus frischem Mäuseblut als auch aus einem Stabilat möglich. Wurde ein Stabilat verwendet, wurde wie folgt vorgegangen.

- Das Stabilat wurde bei 37 °C zügig aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt.
- Bis zu einem Glycingehalt kleiner 1 % wurde tropfenweise Kulturmedium zugegeben, damit die Zellen nicht platzten.
- Anschließend wurde zehn Minuten bei 250 g zentrifugiert.
- Der Überstand wurde bis auf einen Milliliter verworfen.

Ab hier war die Behandlung bei Verwendung von isolierten Trypanosomen aus frischem Mäuseblut identisch.

- Die Trypanosomen wurden in einem Milliliter frischem Kulturmedium für Trypanosomen resuspendiert.
- Mittels Neubauer-Zählkammer wurden sie ausgezählt und bis zu einer Einsaatdichte von zirka 10^6 Trypanosomen pro Milliliter mit Medium verdünnt.
- Das Fibroblastenmedium wurde komplett von dem vorbereiteten Zellrasen abgesaugt.
- Die Trypanosomen wurden eingesät und das Medium gegebenenfalls mit frischem Kulturmedium für Trypanosomen ergänzt.

3.3.1.8 Kultur der Trypanosomen

Je nach Parasitendichte wurden im Abstand von ein bis drei Tagen 50-100 Prozent des Mediums durch frisches Medium ersetzt beziehungsweise das Medium durch ein paar Tropfen frisches Medium ergänzt. Der Austausch von 50 Prozent des Mediums im Abstand von zwei Tagen hatte sich für die Erhaltung einer gleichmäßigen Trypanosomenzahl bewährt. Um eine starke Vermehrung mit logarithmischer Wachstumsphase zu erreichen beziehungsweise aufrecht zu erhalten, wurden Trypanosomen aus Kultur auf frische 36 Stunden alte MEF-Zellen umgesetzt. Das Wachstum der Trypanosomen wurde unter einem Mikroskop untersucht (Okular 10x, Invertobjektiv 20x). Zur Bewertung der Kultur wurde die Anzahl der lebenden Trypanosomen sowie deren Morphologie und Motilität nach folgendem Schema beurteilt.

+++ 21-100 Trypanosomen/Gesichtsfeld

++ 3-20 Trypanosomen/Gesichtsfeld

+ 1-2 Trypanosomen/Gesichtsfeld

0 keine lebenden Trypanosomen

Die Trypanosomen wurden unter der Voraussetzung als lebend gezählt, dass sie nicht in aufgeblasener oder anderweitig abnormer Form vorlagen und dass die typische Vorwärtsbewegung feststellbar war.

3.3.1.9 Aktivitätstest gegen *Trypanosoma brucei brucei*

Zur Bestimmung der Aktivität verschiedener Pflanzenextrakte, isolierter Fraktionen und Einzelverbindungen gegen *T. b. brucei* wurde der LTVA verwendet, ein zehn-Tages-

Test, der sich bereits für die Untersuchung von Wirkstoffen und Extrakten gegen Trypanosomen bewährt hatte und am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin etabliert war. Dieser wurde weitgehend nach der Methode von Kaminsky *et al.* (1989) durchgeführt.

Dabei wurde auf einer 96-Well-Kulturplatte wie in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben, ein konfluenter Nährzellrasen aus MEF-Zellen ausgebildet, auf dem wie in Kapitel 3.3.1.7 beschrieben Trypanosomen eingesät wurden. Nach 24-48 Stunden, wenn sich die Trypanosomen in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurde die Hälfte des Mediums durch Medium mit der doppelten Testkonzentration des Prüfstoffes ausgetauscht, um in Kultur die angestrebte Testkonzentration des Stoffes zu erhalten. An den darauf folgenden neun Tagen wurde jeweils die Hälfte des Medium durch Medium mit dem Prüfstoff in Testkonzentration ersetzt.

Die Pflanzenextrakte wurden zunächst in einer Testkonzentration von 50, 100, 200 und 500 µg/ml eingesetzt. Bei guter Aktivität wurden anschließend auch geringere Konzentrationen getestet. Kurz vor Verwendung im Testsystem wurde aus einer Stammlösung des Pflanzenextraktes eine Verdünnungsreihe mit Kulturmedium hergestellt. Als Positivkontrolle wurde Diminazenaceturat (Berenil[®], Hoechst) in einer Konzentration von 0,05 µg/ml eingesetzt. Da für die lipophilen Extrakte DMSO (Dimethylsulfoxyd) als Lösungsmittel verwendet wurde und dieses ab einer bestimmten Konzentration zelltoxisch wirkt, wurde als Negativkontrolle Medium mit der Konzentration an DMSO verwendet, die der höchsten Konzentration im Testansatz entsprach.

Unter standardisierten Versuchsbedingungen wurde für jeden Extrakt eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die MHK (minimale Hemmkonzentration) eines Pflanzenextraktes war dann erreicht, wenn nach dem zehnten Tag nach Aufbringen der Prüfsubstanz kein Trypanosom mit normalem Aussehen und Beweglichkeit mehr vorhanden war. Die Zahl der Trypanosomen wurde täglich durch Durchmustern jedes Wells unter dem Lichtmikroskop kontrolliert, wie in Kapitel 3.3.1.8 beschrieben, und am zehnten Tag ausgewertet. Zur Bestätigung des Ergebnisses wurden die Versuche mindestens einmal, bei positivem Ergebnis mindestens zweimal wiederholt. Beim Test von Reinsubstanzen oder isolierten Fraktionen wurde verfahren wie mit den Pflanzenextrakten. Diese wurden zunächst in den Konzentrationen 25, 50 und

100 µg/ml eingesetzt, bei guter Wachstumshemmung bei 25 µg/ml wurde die Konzentration weiter gesenkt.

3.3.2 *In vivo* Testsystem

3.3.2.1 Infektion mit *Trypanosoma brucei brucei*

Ein Trypanosomenstabilat wurde bei 37 °C aufgetaut und mit 0,5 ml Pufferlösung verdünnt. Anschließend wurde die Beweglichkeit der Trypanosomen an einem kleinen Tropfen unter dem Mikroskop überprüft und die Anzahl der Trypanosomen bestimmt. Ohne große Zeitverzögerung beziehungsweise unter Kühlung auf Eis wurden damit zwei *Mastomy coucha* Mäuse durch intraperitoneale Injektion infiziert. Die Parasitämie steigt erfahrungsgemäß während der ersten Tage an und erreicht an Tag 3 oder 4 nach der Infektion ihren Maximalwert. Die Parasitendichte wurde wie in folgendem Abschnitt beschrieben ermittelt. Stieg die Parasitämie über 10^6 Tryps/ml an, konnte trypanosomenhaltiges Blut durch Herzpunktion gewonnen werden und für den *in vivo* Test verwendet werden, falls die Parasitämie nur einen geringeren Wert erreichte, wurden mit dem Blut zwei weitere Mäuse infiziert bis die Parasitämie hoch genug war. Das durch Herzpunktion gewonnene Blut dieser Maus/Mäuse konnte für den *in vivo* Wirksamkeitstest verwendet werden.

3.3.2.2 Nachweis von Trypanosomen im Blut

Für die parasitologischen Untersuchungen wurde durch Abschneiden der äußersten Schwanzspitze beziehungsweise durch Anschneiden des gebildeten Schorfes ein kleiner Tropfen Schwanzblut gewonnen. Zur Gewinnung eines Nativpräparats wurde der Tropfen auf einen Objektträger getupft, mit einem Deckgläschen abgedeckt und unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung (Okular 10x, Objektiv 40x) nach der unten beschriebenen *Rapid Matching Method* von Herbert and Lumsden durchmustert (Herbert und Lumsden, 1976). Bei nicht nachweisbarer Parasitämie im Nativpräparat wurde die Parasitämie mittels HCT überprüft. Diese ermöglicht den Nachweis sehr geringer Parasitämien von 5×10^2 Tryps/ml (WHO, 1986).

3.3.2.2.1 Rapid Matching Method nach Herbert und Lumsden

Mit der *Rapid Matching Method* kann sehr rasch die Anzahl der Parasiten im Nativpräparat abgeschätzt werden (Herbert und Lumsden, 1976). Ein kleiner Tropfen Schwanzblut wurde auf einen Objektträger mit Deckglas gebracht, wobei die Menge an Blut den Platz unter dem Deckglas gerade nicht ausfüllen soll. Dann wurde der Film unter 400-facher Vergrößerung (Okular 10x, Objektiv 40x) durchmustert. Ein Geldrolleneffekt der Erythrozyten konnte auftreten, ansonsten sollten die Zellen nur eine Schicht bilden. Wenn mehr als ein Trypanosom pro Gesichtsfeld vorhanden war, wurde nur ein repräsentatives Feld ausgezählt. Wenn kein oder nur ein Trypanosom vorhanden war, wurden zunächst 5 Felder ausgezählt, falls in den 5 Feldern zwei oder weniger Trypanosomen vorhanden waren, wurden 10 oder bei zwei oder weniger Trypanosomen in 10 Feldern, 20 Felder ausgezählt. Ein Trypanosom pro Feld entspricht erfahrungsgemäß einer Parasitämie von $3,9 \times 10^6$ Tryps/ml Blut. Ein Trypanosom pro 20 Felder entspricht einer Parasitämie von $1,95 \times 10^5$ Tryps/ml Blut.

3.3.2.2.2 Hämatokrit-Zentrifugations-Technik (HCT)

Die Hämatokrit-Zentrifugations-Technik wurde von Woo (1970) entwickelt und von Walker und Mehlitz modifiziert (Walker, 1972; Mehlitz, 1978). Bei dieser Technik reichern sich die Trypanosomen in einer Kapillare an der Grenze zwischen Zellsediment und Plasmasäule an.

- Heparinisierte Hämatokritkapillaren (60 µl) wurden einen Zentimeter hoch mit Walker-Lösung gefüllt.
- Die gleiche Menge Schwanzblut wurde mit der Kapillare aufgenommen und diese einseitig mit Plastilin verschlossen.
- In der Hämatokritzentrifuge wurde zehn Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert.
- Die Parasiten wurden in der Kapillare bei 400-facher Vergrößerung (Spitzobjektiv 40/0,85 Öl) in einer mit Immersionsöl gefüllten Rinne einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

3.3.2.3 In vivo Test zur Dosisfindung

Im Vorfeld des eigentlichen Wirksamkeitstests sollte an wenigen Mäusen die Verträglichkeit der geplanten Dosis getestet werden, um im späteren Test Mäuse

einzusparen. In Absprache mit Herrn Rundfeldt von der Firma Elbion und meinen Betreuern wurde dafür folgender Test entwickelt.

Die Extrakte, die *in vitro* eine gute Wirksamkeit zeigten, wurden zur Dosisfindung ohne vorherige Infektion in einer Konzentration von 37,5 mg/kg KG; 75 mg/kg KG beziehungsweise 150 mg/kg KG je einer Maus zweimal täglich über drei Tage intraperitoneal verabreicht. Dies entsprach dem Behandlungsschema, das für einen darauf folgenden *in vivo* Wirksamkeitstest vorgesehen war. Die Extrakte wurden kurz vor der Injektion in Mandelöl gelöst beziehungsweise im Ultraschall fein suspendiert. Die Menge betrug bei jeder Injektion 0,5 ml pro 75 g Körpergewicht. Daraus ergab sich für die höchste Dosierung von 150 mg/kg KG eine Konzentration des Extraktes von 22,5 mg/ml, für die niedrigeren Dosierungen jeweils 11,25 mg/ml bzw. 5,625 mg/ml. Klinische Symptome, die die Mäuse während des Versuches zeigten, wurden dokumentiert.

3.3.2.4 Pathologische Untersuchungen

Die Mäuse aus der Dosisfindungsuntersuchung wurden zur Ermittlung der Auswirkung der Extrakte auf die inneren Organe einer pathologischen Untersuchung am Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin unterzogen. Dabei wurden Leber, Niere, Herz, Lunge, ZNS und die lymphatischen Organe untersucht.

3.3.2.5 *In vivo* Wirksamkeitstest

Extrakte mit hoher Aktivität *in vitro* und geringer Toxizität *in vivo* wurden im *Standard-Drug Sensitivity Test* nach Eisler *et al.* (2001) auf ihre Wirksamkeit untersucht. Für jede Behandlungsgruppe und für die Kontrollgruppe wurden jeweils sechs Tiere eingesetzt. Die Mäuse wurden jeweils mit 10^5 Trypanosomen aus dem Herzblut einer Maus mit sehr hoher Parasitämie ($> 10^6$ Trypanosomen/ml) intraperitoneal infiziert. 24 Stunden nach der Infektion wurden die Mäuse zweimal täglich über insgesamt drei Tage durch intraperitoneale Injektion behandelt. Die Extrakte wurden wie in Kapitel 3.3.2.3 beschrieben in Mandelöl gelöst beziehungsweise suspendiert, den Mäusen der Kontrollgruppe wurde reines Mandelöl in der gleichen Menge intraperitoneal injiziert. Der Verlauf der Parasitämie wurde täglich wie in Kapitel 3.3.2.2 beschrieben bestimmt und dokumentiert.

3.3.3 Phytochemische Methoden

3.3.3.1 Herstellen der Extrakte für die *in vitro* und *in vivo* Versuche

Eine Menge von 20-40 g des getrockneten und pulverisierten Pflanzenmaterials wurde mit der zehnfachen Menge an Lösungsmittel versetzt.

Die mit DCM (Dichlormethan) bzw. MeOH (Methanol) versetzten Drogen wurden unter Rückfluss 30 Minuten lang extrahiert. Anschließend wurde der Drogenrückstand abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C für Dichlormethan und bei 65 °C für Methanol am Rotationsverdampfer abgedampft.

Die wässrigen Extrakte wurden durch Mazeration hergestellt. Die mit Wasser versetzte Droge wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 20 Minuten lang mit Ultraschall behandelt. Der so gewonnene Extrakt wurde filtriert, gefriergetrocknet und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

3.3.3.2 Aktivitätsgeleitete Fraktionierung

Der Extrakt mit der größten Aktivität im LTVA sowie im *Standard-Drug Sensitivity Test* wurde nach dem Prinzip der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung weiter untersucht. Eine erste Vortrennung wurde durch aufeinander folgende Extraktion des Methanolextraktes mit Petrolether, Dichlormethan, Ethylacetat und Methanol erreicht. Außerdem wurde der Methanolextrakt über präparative DC in verschiedene Fraktionen getrennt. Gab es laut Literaturangaben und durchgeführter DC Untersuchungen Hinweise auf Alkaloide oder Saponine, wurden diese durch spezielle Extraktionsverfahren angereichert.

Alle erhaltenen Fraktionen wurden auf Wirksamkeit gegen *T. b. brucei* im *in vitro* System getestet. Ließ sich die Aktivität in einzelnen Fraktionen anreichern, wurden diese weiter aufgetrennt und jeweils auf ihre Wirksamkeit *in vitro* getestet. Diese Auftrennung erfolgte bei größeren Substanzmengen mittels Säulenchromatographie mit der stationären Phase Kieselgel, Kieselgel RP-18 oder Sephadex LH-20, bei geringeren Mengen an der HPLC oder über präparative DC.

3.3.3.2.1 Extraktion mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität

Ein Methanolextrakt wurde hergestellt, indem 20 g Droge zweimal mit je 100 ml Methanol eine halbe Stunde lang bei Raumtemperatur im Ultraschall extrahiert wurde.

Anschließend wurde 12 Stunden bei Raumtemperatur mazeriert und erneut eine halbe Stunde im Ultraschall extrahiert. Der so gewonnene Methanolextrakt wurde zur Trockene eingedampft und in 100 ml zwei prozentiger wässriger Weinsäure gelöst beziehungsweise suspendiert. Daraus wurden sehr lipophile Stoffe mit zweimal je 100 ml Petrolether abgetrennt. Anschließend wurde nacheinander mit je zweimal 100 ml Dichlormethan und EtOAc (Ethylacetat) extrahiert und die jeweiligen Phasen abgetrennt. Die entstandenen Fraktionen wurden im *in vitro* Testsystem getestet.

3.3.3.2.2 Präparative DC des Methanolextraktes

Der Methanolextrakt wurde mittels präparativer DC zunächst an DC-Folien zur Einstellung der optimalen Trennbedingungen, später an Glasplatten mit Schichtdicken von 0,5 mm chromatographiert. Alle voneinander getrennten Fraktionen und auch Zwischenfraktionen wurden von den Platten abgekratzt und zweimal mit Methanol im Ultraschall extrahiert. Durch zweimaliges Zentrifugieren und Abheben des Überstandes mit einer Pipette wurden die extrahierten Substanzen vom Plattenmaterial getrennt und der Methanol abgedampft. Alle so gewonnenen Substanzen wurden im *in vitro* Testsystem getestet.

3.3.3.2.3 Gewinnung des Rohalkaloidextraktes

Zur Gewinnung des Rohalkaloidextraktes wurde eine Drogenmenge von 200 g verwendet. Die Wurzelstücke wurden durch eine Pulvermühle weiter zerkleinert und anschließend zweimal mit je einem Liter Methanol bei einer Temperatur von 40 °C eine Stunde unter Rückfluss extrahiert. Der so gewonnene Methanolextrakt wurde zur Trockene eingedampft und in einem Liter zwei prozentiger wässriger Weinsäure gelöst beziehungsweise suspendiert. Daraus wurden zunächst lipophile neutrale beziehungsweise saure Komponenten durch dreimaliges Ausschütteln mit je einem Liter Dichlormethan abgetrennt. Nach Alkalisieren der wässrigen Phase mit Ammoniak auf pH = 8 wurden anschließend basische Komponenten durch dreimaliges Ausschütteln mit je einem Liter einer Mischung aus Dichlormethan und Isopropanol im Verhältnis 3:1 angereichert.

3.3.3.2.4 Gewinnung des Rohsaponinextraktes

Zur Gewinnung des Rohsaponinextraktes wurde zunächst ein 45-prozentiger Ethanolextrakt hergestellt. Das zerkleinerte Pflanzenmaterial wurde dabei zweimal mit insgesamt der doppelten Menge 45-prozentigem Ethanol eine halbe Stunde unter Ultraschall extrahiert, anschließend unter gelegentlichem Umschütteln zwölf Stunden mazeriert und erneut eine halbe Stunde mit Ultraschall behandelt. Nach Abtrennung des Ethanols mittels Rotationsverdampfers wurde die wässrige Phase zweimal mit n-Butanol ausgeschüttelt, wobei beim Ausschütteln das Verhältnis Extrakt/n-Butanol 2:1 betrug. Der Butanolextrakt wurde zur Trockene eingengt und in Methanol gelöst. Aus dieser konzentrierten Lösung wurde durch Etherfällung unter Eiskühlung das Rohsaponingemisch erhalten, das mehrmals mit Ether gewaschen und über Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 weiter aufgereinigt wurde.

3.3.4 Strukturaufklärung von Reinsubstanzen

Zur Strukturaufklärung von Reinsubstanzen wurden verschiedene spektroskopische Methoden verwendet. Das Molekulargewicht wurde mit Hilfe der EI-Massenspektrometrie bestimmt. Beim Bestehen glykosidischer oder anderer labiler Bindungen wurden FAB-Massenspektren aufgenommen. Zur Identifizierung charakteristischer Strukturelemente wurde die ^1H -NMR-Spektroskopie herangezogen. Diese Daten reichten bereits aus, um durch den Vergleich mit Literaturangaben herauszufinden, ob es sich um eine bereits bekannte Substanz handelt. Zur genaueren Strukturaufklärung können ^{13}C -NMR-Spektren und zweidimensionale NMR-Methoden wie H, H-COSY (Zweidimensionale Protonen-Korrelation / Correlation Spectroscopy) und C, H-COSY herangezogen werden. Um die genaue Anordnung bestimmter Strukturelemente im Molekül zu bestimmen, können HMBC-Spektren aufgenommen werden.

4 ERGEBNISSE

4.1 *In vitro* Screening der Arzneipflanzen aus Mali

Von allen Pflanzenteilen wurden Dichlormethanextrakte hergestellt und im LTVA auf die Wirksamkeit gegen *T. b. brucei* getestet. 17 Extrakte (36 Prozent) zeigten keine Aktivität mit MHK-Werten $> 200 \mu\text{g/ml}$, 17 Extrakte (36 Prozent) zeigten moderate Aktivität mit MHK-Werten von > 100 bis $200 \mu\text{g/ml}$, 13 Extrakte (28 Prozent) waren aktiv mit MHK-Werten $\leq 100 \mu\text{g/ml}$ (Tabelle 4-1). Die MTK (minimale toxische Konzentration) bezeichnet die Konzentration, bei der sichtbare Schädigung an den MEF-Zellen festzustellen war. Die MHK wurde festgelegt als die Konzentration, bei der unter visueller Betrachtung unter dem Mikroskop nach zehn Tagen kein Trypanosom mit normaler Gestalt und Beweglichkeit mehr vorhanden war.

Tabelle 4-1 MTK- und MHK-Werte der lipophilen Rohextrakte aus den angegebenen Drogen

Pflanzenart	Pflanzenteil(e)	MTK($\mu\text{g/ml}$)	MHK($\mu\text{g/ml}$)
<i>Acacia nilotica</i>	Stammrinde	500	50
	Wurzelrinde	100	50
<i>Afzelia africana</i>	Stammrinde	> 500	500
<i>Ampelocissus grantii</i>	Oberirdische Teile	> 500	200
<i>Annona senegalensis</i>	Wurzel	50	50
	Blätter	> 500	> 500
<i>Anogeissus leiocarpa</i>	Wurzelrinde	> 500	200
	Blätter	> 500	200
<i>Balanites aegyptiacus</i>	Wurzel	500	500
	Stammrinde	500	50
	Triebe	> 500	200
<i>Bauhinia reticulata</i>	Zweige/Blätter	100	100
<i>Boscia angustifolia</i>	Stammrinde	100	200
<i>Cassia sieberiana</i>	Wurzel	> 500	500
<i>Ceiba pentandra</i>	Stammrinde	> 500	200
	Wurzelrinde	> 500	> 500
	Blätter	> 500	500

<i>Celtis integrifolia</i>	Zweige/ Blätter	> 500	> 500
<i>Cochlospermum tinctorium</i>	Wurzel	500	500
<i>Combretum glutinosum</i>	Stammrinde	200	100
<i>Combretum micranthum</i>	Blätter	> 500	500
<i>Diospyros mespiliformis</i>	Blätter	> 500	500
<i>Entada africana</i>	Wurzel	> 500	200
<i>Erythrophleum guineense</i>	Blätter	> 500	500
<i>Ficus iteophylla</i>	Blätter	> 500	100
<i>Gardenia triacantha</i>	Wurzel	> 500	200
<i>Guiera senegalensis</i>	Wurzel	> 500	200
	Blätter	200	50
<i>Holarrhena floribunda</i>	Zweige/Blätter	> 500	200
<i>Khaya senegalensis</i>	Stammrinde	> 500	100
<i>Lannea microcarpa</i>	Stammrinde	> 500	> 500
	Blätter	> 500	200
<i>Lawsonia alba</i>	Zweige/Blätter	> 500	200
<i>Leptadenia hastata</i>	Oberirdische Teile	> 500	> 500
<i>Loranthus pentagonia</i>	Ganze Pflanze	> 500	500
<i>Maytenus senegalensis</i>	Zweige/Blätter	> 500	200
<i>Mitragyna inermis</i>	Blätter	> 500	100
	Stammrinde	> 500	200
<i>Opilia celtidifolia</i>	Zweige/Blätter	> 500	500
<i>Pterocarpus erinaceus</i>	Triebe	> 500	200
<i>Securidaca longepedunculata</i>	Wurzel	> 500	50
<i>Spilanthes oleracea</i>	Blüten	500	100
<i>Sterculia tomentosa</i>	Wurzel	> 500	500
<i>Strychnos spinosa</i>	Wurzel	500	200
<i>Tamarindus indica</i>	Blätter	> 500	500
<i>Terminalia avicennioides</i>	Stammrinde	> 500	100
<i>Trichilia emetica</i>	Stammrinde	500	200
Diminazenaceturat			0,05

Die genauen Pflanzenbezeichnungen mit Autoren der Erstveröffentlichung sind in Tabelle 3-1 angegeben.
 MTK = Minimale toxische Konzentration MHK = Minimale Hemmkonzentration

Aus den insgesamt 47 Dichlormethanextrakten, die im LTVA getestet wurden, zeigten Extrakte von 6 Drogen eine MHK kleiner oder gleich 50 µg/ml. Von diesen Drogen wurden zusätzlich Wasser- und Methanolextrakte hergestellt und im LTVA getestet, um eine erste Einschätzung der Verteilung der aktiven Komponenten zu bekommen (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2 MHK-Werte, MTK-Werte und Selektivitätsindices ($SI = MTK/MHK$) der aktiven Dichlormethanextrakte im Vergleich zu den Wasser- und Methanolextrakten

Pflanzenart	Pflanzenteil	Extrakt	MHK (µg/ml)	MTK (µg/ml)	SI
<i>A. nilotica</i>	Stammrinde	H ₂ O	200	> 500	>2,5
		CH ₃ OH	100	> 500	>5
		CH ₂ Cl ₂	50	500	10
	Wurzelrinde	H ₂ O	200	> 500	>2,5
		CH ₃ OH	100	> 500	>5
		CH ₂ Cl ₂	50	100	2
<i>A. senegalensis</i>	Wurzel	H ₂ O	> 500	> 500	1
		CH ₃ OH	500	50	0,1
		CH ₂ Cl ₂	50	50	1
<i>B. aegyptiaca</i>	Stammrinde	H ₂ O	200	100	0,5
		CH ₃ OH	100	100	1
		CH ₂ Cl ₂	50	500	10
<i>G. senegalensis</i>	Blätter	H ₂ O	200	> 500	>2,5
		CH ₃ OH	200	> 500	>2,5
		CH ₂ Cl ₂	50	200	4
<i>S. longepedunculata</i>	Wurzel	H ₂ O	50	100	2
		CH ₃ OH	50	200	4
		CH ₂ Cl ₂	50	> 500	> 10

4.2 Studie zur Dosisfindung *in vivo*

Die Extrakte, die *in vitro* eine gute Wirksamkeit zeigten, wurden wie in Kapitel 3.3.2.3 beschrieben zur Dosisfindung in drei Konzentrationen je einer Maus verabreicht. Vier der sechs Extrakte zeigten bereits *in vitro* relativ geringe Zytotoxizität gegenüber den Feederlayer Zellen und selbst bei Verabreichung in der höchsten Dosierung von 150 mg/kg KG zweimal täglich über drei Tage ergab sich bei den Versuchsmäusen kein besonderer Befund. Die untersuchten Organe zeigten nur milde Veränderungen.

4.2.1 Symptome der Versuchsmäuse nach Verabreichung der Extrakte

Das Ergebnis der klinischen Untersuchung der Mäuse ist in Tabelle 4-3 wiedergegeben.

Tabelle 4-3 Ergebnisse der Dosisfindungsstudie: klinische Befunde

Dosis mg/kg KG	<i>A. nilotica</i> Wurzelrinde	<i>A. nilotica</i> Stammrinde	<i>A. sene- galensis</i>	<i>B. aegypti- tiaca</i>	<i>G. sene- galensis</i>	<i>S. longep- dunculata</i>
37,5	O.b.B.	O.b.B.	O.b.B.	†	O.b.B.	O.b.B.
75	Deutl.B.	O.b.B.	O.b.B.	†	O.b.B.	O.b.B.
150	†	Ger.B.	O.b.B.	†	O.b.B.	O.b.B.

O.b.B. = Ohne besonderen Befund *Deutl.B.* = deutlicher Befund
Ger.B. = Geringer Befund † = Maus verstorben

Bei einer Dosis von 75 mg/kg KG zeigte die Maus, der ein Extrakt der Wurzelrinde von *A. nilotica* verabreicht wurde, ab der vierten Behandlung deutliche toxische Auswirkungen. Die Maus der eine Dosis von 150 mg/kg KG des gleichen Extraktes verabreicht wurde, starb nach der dritten Behandlung. Die Maus, der der Extrakt der Stammrinde von *A. nilotica* in einer Dosis von 150 mg/kg KG verabreicht wurde, zeigte anfangs toxische Symptome, die ab der vierten Behandlung nicht mehr zu beobachten waren (Tabelle 4-4). Alle drei Mäuse denen der Extrakt der Stammrinde von *B. aegyptiaca* verabreicht wurde starben, bei Gabe von 150 mg/kg KG und 75 mg/kg KG bereits nach der zweiten Behandlung, bei Gabe von 37,5 mg/kg KG nach der vierten Behandlung.

Tabelle 4-4 Klinische Symptome je einer Maus nach intraperitonealer Injektion von 75 mg/kg KG Wurzelrindenextrakt bzw. 150 mg/kg KG Stammrindenextrakt von *A. nilotica*

	<i>A. nilotica</i> 75 mg/kg KG Wurzelrinde,	<i>A. nilotica</i> 150 mg/kg KG Stammrinde,
Nach 2. Beh.	o.b.B.	Leicht aufgerichtetes Haarkleid
Vor 3. Beh.	o.b.B.	Apathisch nach Behandlung
Vor 4. Beh.	Leicht apathisch Leicht aufgerichtetes Haarkleid	Aufgerichtetes Haarkleid Augenspalte reduziert
Vor 5. Beh.	Augen geschlossen Aufgerichtetes Haarkleid Verminderte Anteilnahme an Umgebung	o.b.B.
Vor 6. Beh.	Augen leicht verklebt Anteilnahme mäßig	o.b.B.

O.b.B. = Ohne besonderen Befund *Beh.* = Behandlung

4.2.2 Histopathologische Untersuchung der Mäuse

Leber, Niere, Herz, Lunge, ZNS und die lymphatischen Organe wurden histopathologisch untersucht. Im Mittelpunkt der Veränderungen standen Schäden an den tubulären Strukturen der Niere. Bei den Tieren, die während des Versuches gestorben sind, ist als Todesursache ein Nierenversagen infolge dieser Schäden wahrscheinlich. Des Weiteren zeigten sich bei allen Tieren eine Veränderung der Leber und eine leichte Immunmodulation mit Hyperplasie der lymphatischen Organe. An den übrigen Organen lagen keine besonderen Befunde vor.

4.3 Bestimmung der *in vivo* Wirksamkeit ausgewählter Extrakte

Die Dichlormethanextrakte der Stammrinde von *A. nilotica*, der Blätter von *G. senegalensis*, der Wurzel von *A. senegalensis* und der Wurzel von *S. longepedunculata* wurden wie in Kapitel 3.3.2.5 beschriebenen im *in vivo* Wirksamkeitstest auf ihre Aktivität im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe untersucht. Diminazenaceturat konnte in vergleichbaren Tests am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität Berlin infizierte Mäuse vollständig von Parasiten befreien.

Tabelle 4-5 zeigt die Verteilung der Versuchsmäuse auf die einzelnen Gruppen.

Tabelle 4-5 Verteilung der Versuchsmäuse auf die einzelnen Gruppen

Kontrolle		<i>A. nilotica</i>		<i>G. senegalensis</i>		<i>A. senegalensis</i>		<i>S. longepedunculata</i>	
Alter* ¹	Gewicht* ²	Alter	Gewicht	Alter	Gewicht	Alter	Gewicht	Alter	Gewicht
20	89	20	98	20	95	18	88	18	97
16	100	16	90	16	52	16	96	12	65
14	82	16	88	14	79	14	74	12	79
14	69	14	74	12	95	14	75	14	86
16	58	14	51	12	51	12	58	14	77
8	80	8	79	14	78	12	54	8	48
8	47	8	48	8	76	8	81		
13,7	75	13,7	75	13,7	75	13,7	75	13	75

*¹ in Wochen *² in gramm

Letzte Zeile: Durchschnittsalter und -gewicht

4.3.1 Entwicklung der Parasitämie

Die Behandlungsgruppe mit *A. senegalensis* musste frühzeitig aus dem Test ausgeschlossen werden, da sich der Extrakt als toxischer herausstellte, als nach dem Vorversuch anzunehmen war. Eine Maus starb bereits nach der ersten Behandlung, eine weitere nach der zweiten Behandlung.

Keiner der Extrakte im Versuch konnte die Parasitämie vollständig zurückdrängen. Durch Behandlung der Mäuse mit dem Blattextrakt von *G. senegalensis* konnte die durchschnittliche Parasitämie von sieben Mäusen verglichen mit der Kontrollgruppe um 41,2 Prozent reduziert werden. Der Wurzelextrakt von *S. longepedunculata* konnte die durchschnittliche Parasitämie von sechs Mäusen um 48,4 Prozent reduzieren. Dabei wurde für jede Maus die Anzahl der Parasiten pro Tag für die gesamte Versuchsdauer von 21 Tagen zusammengezählt. Anschließend wurde aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an Mäusen in den einzelnen Gruppen der Mittelwert aus den Parasitämien der einzelnen Mäuse gebildet. Die Mittelwerte für die Behandlungsgruppen wurden mit dem Mittelwert für die Kontrollgruppe verglichen. Verwendet man nur die Parasitämiewerte für die unten dargestellten ersten acht Tage nach Infektion, so ergibt sich eine Reduktion von 48,8 Prozent für *S. longepedunculata* und eine Reduktion von 41,3 Prozent für *G. senegalensis*. Der Verlauf der Parasitämie ist in Abbildung 4-1 dargestellt.

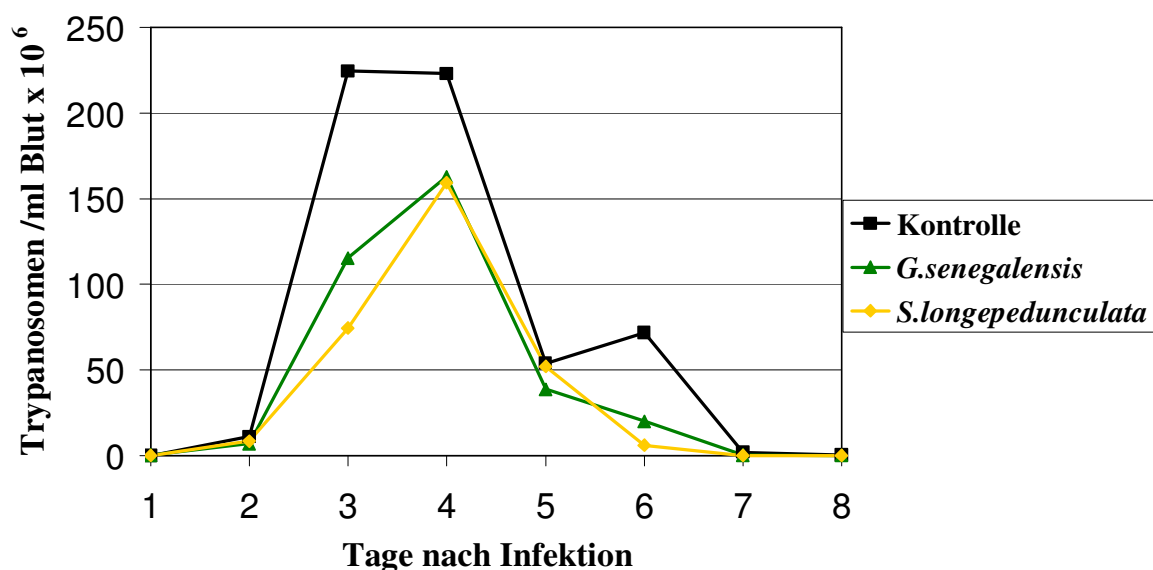


Abbildung 4-1 Entwicklung der Parasitämie in Mäusen nach Infektion mit *T. b. brucei* und Behandlung mit 150 mg/kg KG Extrakt, gezeigt sind die Mittelwerte von 6 beziehungsweise 7 Mäusen

Die folgenden Abbildungen zeigen die Parasitämieentwicklung der einzelnen Mäuse aus den oben dargestellten Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe. Bei einer Maus aus der Kontrollgruppe konnte nach Infektion keine Parasitämie festgestellt werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass bei der intraperitonealen Infektion der Darm getroffen wurde. Diese Maus wurde nicht in die Statistik mit aufgenommen.

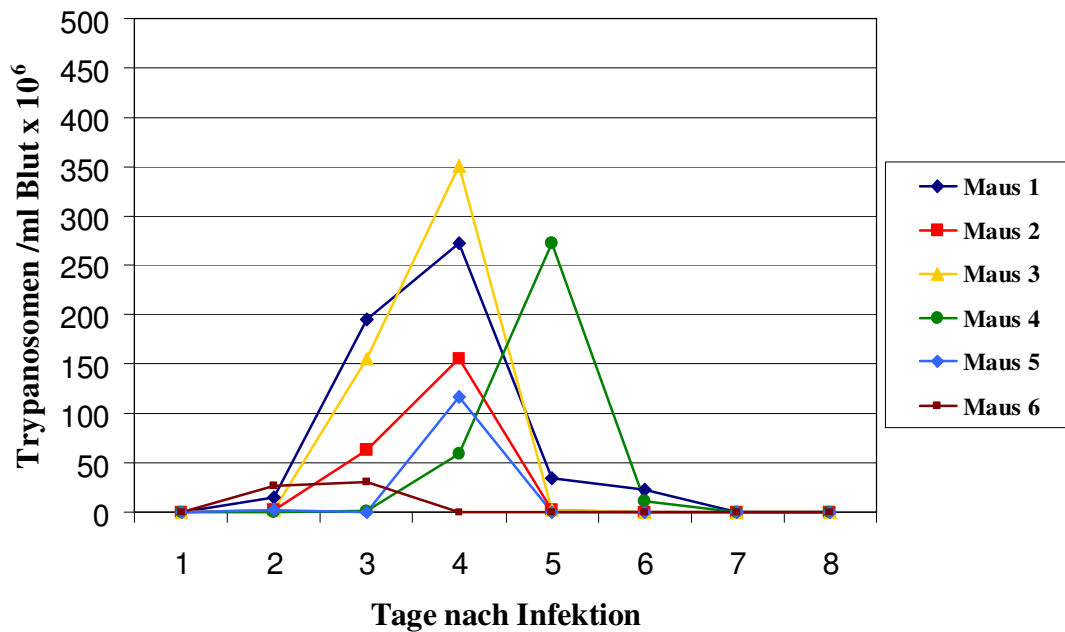


Abbildung 4-2 Entwicklung der Parasitämie in den 6 Mäusen, die nach Infektion mit *T. b. brucei* mit 150 mg/kg KG des Wurzelextrakts von *S. longepedunculata* behandelt wurden

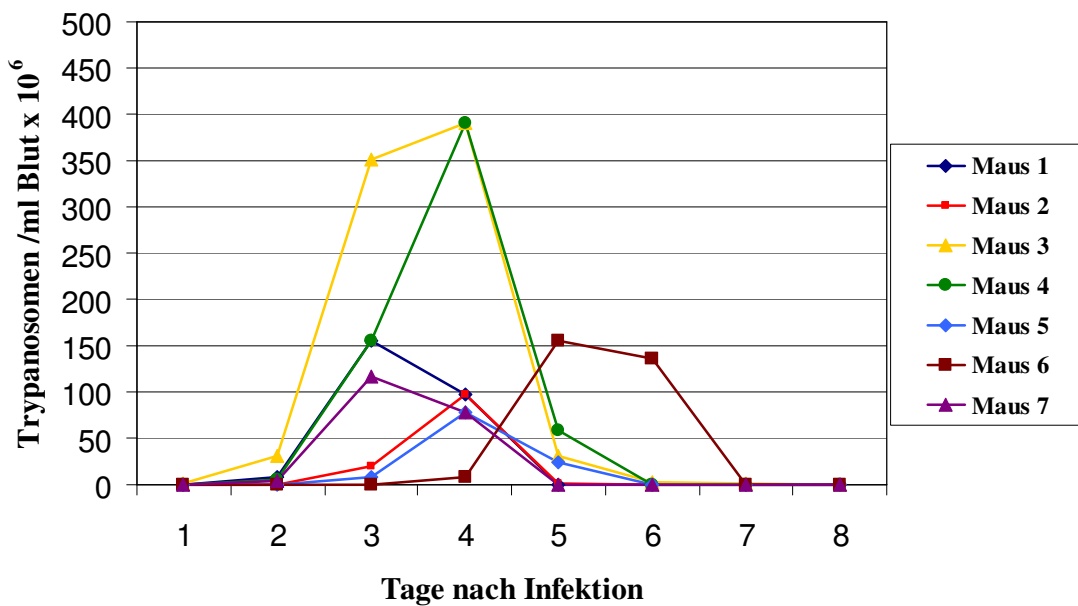


Abbildung 4-3 Entwicklung der Parasitämie in den 7 Mäusen, die nach Infektion mit *T. b. brucei* mit 150 mg/kg KG Blattextrakt von *G. senegalensis* behandelt wurden

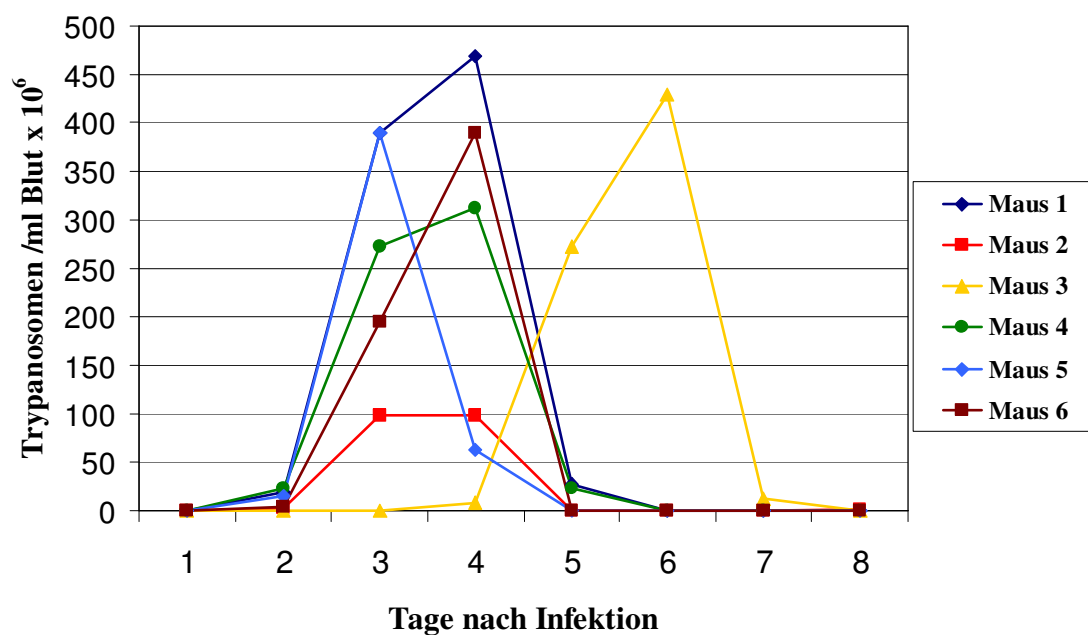


Abbildung 4-4 Entwicklung der Parasitämie in den 6 Mäusen, die nach Infektion mit *T. b. brucei* als Kontrollgruppe dienten

4.3.2 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung des Ergebnisses wurde der Mann-Whitney-Test („Mann-Whitney-U-Test“ oder kurz „U-Test“) verwendet. Dies ist ein parameterfreier statistischer Test mit dem überprüft werden kann, ob zwei unabhängige Verteilungen A und B, wie hier eine unbeeinflusste Kontrollgruppe und eine beeinflusste Behandlungsgruppe sich signifikant voneinander unterscheiden.

Für ein Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ ist das Ergebnis für keine der Behandlungsgruppen statistisch signifikant.

4.4 Immunsuppressiver Effekt der Stammrinde von *Acacia nilotica*

Der Dichlormethanextrakt der Stammrinde von *A. nilotica* zeigte bei der *in vivo* Untersuchung einen erstaunlichen Nebeneffekt. Während des Versuches stieg die Parasitämie der sieben Mäuse, die mit *T. b. brucei* infiziert wurden, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe auf das 2,7-fache an. Dies deutet auf einen immunsuppressiven Effekt des Extraktes hin.

4.4.1 Entwicklung der Parasitämie

Der Verlauf der Parasitämie ist in Abbildung 4-5 dargestellt.

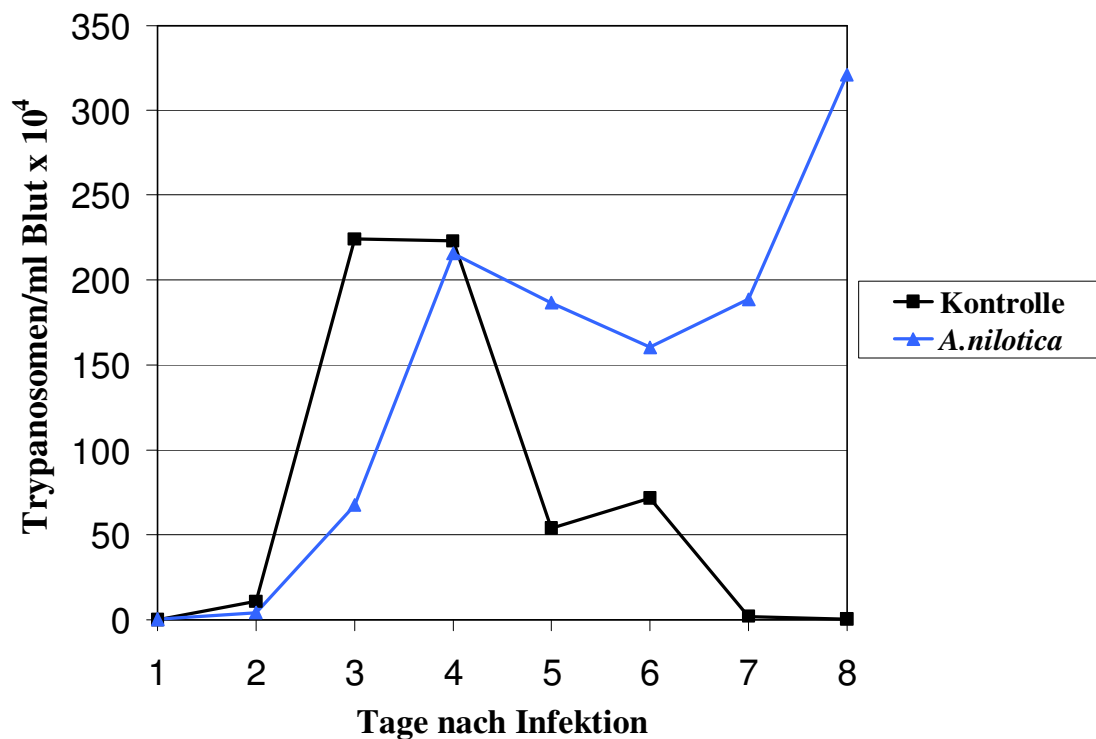


Abbildung 4-5 Verlauf der Parasitämie in Mäusen nach Infektion mit *T. b. brucei* und Behandlung mit 150 mg/kg KG Extrakt der Stammrinde von *A. nilotica*, gezeigt sind die Mittelwerte von 6 beziehungsweise 7 Mäusen

Die folgende Abbildung zeigt die Parasitämieentwicklung der einzelnen Mäuse aus der Behandlungsgruppe mit dem Extrakt der Stammrinde von *A. nilotica*. Im Gegensatz zu den anderen Graphiken, bei denen je acht Tage nach Infektion angegeben sind, sind hier elf Tage nach Infektion dargestellt, um die Parasitämieentwicklung deutlich zu machen. Maus 7 ist nach acht Tagen gestorben.

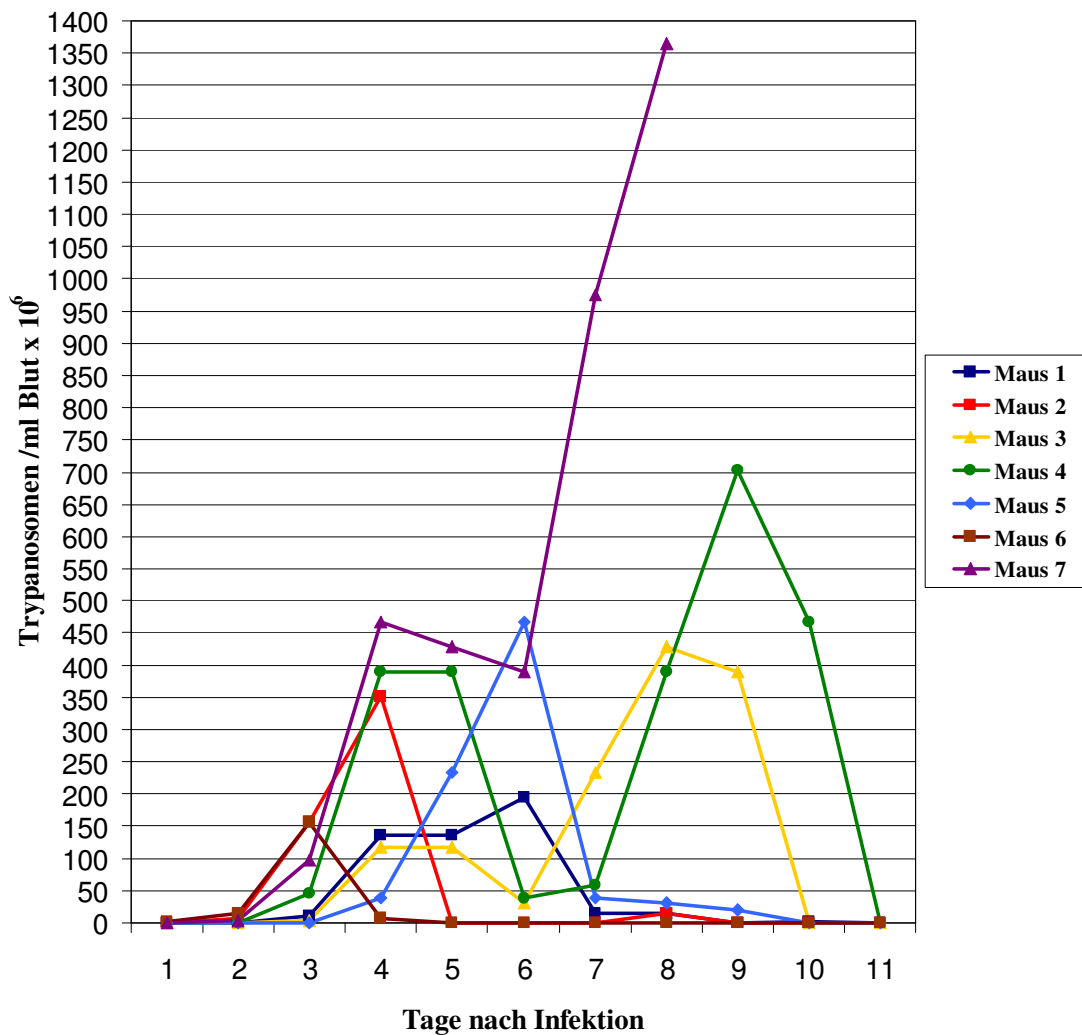


Abbildung 4-6 Entwicklung der Parasitämie in den 7 Mäusen, die nach Infektion mit *T. b. brucei* mit 150 mg/kg KG Extrakt der Stammrinde von *A. nilotica* behandelt wurden

4.4.2 Statistische Auswertung

Wenn der Auswertung die Parasitämie der einzelnen Mäuse während der ersten elf Tage zugrunde gelegt wird, ergibt sich eine Erhöhung der Parasitämie auf das 2,7-fache. Die Parasitämie der Maus, die am achten Tag gestorben ist, wurde ab diesem Tag mit Null gerechnet. Auch hier ist das Ergebnis unter Anwendung des Mann-Whitney-Tests und eines Signifikanzniveaus von $\alpha = 5 \%$ nicht statistisch signifikant.

4.5 Phytochemische Charakterisierung der Wurzel von *Securidaca longepedunculata*

Die Wurzel von *S. longepedunculata*, deren Extrakt die höchsten Aktivität *in vivo* aufzeigte, wurde für die phytochemische Charakterisierung ausgewählt.

Für die *in vitro* Tests von Einzelverbindungen, Rohextrakten oder Zwischenfraktionen wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur Bestätigung des Ergebnisses wurden die Versuche mindestens einmal, bei positivem Ergebnis mindestens zweimal wiederholt.

4.5.1 Wirksamkeit bekannter Inhaltsstoffe *in vitro*

Aus der Literatur sind mehrere Inhaltsstoffe aus der Pflanze bekannt. Einige davon wurden im *in vitro* System als Reinsubstanzen getestet. Keine dieser Einzelverbindungen konnte die Aktivität des Gesamtextraktes überschreiten.

Tabelle 4-6 *In vitro* Wirksamkeit bekannter Inhaltsstoffe aus *S. longepedunculata*

Getestete Substanzen	MHK (µg/ml)	Getestete Substanzen	MHK (µg/ml)
Elymoclavin	50	Salicylsäuremethylester	> 50
Salicylsäure	> 50	Sinapinsäure	> 50
Na-Salicylat	> 50	Kaffeensäure	50

4.5.2 Aktivitätsgeleitete Fraktionierung

Wie bereits in Tabelle 4-2 dargestellt, waren der Methanolextrakt und der wässrige Extrakt im *in vitro* Test ebenso aktiv wie der Dichlormethanextrakt. Die Werte für die MHK und die MTK sowie die Selektivitätsindices sind in folgender Tabelle nochmals dargestellt.

Tabelle 4-7 Aktivität des Wasser-, Methanol- und Dichlormethanextraktes von *S. longepedunculata*

Pflanzenart	Pflanzenteil	Extrakt	MHK (µg/ml)	MTK (µg/ml)	SI
<i>S. longepedunculata</i>	Wurzel	H ₂ O	50	100	2
		CH ₃ OH	50	200	4
		CH ₂ Cl ₂	50	> 500	> 10

Durch aufeinander folgende Extraktion des in zwei prozentiger Weinsäure gelösten Methanolextraktes mit mehreren Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität (Petrolether, Dichlormethan und Ethylacetat), wie in Kapitel 3.3.3.2.1 beschrieben, konnte in keiner Fraktion eine Anreicherung der Wirksamkeit im Vergleich zum reinen Methanolextrakt festgestellt werden.

Tabelle 4-8 Aktivität der Fraktionen nach Extraktion des Methanolextraktes mit Lösungsmitteln absteigender Polarität

Getestete Substanzen	MHK ($\mu\text{g/ml}$)	Getestete Substanzen	MHK ($\mu\text{g/ml}$)
Methanolextrakt	50	Dichlormethanfraktion	> 50
Petroletherfraktion	> 50	Ethylacetatfraktion	> 50

Die Wirksamkeit der Ethylacetatphase, in der sich phenolische Komponenten anreichern, war geringer als die des Gesamtextraktes. Dies zeigt, dass in dieser Pflanze die phenolischen Komponenten für die Wirksamkeit höchstens eine untergeordnete Rolle spielen. Durch Trennung des Methanolextraktes über präparative DC, wie in Kapitel 3.3.3.2.2 beschrieben, konnten neun Banden gesammelt werden. Als Fließmittel hat sich ein Gemisch aus EtOAc/MeOH/H₂O im Verhältnis von 100 : 13,5 : 10 als geeignet herausgestellt. Eine Anreicherung der Wirksamkeit konnte jedoch bei keiner dieser Banden beobachtet werden.

Im Extrakt der Wurzel von *S. longepedunculata* wurden in der Literatur Mutterkornalkaloide und Saponine nachgewiesen. Dies konnte durch DC und Detektion mit den entsprechenden Sprühreagenzien, dem van Urk-Reagenz beziehungsweise dem Vanillin-Schwefelsäurereagenz, bestätigt werden. Ein Alkaloid-Rohextrakt und ein Saponin-Rohextrakt wurden daraufhin wie in Kapitel 3.3.3.2.3 und Kapitel 3.3.3.2.4 beschrieben hergestellt. In beiden Rohextrakten konnte eine deutliche Anreicherung der Aktivität im *in vitro* Test festgestellt werden. Sie zeigten jeweils eine MHK von 25 $\mu\text{g/ml}$ und wurden weiter untersucht.

Auch alle bei der Extrahierung entstandenen Nebenprodukte wurden *in vitro* getestet, zeigten jedoch keine nennenswerte Aktivität.

4.5.3 Alkaloid-Rohextrakt

Von den bekannten Alkaloiden aus der Pflanze konnte Elymoclavin als Reinsubstanz getestet werden. Allerdings zeigte die Verbindung mit einer MHK von 50 µg/ml nur die gleiche Aktivität wie der Methanolextrakt. Da die Mutterkornalkaloide im Extrakt nur in kleinen Mengen vorhanden waren (Abbildung 4-7), kann davon ausgegangen werden, dass dieses Alkaloid nicht der alleinige Grund für die hohe Aktivität des Alkaloid-Rohextraktes sein kann. Durch die Detektion mit Dragendorff-Reagenz waren keine weiteren Alkaloide detektierbar. Aufgrund der hohen Aktivität wurde der Alkaloid-Rohextrakt dennoch in größerer Menge hergestellt, weiter aufgetrennt und untersucht. Die Auftrennung erfolgte nacheinander über verschiedene Säulen (Kieselgel RP-18, Sephadex LH-20, Kieselgel) beziehungsweise über präparative DC oder HPLC. Alle entstandenen Fraktionen wurden im *in vitro* Versuch getestet und bei guter Aktivität weiter aufgetrennt.

4.5.3.1 Trennung des Alkaloid-Rohextraktes an Kieselgel RP-18

Zunächst wurden ~ 1000 mg des Rohalkaloidextraktes an einer mit Kieselgel RP-18 gefüllten Trennsäule mit einem H₂O/MeOH-Gradienten aufgetrennt. Dabei wurden jeweils 100 ml eines jeden Lösungsmittelgemisches verwendet und der Methanolanteil jeweils in Zehnerschritten von H₂O/MeOH (70:30) bis MeOH (100 %) erhöht. Die einzelnen Fraktionen wurden zu je 5 ml in Reagenzgläsern aufgefangen und mittels DC mit dem Fließmittel EtOAc/MeOH/H₂O (100 : 13,5 : 10) untersucht und zu den Fraktionen 21-30 zusammengefasst.

Abbildung 4-7 zeigt schematisch die Ausbeute der relevanten Fraktionen und deren Bedeutung für weitere Untersuchungen.

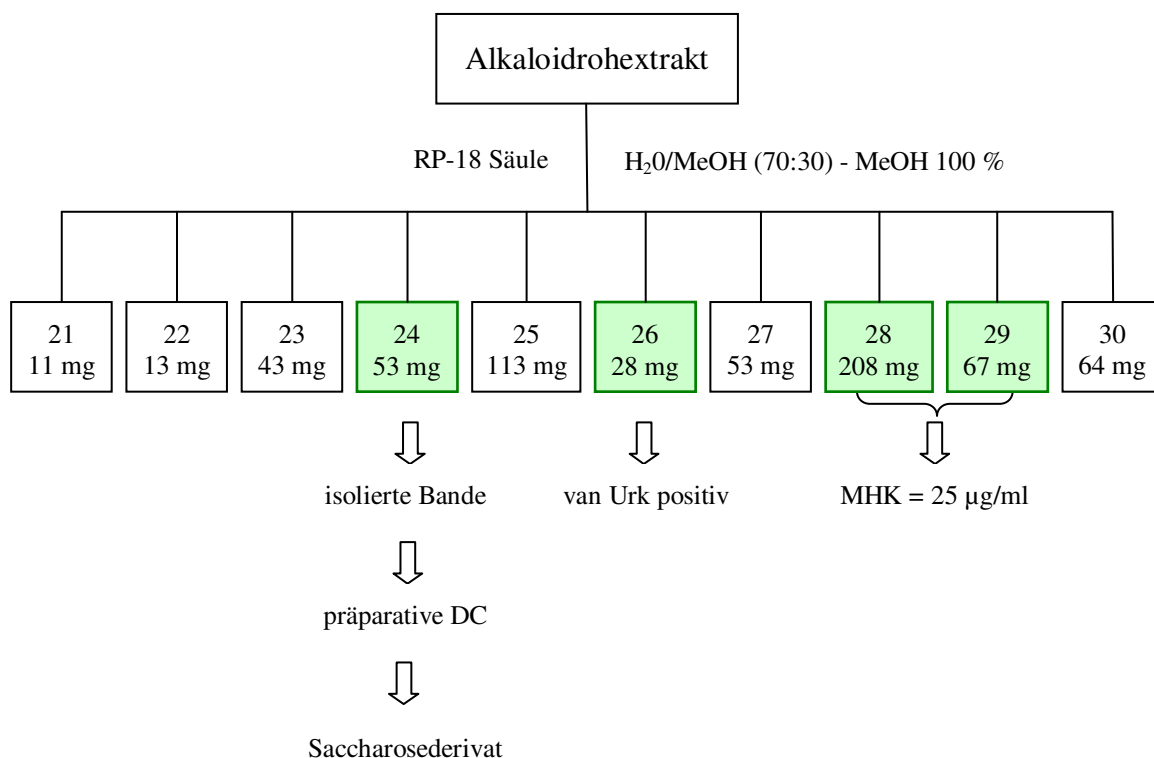
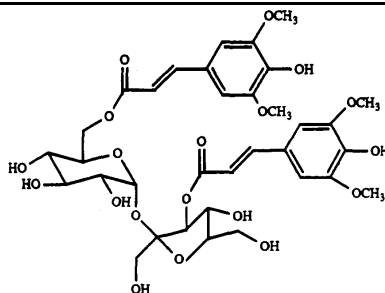


Abbildung 4-7 Auftrennung des Alkaloidrohextraktes in Fraktionen 21-30

Fraktion 26 zeigte eine positive van Urk-Reaktion, Fraktion 24 zeigte auf der DC Platte nur eine isolierte Bande und wurde durch anschließende präparative DC weiter aufgetrennt. Die Fraktionen 28 und 29 zeigten *in vitro* eine MHK von 25 µg/ml. Alle anderen Fraktionen zeigten nur eine MHK > 50 µg/ml.

4.5.3.2 Identifizierung des Saccharose-Derivats

Aus Fraktion 24 konnte durch präparative DC auf Kieselgelglasplatten der Schichtdicke 0,5 mm unter Beibehaltung von oben verwendetem Fließmittel eine Reinsubstanz isoliert werden. Mittels ¹H-NMR, und EI- und FAB- Massenspektroskopie konnte sie als β-D-(3-sinapoyl) fructofuranosyl-α-D-(6-sinapoyl) glucopyranosid identifiziert werden. Diese Verbindung wurde zuvor bereits aus der Pflanze isoliert. Die Isolierung erfolgte jedoch nicht aus der Wurzel sondern aus der Rinde von *S. longepedunculata* (De Tommasi *et al.*, 1993). Ein Test dieser isolierten Substanz im *in vitro* System zeigte, dass sie nur relativ geringe Aktivität besitzt.

Tabelle 4-9 Eigenschaften von β -D-(3-sinapoyl)fructofuranosyl- α -D-(6-sinapoyl)glucopyranosid**Saccharose-Derivat**

Summenformel	$C_{34}H_{42}O_{19}$
Menge	23 mg
Eigenschaften	Fast weißer Feststoff
Säulenchromatographie	Kieselgel RP-18 Gradient: $H_2O/MeOH$ (70:30) – $MeOH$ 100 % Elution bei $H_2O/MeOH$ (50:50)
DC-System	Kieselgel 60; Schichtdicke 0,5 mm $EtOAc/MeOH/H_2O$ (100:13,5:10) R_f -Wert (Retentionsfaktor): 0,45
HR-EI-MS, m/z, 80eV	386,1145 (386,1213 berechnet für $[C_{17}H_{22}O_{10}]^+$) 366,0954 (366,0951 berechnet für $[C_{17}H_{18}O_9]^+$) 224,0684 (224,0685 berechnet für $[C_{11}H_{12}O_5]^+$) 207,0656 (207,0657 berechnet für $[C_{11}H_{11}O_4]^+$) 180,0786 (180,0787 berechnet für $[C_{10}H_{12}O_3]^+$)
(+)-FAB-MS, m/z	777 $[M+Na]^+$, 385 $[C_{17}H_{21}O_{10}]^+$
(-)-FAB-MS, m/z	753 $[M-H]^-$, 775 $[M+Na-H]^-$
1H -NMR (400 MHz) in CD_3OD	Siehe Tabelle 4-10
Antitrypanosomale Aktivität	> 50 $\mu g/ml$

Das (-)-FAB-MS-Spektrum der Substanz zeigte ein Molpeakion bei m/z 753 $[M-H]^-$ auf. Dies entspricht einem Molekulargewicht von 754 g/mol und der Summenformel $C_{34}H_{42}O_{19}$.

Tabelle 4-10 $^1\text{H-NMR}$ -Daten (400 MHz) des Saccharose-Derivats in CD_3OD

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (Intensität, Kopplung, Frequenz)
Sinapinsäureeinheiten	
H-2/H-6	6,93 (2H, s)
H-7	7,67 (1H, d, J = 15,8 Hz)
H-8	6,46 (1H, d, J = 16,0 Hz)
3-OCH ₃ /5-OCH ₃	3,88 (6H, s)
H-2'/H-6'	6,89 (2H, s)
H-7'	7,59 (1H, d, J = 15,9 Hz)
H-8'	6,45 (1H, d, J = 15,8 Hz)
3'-OCH ₃ /5'-OCH ₃	3,85 (6H, s)
Saccharoseeinheit	
Glucose	
H-1	5,52 (1H, d, J = 3,5 Hz)
H-2	3,48 (1H, dd, J = 9,7/3,9 Hz)
H-3	3,65 (1H, m)
H-4	3,34 (1H, m)
H-5	3,80 (1H, m)
H-6a	4,68 (1H, br.d, J = 10,5 Hz)
H-6b	4,21 (1H, dd, J = 11,5/7,3 Hz)
Fructose	
H-1a/H-1b	3,65 (2H, m)
H-3	5,51 (1H, d, J = 7,9 Hz)
H-4	4,50 (1H, t, J = 8,0 Hz)
H-5	4,29 (1H, br.t, J = 8,2 Hz)
H-6a	3,95 (1H, m)
H-6b	3,80 (1H, m)

s = Singulett *d* = Dublett *dd* = Doppeldublett *br.d* = breites Dublett
t = Triplett *br.t* = breites Triplett *m* = Multiplett
J = Kopplungskonstante

Die Substanz zeigte im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum die charakteristischen Signale für zwei Sinapinsäurereste. Sichtbar waren jeweils die zwei Protonen der trans-Doppelbindung mit einer Kopplungskonstanten von ~ 16 Hertz und das Singulett, das charakteristisch ist für den symmetrisch substituierten Aromaten. Die beiden Methoxygruppen an den Aromaten ergaben ein großes Singulett bei einer Verschiebung von $\sim 3,9$. Welche Signale zu welchem Sinapinsäurerest gehören, könnte man mit einem HMBC-Spektrum genauer analysieren. Anhand des Vergleichsspektrums aus der Literatur konnte die Substanz jedoch auch ohne HMBC eindeutig identifiziert werden.

Die Signale der Protonen der Saccharose, mit der die beiden Sinapinsäurereste verestert sind, waren vergleichbar mit denen aus der Publikation von De Tommasi *et al.* (1993), wobei wegen der Überlappung einiger Signale nicht alle Protonensignale des Zuckers mit Sicherheit zugeordnet werden konnten. In der Publikation von De Tommasi *et al.* (1993) erschienen uns das H-5 der Glucose zu tief und die Kopplungskonstanten nicht ganz korrekt zu sein. Der Vergleich mit einem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eines doppelt veresterten Saccharose-Derivates aus einer neueren Publikation zeigt, dass hier das H-5 der Glucose im Feld wesentlich höher erscheint, was auch unserem Spektrum entspricht (Kobayashi *et al.*, 2000).

4.5.3.3 Auftrennung von Fraktion 28 und 29 über Säulenchromatographie

Fraktion 29 konnte über eine kleine Kieselgelsäule (2 ml Spritze) mit einem Fließmittelgradienten angefangen mit 100 % n-Hexan über 100 % DCM, in 25er Schritten zu DCM/MeOH (25:75) über DCM/MeOH (10:90) in Zehnerschritten zu MeOH 100 % weiter aufgetrennt werden. Nach DC-Analyse wurden die Fraktionen zu den vier Fraktionen 29a bis 29d zusammengefasst. Eine NMR-Analyse gab leider keinen Aufschluss über die Art der Verbindungen. Der *in vitro* Test der vier Fraktionen zeigte folgendes Ergebnis.

Tabelle 4-11 Mengen und MHK-Werte der Fraktionen 29a bis 29d im *in vitro* Test

Fraktion	Menge	MHK ($\mu\text{g/ml}$)	Fraktion	Menge	MHK ($\mu\text{g/ml}$)
29a	3,4 mg	> 50	29c	8,9 mg	12,5
29b	11,2 mg	25	29d	4,0 mg	12,5

Fraktion 28 wurde zunächst über Sephadex LH 20 mit dem Elutionsmittel Methanol und einer Fließgeschwindigkeit von ~1,5 ml/min in Fraktionen zu je 2 ml aufgetrennt und nach DC-Analyse mit dem Fließmittel Chloroform-MeOH-H₂O (6:4:1) zu den Fraktionen 28a (6-21), 28b (26-29), 28c (32-41) und 28d (49-56) zusammengefasst. Die Fraktion 28a zeigte orange-rote Färbung mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz (Tabelle 4-12).

Tabelle 4-12 Mengen und MHK-Werte der Fraktionen 28a bis 28d im *in vitro* Test

Fraktion	Menge	MHK (µg/ml)	Fraktion	Menge	MHK (µg/ml)
28a	166,4 mg	25	28c	5,0 mg	> 50
28b	3,5 mg	> 50	28d	1,3 mg	> 50

Fraktion 28a wurde anschließend über eine Kieselgelsäule mit 1,5 cm Innendurchmesser, die mit ~10 g Kieselgel 60 gefüllt wurde, weiter aufgetrennt. Dabei wurde mit einem Fließmittelgradienten aus Dichlormethan und Methanol gearbeitet. Die Methanolkonzentration wurde beginnend bei einem Verhältnis von 95:5 in fünf Schritten bis zu einem Verhältnis von 50:50 gesteigert. Mit DCM/MeOH (30:70) und anschließend mit MeOH 100 % wurden Reste von der Säule gespült. Nach Auswertung über DC mit dem Fließmittel Chloroform/MeOH/H₂O (6:4:1) und Vanillin-Schwefelsäure als Detektionsmittel wurden acht Fraktionen gebildet. Die Mengen der einzelnen Fraktionen sind in folgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 4-13 Mengen und MHK-Werte nach Auftrennung der Fraktion 28a an Kieselgel 60

Fraktion	Menge	Fraktion	Menge
1-75	11 mg	140-189	33,2 mg
76-80	2,3 mg	190-300	42,5 mg
81-96	3,8 mg	Rest1	7,0 mg
97-139	26 mg	Rest2	4,0 mg

Aufgrund der geringen Mengen wurde vor dem *in vitro* Test der Fraktionen eine Auftrennung an der HPLC vorgenommen.

4.5.3.4 Trennung der Fraktionen 28a, 29c und 29d an der HPLC

Die Fraktionen, die aus Fraktion 28a hervorgingen wurden an Anlage 1 und Säule 1 aufgetrennt. Als Laufmittel wurde ein MeOH/H₂O-Gradient gewählt (Start: MeOH/H₂O 20:80, nach 20 min 70:30, nach 70 min 95:5 [V/V]; Flussrate: 1 ml/min). Die Fraktionen 28a (81-96), 28a (97-139), 28a (140-189) und 28a (190-300) zeigten jeweils drei Hauptpeaks unterschiedlicher Intensität (Abbildung 4-8). Durch präparative Trennung wurden diese drei Hauptpeaks mit den Retentionszeiten von rund 27, 33 und 42 Minuten gesammelt und aus den einzelnen Fraktionen zusammengefasst (Abbildung 4-9). Fraktionen 28a (1-75) und 28a (76-80) zeigten neben Begleitstoffen vor allem den ersten Peak, die Reste 1 und 2 zeigten neben Begleitstoffen Peaks 1, 2, und 3. Auch aus diesen Fraktionen wurden anhand der Retentionszeiten die Peaks 1, 2 und 3 isoliert.

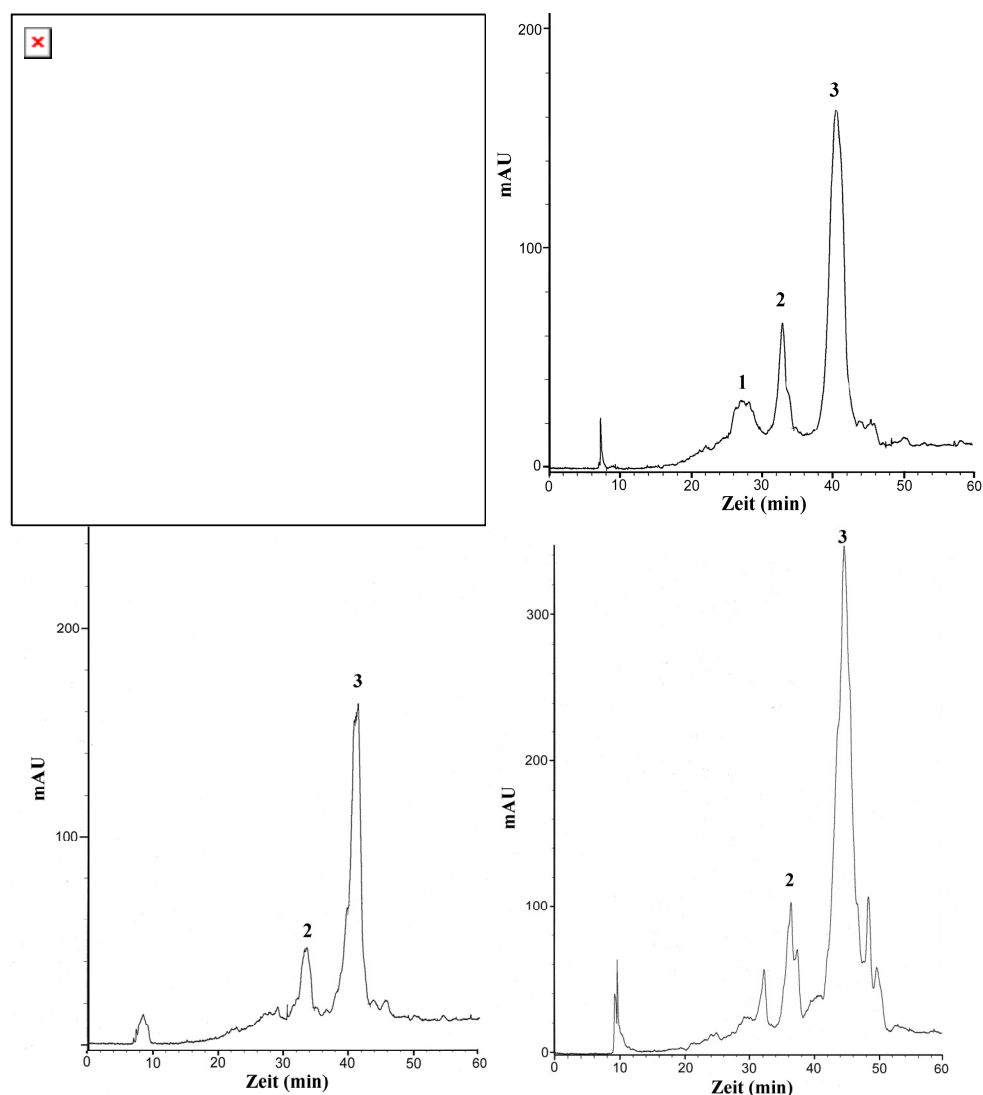


Abbildung 4-8 HPLC-Chromatogramme der Fraktionen 28a (81-96), links oben, 28a (97-139), rechts oben, 28a (140-189), links unten und 28a (190-300), rechts unten

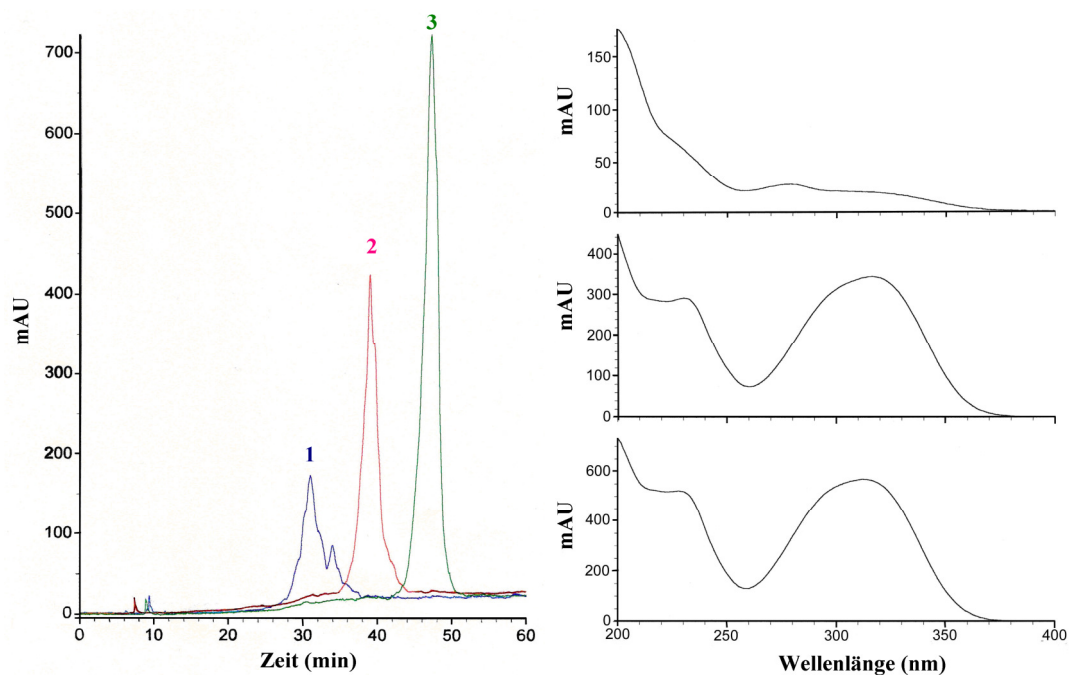


Abbildung 4-9 Links: Chromatogramme der zusammengefassten Peaks 1, 2 und 3 aus den Fraktionen 28a (1-300) und 28a (Rest1) und 28a (Rest2), dargestellt in einem Bild, Rechts: UV-Spektren der Peaks 1-3 von oben nach unten.

Die Mengen und MHK-Werte für Peaks 1, 2 und 3, die als isolierte Peaks Retentionszeiten von 31, 39 und 46 Minuten zeigten, im Folgenden Fraktionen 28a (RT31), 28a (RT39) und 28a (RT46) genannt, sind in Tabelle 4-14 dargestellt. Mit zunehmender Retentionszeit nahm die Aktivität der Substanzen zu. Die Fraktionen 29c und 29d, die eine höhere Aktivität im *in vitro* Test zeigten, wiesen eine noch längere Retentionszeit auf, siehe Abbildung 4-10. Fraktion 29d zeigte ein ähnliches Bild wie Fraktion 29c. UV-Spektren der Peaks 1, 2 und 3 aus der Fraktion 29d sind in Abbildung 4-10 dargestellt.

Tabelle 4-14 Mengen und MHK-Werte für die Fraktionen 59 bis 61

Fraktion	Menge	MHK ($\mu\text{g/ml}$)
28a (RT31)	5,7 mg	> 50
28a (RT39)	10,3 mg	50
28a (RT46)	50,8 mg	25
29c	8,9 mg	12,5
29d	4,0 mg	12,5

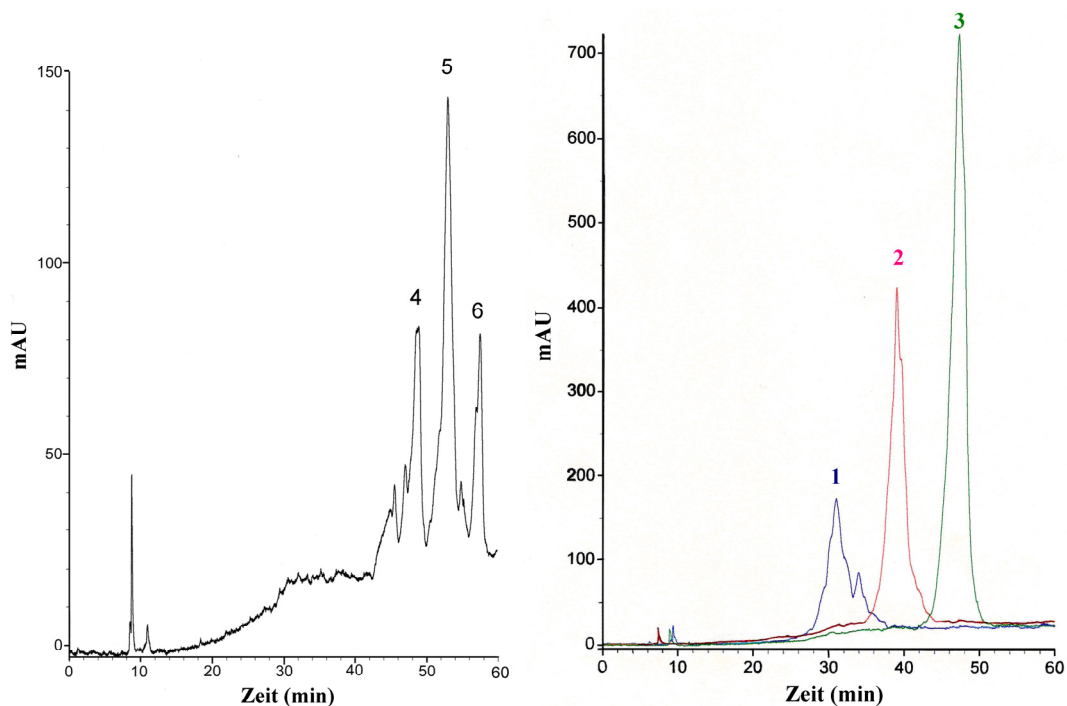


Abbildung 4-10 Links: HPLC-Chromatogramm der Fraktion 29d, Rechts: Chromatogramme der isolierten Peaks 1 bis 3 in einem Bild

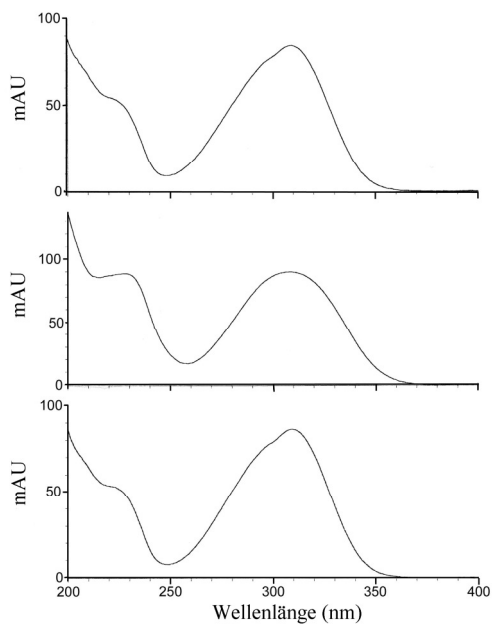


Abbildung 4-11 UV-Spektren der Peaks 4, 5 und 6 aus Fraktion 29d von oben nach unten

Fraktion 61 zeigte im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum kein einheitliches Bild. Bei der weiteren Auftrennung über die HPLC (Anlage 2) unter anderem mit dem Fließmittel MeOH/H₂O

+ TFA 0,01 % an Säule 1 und mit Acetonitril/H₂O + TFA 0,1 % an Säule 2 zeigte die Substanz eine Aufspaltung in mehrere Einzelpeaks.

4.5.4 Saponin-Rohextrakt

Ein Saponin-Rohextrakt wurde wie in Kapitel 3.3.3.2.4 beschrieben hergestellt. Dabei wurden aus 200 g Ausgangsmaterial 5,9 g Rohsaponinextrakt erhalten, was einem Saponinanteil in der Wurzel von rund drei Prozent entspricht. Der Extrakt wurde über eine Sephadex LH-20 Säule weiter aufgereinigt. Dabei wurde die hundertfache Menge Säulenmaterial im Vergleich zum Extrakt eingesetzt, das Rohsaponingemisch in Methanol gelöst und mit reinem Methanol eluiert. Die Fraktionen 1-32 wurde mittels DC-Analyse mit dem Fließmittel DCM/MeOH/H₂O (6:4:1) und Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz als Detektionsmittel zu den Hauptfraktionen 58a (1-3), 58b (4-6), 58c (7-14), 58d (15-25) und 58e (26-32) zusammengefasst. Die Mengen und Ergebnisse der *in vitro*-Prüfung zeigt Tabelle 4-15. Die mit unterschiedlichen Lösungsmitteln von der Säule gespülten Reste ergaben keine nennenswerte Aktivität im *in vitro* Test.

Tabelle 4-15 Mengen und MHK-Werte im *in vitro* Test der Fraktionen 58a bis 58e

Fraktion	Menge	MHK (µg/ml)	Fraktion	Menge	MHK (µg/ml)
58a	100 mg	> 50	58d	815 mg	25
58b	173 mg	25	58e	31 mg	> 50
58c	4050 mg	25			

Die Fraktionen 58b, 58c und 58d zeigten starke Färbung mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz sowie hohe Aktivität im *in vitro* Test und wurden mittels präparativer HPLC weiter aufgetrennt, siehe Abbildung 4-12 links. Dabei wurde Anlage 1 und Säule 1 verwendet. Als Laufmittel wurde ein MeOH/H₂O-Gradient gewählt (Start: MeOH/H₂O 20:80, nach 30 Minuten 70:30, nach 70 Minuten 85:1 [V/V]; Flussrate 1ml/min). Die Fraktionen 58c und 58d zeigten ein ähnliches Chromatogramm und wurden zu einer Fraktion zusammengefasst. Abbildung 4-12 zeigt auf der rechten Seite das Chromatogramm nach Vereinigung beider Fraktionen.

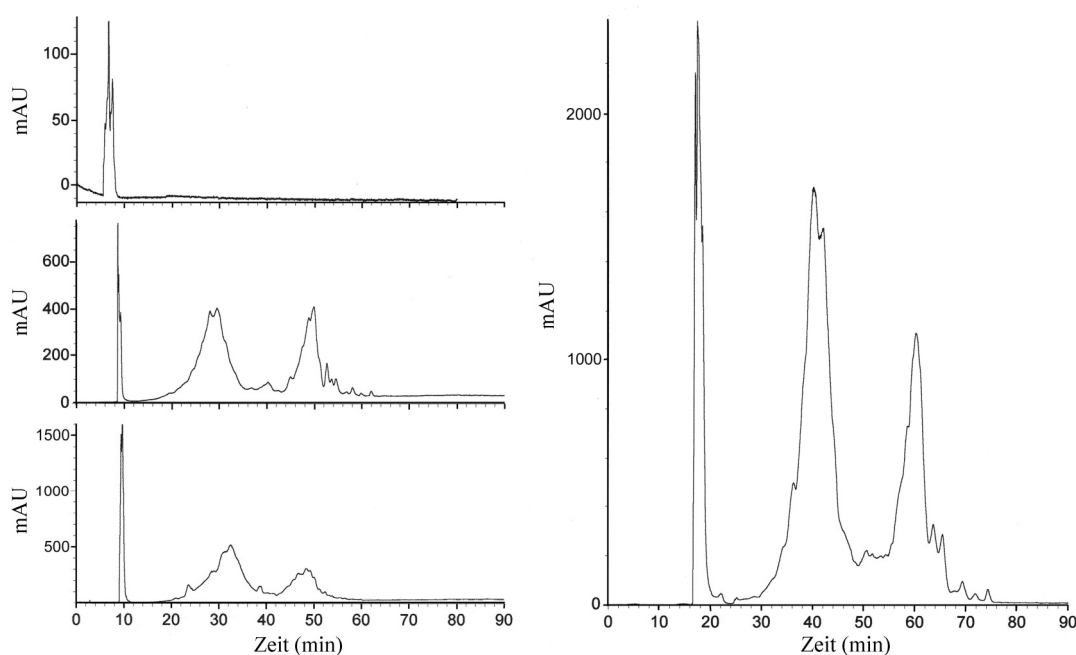


Abbildung 4-12 Links: HPLC Chromatogramme der Fraktionen 58b, 58c und 58d, Rechts: zusammengefasste Fraktionen 58c und 58d

Mittels präparativer HPLC wurden daraus durch Trennung der beiden Hauptpeaks wieder zwei Fraktionen gebildet: Fraktion 1 mit einer Retentionszeit von 30-49 Minuten und Fraktion 2 mit einer Retentionszeit von 55-67 Minuten. Fraktion 1 ergab einen gelben Feststoff, Fraktion 2 einen rein weißen Feststoff. Die MHK-Werte im *in vitro* Test zeigt folgende Tabelle. Die Fraktionen wurden nicht weiter aufgetrennt.

Tabelle 4-16 MHK-Werte im *in vitro* Test der Fraktionen 58c/d (RT30-49) und 58c/d (RT55-67)

Fraktion	MHK (µg/ml)	Fraktion	MHK (µg/ml)
1	> 50	2	25

4.6 *In vitro* Screening von Saponinen gegen Trypanosomen

Ein Vergleich der *in vitro* Aktivität von Fraktion 71 beziehungsweise dem Rohsaponinextrakt aus der Wurzel von *S. longepedunculata* mit der Aktivität anderer Saponine sollte Klarheit über die Spezifität der Wirksamkeit der Saponine aus *S. longepedunculata* bringen. Aus der Wurzel von *Polygala senega* L. wurde unter den gleichen Bedingungen wie bei *S. longepedunculata* ein Saponingemisch extrahiert. Laut Literatur sollten in der Wurzel ähnliche Saponine enthalten sein wie in der Wurzel von *S. longepedunculata* (Tubery, 1974). Die Aktivität dieses Extraktes wurde im *in vitro* Test bestimmt. Außerdem wurden β -Aescin, das Standard-Saponingemisch Saponinum

album, die zwei Saponine α -Hederin und Hederacosid-C sowie das Genin Hederagenin aus *Hedera helix* L. getestet. Die Aktivitäten von Saponinum album und den Saponinen aus *P. senega* waren mit 25 $\mu\text{g/ml}$ genauso groß wie die der Fraktion 71 aus *S. longepedunculata*, β -Aescin zeigte eine Aktivität von 50 $\mu\text{g/ml}$, alle anderen getesteten Saponine zeigten bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ noch keine Aktivität (Tabelle 4-17). In meinem Testsystem gab es bis zur Testkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ während der Testdauer von 10 Tagen bei keiner der getesteten Reinsubstanzen oder Extrakte sichtbare Veränderungen an den Fibroblasten.

Tabelle 4-17 Ausgewählte Saponine und MHK-Werte *in vitro*

Substanz	MHK ($\mu\text{g/ml}$)	Substanz	MHK ($\mu\text{g/ml}$)
α -Hederin	> 50	β -Aescin	50
Hederacosid-C	> 50	Glycyrrhizinsäure	> 50
Hederagenin	> 50	Saponine aus <i>P. senega</i>	25
Saponinum album	25	Fraktion 71	25

5 DISKUSSION

5.1 Aktivität der Pflanzenextrakte

5.1.1 Bezug zur Untersuchung von Bizimana *et al.* (2006)

In einer vorangegangenen Untersuchung wurden Wasser- Methanol- und Dichlormethanextrakte der in Tabelle 3-1 gelisteten Pflanzen im LILIT (Long Incubation Low Inoculation Test) einem Screening auf antitrypanosomale Aktivität unterzogen. Dabei wurden die Auswirkungen der Pflanzenextrakte während eines Zeitraumes von vier Tagen beobachtet (Bizimana *et al.*, 2006). Nur die Extrakte, die im LILIT hohe Aktivität zeigten, wurden auch im LTVA über zehn Tage getestet. In dieser Untersuchung zeigte nur ein Extrakt im LTVA eine MHK $< 100 \mu\text{g/ml}$ und keiner der getesteten Dichlormethanextrakte zeigte hohe Aktivität mit MHK-Werten $\leq 100 \mu\text{g/ml}$. In den Untersuchungen von Bizimana *et al.* (2006) war bei dem LTVA die Korrelation zwischen *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen besser als beim LILIT und wir vermuteten unter den Extrakten Dichlormethanextrakte mit hoher Aktivität. Deshalb wurde für die vorliegende Arbeit der Langzeittest LTVA als alleiniges *in vitro* Testsystem verwendet und der Fokus auf Dichlormethanextrakte gelegt.

5.1.2 Verwendung von Dichlormethanextrakten bei ethnopharmakologischem Hintergrund

In den traditionellen Zubereitungen findet man kaum Lösungsmittel, die dem verwendeten Dichlormethan entsprechen. Man findet jedoch häufig die Anwendung der Drogen in Form von pulverisierten Pflanzenteilen und bei Tieren werden die entsprechenden Pflanzen oder Pflanzenteile oft direkt gefüttert. Deshalb können die aktiven Stoffe einer traditionellen Zubereitung auch im Dichlormethanextrakt zu finden sein.

Für die Suche aktiver Verbindungen aus den Pflanzen sollten die lipophilen Extrakte interessant sein. Erstens weil es vorteilhaft wäre, Wirkprinzipien mit höherer Lipophilie aufzuspüren, die mit größerer Wahrscheinlichkeit die Blut-Hirn-Schranke überqueren

können, und zweitens weil Reinsubstanzen leichter aus lipophilen als aus hydrophilen Extrakten zu isolieren sind.

5.1.3 Diskussion der Ergebnisse des *in vitro* Versuchs

In der vorliegenden Studie waren 13 Dichlormethanextrakte (28 Prozent) aktiv mit MHK-Werten von $\leq 100 \mu\text{g/ml}$. Sechs Extrakte konnten sogar MHK-Werte von $50 \mu\text{g/ml}$ erreichen. Keiner dieser Extrakte zeigte zuvor im LILIT eine hohe Aktivität. Die Hypothese, dass durch den gewählten Versuchsaufbau weitere aktive Extrakte gefunden werden können, konnte demnach bestätigt werden. Grundsätzlich kann ein Extrakt als wirksam angesehen werden, wenn die IC_{50} kleiner gleich $50 \mu\text{g/ml}$ ist (O'Neill *et al.*, 1985). In meinen Untersuchungen wird die MHK verwendet, die der IC_{100} entspricht. Dies hat den Vorteil, dass nur diejenigen Extrakte weiter untersucht werden, die tatsächlich in der Lage sind innerhalb von zehn Tagen alle Erreger abzutöten. Dies scheint ein praxisnahes Schema zu sein, das auch gut auf *in vivo* Bedingungen übertragbar ist. Könnte man die MHC-Werte meiner Untersuchung in IC_{50} -Werte umrechnen, würden sich für die aktivsten Extrakte Werte ergeben, die deutlich unter $50 \mu\text{g/ml}$ liegen.

Die minimale toxische Konzentration der Extrakte wurde ausschließlich durch die parallel zum Versuch durchgeführte visuelle Betrachtung der Feederlayer Zellen bestimmt. Die Werte und die daraus abgeleiteten Selektivitätsindices sind deshalb nur erste Annäherungen. Um die tatsächliche minimale toxische Konzentration zu bestimmen, müsste man die Extrakte an mehreren unterschiedlichen Zelllinien untersuchen.

5.1.4 Diskussion der Ergebnisse der *in vivo* Versuche

Durch die *in vivo* durchgeführte Dosisfindungsuntersuchung konnte eine Einschätzung erhalten werden, welche Extrakte in welcher Dosierung für den *in vivo* Wirksamkeitstest verwendet werden können. Die größte eingesetzte Dosis von 150 mg/kg KG erwies sich als gerade noch löslich beziehungsweise suspendierbar in der entsprechenden Menge Mandelöl, die jeder Maus dreimal täglich injiziert werden sollte. Bei Verwendung eines Injektionsvolumens von $0,5 \text{ ml}$ pro Injektion bei einer Maus von 75 g Körpergewicht ergab sich für die Injektionen eine Konzentration von $22,5 \text{ mg/ml}$.

Die Extrakte wurden im *in vivo* Wirksamkeitstest in der größten tolerierten Dosis eingesetzt, da wir uns davon die größte Wirkung versprochen. Vier der Extrakte zeigten hohe Toleranz in der Dosisfindungsstudie und wurden im *in vivo* Test untersucht. Bei einer Substanz musste der Versuch abgebrochen werden, weil Sie sich als toxischer herausstellte, als sich im Dosisfindungstest gezeigt hatte. Zwei davon konnten die Parasitämie der Mäuse eindeutig reduzieren.

Das Ergebnis bestätigt eine gute Korrelation zwischen dem LTVA und dem *in vivo* Modell, die schon in vorhergehenden Untersuchungen am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität Berlin festgestellt wurde.

Im Nachhinein kritisch zu sehen ist die Behandlungsdauer von nur drei Tagen. In jeder Gruppe war wenigstens eine Maus, bei der die höchste Parasitämie erst zwischen dem fünften und sechsten Tag nach Infektion auftrat. Auch in der Praxis ist bei den verfügbaren antitrypanosomalen Wirkstoffen oft eine längere Behandlungsdauer nötig. Der Behandlungserfolg könnte eventuell besser sein, wenn die Mäuse nicht nur drei sondern sechs Tage lang mit den Extrakten behandelt werden würden. Durchschnittlich war das Maximum der Parasitämie in den behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe um einen halben Tag nach hinten verschoben. Interessant zu untersuchen wäre, ob bei einer längeren Behandlungsdauer dieses Maximum der Parasitämie nur noch weiter nach hinten verschoben wäre, oder ob die Phase mit hoher Parasitämie ganz ausbleiben würde.

Bei einem weiteren Versuch mit den Extrakten bei denen eine *in vivo* Wirksamkeit bereits nachgewiesen werden konnte, wäre darüber hinaus zu überdenken, ob man eine andere Mäuseart verwenden sollte, die empfindlicher auf die Erreger reagiert und normalerweise an der Infektion stirbt. Damit wären der Endpunkt und der Erfolg eindeutiger zu bestimmen. Darüber hinaus könnte man bei kommerziell erworbenen Mäusen die Parameter Gewicht, Geschlecht und Alter einheitlicher wählen als das in diesem Versuch der Fall war. Dadurch wäre es einfacher, vergleichbare Gruppen von Mäusen für die Test- und die Kontrollgruppe zu wählen.

5.1.5 Korrelation der *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse

In der vorliegenden Studie zeigte der Extrakt der Stammrinde von *B. aegyptiaca* geringe Toxizität gegenüber den MEF-Zellen aber hohe Toxizität im Dosisfindungsversuch. Der

Extrakt der Stammrinde von *A. nilotica* zeigte hohe Aktivität und geringe Toxizität *in vitro*. Auch *in vivo* im Dosisfindungstest war die Toxizität gering. Im *in vivo* Wirksamkeitstest zeigte sich jedoch ein immunsuppressiver Effekt, durch den der Extrakt für den beabsichtigten Verwendungszweck wertlos wird. Diese beiden Ergebnisse können zeigen, wie wichtig *in vivo* Tests für die Beurteilung der Wirksamkeit von Extrakten sind.

Der Extrakt von *A. senegalensis* zeigte im *in vitro* Test eine hohe Zytotoxizität, die sich in der Dosisfindungsstudie in den Mäusen nicht bestätigte, jedoch im eigentlichen *in vivo* Wirksamkeitstest wieder auftrat. Dass ein Extrakt *in vitro* hohe Toxizität zeigt, der *in vivo* nicht mehr auftritt, kann daran liegen, dass die toxische Substanz im lebenden Organismus schnell metabolisiert wird oder daran, dass sie sich in Mandelöl schwer löst, und somit nur langsam und in geringerer Konzentration zur Wirkung kommt. Dass der toxische Effekt jedoch im Wirksamkeitstest wieder auftritt, ist ungewöhnlich. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass der Extrakt für den Wirksamkeitstest neu aus dem Pflanzenmaterial zubereitet wurde. Eventuell gab es im Extrakt *in vivo* toxische Stoffe, die sich bei längerer Lagerung in weniger toxische Stoffe umwandeln. Es ist aber auch denkbar, dass die Tatsache eine Rolle spielt, dass die Mäuse im Wirksamkeitstest mit Trypanosomen infiziert waren und nicht wie im Dosisfindungstest dem reinen Extrakt ausgesetzt waren.

5.1.6 Vergleich der Ergebnisse mit in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen

Youan *et al.* (1997) untersuchten jeweils eine Mazeration und eine Dekoktion der Blätter von *A. senegalensis*, der Blätter von *G. senegalensis* und der frischen Wurzel von *S. longepedunculata* an Hausmäusen, die zuvor mit *T. b. gambiense* infiziert wurden. Die orale zweimal tägliche Gabe der Extrakte über drei Tage führte zum Tod der Mäuse aufgrund der hohen Parasitämie, während die Kontrollmäuse, die mit Melarsoprol behandelt wurden, überlebten. Auch die einmalige intraperitoneale Gabe der Extrakte konnte keinen Effekt gegenüber den unbehandelten Kontrollmäusen zeigen. Die verabreichte Dosis ist angegeben mit 0,3 ml pro 10 g Körpergewicht für jede der per oralen Gaben und 0,1 ml pro 10 g Körpergewicht bei der intraperitonealen Gabe.

Über die Herstellung und die Konzentration der verabreichten Extrakte wird nicht berichtet.

Abubakar *et al.* (2005) führten eine Studie durch, bei der sie Ratten, die mit *T. b. brucei* infizierte wurden, an sieben Folgetagen nach etablierter Parasitämie mit wässrigen Extrakten der Wurzel und Wurzelrinde von *S. longepedunculata* und der Blätter von *A. senegalensis* durch per orale Gabe behandelten. Die Behandlung mit Wurzel- und Wurzelrindenextrakt von *S. longepedunculata* in einer Konzentration von 100 mg/kg KG verlängerte das Leben der Tiere verglichen mit einer positiven Kontrolle um drei beziehungsweise vier Tage. Der Blattextrakt von *A. senegalensis* war in der Konzentration von 200 mg/kg KG nicht wirksam.

Ogbadoyi *et al.* (2007) führten einen *in vivo* Test an Mäusen durch, die mit *T. b. brucei* infiziert wurden. Die intraperitoneale Gabe von 200 mg/kg KG des wässrigen Blattextraktes von *A. senegalensis* konnte die Trypanosomen innerhalb von drei Behandlungstagen komplett aus dem Blut eliminieren. Unbehandelte Mäuse starben bis zu diesem dritten Tag. In dieser Studie zeigte der wässrige Wurzelextrakt von *A. senegalensis* einen zytostatischen Effekt. Die Parasiten konnten nach täglicher Behandlung zwischen dem 10. und 14. Tag unter die Nachweisgrenze reduziert werden, traten jedoch am Tag 16 wieder auf, nachdem die Behandlung ab dem 14. Tag ausgesetzt wurde.

Atawodi *et al.* (2003) testeten Methanolextrakte der Wurzel von *A. senegalensis*, der Blätter von *G. senegalensis* und der Wurzel von *S. longepedunculata*. Es wurde ein *in vitro* Test verwendet, bei dem Blut, das die Erreger *T. congolense* beziehungsweise *T. b. brucei* enthält mit den Extrakten in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt wurde. Durch den Methanolextrakt der Wurzel von *S. longepedunculata* konnten innerhalb von 60 Minuten sowohl die Motilität von *T. b. brucei* als auch von *T. congolense* gestoppt werden. Der Methanolextrakt der Wurzel von *A. senegalensis* zeigte leichte Effekte auf *T. congolense* und keinen merkbaren Effekt auf *T. b. brucei*. Der methanolische Blattextrakt von *G. senegalensis* zeigte ebenfalls leichte Effekte auf *T. congolense*. Auf *T. b. brucei* wurde dieser Extrakt nicht getestet.

Freiburghaus *et al.* (1996) testeten Petrolether-, Dichlormethan-, Methanol- und wässrige Extrakte von unterschiedlichen Pflanzenteilen aus den Pflanzen *A. nilotica*, *A. senegalensis*, *B. aegyptiaca* und *S. longepedunculata* gegen *T. b. rhodesiense* in

vitro. MIC-Werte $\leq 19 \mu\text{g/ml}$ zeigten der Dichlormethan- und der Methanolextrakt der Stammrinde von *A. nilotica* und der methanolische Blattextrakt von *A. nilotica*, außerdem der Petroletherextrakt der Stammrinde von *A. senegalensis*. Von der Pflanze *S. longepedunculata* wurden die Wurzelrinde und Zweige mit Blättern getestet, wobei der Methanol- und der wässrige Extrakt der Wurzelrinde jeweils eine MIC von $56 \mu\text{g/ml}$ zeigten.

Auffällig dabei ist, dass der wässrige Blattextrakt von *A. senegalensis* in mehreren Untersuchungen unwirksam war gegen *T. b. gambiense*, *T. b. brucei* und *T. b. rhodesiense*. Ganz entgegen diesen Untersuchungen konnte der wässrige Extrakt in der Studie von Ogbadoyi *et al.* (2007) mit *T. b. brucei* infizierte Mäuse innerhalb von drei Tagen heilen. Dies zeigt, dass es sehr viele Variable gibt, die für die Wirksamkeit eines Pflanzenextraktes beziehungsweise für die Nachweisbarkeit der Wirksamkeit eine Rolle spielen. Das Vorhandensein der wirksamen Inhaltsstoffe in einer Zubereitung kann von dem Ort und dem Zeitpunkt der Ernte abhängig sein, von der Art der Trocknung der Pflanzenteile, von der Art der Zubereitung und von der Lagerung des Extraktes. Bei *in vitro* Untersuchungen spielen die Art des Erregers und der Versuchsaufbau eine entscheidende Rolle. Bei *in vivo* Versuchen ist zusätzlich die Art der Versuchstiere, die Dosis, die Häufigkeit und die Art der Gabe entscheidend. Deshalb lassen sich Ergebnisse aus unterschiedlichen Untersuchungen schwer miteinander vergleichen. Andererseits wurde in fast allen Untersuchungen eine Referenzsubstanz wie Melarsoprol oder Diminazenaceturat als positive Kontrolle verwendet, deren Effekt in jedem Versuchsaufbau darstellbar war. So kann man postulieren, dass die Wirkung eines hoch wirksamen Extraktes auch in jedem dieser Systeme nachzuweisen sein müsste. Das Auftreten und die Konzentration bestimmter Inhaltsstoffe einer Pflanze hängen jedoch von Umweltfaktoren wie Bodenbeschaffenheit, Lage und Niederschlagsmenge ab und auch der Erntezeitpunkt und die Art der Trocknung spielen eine Rolle. Deshalb gibt es bereits bei der Drogengewinnung viele Variablen, die zu unterschiedlicher Wirksamkeit von Extrakten der gleichen Pflanzenart führen. Darüber hinaus können sich Variablen bei der Extraktbereitung ergeben. Dabei spielt die Art und Menge des Lösungsmittels, das Extraktionsverfahren und die dabei verwendete Temperatur eine entscheidende Rolle. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten wäre es deshalb nötig, möglichst genaue

Angaben zur Drogen- und Extraktgewinnung zu machen bzw. die Bedingungen zu standardisieren.

Bei der *in vivo* Untersuchung des wässrigen Wurzel- und Wurzelrindenextraktes von *S. longepedunculata* durch Abubakar *et al.* (2005) wurde wie in meiner Untersuchung der Erreger *T. b. brucei* verwendet. Im Unterschied dazu fand der *in vivo* Versuch an Ratten statt und nicht an Mäusen und es wurde kein Dichlormethanextrakt sondern ein wässriger Extrakt verwendet. Die Applikation erfolgte an sieben aufeinander folgenden Tagen nach der Infektion oral und nicht intraperitoneal an drei Tagen. Das Ergebnis der Reduktion der Parasitämie der Mäuse beziehungsweise Verlängerung des Lebens der Ratten ist in beiden Fällen ähnlich. Interessant wäre, ob bei unserem Versuchsaufbau mit wässrigen Extrakten bei oraler Gabe ein ähnlicher Effekt zu erzielen wäre. Primär ist jedoch herauszufinden, ob sich die *in vivo* Wirksamkeit durch Extraktion bestimmter Inhaltsstoffgruppen, im Speziellen der Saponine, so steigern ließe, dass die Trypanosomen aus infiziertem Blut vollständig zu eliminieren wären.

Bei dem *in vitro* Test von Atawodi *et al.* (2003) zeigte der Methanolextrakt von *S. longepedunculata* gute Wirksamkeit sowohl gegen *T. b. brucei* als auch gegen *T. congolense*. Es wäre interessant zu untersuchen, ob sich die Wirkung auf *T. congolense* unter unseren Versuchsbedingungen im *in vitro* und *in vivo* Versuch bestätigen ließe.

Freiburghaus *et al.* (1996) untersuchten die Wurzelrinde und Zweige mit Blättern von *S. longepedunculata* *in vitro* gegen *T. b. rhodesiense*. Die Wirksamkeit war im Vergleich zu den anderen getesteten Extrakten nicht herausragend. Es ist jedoch bemerkenswert zu sehen, dass Extrakte von *S. longepedunculata* auch gegen diesen menschenpathogenen Erreger eine gewisse Wirksamkeit entfalten. Der Wurzelextrakt der Pflanze wurde in dem Versuch von Freiburghaus *et al.* (1996) nicht getestet aber der Methanolextrakt der Zweige mit Blättern zeigte die gleiche Wirksamkeit wie der Methanolextrakt der Wurzelrinde. Es wäre eine Untersuchung wert, ob als Ausgangsdroge die Zweige mit Blättern eine Alternative zur Wurzel wären, zumal dadurch die Pflanze besser geschützt werden könnte.

5.2 *Securidaca longepedunculata*

Die Wurzel von *S. longepedunculata* (Abbildung 5-1) wurde für die phytochemischen Untersuchungen ausgewählt, weil deren Dichlormethanextrakt die höchste Aktivität im *in vivo* Test zeigte.



Abbildung 5-1 Getrocknete Wurzeln von *S. longepedunculata* (Phytogreen-ng, 2009)

Zudem gibt es noch keine phytochemischen Untersuchungen dieser Pflanze hinsichtlich der Wirkung auf Trypanosomen oder andere Protozoen. Die Blätter von *G. senegalensis* wären auch eine Droge, deren weitere Untersuchung lohnenswert wäre. Allerdings wurden in anderen Arbeitsgruppen bereits drei interessante Alkaloide isoliert, die Beta-carboline Harman, Tetrahydroharman und Harmalan (Dihydroharman). Die Verbindungen zeigten Aktivität gegen Plasmodien (Ancolio *et al.*, 2002; Azas *et al.*, 2002; Fiot *et al.*, 2006). Harman zeigte darüber hinaus Aktivität gegen *T. b. rhodesiense* (Freiburghaus *et al.*, 1996).

Im Folgenden wird die Pflanze *S. longepedunculata*, die für die phytochemische Untersuchung ausgewählt wurde, näher beschrieben.

5.2.1 Systematische Einordnung

S. longepedunculata stammt aus der Familie der Polygalaceae (Kreuzblumengewächse), die zur Ordnung Fabales (Schmetterlingsblütenartige) gehört. Die Familie kommt fast weltweit in gemäßigten und tropischen Regionen vor und enthält 17 Gattungen mit etwa 800 Arten von Bäumen, Sträuchern, Kräutern und selten auch Lianen (Watson und Dallwitz, 1992 onwards). Pflanzen dieser Familie, die in unseren Breiten bekannt sind, sind die Gemeine Kreuzblume *Polygala vulgaris* L., die auf Weiden, Heiden und an Wegrändern in nordmediterranen Gebieten und in Westeuropa vorkommt, die bittere Kreuzblume *Polygala amara* L., die in subalpinen und alpinen Regionen Mittel- und

Südeuropas wächst und der Zwergbuchs *Polygala chamaebuxus* L., der im Gebirge Mittel- und Südeuropas beheimatet ist. Aus Nordamerika stammt die Pflanze *P. senega*, die die Senega- oder Klapperschlangenzwurzel liefert, ein altes Heilmittel der Seneca-Indianer, das auch bei uns als Expektorans Anwendung findet (Bogenrieder, 1985).

Die Gattung *Securidaca* L. umfasst 80 Spezies, die in allen tropischen Gebieten außer Australien vorkommen (Hyde und Wursten, 2009).

5.2.2 Beschreibung der Pflanze

Der blühende Baum oder Strauch wird 2-10 Meter hoch und wächst vorwiegend auf sandigem Boden (Abbildung 5-2). Die freigelegte Wurzel verbreitet einen intensiven aromatischen Geruch. *S. longepedunculata* ist im gesamten tropischen Afrika verbreitet, z.B. in Äthiopien, Südafrika (Transvaal) und Nord-Namibia und wächst hauptsächlich in Savannen, im Buschland und in lichten Wäldern bis 1600 Metern Höhe. Die Wurzeln und der Stamm sind an der Schnittstelle gelb, die Rinde des dünnen Stamms ist hellgrau und glatt (Abbildung 5-4). Rinde und Zweige ergeben eine exzellente Naturfaser, aus der Nähgarn und Seile für Fischernetze hergestellt werden.



Abbildung 5-2 Links: *S. longepedunculata* (Latham, 2005), Rechts: *S. longepedunculata* (SANBI, 2009)

Die Blätter sind alternierend und sitzen an kurzen Stielen mit 0,4-0,8 Zentimetern Länge. Die Blattspreite ist 5-9 mal 2-3 Zentimeter groß, länglich-elliptisch, länglich-lanzettlich oder länglich-eiförmig, manchmal fast linear. Die Oberfläche der Blätter ist glatt und ledrig und variiert farblich von grau-grün bis bläulich (Abbildung 5-3). Die kleinen violetten Blüten hängen an langen, dünnen Blütenstielen in Büscheln oder losen

Trauben und verbreiten einen starken süßlichen, veilchenähnlichen Duft (Abbildung 5-3).

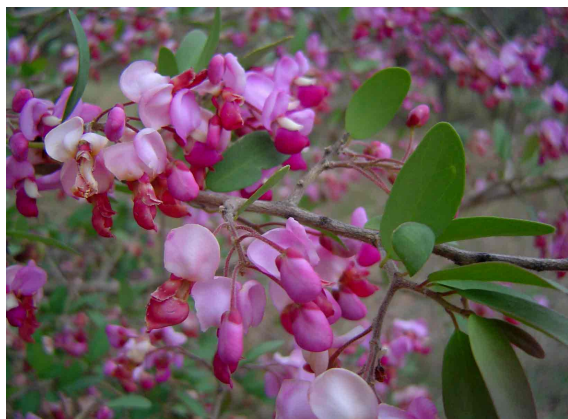


Abbildung 5-3 Links: Zweig mit Blättern und Blüten von *S. longepedunculata*,
Rechts: Blüten von *S. longepedunculata* (Wursten, 2009)

Die Früchte sind einsamig und ähneln durch die vielgeäderten Flügel, an denen eine harte runde Nuss sitzt, den Früchten des Ahorns (Abbildung 5-4) (Neuwinger, 1998).



Abbildung 5-4 Links: Zweig mit Blättern und Früchten von *S. longepedunculata*,
Rechts: Zweig mit angeschnittener Rinde, Bilder: H.-J. von Maydell

Die Wurzel ist der Pflanzenteil, deren volksheilkundliche Verwendung am häufigsten beschrieben wird, im Verbreitungsgebiet kann man sie auf vielen Märkten kaufen. Die folgenden Abschnitte beziehen sich deshalb fast ausschließlich auf die Wurzel.

5.2.3 Phytochemische Charakterisierung der Droge

Securidacae radix enthält Saponine, die in der Zusammensetzung stark denen der Wurzel von *P. senega* ähneln. Isoliert wurde das in der Wurzel vorhandene Presenegenin in freier Form als Genin und als Glykosid (Saponin) (Tubery, 1974). Salicylsäuremethylester stellt mit 90 Prozent den größten Anteil der flüchtigen Bestandteile der Wurzelrinde dar und ist für den charakteristischen Geruch

verantwortlich. Kaffeesäure, 4,5-Di-O-kaffeoylchinasäure, 3,4,5-Tri-O-kaffeoylchinasäure und Sinapinsäure wurden ebenfalls aus der Wurzel isoliert (Mahmood *et al.*, 1993). Costa *et al.* (1992) identifizierten im Methanolextrakt der Wurzel die in höheren Pflanzen nur selten vorkommenden Ergot-Alkaloide. Nachgewiesen wurden Elymoclavin, Dehydroelymoclavin und weitere Ergolin-Alkaloide. Wrobel *et al.* (1996) stellten fest, dass diese Alkaloide nur in den Wurzeln zu finden sind, die in der Trockenperiode gesammelt wurden. In den Wurzeln, die in der Regenzeit geerntet wurden, fand man cis- und trans- Derivate des Zimtsäureesters. Auch ist wie bei den Pflanzen der Familie der Convolvulaceae zu diskutieren, ob diese Alkaloide von der Pflanze selbst produziert werden oder von einem pflanzenassoziierten Pilz stammen (Kucht *et al.*, 2004). Ein weiteres interessantes Alkaloid, das Securinin, wurde bisher nur aus der Stammrinde isoliert (Kogan *et al.*, 1970). In der Wurzel fanden Galeffi *et al.* (1990) ein neues Xanthon, das 1,7-Dimethoxy-2-hydroxyxanthon. Zwei neue Saccharose-Derivate, das β -D-(3,4-disinapoyl) fructofuranosyl- α -D-(6-sinapoyl) glucopyranosid und das β -D-(3-sinapoyl) fructofuranosyl- α -D-(6-sinapoyl) glucopyranosid wurden von De Tommasi *et al.* (1993) aus der Stammrinde isoliert. Als weitere Inhaltsstoffe konnten Sterole und Tannine nachgewiesen werden (Prista und Correira, 1958). Eine Übersicht über die wichtigsten Inhaltsstoffe und deren Strukturformeln geben Tabelle 5-1 und Abbildung 5-5.

Tabelle 5-1 Übersicht über wichtige Inhaltsstoffe von *S. longepedunculata*

Stoffgruppe	Inhaltsstoffe	Quelle
Saponine	Presenegenin als Genin und als Glykosid (Saponin)	(Tubery, 1974; Delaude, 1992)
	Salicylsäuremethylester	(Jayasekara <i>et al.</i> , 2002)
Phenylpropanderivate	Kaffeesäure	(Mahmood <i>et al.</i> , 1993;
	4,5-Di-O-Kaffeoylchinasäure	Wrobel <i>et al.</i> , 1996)
	3,4,5-Tri-O-Kaffeoylchinasäure	
	Sinapinsäure	
	Cis- und trans-Derivate des Zimtsäureesters	

Alkaloide	Elymoclavin	(Costa <i>et al.</i> , 1992;
	Dehydroelymoclavin	Scandola <i>et al.</i> , 1994)
	Ergolin-alkaloide	
Xanthon	1,7-Dimethoxy-2-hydroxyxanthon	(Galeffi <i>et al.</i> , 1990)
Saccharosederivate	β -D-(3,4-disinapoyl) fructofuranosyl-	(De Tommasi <i>et al.</i> , 1993)
	α -D-(6-sinapoyl) glucopyranosid	
	β -D-(3-sinapoyl) fructofuranosyl-	
	α -D-(6-sinapoyl) glucopyranosid	
Sterole, Tannine		(Prista und Correira, 1958)

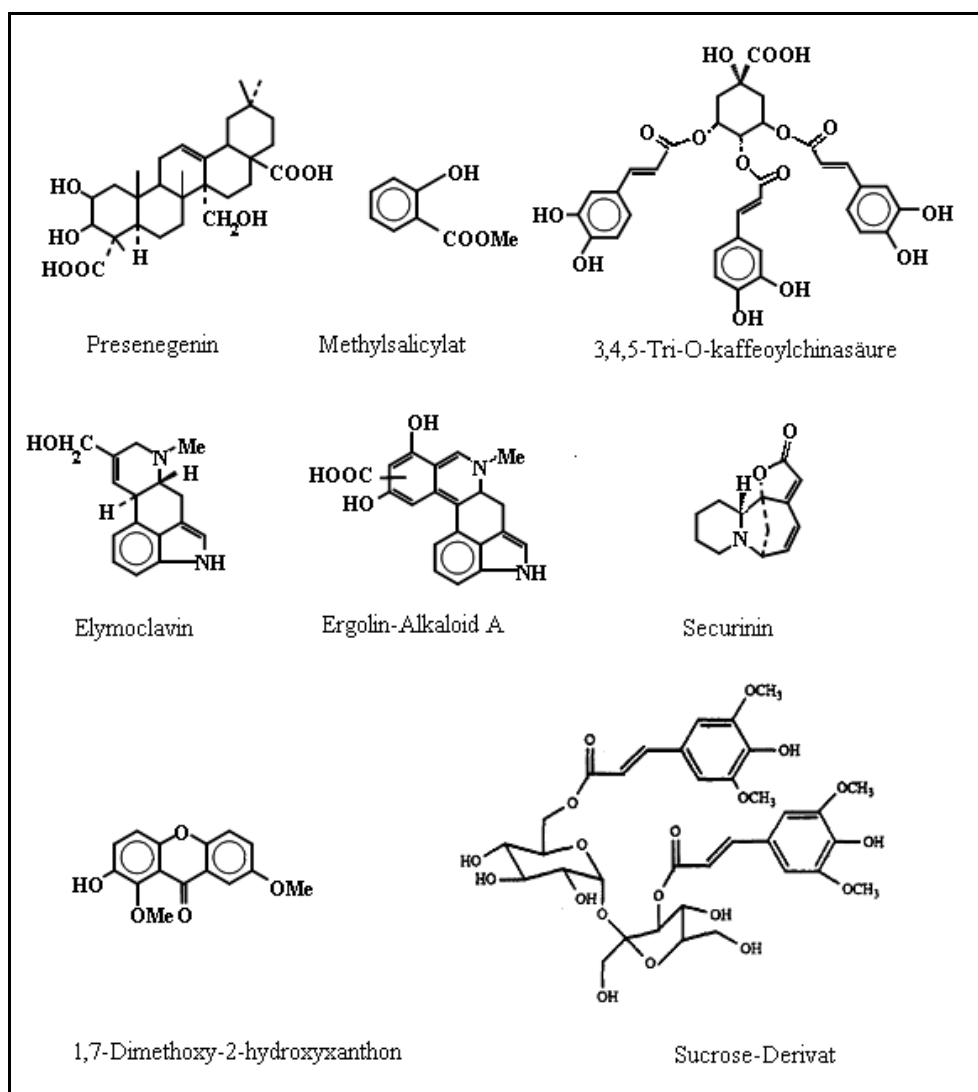


Abbildung 5-5 Strukturformeln bekannter Inhaltsstoffe von *S. longepedunculata*

5.2.4 Anwendung in der traditionellen afrikanischen Medizin

Da man *S. longepedunculata* in fast allen Ländern Afrikas finden kann, gibt es im Verbreitungsgebiet fast keinen Medizinmann, der diesen Baum nicht kennt. In einer lokalen Sprache wird er sogar als „Mutter der Medizin“ bezeichnet. In Äthiopien ist die Pflanze Motiv einer Briefmarke (Abbildung 5-6), was die allgemeine Bekanntheit und Wertschätzung dokumentiert.



Abbildung 5-6 *S. longepedunculata* als Motiv einer Briefmarke in Äthiopien

Fast alle Teile der Pflanze (Blätter, Zweige, Stamm, Rinde, Wurzel und Samen) werden nicht nur therapeutisch, sondern auch für andere Zwecke genutzt, z.B. um Wasser zu reinigen, um Wäsche zu reinigen oder zu bleichen, als Fischfanggift, um Schlangen abzuwehren oder um Getreide vor Insektenfraß zu bewahren.

Ein Teil dieser Drogenanwendungen kann durchaus mit den bisher nachgewiesenen Inhaltsstoffen rational begründet werden. Die Verwendung als Reinigungsmittel und als Fischfanggift kann auf den hohen Saponingehalt zurückgeführt werden. Für Fische sind Saponine toxisch, da durch deren oberflächenaktiven (lyobipolaren) Charakter die Permeabilität des Kiemenepithels stark zunimmt (Umezu, 1991). Clark und Shivik (2002) untersuchten die repellierende Wirkung von ätherischen Ölen und Naturprodukten auf die Braune Nachtbaumnatter. Dabei erwies sich Methylsalicylat als wirksamer Bestandteil. Der Gehalt an flüchtigem Methylsalicylat in der Pflanze erklärt ferner die Insekten abwehrende Wirkung, die auch in Europa bekannt ist.

Die Wurzel ist auch für ihre Toxizität bekannt. Es gibt umfangreiche Belege für ihre Verwendung als Jagdgift und als potentes Gift für so genannte Gottesurteile oder Giftorakel (Irvine, 1961; Neuwinger, 1998). Bei einzelnen Volksgruppen in Zambia, Angola und Mosambik ist die intravaginale Anwendung des Wurzelbreis als Suizidalgift bekannt. Dabei wird die Wurzelrinde entfernt und die Wurzel durch Kneten und Ausdrücken mit der Hand in einen Brei verwandelt. Dieser Brei wird zu einem Ball

geformt und in die Vagina eingeführt. Der Tod tritt innerhalb von 12 bis 24 Stunden ein (Watt und Breyer-Brandwijk, 1962). An der toxischen Wirkung könnten hierbei die Saponine beteiligt sein, die reichlich in der Pflanze vorhanden sind. Eigene Untersuchungen ergaben einen Anteil von rund drei Prozent Gesamtsaponin in der Wurzel (eigene unveröffentlichte Untersuchung). Durch ihre Oberflächenaktivität besitzen Saponine in entsprechender Konzentration eine Membran schädigende Wirkung. Wenn sie in die Blutbahn gelangen, wirken sie hämolytisch. In einer Untersuchung am Frosch löst das Saponingemisch aus *S. longepedunculata* eine Bradykardie aus, in höherer Konzentration blieb das Herz in der Systole stehen (Prista und Correira, 1958). Methylsalicylat besitzt beim Menschen bei oraler Aufnahme eine LD₅₀ (Letale Dosis, bei der 50 Prozent einer Population sterben) von 70 mg/kg (Neuwinger, 1998) und hat in der Wurzelrinde einen Gewichtsanteil von rund 0,3 Prozent (Jayasekara *et al.*, 2002). In dieser Konzentration ist Methylsalicylat nicht toxisch. Es kann jedoch über die gereizte Vaginalschleimhaut in höherem Maße aufgenommen werden und am Resorptionsort durch die hyperämisierende Wirkung die Resorption anderer Stoffe erleichtern und dadurch indirekt einen Anteil an der Toxizität haben. Für Elymoclavin konnte eine LD₅₀ für Mäuse von 350 mg/kg KG und für Ratten von 145 mg/kg festgestellt werden (Petkov *et al.*, 1984). Vor allem wenn man betrachtet, dass diese Stoffe in der Wurzel nur in geringer Konzentration vorkommen, können diese Alkaloide nur einen begrenzten Anteil an der toxischen Wirkung haben.

Häufig beschrieben ist die Verwendung der Pflanze bei Schmerzen aller Art. In Namibia wird die Wurzel bei Zahnschmerzen gekaut, in Zaire findet man die Verwendung des Wurzeldekokts als Einreibung bei Rheuma. Wurzelpulver in zitronensaurem Wasser wird in der Elfenbeinküste bei eingeklemmten Brüchen eingenommen. Die pulverisierte Wurzel verursacht heftiges Niesen und wird als stimulierendes Schnupfpulver gegen Kopfschmerzen eingesetzt (Irvine, 1961).

Die analgetische und antirheumatische Wirkung der Wurzel erscheinen aufgrund des Anteils an Methylsalicylat plausibel. Es wird über die Schleimhaut aufgenommen und kann systemisch eine Salicylatwirkung ausüben. In gewissem Maße ist auch eine perkutane Resorption von Methylsalicylat möglich. Bekannt ist in Deutschland eine methylsalicylathaltige Salbe gegen Rheuma, deren Zusammensetzung im NRF 2006 (Neues Rezepturformularium) näher beschrieben wird. Ob die analgetische Wirkung

des Wurzelpulvers bei eingeklemmten Brüchen ausreicht, ist jedoch zweifelhaft. Der heftige Niesreiz kann durch die in der Wurzel reichlich enthaltenen Saponine ausgelöst werden, eigene Erfahrungen mit dem Wurzelpulver bestätigen diese Wirkung. Die Wurzel wird auch als Stimulans verwendet. In Guinea-Bissau und Nordost-Ghana werden die Wurzeln als psychoaktive Zubereitungen bei Feiern eingesetzt. Manche Gambier trinken das Wurzel-Mazerat bei Müdigkeit nach schwerer Arbeit (Neuwinger, 1998).

Im gesamten Verbreitungsgebiet hat die Wurzel den Ruf als Gegengift bei Schlangenbissen zu wirken. Heilkundige im Senegal nehmen eine Messerspitze Wurzelpulver zu sich, bevor sie in schlangenreichen Gebieten Arzneipflanzen in Busch und Wald sammeln. Nach Kone (1980) soll die Wirksamkeit darauf zurückzuführen sein, dass in den Wurzeln ein dem Schlangengift von *Naja nigrocollis* ähnliches Protein existiert, das sich an den Rezeptor des Haupttoxins anlagert, aber weniger toxisch ist (Neuwinger, 1998). Genauere Angaben fehlen allerdings.

Die Wurzel von *S. longepedunculata* wird auch gegen viele Infektionskrankheiten eingesetzt. Beschrieben wird eine Wirkung bei Fieber, Husten und Erkältungen, was durch den Gehalt an expektorierend wirkenden Saponinen und Methylsalicylat nachvollziehbar ist.

In Namibia wird die Wurzel bei Syphilis und Gonorrhö gekaut. Sie wird auch als Mittel gegen Malaria und Schlafkrankheit eingesetzt, gegen Eingeweidewürmer und –parasiten sowie gegen Lepra. Diese Wirkungen können zum Teil durch *in vitro* und *in vivo* Experimente bestätigt werden (Ancolio *et al.*, 2002; Atawodi *et al.*, 2003; Aderbauer *et al.*, 2008).

In Südafrika werden Zubereitungen der Wurzel als Kontrazeptivum und auch als Mittel gegen Impotenz verwendet. Für die Wirkung gegen Impotenz soll ein Stoff aus der Gruppe der Xanthone verantwortlich sein (Rakuambo *et al.*, 2004).

Verbreitet ist darüber hinaus die Verwendung bei Magen-Darm-Beschwerden, als Abführmittel und als Emetikum. Auch die Wirkung auf den Magen-Darm-Trakt konnte durch pharmakologische Experimente belegt werden (Olajide *et al.*, 1999).

Auffallend ist der Einsatz der Wurzel gegen Epilepsie in Äthiopien, Zimbabwe, Malawi und Mosambik, eine in der Volksmedizin sonst wenig verbreitete Anwendung. Olajide

et al. (1998) konnte die antikonvulsive Wirkung in einer *in vivo* Untersuchung bestätigen.

Leider hat die breite Anwendung der Wurzel bereits dazu geführt, dass der Bestand von *S. longepedunculata* an seinen natürlichen Standorten gefährdet ist (Mouzou *et al.*, 1999).

5.2.5 *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen

Im sub-saharischen Afrika sind über 43 Prozent aller Todesfälle durch Infektionskrankheiten und parasitäre Erkrankungen bedingt (WHO, 2004). Da es für viele dieser Erkrankungen keine zufrieden stellende Behandlungsmöglichkeit gibt und die Mittel in den betroffenen Ländern knapp sind, rücken nachwachsende Rohstoffe wieder stärker in den Mittelpunkt der Untersuchungen. Auch die Wurzel von *S. longepedunculata* wurde und wird auf deren Wirksamkeit gegen Infektionskrankheiten und parasitäre Erkrankungen untersucht, die auf traditionelle Anwendungen zurückgehen.

Der 70 prozentige Methanolextrakt zeigte in einer Untersuchung *in vitro* stark antimikrobielle Eigenschaften. Die wirksamste Flavonoidfraktion aus diesem Methanolextrakt war doppelt so aktiv wie Chloramphenicol auf gramnegative Bakterien und dreimal so aktiv wie Penicillin G auf grampositive Bakterien (Ajali und Chukwurah, 2004). Die isolierten Verbindungen 3,4,5-Tri-O-Kaffeoylchinasäure und 4,5-Di-O-Kaffeoylchinasäure zeigten *in vitro* eine selektive Hemmung der HIV-Replikation (Mahmood *et al.*, 1993). Der Methanol- und der Chloroformextrakt zeigte *in vitro* eine Wirksamkeit gegen *Plasmodium falciparum* (Ancolio *et al.*, 2002). Atawodi *et al.* (2003) demonstrierten die *in vitro* Wirksamkeit sowohl gegen *T. b. brucei* als auch gegen *T. congolense*.

Durch *in vitro* und *in vivo* Versuche konnten auch weitere pharmakologische Effekte, die der Wurzel in der traditionellen Medizin zugeschrieben werden, bestätigt werden. Durch das aus der Wurzel isolierte 1,7-Dimethoxy-2-hydroxy-xanthon konnte *in vitro* am *Corpus cavernosum* des Kaninchens eine relaxierende Wirkung festgestellt werden, die 63 Prozent der Wirkung des Sildenafil entspricht (Rakuambo *et al.*, 2004).

Eine erhöhte Muskelkontraktilität und eine Erhöhung des Natriumeinstroms durch den Wurzelextrakt konnte an kultivierten Skelettmuskelzellen von Ratten nachgewiesen

werden. Hier wird eine Wechselwirkung mit dem Dihydropyridin-Rezeptor postuliert (Mouzou *et al.*, 1999). Das Wurzelpulver, der Methanolextrakt und die hauptflüchtige Komponente Methylsalicylat wiesen repellierende und toxische Wirkung auf den Maiskäfer *Sitophilus zeamais* auf (Jayasekara, 2005).

Olajide *et al.* (1998) stellten eine Wirkung des Methanolextrakts gegen Ödeme und gegen Krämpfe bei Mäusen fest, die durch Leptozol induziert wurden. Außerdem konnten sie eine Potenzierung der Phenobarbital-Schlafdauer in Mäusen nachweisen. Olajide (1999) stellte in einer weiteren Studie an Mäusen eine propulsive Wirkung des Methanolextrakts fest, die mit einer verringerten Magenentleerzeit und einer höheren Frequenz weicher Stühle einherging.

5.2.6 Eigene Untersuchungen

Im *in vitro* Versuch zeigten der Dichlormethanextrakt, der Methanolextrakt und der wässrige Extrakt die gleiche Aktivität. Nur die Zytotoxizität der Extrakte unterschied sich deutlich voneinander, wobei der Dichlormethanextrakt die geringste Toxizität und der wässrige Extrakt die höchste Toxizität aufwies (Tabelle 4-7). Als Ausgangspunkt für die phytochemische Untersuchung wurde der Methanolextrakt ausgewählt, weil damit das größte Spektrum an Inhaltsstoffen erfasst werden kann.

Durch Isolierung einzelner Fraktionen des Methanolextraktes sowohl durch präparative DC als auch durch aufeinander folgende Extraktion mit Lösungsmitteln aufsteigender Polarität konnte keine Fraktion eine höhere oder auch nur die gleiche Aktivität wie der Gesamtextrakt aufweisen. Dies kann daran liegen, dass im Gesamtextrakt synergistische Effekte eine Rolle spielen.

Der Rohalkaloidextrakt und der Saponin-Rohextrakt zeigten mit 25 µg/ml deutlich höhere Aktivität als der Methanolextrakt mit 50 µg/ml. Diese Stoffgruppen scheinen maßgeblich an der Wirkung beteiligt zu sein. Da die Saponine in der Pflanze zudem zu einem hohen Anteil vorkommen, gilt dieser Stoffgruppe ein besonderes Augenmerk.

5.2.6.1 Alkaloid-Rohextrakt

Aus dem Rohalkaloidextrakt konnten wie schon aus der Literatur bekannt, Lysergsäurederivate nachgewiesen werden. Diese wiesen jedoch sowohl in ihrer Summe in der van Urk positiven Bande (MHK > 50 µg/ml) als auch das Elymoclavin als getestete Reinsubstanz (MHK = 50 µg/ml) eine geringere Aktivität auf als der

Rohalkaloidextrakt. Diese Alkaloide scheinen daher für die Gesamtwirkung nur eine untergeordnete Rolle zu spielen oder nur im Synergismus mit anderen Stoffen ihre ganze Wirkung zu entfalten. In der Literatur konnten aus der Wurzel von *S. longepedunculata* außer den Mutterkornalkaloiden keine weiteren Alkaloide identifiziert werden. Dies bestätigte sich in meinen Untersuchungen.

Aus der Rohalkaloidfraktion konnten zwar Fraktionen isoliert werden, die eine höhere Aktivität oder zumindest die gleiche Aktivität aufwiesen wie der Ausgangsextrakt. Jedoch war durch die verwendeten Methoden keine wirksame Einzelsubstanz greifbar. Entweder waren die Substanzen sehr instabil oder der Versuch müsste mit einer größeren Menge an Extrakt oder mit anderen Methoden wie der HPLC-MS wiederholt werden. Welche Stoffe außer Alkaloiden dort in der Rohalkaloidfraktion zu finden waren, lässt sich durch den Ausschüttelgang erklären. Der in Weinsäure gelöste beziehungsweise suspendierte Methanolextrakt wurde mit Dichlormethan ausgeschüttelt. In der weinsauren Lösung liegen dabei die Alkaloide protoniert, das heißt geladen vor und gehen nicht in die lipophile Dichlormethanphase über. Saure Verbindungen liegen undissoziiert vor und lösen sich zusammen mit neutralen Verbindungen in Dichlormethan. Allerdings gibt es auch neutrale Verbindungen, die nicht lipophil genug sind, um sich in Dichlormethan zu lösen. Nach Alkalisieren der Lösung mit Ammoniak wurde mit einer Mischung aus Dichlormethan und Isopropanol (3:1) ausgeschüttelt, in der sich dann die unprotoniert vorliegenden Alkaloide lösen, und, da Isopropanol weniger lipophil ist als Dichlormethan, auch neutrale weniger lipophile Verbindungen. So kann es sein, dass neutrale Stoffe oder sogar hydrophile saure Verbindungen im Rohalkaloidextrakt erscheinen. Auch das isolierte Saccharose-Derivat war vermutlich aufgrund der hydrophilen Zuckerkette im Rohalkaloidextrakt zu finden. Die über die HPLC isolierten gut wirksamen Fraktionen gehören demnach auch zur Gruppe der neutralen oder sauren hydrophilen Stoffe. Die UV-Spektren dieser Stoffe weisen auf Kaffeesäurederivate hin.

5.2.6.2 Rohsaponinextrakt

Die Wurzel von *S. longepedunculata* ist mit einem durch eigene Untersuchungen festgestellten Anteil von drei Prozent in der Droge stark saponinhaltig. Der Rohsaponinextrakt war gelb gefärbt. Da Saponine kein Chromophor besitzen, muss die Farbe von Begleitstoffen stammen. Nach Auftrennung der wirksamen Fraktionen an der

HPLC entstand eine gelbe Fraktion mit geringer *in vitro* Aktivität und eine rein weiße Fraktion mit hoher Aktivität. Die weiße Fraktion wäre eine gute Ausgangssubstanz für die Analyse von Einzelverbindungen. Für die wirkungsorientierte Untersuchung war jedoch zunächst wichtig zu wissen, wie die Wirkung dieser Saponingruppe im Vergleich zu anderen Saponinen zu beurteilen ist. Da darüber kaum Untersuchungen vorliegen (siehe Kapitel 5.3.2), folgte zunächst ein Test einiger bekannter Saponine und Saponinextrakte im *in vitro* Modell.

Der Extrakt von *S. longepedunculata* wird traditionell als Mazerat (Kaltwasserauszug), Dekokt (Abkochung) oder Infus (Aufguss) verwendet. Da auch der wässrige Extrakt Aktivität gegen Trypanosomen gezeigt hat, Saponine die wirksamen Bestandteile der Wurzel sind und viele Saponine wasserlöslich sind, ist die Wirkung der traditionellen Anwendungsformen durchaus nachvollziehbar.

5.3 Wirksamkeit von Saponinen gegen Trypanosomen

Saponine haben Forscher schon mehr als hundert Jahre lang fasziniert, die größten Fortschritte wurden jedoch in den letzten Jahrzehnten gemacht. Neue Techniken bei der Isolierung, der Strukturaufklärung und bei biologischen Testsystemen brachten eine Vielzahl von bioaktiven Saponinen aus unterschiedlichen Pflanzen hervor. Die Wirkungen betreffen unter anderem die Aktivität gegen Krebszellen, immunstimulierende, immunadjuvante, antiphlogistische, antihepatotoxische und kardiovaskuläre Aktivität und Effekte auf das Zentralnervensystem (Lacaille-Dubois, 2000). Bioverfügbarkeitsstudien und klinische *in vivo* Studien gibt es jedoch noch sehr wenige (Oleszek und Marston, 2000).

5.3.1 Wirkung von Saponinen allgemein

In der Vergangenheit waren Saponine vor allem bekannt als Wasch- und Reinigungsmittel und als Fischgift. Auch die hämolytische Wirkung von Saponinen ist schon lange bekannt. Kobert hat bereits 1887 von dieser Wirkung berichtet (Kobert, 1887), zitiert nach Hostettman und Marston (1995). Als gemeinsames Merkmal vieler Saponine ist darüber hinaus die Fähigkeit Cholesterol zu komplexieren zu nennen, die bereits 1909 von Windaus entdeckt wurde (Windaus, 1909), zitiert nach Hostettman und Marston (1995). Cholesterol und Gallensäuren werden dadurch vermehrt ausgeschieden

beziehungsweise in geringerem Maße resorbiert und rückresorbiert. Dies hat zur Folge, dass Gallensäuren vermehrt aus endogenem Cholesterol neu gebildet werden (Rao und Kendall, 1986). Saponine bilden außerdem Komplexe mit Plasmalipiden (Oakenfull und Topping, 1983). Saponinreiche Nahrung könnte dadurch den Cholesterolspiegel senken und das Risiko von Herz-Kreislauf-Erkrankungen verringern (Oakenfull, 1981).

An Schleimhäuten bewirken Saponine eine unspezifische lokale Irritation (Vogel, 1963), zitiert nach Hostettman und Marston (1995). Ein Effekt davon ist der Niesreiz, der von Saponinen ausgelöst wird. Auch der therapeutische Einsatz von saponinhaltigen Drogen wie der Primel-, der Senega-, der Süßholzwurzel und den Efeublättern als Expektoranzien ist zumindest teilweise durch lokale Irritation der Schleimhäute zu erklären.

Die diuretische Wirkung vieler Saponine kann auch auf eine Schleimhautirritation, in diesem Fall des Nierenepithels zurückgeführt werden (Hostettman und Marston, 1995). Bei saponinhaltigen diuretisch eingesetzten Drogen, wie dem echten oder dem Riesen-Goldrutenkraut, dem Bruchkraut, den Birkenblättern oder dem Ackerschachtelhalmkraut, beruht die Wirkung zum Teil auf der Saponinwirkung und zum Teil auf begleitenden Flavonoiden oder ätherischen Ölen (Hänsel und Haas, 1983), zitiert nach Hostettman und Marston (1995).

Die antiexsudative und entzündungshemmende Wirkung der Rosskastaniensamen beziehungsweise des darin enthaltenen Aescins und des Mäusedornwurzelstocks ist vermutlich teilweise die Folge einer durch die Saponine bedingten Steigerung der Gewebskonzentration an Glucocorticoiden (Teuscher *et al.*, 2004).

Die Ginsengwurzel ist als saponinhaltige Droge bekannt in ihrer Wirkung als Stimulans des Zentralnervensystems und für ihre adaptogene Wirkung (Lacaille-Dubois, 2000).

Saponine haben spermizide Aktivität gezeigt. Der Hauptwirkmechanismus ist wahrscheinlich wie bei dem kommerziell erhältlichen Spermizid Nonoxynol-9 eine Schädigung der spermatozoiden Plasmazellmembran (Hostettman und Marston, 1995).

Die Funktion der Saponine in Pflanzen wurde oft diskutiert und man hat nicht immer eine Erklärung für den zum Teil sehr hohen Saponingehalt von bis zu 30 Prozent. Eine Theorie ist, dass sich die Pflanze dadurch vor Pilzbefall schützt (Défago, 1977), zitiert nach Hostettman und Marston (1995). Viele Saponine besitzen antivirale und antimikrobielle Wirkung, besonders die Wirkung gegen Pilze ist ausgeprägt und oft ist der

Saponingehalt einer Pflanze bei mikrobiellem Befall erhöht. Dies spricht für die Theorie und ist ein Hinweis auf eine ökologische Funktion der Saponine. Der sehr hohe Saponingehalt deutet jedoch darauf hin, dass einige Stoffe über die ökologische Funktion hinaus auch Speicherfunktion haben könnten (Teuscher *et al.*, 2004).

Saponine gehören neben Fetten, Lektinen, Polysacchariden und Metaboliten aus Pilzen zu den Substanzklassen mit Einfluss auf das menschliche Immunsystem (Hostettman und Marston, 1995). Bei ihrem Einsatz als Adjuvantien können sie das zelluläre Immunsystem modulieren und auch die Antikörperproduktion erhöhen. Gegenüber anderen Adjuvantien haben sie den Vorteil, dass nur geringe Dosen nötig sind (Oda *et al.*, 2000).

Bei oraler Applikation werden Saponine nur in sehr geringem Maße aufgenommen, besonders, wenn sie viele Zuckerreste tragen, die das Molekül polarer machen. Eine Studie zeigt, dass bei einem Saponin mit antiexsudativem Effekt bei per oraler Gabe die zehnfache Dosis im Vergleich zur intramuskulären Gabe nötig ist, um den gleichen Effekt zu erzielen (Yamamoto *et al.*, 1975). Eine andere Studie beschreibt eine Absorptionsrate von 10-20 Prozent für α -Aescin aus dem Zwölffingerdarm von Ratten (Henschler *et al.*, 1971). Der Anteil, der nicht in die Blutbahn gelangt, wird dann entweder unverändert ausgeschieden oder durch die Darmflora metabolisiert. Dadurch ist es schwer, vorherzusehen wie diese Saponine wirken. Und für viele Wirkungen, für die Saponine verantwortlich gemacht werden, gibt es noch keinen direkten Beweis.

Die Toxizität von Saponinen für warmblütige Tiere ist bei oraler Aufnahme relativ gering. Die LD₅₀ liegt zwischen 50 und 1000 mg/kg KG. Aufgrund des verbreiteten Vorkommens von Saponinen in der Nahrung wie in Bohnen, Erbsen, Sojabohnen, Erdnüssen, Linsen, Spinat und Hafer, ist die tägliche Aufnahme von Saponinen zum Teil sehr hoch. Die durchschnittliche Familie aus Großbritannien nimmt 15 mg Saponine pro Person und Tag auf, Asiaten, die sich vegetarisch ernähren nehmen 214 mg Saponine pro Person und Tag auf (Ridout *et al.*, 1988). Zeichen für eine Vergiftung mit Saponinen sind übermäßiger Speichelfluss, Erbrechen, Durchfall, Appetitverlust und Lähmungserscheinungen.

Die parenterale, vor allem die intravenöse Injektion kann gravierendere Auswirkungen haben. Die LD₅₀ variiert hier zwischen 0,67 mg/kg KG für Quillaioside von *Quillaja saponaria* bis 50 mg/kg Körpergewicht für Hederasaponin C aus *Hedera helix*.

Saponine im Blutkreislauf können Leberschädigung, Hämolyse der roten Blutkörperchen, Ausfall der Atmung, Krämpfe und Koma hervorrufen (Hostettman und Marston, 1995).

5.3.2 Literatur zur Wirksamkeit von Saponinen gegen Trypanosomen

In einer Publikation von 1966 wird der Einfluss von Ginseng auf Mäuse, die mit Trypanosomen infiziert wurden untersucht. Angaben darüber welche Zubereitung von Ginseng und welche Trypanosomen verwendet wurden, konnten aus dem Abstract nicht entnommen werden, der Originalartikel erschien nur auf Chinesisch. Den Mäusen wurde dabei *per oral* drei Wochen lang täglich eine Dosis von 0,1 g/kg KG verabreicht. Anschließend wurden die Mäuse mit Trypanosomen infiziert. Zu sehen war, dass der Verlauf der Krankheit durch diese Vorbehandlung gemildert werden konnte. Die Trypanosomen erschienen später im Blut und die Überlebenszeit der behandelten Mäuse war verglichen mit der Kontrolle signifikant verlängert (Chang, 1966).

In "Natural products active against African trypanosomes: a step towards new drugs" geben Hoet *et al.* (2004) einen Überblick über Naturstoffe, die eine Aktivität gegen afrikanische Trypanosomen zeigen, hauptsächlich gegen *T. brucei* Subspezies, *T. congolense* und *T. vivax*. Keine der 89 Literaturangaben von den 1980ern bis Juni 2003 beziehen sich auf Saponine. Ein neuerer Review-Artikel aus dem Jahr 2006, der die Literatur von Mitte der 1990 Jahre bis Dezember 2005 einbezieht, gibt ebenfalls keinen Hinweis auf die Wirksamkeit von Saponinen gegen Trypanosomen (Salem und Werbovetz, 2006). Beim Durchsuchen der Datenbanken „Pubmed“ und „Chemical Abstracts“ (Science-Finder) und der elektronischen Zeitschriften, die über die Plattform „Science-direct“ von Elsevier und Wiley Interscience verfügbar sind, sind ebenfalls keine Angaben über die Wirkung von Saponinen gegen Trypanosomen zu finden.

5.3.3 Wirksamkeit von Saponinen gegen andere Protozoen

Leishmanien, die Erreger der Leishmaniose sind die Erreger, die den Trypanosomen am ähnlichsten sind. Beide Erreger sind einzellige Parasiten (Protista) der Familie Trypanosomatidae aus der Ordnung Kinetoplastida. Innerhalb dieser Familie liegt die Gattung Trypanosoma mit den Erregern der Trypanosomose und die Gattung Leishmania mit den Erregern der Leishmaniose von denen als wichtigste Erreger zu nennen sind: *Leishmania donovani*, der Erreger der viszeralen Leishmaniose oder Kala-

Azar, *Leishmania tropica*, der Erreger der Orientbeule und *Leishmania brasiliensis*, der Erreger der amerikanischen Hautleishmaniose. Während sich Trypanosomen extrazellulär im Blut des Vertebraten-Wirtes vermehren, vermehren sich Leishmanien ausschließlich intrazellulär in phagozytierenden Zellen (Makrophagen).

Es wurde immer wieder versucht, Wirkstoffe, die gegen Trypanosomen wirksam waren auch gegen Leishmanien einzusetzen und umgekehrt. 1985 war Allopurinol in der klinischen Phase II sowohl gegen viszerale Leishmaniose als auch gegen die Chagaskrankheit mit dem Erreger *Trypanosoma cruzi*. Pentamidin, das seit langem zur Standardtherapie der Schlafkrankheit gehört wird jetzt auch in der Therapie der viszeralen Leishmaniose und der Hautleishmaniose eingesetzt (Croft *et al.*, 2005).

Es gibt mehrere Studien zur Wirksamkeit einzelner Saponine gegen Leishmanien. Majester-Savornin *et al.* (1991) berichten zum ersten mal über die *in vitro* Aktivität von Saponinen aus dem Efeu, *Hedera helix* L., gegen promastigote und amastigote Formen von *Leishmania infantum* und *Leishmania tropica*. Delmas *et al.* (2000) untersuchten die antileishmaniale Aktivität von drei isolierten Saponinen aus *H. helix*: α -Hederin, β -Hederin und Hederacolchisid A₁. Die Verbindungen zeigten eine stark antiproliferative Aktivität auf alle Entwicklungsstadien der Parasiten durch Änderung der Membranintegrität und des Membranpotentials. Hederacolchisid A₁ zeigte sich dabei als wirksamste Verbindung. Die IC₅₀ gegen amastigote Formen von *L. infantum* betrug 0,053 μ M. Die Saponine zeigten auch antiproliferative Aktivität gegen humane Monozyten, die IC₅₀ für Hederacolchisid A₁ beträgt hierfür 0,45 μ M. Ridoux *et al.* (2001) zeigten die *in vitro* antileishmaniale Aktivität der drei Saponine aus *H. helix* gegen promastigote und amastigote Formen von *L. mexicana*. Hederacolchisid A₁ war mit einer IC₅₀ von 0,068 μ M am stärksten wirksam. Die IC₅₀ gegen Monozyten der Zelllinie THP-1 betrug 0,8 μ M. In der Studie konnte auch gezeigt werden, dass subtoxische Konzentrationen der Saponine die Aktivität von antileishmanialen Substanzen wie Pentamidin und Amphotericin B erhöhen konnten. Ein steroidales Saponin, das aus *Yucca filamentosa* L. isoliert wurde, zeigte dosisabhängigen inhibitorischen Effekt auf promastigote Formen von *L. mexicana amazonensis*. Die Yuccasaponin MC3 genannte Verbindung zeigte in einer Konzentration von 10 μ g/ml eine 100 prozentige leishmanizide Aktivität (Plock *et al.*, 2001). Okunji *et al.* (1996) konnten antileishmaniale Aktivität von Saponinen aus dem westafrikanischen

Seifenbaum *Dracaena* spp. (Spezies) feststellen. Spiroconazol A, das durch aktivitätsgeleitete Fraktionierung aus *D. mannii* erhalten wurde, zeigte Aktivität gegen Leishmanien und Plasmodien und auch fungizide und bakteriostatische Aktivität. Im *in vitro* Test gegen *L. chagasi* konnte eine IC₅₀ von rund 10 µg/ml erreicht werden. Eine dosisabhängige *in vivo* Aktivität konnte durch Gabe von Spiroconazol A in Hamstern, die mit *L. panamensis* infiziert wurden, erreicht werden. Bei einer vier Tage langen Gabe von 26 mg/kg/pro Tag konnten die Läsionen, die durch den Erreger verursacht wurden um 73 Prozent reduziert werden, bei 13 mg/kg/Tag um 51 Prozent und bei 3,25 mg/kg/Tag um 7 Prozent.

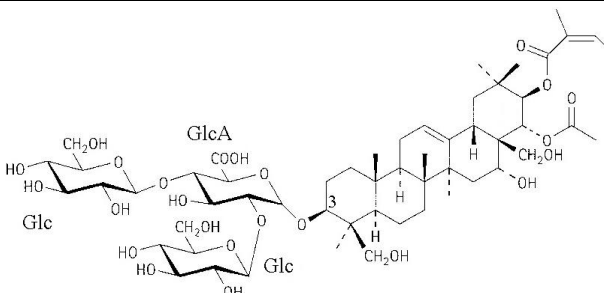
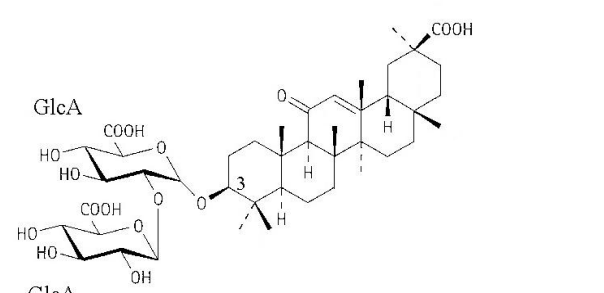
Aus *Maesa balansae* Mez aus der Familie der Myrsinaceae wurden sehr aktive Triterpensaponine vom Oleanantyp isoliert. Die Maesabalide III und IV zeigten mit einer IC₅₀ von 0,007 µg/ml und 0,014 µg/ml die größte Aktivität gegen intrazelluläre amastigote Formen von *L. infantum*. Zum Vergleich ergaben die Referenzsubstanzen Amphotericin B und Natriumstibogluconat eine IC₅₀ von 0,29 beziehungsweise 5,6 µg/ml (Germonprez *et al.*, 2005). Die Mischung aus sechs Triterpensaponinen vom Oleanantyp, die zu 70 Prozent aus den Maesabaliden III und IV besteht, genannt PX-6518, zeigte eine *in vitro* Aktivität gegen amastigote Formen von *L. infantum* von 0,04 µg/ml. Die zytotoxische Konzentration, bei der in 50 Prozent der Fällen der Zelltod ausgelöst wurde, lag in murinen Wirtszell-Makrophagen bei 1 mg/ml und bei > 32 µg/ml in humanen Fibroblasten. Bei Konzentrationen bis zu 32 µg/ml zeigte PX-6518 keine Aktivität gegen sämtliche Viren-, Bakterien-, Hefe-, Pilz-, und Parasitenarten einschließlich Plasmodien und Trypanosomen und die Substanz ist unwirksam gegen promastigote Formen des Leishmania-Erregers. Das spricht für eine sehr selektive Toxizität gegen amastigote Formen von Leishmanien. In diesem Fall ist folglich die Wirkungsweise nicht durch allgemeine Membrantoxizität zu erklären ist, wie dies in den meisten Fälle eines antimikrobiellen Effekts von Saponinen der Fall ist (Maes *et al.*, 2004). PX-6518 zeigte auch sehr viel versprechende *in vivo* Ergebnisse in BALB/c Mäusen (Albinostamm von Labormäusen), die mit *L. donovani* infiziert wurden. Durch eine einzige subkutane Injektion von 2,5 mg/kg KG entweder fünf Tage vor oder drei Tage nach Infektion konnten die amastigoten Leberparasiten vollständig beseitigt werden (Maes *et al.*, 2004). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die

Substanzklasse der Saponine auch für die Bekämpfung der Trypanosomen interessant sein könnte.

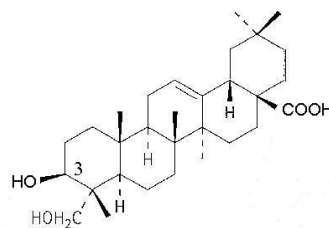
5.3.4 Beurteilung der Wirkung der getesteten Saponine

Der Rohsaponinextrakt von *P. senega* zeigte die gleiche Aktivität wie der Rohsaponinextrakt von *S. longepedunculata*. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass sich die enthaltenen Saponine, wie bereits von Tubery (1974) beschrieben, tatsächlich ähneln könnten. Da die aus *S. longepedunculata* und *P. senega* isolierten Saponine mit Presenegenin als Grundkörper sauer reagieren, wurden als Vergleich im Test ebenfalls sauer reagierende Saponine ausgewählt (siehe Tabelle 5-2). Nur *Saponinum album* konnte die gleiche Aktivität wie die Saponine aus *S. longepedunculata* beziehungsweise *P. senega* erreichen. Es ist deshalb nicht von einer rein unspezifischen Wirkung von Saponinen allgemein auszugehen. Um dies noch besser beurteilen zu können, müsste noch eine größere Zahl an Saponinen getestet werden.

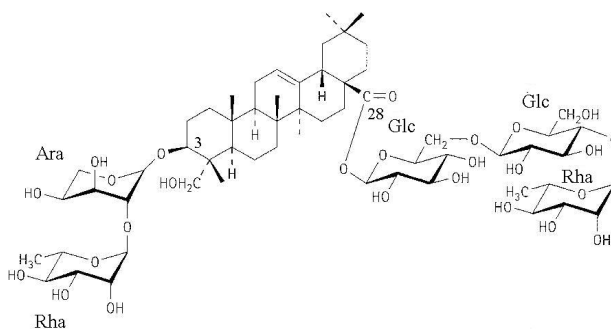
Tabelle 5-2 Bekannte Strukturen der getesteten Saponine

Stoff	Pflanzenart, Familie und Droge	Struktur
β -Aescin	Roskastanie (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.) Hippocastanaceae Hippocastani semen	 <p>Hauptkomponente des β-Aescin (Aescin Ia)</p>
Glycyrrhizinsäure	Süßholz (<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.) Fabaceae Liquiritiae radix	

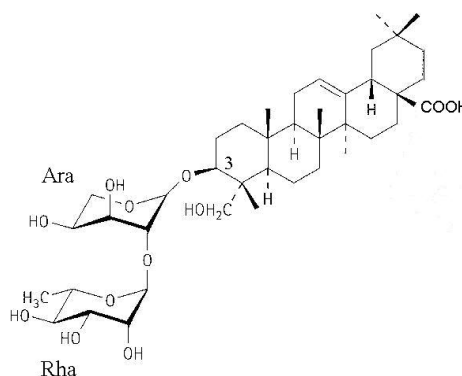
Hederagenin Efeu
(*Hedera helix* L.)
Araliaceae
Hederae helicis folium



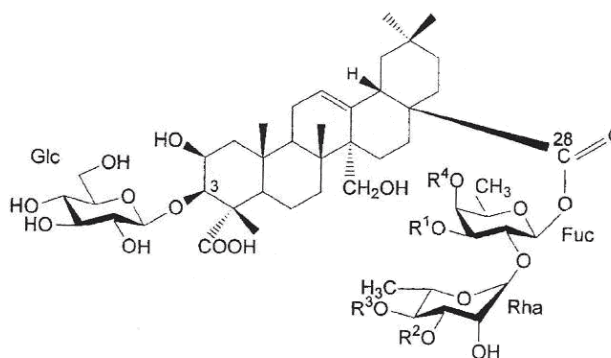
Hederasaponin C



α-Hederin

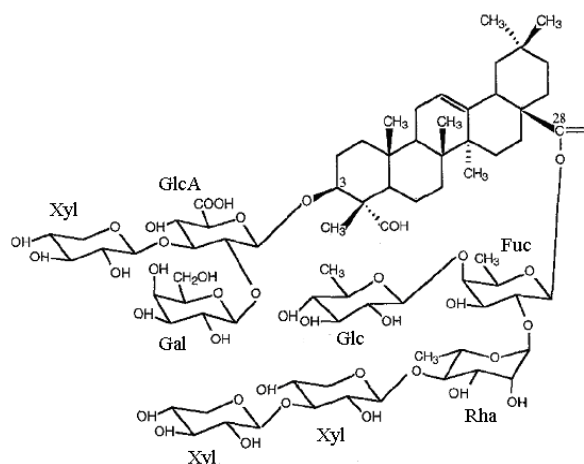


Presenegenin-*S. longepedunculata*
Glycoside Polygalaceae
Securidacae radix
P. senega
Polygalaceae
Polygalae radix



3-O-(β-D-glucopyranosyl)-presenegenin 28-[O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-fucopyranosyl]ester

Saponinum album *Gypsophila paniculata* L.
Caryophyllaceae
Saponariae radix alba
(weiße Seifenwurzel)



Eines der von Delay *et al.* (1997) isolierten Saponine

Die im *in vitro* Test bei 25 µg/ml aktiven Saponine aus Saponinum album, *P. senega* und *S. longepedunculata* sind jeweils Gemische aus verschiedenen Saponinen, deren Strukturen noch nicht alle aufgeklärt sind.

Saponinum album ist ein Gemisch bisdesmosidischer Triterpensaponine mit den Aglyka Gypsogenin und Quillajasäure. Die Struktur von fünf Saponinen wurde bislang aufgeklärt. Bei diesen fünf Verbindungen ist die OH-Gruppe an C3 jeweils verknüpft mit drei Zuckern, wobei zwei davon immer Glucuronsäure und Galactose sind, die dritte Arabinose oder Xylose. Das C28 der Säurefunktion ist bei diesen vier Verbindungen jeweils mit einer Gruppe von fünf Zuckern verbunden (Kim *et al.*, 1992; Delay *et al.*, 1997; Weng *et al.*, 2009).

Die Senegawurzel enthält eine Reihe von Saponinen mit dem Grundgerüst Presenegenin. Dieses ist verknüpft mit einem einzigen Zucker an Position 3 und einer 4-6 verknüpften Zuckerkette an Position 28. Eine Reihe von Methoxyzimtsäureestern sind am mittleren Zucker der C-28 Kette angeheftet. Diese Saponine haben die Namen Senegin I-IV und Senegasaponine A-D (Yoshinobu *et al.*, 1971; Tsukitani und Shoji, 1973; Yoshikawa *et al.*, 1995; Yoshikawa *et al.*, 1996).

Presenegenin ist in reiner Form in *S. longepedunculata* und in Form von Saponinen in *S. longepedunculata* und in *P. senega* vorhanden (Tubery, 1974). In einem Review-Artikel über Triterpensaponine aus der Familie der Polygalaceae bezeichnen Lacaille-Dubois und Mitaine-Offier (2005) Presenegenin als das Aglykon, das in den meisten saponinhaltigen Pflanzen der Familie Polygalaceae enthalten ist. Als gemeinsames

Prinzip fanden sie die Sequenz 3-O-(β -D-glucopyranosyl)-presenegenin 28-[O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopyranosyl]ester (Tabelle 5-2), die für die Familie der Polygalaceae als chemotaxonomischer Marker angesehen werden kann. Genauer über die Struktur der Saponine aus *S. longepedunculata* ist nicht bekannt. Bei den in dieser Untersuchung aus *P. senega* und *S. longepedunculata* gewonnenen Extrakten können für die Wirkung auch noch Begleitstoffe eine Rolle spielen. Um eine Struktur-Wirkungs-Beziehung ableiten zu können, müssten einzelne Saponine aus den Pflanzen isoliert und getestet werden.

5.4 Immunsuppressiver Effekt von *Acacia nilotica*

A. nilotica ist eine Pflanze, die in der traditionellen Medizin Afrikas und Indiens gut bekannt ist und viele interessante Anwendungsgebiete bietet. Aber es gibt keinen Hinweis auf die Anwendung von *A. nilotica* gegen Erkrankungen, die das Immunsystem betreffen. (Watt und Breyer-Brandwijk, 1962; Kokwaro, 1976; Von Maydell, 1983). Diese Krankheiten stehen jedoch auch erst kürzlich im Fokus der medizinischen Forschung.

5.4.1 Anwendungsgebiete der Rinde

In den vergangenen Jahren wurden mehrere Studien über die Wirksamkeit der Rinde von *A. nilotica* durchgeführt. Dabei konnte molluskizide (Ayoub, 1984), antioxidative (Sultana *et al.*, 2007), antiplasmodiale (Kirira *et al.*, 2006), antidiarrhoische (Agunu *et al.*, 2005), antimutagene und chemopräventive Aktivität (Kaur *et al.*, 2002) festgestellt werden. In der Literatur gibt es jedoch keinen Hinweis auf immunsuppressive Aktivität der Rinde von *A. nilotica*.

5.4.2 Bekannte Verbindungen aus der Droge

Verbindungen, die laut Literaturangaben bereits aus der Rinde von *A. nilotica*, oder aus anderen Pflanzenteilen, die Rinde enthalten, isoliert wurden, sind in Tabelle 5-3 aufgeführt.

Tabelle 5-3 Bekannte Verbindungen aus der Rinde von *A. nilotica*

Substanzklasse	Verbindung	Pflanzenteil	Quelle
Phenolische Verbindungen	3,5-Dihydroxy-4-methoxybenzoesäure	Oberirdische Teile	(Chaubal, 2005a)
	3,4-Dimethoxy-4-hydroxybenzoesäure (Syringasäure)		
	Vier Derivate von (+)-Catechin-5-gallat	Rinde	(Malan, 1991)
	(+)-Catechin	Rinde	(Khalid <i>et al.</i> , 1989)
	(+)-Catechin-5-galloylester		
	Gallussäure		
	Gallussäuremethylester		
	Naringenin		
	Polyphenolische Phlobaphene	Rinde	(Ishak, 1974)
Triterpene	β -Amyrin	Wurzelrinde	(Prakash und Garg, 1981)
	Betulin		
Sterol	β -Sitosterol		
Aliphatischer Alkohol	Octacosanol		
Androstenes Steroid	3 β -Acetoxy-17 β -hydroxy-Androst-5-en	Oberirdische Teile	(Chaubal <i>et al.</i> , 2003)
Saponin	Saponin II (Oleanolsäure, Arabinose, Galaktose)	Alte Stämme	(Abdel Wahab und Wassel, 1990)
Zuckerähnliche Verbindung	D-Pinitol	Oberirdische Teile	(Chaubal, 2005b)

5.4.3 Immunsuppressiv wirkende Verbindungen aus der Droge

Für einige der bekannten Verbindungen gibt es in der Literatur Hinweise für einen Effekt auf das Immunsystem. Das sind die Verbindungen β -Amyrin, Betulin, β -Sitosterol, das androstene Steroid 3 β -Acetoxy-17 β -hydroxy-androst-5-en und die zuckerähnliche Verbindung D-Pinitol.

Eine Studie zeigt einen suppressiven Effekt von β -Amyrin auf CINC-1 (Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant-1)- Induktion in IL-1 β -stimulierten NRK-49F (Anchorage-dependent cell line) Zellen, der durch sensitiven ELISA quantifiziert wurde. Bei einer Konzentration von 1 μ M war der Grad der Hemmung 23 ± 2 %, die steroidalen antiinflammatorischen Wirkstoffe Dexamethason, Betamethason,

Triamcinolon und Prednisolon zeigten eine hemmende Wirkung zwischen 51 % und 66 % (Ha *et al.*, 1997). Eine andere Studie zeigt den immunsuppressiven Effekt des Ethylacetatextraktes der chinesischen Pflanze *Tripterygium wilfordii* Hook.f. Das β -Amyrin war eine der Verbindungen, die aus dem Extrakt isoliert wurden. Über die Wirkung der isolierten Substanz wurde jedoch nichts publiziert (Kutney *et al.*, 1992).

Betulin ist ein Triterpen, das in der Rinde der Birke in Konzentrationen bis zu 30 Prozent vorkommt. Man kann es auch in vielen anderen Pflanzen finden. Laut Alakurtti *et al.* (2006) gibt es im Moment kein spezielles Einsatzgebiet für diese Verbindung. Sie kann leicht in Betulinsäure umgewandelt werden, die ein breites Spektrum pharmakologischer Aktivitäten zeigt. Eine Untersuchung gibt es jedoch, die einen spezifischen Effekt von Betulin zeigt und auch hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf das Immunsystem von Interesse sein könnte. Neben anderen Verbindungen wurde Betulin aus einer Pflanze isoliert, die in der chinesischen Volksmedizin eingesetzt wird, um Rheuma und Neuralgien zu heilen. In diesem Versuch zeigte Betulin einen suppressiven Effekt auf die stimulusinduzierte Superoxidgeneration in humanen neutrophilen Leukozyten (Yamashita *et al.*, 2002).

Das β -Sitosterol ist ein pflanzliches Sterol, das gegen die Symptome der benignen Prostatahyperplasie und zur Senkung des Cholesterolspiegels eingesetzt wird. Es besitzt auch antiinflammatorische Aktivität. Wenn man den Einfluss von β -Sitosterol auf das Immunsystem genauer betrachtet, zeigt es einen Anstieg der TH1 (T-Helferzelle 1)-abhängigen Zytokinen, eine Abnahme der TH2 (T-Helferzelle 2)-abhängigen Zytokine, einen Anstieg der Lymphozytenproliferation und eine stärkere Aktivität der natürlichen Killerzellen (Bouic, 1999). Eine Studie, die an Marathonläufern durchgeführt wurde, deutet auf eine Hemmung der nach dem Marathon auftretenden Immunsuppression und Entzündung hin (Bouic *et al.*, 1999). Diesen Studien zufolge hat β -Sitosterol eher einen immunstimulierenden Effekt.

Das androstene Steroid 3 β -Acetoxy-17 β -hydroxy-androst-5-en wurde bislang aus keiner anderen Pflanze isoliert aber bereits synthetisch hergestellt. Es ist nichts über immunologische Effekte dieser Verbindung bekannt aber sie zeigt antiinflammatorische Aktivität (Chaubal *et al.*, 2003).

Neueste Studien deuten darauf hin, dass D-Pinitol eine wichtige Rolle in immunopharmakologischen Prozessen spielt. D-Pinitol hemmt die Entzündung, die in

einem Mausmodell für Asthma durch Ovalbumin ausgelöst wurde. Es hemmt asthmatische Reaktionen wie die Leukozytenrekrutierung und reguliert das TH1/TH2 Verhältnis. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass D-Pinitol das Eindringen von eosinophilen Leukozyten und die Aktivität der eosinophilen Peroxidase verringern kann (Lee *et al.*, 2007). Eine andere Studie zeigt den Einfluss von D-Pinitol auf dendritische Zellen, die aus dem Knochenmark von Mäusen stammen. In diesen dendritischen Zellen konnte eine Hemmung der phänotypischen Reifung und eine Modulation der Zytokinproduktion gezeigt werden, wodurch es zu einer signifikanten Hemmung der TH1 Entwicklung kommt. Die Hemmung der TH1 Reaktion konnte auch unter *in vivo* Bedingungen bestätigt werden (Lee, 2007).

Die Wurzel von *A. nilotica* könnte interessant sein für Arbeitsgruppen, die sich näher mit immunsupprimierenden Effekten beschäftigen.

6 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Aus den 47 untersuchten traditionell verwendeten Pflanzenextrakten zeigten 13 Extrakte eine *in vitro* Aktivität gegen den Erreger *T. b. brucei* von $MHC \leq 100 \mu\text{g/ml}$. Von den vier Extrakten, die auch *in vivo* gegen *T. b. brucei* getestet wurden, konnte bei dem Blattextrakt von *G. senegalensis* und dem Wurzelextrakt von *S. longepedunculata* ein Effekt in Form einer Reduktion der Parasitämie um 41 bzw. 49 % festgestellt werden. Durch phytochemische Untersuchungen des Wurzelextraktes von *S. longepedunculata* konnten Stoffgruppen isoliert werden, die aktiver waren als der Gesamtextrakt. Die Saponine konnten dabei als eine wirksame Stoffgruppe identifiziert werden.

Die traditionelle Verwendung des Extraktes von *S. longepedunculata* in Form von wässrigen Zubereitungen ist meinen Untersuchungen zufolge durchaus berechtigt und kann in Gebieten, in denen für Tier oder Mensch andere Medikamente nicht verfügbar sind, sinnvoll sein. Lässt sich der Effekt aus den *in vivo* Untersuchungen auch auf die Bedingungen im Feld übertragen, könnte dadurch zumindest die Parasitenlast gesenkt werden. Die Voruntersuchung am *in vitro* Modell zeigte, dass eine Zubereitung mit lipophilerem Lösungsmittel genauso wirksam aber weniger toxisch ist. Inwiefern diese Erkenntnis sich bei weiteren Zelllinien bestätigt und auch im *in vivo* Versuch an Mäusen und schließlich am Rind oder Menschen festzustellen und im Feld umsetzbar ist, gilt es noch zu untersuchen.

Die weitere Auftrennung der Saponine von *S. longepedunculata* in Fraktionen und Einzelsubstanzen und deren Test auf antitrypanosomale Aktivität scheint angesichts der vergleichenden Untersuchungen mit anderen Saponinen lohnenswert, zumal die Strukturen der Saponine von *S. longepedunculata* und die Auswirkungen von Saponinen gegen Trypanosomen noch kaum untersucht sind. Auch die Saponine von *P. senega* und das Standard-Saponingemisch Saponinum album scheinen hinsichtlich einer antitrypanosomalen Wirkung interessant zu sein.

Im *in vivo* Test konnte als Nebeneffekt eine immunsuppressive Wirkung der Stammrinde von *A. nilotica* festgestellt werden. Dies ist der erste Hinweis auf eine immunsuppressive Wirkung dieser Pflanze und könnte ein interessanter Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen sein. Am Beispiel von *A. nilotica* wird deutlich, dass durch

moderne Untersuchungen von traditionell angewandten Arzneipflanzen auch Anwendungsgebiete erkennbar werden, die früher gar nicht im Spektrum der therapeutischen Möglichkeiten lagen.

Diese Arbeit kann darüber hinaus zeigen, dass die Verbindung des über Jahrhunderte übertragenen Wissens über Arzneipflanzen mit unseren Möglichkeiten der modernen Forschung ein viel versprechender Ansatz ist, um neue Wirkstoffe zu finden.

ZUSAMMENFASSUNG

Rund 60 Millionen Menschen aus 37 Ländern Afrikas stehen unter dem ständigen Risiko der unbehandelt tödlich verlaufenden Schlafkrankheit. Die Viehseuche Nagana ist der Hauptgrund, warum neun Millionen Quadratkilometer, das heißt etwa die Hälfte des kultivierbaren Landes in Afrika nicht für intensive Viehzucht genutzt werden kann. Die Krankheit wird bei Mensch und Tier durch mehrere Trypanosomenarten hervorgerufen, die hauptsächlich mit konventionellen Arzneistoffen behandelt werden, in manchen Fällen auch mit traditionell verwendeten Heilpflanzen. Da es zahlreiche Probleme mit der derzeit verfügbaren Therapie mit konventionellen Arzneistoffen gibt, war Ziel dieser Arbeit, die Wirkung einiger dieser Heilpflanzen besser beurteilen zu können und deren Anwendbarkeit nach Möglichkeit zu optimieren.

Dabei wurden 47 Dichlormethanextrakte von Pflanzenteilen aus 37 Heilpflanzenarten im *in vitro* Modell an dem Erreger *Trypanosoma brucei brucei* auf ihre trypanozide Aktivität untersucht. 13 Extrakte zeigten Aktivität mit MHK-Werten von ≤ 100 $\mu\text{g/ml}$. Sechs Extrakte wiesen MHK-Werte von 50 $\mu\text{g/ml}$ auf und wurden in einem *in vivo* Test an Mäusen weiter untersucht. Dabei konnten der Blattextrakt von *Guiera senegalensis* und der Wurzelextrakt von *Securidaca longepedunculata* die Parasitämie zuvor mit *T. b. brucei* infizierter Mäuse um 41 beziehungsweise 49 % reduzieren.

Die anschließende phytochemische Untersuchung der Wurzel von *S. longepedunculata* zeigte, dass für die festgestellte therapeutische Wirkung die reichlich vorkommenden Saponine eine interessante Rolle spielen. Die Wirksamkeit von Saponinen gegen Trypanosomen wurde in den letzten 40 Jahren nicht dokumentiert. Ein erster Vergleich mit bereits bekannten Saponinen zeigt, dass eine gewisse Selektivität der in dieser Arbeit isolierten Saponinfraktion gegeben ist.

Als Nebenprodukt aus der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung konnte aus der Wurzel von *S. longepedunculata* ein Saccharose-Derivat isoliert werden, das bisher nur in der Stammrinde gefunden wurde. Während des *in vivo* Versuchs konnte als interessanter Nebeneffekt ein Anstieg der Parasitämie auf das 2,7-fache nach Behandlung mit dem Extrakt der Stammrinde von *Acacia nilotica* festgestellt werden. Dies deutet auf einen bisher unbekanntem immunsuppressiven Effekt des Extraktes hin.

SUMMARY

Approximately 60 million people from 37 sub-Saharan African countries are at risk of contracting sleeping sickness, a fatal disease if left untreated. The epizootic disease nagana in livestock is the main reason why nine million square kilometres, about half of the cultivable land in Africa cannot be used for intensive livestock farming. The disease in humans and animals is caused by various trypanosome species that are mainly controlled by chemotherapy using conventional drugs and in some instances medicinal plants. Due to the numerous problems associated with the conventional drug therapy, the aim of this work was to evaluate the effect of some of these medicinal plants and to optimize their utilization.

Trypanocidal activity of 47 dichloromethane extracts from plant parts of 37 medicinal plant species was investigated in an *in vitro* model using *Trypanosoma brucei brucei*. 13 extracts showed activity with MHC-values of $\leq 100 \mu\text{g/ml}$. Six extracts showed MHC-values of $50 \mu\text{g/ml}$ and were further examined in an *in vivo* test with mice. The leaf extract from *Guiera senegalensis* and the root extract from *Securidaca longepedunculata* reduced the parasitaemia of *T. b. brucei* infected mice by 41 and 49 % respectively.

Subsequent phytochemical investigation of *S. longepedunculata* roots indicated that the richly occurring saponins play an interesting role for the noted therapeutic efficacy. The activity of saponins against trypanosomes has not been documented over the last 40 years. A first comparison with well-known saponins showed a certain selectivity of the saponin fraction, isolated in this work.

As a by-product of activity guided fractionation a sucrose derivative could be isolated from *S. longepedunculata* roots that has only been found in the stem bark before. During the *in vivo* test, a 2,7-fold increase in parasitaemia was detected as an interesting side effect post-treatment with *Acacia nilotica* stem bark extract. All indications show that the extract has an unknown immunosuppressive effect.

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1-1	Systematische Einordnung der Trypanosomen	22
Tabelle 1-2	Trypanosomenarten, Krankheiten, die wichtigsten Wirte und Überträger nach Taylor und Authié (2004)	23
Tabelle 1-3	Wirkstoffe gegen Nagana und ihre Anwendungen, abgewandelt nach Peregrine (1994).....	40
Tabelle 3-1	Arzneipflanzen aus Mali/Burkina Faso, gesammelt von Herrn Bizimana im November 2001	56
Tabelle 3-2	Optimale Zelldichten der MEF-Zellen vor dem Einsäen in Kulturplatten/-flaschen.....	65
Tabelle 4-1	MTK- und MHK-Werte der lipophilen Rohextrakte aus den angegebenen Drogen	77
Tabelle 4-2	MHK-Werte, MTK-Werte und Selektivitätsindices (SI = MTK/MHK) der aktiven Dichlormethanextrakte im Vergleich zu den Wasser- und Methanolextrakten.....	79
Tabelle 4-3	Ergebnisse der Dosisfindungsstudie: klinische Befunde	80
Tabelle 4-4	Klinische Symptome je einer Maus nach intraperitonealer Injektion von 75 mg/kg KG Wurzelrindenextrakt bzw. 150 mg/kg KG Stammrindenextrakt von <i>A. nilotica</i>	80
Tabelle 4-5	Verteilung der Versuchsmäuse auf die einzelnen Gruppen	81
Tabelle 4-6	<i>In vitro</i> Wirksamkeit bekannter Inhaltsstoffe aus <i>S. longepedunculata</i>	87
Tabelle 4-7	Aktivität des Wasser-, Methanol- und Dichlormethanextraktes von <i>S. longepedunculata</i>	87
Tabelle 4-8	Aktivität der Fraktionen nach Extraktion des Methanolextraktes mit Lösungsmitteln absteigender Polarität	88

Tabelle 4-9	Eigenschaften von β -D-(3-sinapoyl) fructofuranosyl- α -D-(6-sinapoyl) glucopyranosid	91
Tabelle 4-10	¹ H-NMR-Daten (400 MHz) des Saccharose-Derivats in CD ₃ OD	92
Tabelle 4-11	Mengen und MHK-Werte der Fraktionen 29a bis 29d im <i>in vitro</i> Test.....	93
Tabelle 4-12	Mengen und MHK-Werte der Fraktionen 28a bis 28d im <i>in vitro</i> Test.....	94
Tabelle 4-13	Mengen und MHK-Werte nach Auftrennung der Fraktion 28a an Kieselgel 60	94
Tabelle 4-14	Mengen und MHK-Werte für die Fraktionen 59 bis 61	96
Tabelle 4-15	Mengen und MHK-Werte im <i>in vitro</i> Test der Fraktionen 58a bis 58e	98
Tabelle 4-16	MHK-Werte im <i>in vitro</i> Test der Fraktionen 58c/d (RT30-49) und 58c/d (RT55-67).....	99
Tabelle 4-17	Ausgewählte Saponine und MHK-Werte <i>in vitro</i>	100
Tabelle 5-1	Übersicht über wichtige Inhaltsstoffe von <i>S. longepedunculata</i>	111
Tabelle 5-2	Bekannte Strukturen der getesteten Saponine	125
Tabelle 5-3	Bekannte Verbindungen aus der Rinde von <i>A. nilotica</i>	129

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1	Links: Länder, in denen die Schlafkrankheit auftritt, Stand 1999 (WHO, 2009c), Rechts: betroffene Gebiete (Weiss <i>et al.</i> , 2006).....	3
Abbildung 1-2	Registrierte Schlafkrankheitsfälle von 1926-1998 nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (Stich und Steverding, 2002).....	4
Abbildung 1-3	<i>Trypanosoma brucei</i> mit Erythrozyten, Rasterelektronenmikroskop (Eye of Science/Reutlingen, 2008)	6
Abbildung 1-4	Schlafkrankheitspatientin (August Stich, Missons-ärztliches Krankenhaus Würzburg).....	7
Abbildung 1-5	Die Tsetsefliege (WHO, 1994).....	14
Abbildung 1-6	Verbreitung der Tsetsefliege (Michel <i>et al.</i> , 2001).....	14
Abbildung 1-7	Tsetsefliege, Flügel übereinander gelegt (FU Berlin, Archiv).....	15
Abbildung 1-8	Verbreitung der Tsetsefliege/Gebiete, in denen Rinder gehalten werden (ILRI, 1989).....	18
Abbildung 1-9	Morphologie eines Trypanosoms, schematische Darstellung nach Uilenberg (1998).....	24
Abbildung 1-10	Darstellung der Antigenvariation bei Trypanosomen anhand einer Blutspiegelkurve, modifiziert nach Ziegelbauer (1994).....	26
Abbildung 1-11	Vermehrung der Trypanosomen durch Längsteilung nach Uilenberg (1998).....	26
Abbildung 1-12	Links: Blutsaugende Fliege mit 1 Speicheldrüse, 2 Proventriculus, 3 Darm, 4 Speicheldrüsengang,	

	5 Speicheldrüse, Rechts: morphologische Varianz von <i>T. brucei</i> , nach Duszenko (1984).....	28
Abbildung 1-13	Giemsa gefärbter Blutausstrich mit <i>T. b. brucei</i> (FU Berlin, Archiv)	29
Abbildung 1-14	Entwicklungszyklus von <i>T. brucei</i> nach Stich und Steverding (2002); Blau gezeichnete Trypanosomenformen tragen den VSG-Mantel.....	29
Abbildung 1-15	Strukturen der Arzneistoffe gegen die frühe und die späte Phase der Schlafkrankheit mit dem Jahr der erstmaligen Synthese nach Fairlamb (2003)	32
Abbildung 1-16	Struktur der Verbindung DB289.....	46
Abbildung 1-17	Fexinidazol (DNDi, 2008).....	47
Abbildung 4-1	Entwicklung der Parasitämie in Mäusen nach Infektion mit <i>T. b. brucei</i> und Behandlung mit 150 mg/kg KG Extrakt, gezeigt sind die Mittelwerte von 6 beziehungsweise 7 Mäusen.....	82
Abbildung 4-2	Entwicklung der Parasitämie in den 6 Mäusen, die nach Infektion mit <i>T. b. brucei</i> mit 150 mg/kg KG des Wurzelextrakts von <i>S. longepedunculata</i> behandelt wurden	83
Abbildung 4-3	Entwicklung der Parasitämie in den 7 Mäusen, die nach Infektion mit <i>T. b. brucei</i> mit 150 mg/kg KG Blattextrakt von <i>G. senegalensis</i> behandelt wurden	83
Abbildung 4-4	Entwicklung der Parasitämie in den 6 Mäusen, die nach Infektion mit <i>T. b. brucei</i> als Kontrollgruppe dienten.....	84
Abbildung 4-5	Verlauf der Parasitämie in Mäusen nach Infektion mit <i>T. b. brucei</i> und Behandlung mit 150 mg/kg KG Extrakt der Stammrinde von <i>A. nilotica</i> , gezeigt sind die Mittelwerte von 6 beziehungsweise 7 Mäusen.....	85

Abbildung 4-6	Entwicklung der Parasitämie in den 7 Mäusen, die nach Infektion mit <i>T. b. brucei</i> mit 150 mg/kg KG Extrakt der Stammrinde von <i>A. nilotica</i> behandelt wurden.....	86
Abbildung 4-7	Auftrennung des Alkaloidhextraktes in Fraktionen 21-30.....	90
Abbildung 4-8	HPLC-Chromatogramme der Fraktionen 28a (81-96), links oben, 28a (97-139), rechts oben, 28a (140-189), links unten und 28a (190-300), rechts unten.....	95
Abbildung 4-9	Links: Chromatogramme der zusammengefassten Peaks 1, 2 und 3 aus den Fraktionen 28a (1-300) und 28a (Rest1) und 28a (Rest2), dargestellt in einem Bild, Rechts: UV-Spektren der Peaks 1-3 von oben nach unten.	96
Abbildung 4-10	Links: HPLC-Chromatogramm der Fraktion 29d, Rechts: Chromatogramme der isolierten Peaks 1 bis 3 in einem Bild.....	97
Abbildung 4-11	UV-Spektren der Peaks 4, 5 und 6 aus Fraktion 29d von oben nach unten	97
Abbildung 4-12	Links: HPLC Chromatogramme der Fraktionen 58b, 58c und 58d, Rechts: zusammengefasste Fraktionen 58c und 58d.....	99
Abbildung 5-1	Getrocknete Wurzeln von <i>S. longepedunculata</i> (Phytogreen-ng, 2009).....	108
Abbildung 5-2	Links: <i>S. longepedunculata</i> (Latham, 2005), Rechts: <i>S. longepedunculata</i> (SANBI, 2009)	109
Abbildung 5-3	Links: Zweig mit Blättern und Blüten von <i>S. longepedunculata</i> , Rechts: Blüten von <i>S. longepedunculata</i> (Wursten, 2009)	110
Abbildung 5-4	Links: Zweig mit Blättern und Früchten von <i>S. longepedunculata</i> , Rechts: Zweig mit angeschnittener Rinde, Bilder: H.-J. von Maydell.....	110

- Abbildung 5-5 Strukturformeln bekannter Inhaltsstoffe von
S. longepedunculata112
- Abbildung 5-6 *S. longepedunculata* als Motiv einer Briefmarke in
Äthiopien113

LITERATURVERZEICHNIS

- Abdel Wahab, S.M. und Wassel, G.M., 1990. The saponin content of *Acacia nilotica* L. Willd. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University 28, 87-89.
- Abubakar, A., Iliyasu, B., Yusuf, A.B., Igweh, A.C., Onyekwelu, N.A., Shamaki, B.U., Afolayan, D.O. und Ogbadoyi, E.O., 2005. Antitrypanosomal and haematological effects of selected Nigerian medicinal plants in Wistar rats. Biokemistri 17, 95-99.
- Aderbauer, B., Clausen, P.-H., Kershaw, O. und Melzig, M.F., 2008. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal effect of lipophilic extracts of medicinal plants from Mali and Burkina Faso. Journal of Ethnopharmacology 119, 225-231.
- Adewunmi, C.O., Agbedahunsi, J.M., Adebajo, A.C., Aladesanmi, A.J., Murphy, N. und Wando, J., 2001. Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. Journal of Ethnopharmacology 77, 19-24.
- Afewerk, Y., Clausen, P.-H., Abebe, G., Tilahun, G. und Mehlitz, D., 2000. Multiple-drug resistant *Trypanosoma congolense* populations in village cattle of Metekel district, north-west Ethiopia. Acta Tropica 76, 231-238.
- Agunu, A., Yusuf, S., Andrew, G.O., Zezi, A.U. und Abdurahman, E.M., 2005. Evaluation of five medicinal plants used in diarrhoea treatment in Nigeria. Journal of Ethnopharmacology 101, 27-30.
- Agyemang, K. und Rege, J.E.O., 2004. Trends in genetic composition of livestock with respect to trypanotolerance and desirable economic traits with special emphasis on mixed farming systems in West and Central Africa. *In*: Williams, T.O., Tarawali, S.A., Hiernaux, P. und Fernandez-Rivera, S., Sustainable crop-livestock production for improved livelihoods and natural resource management in West Africa. Proceedings of an international conference held at the

- International Institute of Tropical Agriculture (IITA) Ibadan, Nigeria, 19-20th November 2001. International Livestock Research Institute (ILRI), Nairobi, Kenya and Technical Centre for Agriculture and Rural Cooperation (CTA), Wageningen, The Netherlands.
- Ajali, U. und Chukwurah, B.K., 2004. Antimicrobial activity of *Securidaca longipedunculata*. *Phytomedicine* 11, 701-703.
- Akoda, K., Van Den Bossche, P., Marcotty, T., De Deken, R. und Van Den Abbeele, J., 2009. Nutritional stress affects the tsetse fly's immune gene expression. International Scientific Council for Trypanosomiasis Research and Control, 30th Meeting, Kampala, Uganda, presentation 5.05.
- Alakurtti, S., Makela, T., Koskimies, S. und Yli-Kauhaluoma, J., 2006. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 29, 1-13.
- Allsopp, R., 1998. The implementation of odour bait techniques for the control of tsetse flies in eastern and southern Africa. PAAT Position Paper, Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), Rome, Italy.
- Ancolio, C., Azas, N., Mahiou, V., Ollivier, E., Di Giorgio, C., Keita, A., Timon-David, P. und Balansard, G., 2002. Antimalarial activity of extracts and alkaloids isolated from six plants used in traditional medicine in Mali and Sao Tome. *Phytotherapy Research* 16, 646-649.
- Apted, F.I.C., 1980. Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the eastern hemisphere. *Pharmacology and Therapeutics* 11, 391-413.
- Asuzu, I.U. und Chimene, C.N., 1990. Effects of *Morinda lucida* leaf extract on *Trypanosoma brucei brucei* infection in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 30, 307-313.

-
- Atawodi, S.E., Bulus, T., Ibrahim, S., Ameh, D.A., Nok, A.J., Mamman, M. und Galadima, M., 2003. *In vitro* trypanocidal effect of methanolic extract of some Nigerian savannah plants. *African Journal of Biotechnology* 2, 317-321.
- Awa, D.N. und Ndamkou, C.N., 2006. Response of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* in zebu cattle in North Cameroon to prophylactic treatment with two formulations of isometamidium. *Preventive Veterinary Medicine* 76, 90-96.
- Ayoub, S.M., 1984. Polyphenolic molluscicides from *Acacia nilotica*. *Planta Medica* 50, 532.
- Azas, N., Laurencin, N., Delmas, F., Di Giorgio, C., Gasquet, M., Laget, M. und Timon-David, P., 2002. Synergistic *in vitro* antimalarial activity of plant extracts used as traditional herbal remedies in Mali. *Parasitology Research* 88, 165-71.
- Bacchi, C.J., Nathan, H.C., Hutner, S.H., McCann, P.P. und Sjoerdsma, A., 1980. Polyamine metabolism: a potential therapeutic target in trypanosomes. *Science* 210, 332-334.
- Bailey, J.W. und Smith, D.H., 1992. The use of the acridine orange QBC technique in the diagnosis of African trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 86, 630.
- Baltz, T., Baltz, D., Giroud, C. und Crockett, J., 1985. Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *The EMBO Journal* 4, 1273-1277.
- Barrett, M.P. und Fairlamb, A.H., 1999. The biochemical basis of arsenical-diamidine crossresistance in African trypanosomes. *Parasitology Today* 15, 136-140.
- Barrett, M.P., Coombs, G.H. und Mottram, J.C., 2004. Future prospects in chemotherapy for trypanosomiasis. *In: Maudlin, I., Holmes, P.H. und Miles, M.A., The trypanosomiases. CABI Publishing, Wallingford, Cambridge.*

- Bayer Schering Pharma, 2007. Nachhaltigkeitsbericht: Zugang zu nachhaltiger Gesundheitsversorgung. Verfügbar im Internet unter:
<http://www.nachhaltigkeit2007.bayer.de/de/zugang-zu-medikamenten.aspx>
[Abruf am 19. April 2009].
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E. und Hamlin, N.E., 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309, 416-422.
- Bisser, S., N'Siesi, F.X., Lejon, V., Preux, P.M., Van Nieuwenhove, S., Miaka Mia Bilenge, C. und Buscher, P., 2007. Equivalence trial of melarsoprol and nifurtimox monotherapy and combination therapy for the treatment of second-stage *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *The Journal of Infectious Diseases* 195, 322-329.
- Bizimana, N., Tietjen, U., Zessin, K.H., Diallo, D., Djibril, C., Melzig, M.F. und Clausen, P.-H., 2006. Evaluation of medicinal plants from Mali for their *in vitro* and *in vivo* trypanocidal activity. *Journal of Ethnopharmacology* 103, 350-356.
- Bogenrieder, A., 1985. *Lexikon der Biologie in acht Bänden, Fünfter Band: Katabiose bis Mimus*. Verlag Herder, Freiburg, Basel, Wien.
- Bouic, P.J., Clark, A., Lamprecht, J., Freestone, M., Pool, E.J., Liebenberg, R.W., Kotze, D. und van Jaarsveld, P.P., 1999. The effects of B-sitosterol (BSS) and B-sitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: inhibition of post marathon immune suppression and inflammation. *International Journal of Sports Medicine* 20, 258-262.
- Bouic, P.J., Lamprecht, J.H., 1999. Plant sterols and sterolins: a review of their immune-modulating properties. *Alternative Medicine Review* 4, 170-177.
- Broadhead, R., Dawe, H.R., Farr, H., Griffiths, S., Hart, S.R., Portman, N., Shaw, M.K., Ginger, M.L., Gaskell, S.J., McKean, P.G. und Gull, K., 2005. Flagellar motility

is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature* 440, 224-227.

Brun, R., Jenni, L., Tanner, M., Schonenberger, M. und Schell, K.F., 1979. Cultivation of vertebrate infective forms derived from metacyclic forms of pleomorphic *Trypanosoma brucei* stocks. Short communication. *Acta Tropica* 36, 387-90.

Brun, R. und Mooloo, S.K., 1982. *In vitro* cultivation of animal-infective forms of a West African *Trypanosoma vivax* stock. *Acta Tropica* 39, 135-141.

Burri, C., Stich, A. und Brun, R., 2004. Current chemotherapy of human African trypanosomiasis. *In: Maudlin, I., Holmes, P.H. und Miles, M.A., The trypanosomiasis. CABI Publishing, Wallingford, Cambridge.*

Büscher, P. und Lejon, V., 2004. Diagnosis of human African trypanosomiasis. *In: Maudlin, I., Holmes, P.H. und Miles, M.A., The trypanosomiasis. CABI Publishing, Wallingford, Cambridge.*

Caffrey, C.R., Scory, S. und Steverding, D., 2000. Cysteine proteinases of trypanosome parasites: novel targets for chemotherapy. *Current Drug Targets* 1, 155-162.

Carter, N.S., Landfear, S.M. und Ullman, B., 2001. Nucleoside transporters of parasitic protozoa. *Trends in Parasitology* 17, 142-145.

Chang, P.H., 1966. The effect of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Mey) on organism reactivity. *Acta Pharmaceutica Sinica* 13, 106-112.

Chaubal, R., Mujumdar, A.M., Puranik, V.G., Deshpande, V.H. und Deshpande, N.R., 2003. Isolation and X-ray study of an anti-inflammatory active androstene steroid from *Acacia nilotica*. *Planta Medica* 69, 287-288.

Chaubal, R., Mujumdar, A.M., Misar, A., Deshpande, N.R., 2005a. Isolation of phenolic compounds from *Acacia nilotica* with topical antiinflammatory activity. *Asian Journal of Chemistry* 17, 1595-1599.

- Chaubal, R., Pawar, P.V., Hebbalkar, G.D., Tungikar, V.B., Puranik, V.G., Deshpande, V.H., Deshpande, N.R., 2005b. Larvicidal activity of *Acacia nilotica* extracts and isolation of D-pinitol - a bioactive carbohydrate. *Chemistry and Biodiversity* 2, 684-688.
- Chaudhuri, M., Ott, R.D. und Hill, G.C., 2006. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends in Parasitology* 22, 484-91.
- Chizyuka, H.G.B., 1992. Programme for the control of African animal trypanosomiasis and related development. FAO Animal Production and Health Paper - 100, Addressing training needs at technical level for tsetse and trypanosomiasis control field personnel. Verfügbar im Internet unter: <http://www.fao.org/docrep/004/T0599E/T0599E00.htm#TOC> [Abruf am 3. November 2009].
- Clark, L. und Shivik, J., 2002. Aerosolized essential oils and individual natural product compounds as brown treesnake repellents. *Pest Management Science* 58, 775-783.
- Clarkson, A.B., Bienen, E.J., Pollakis, G. und Grady, R.W., 1989. Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 17770-17776.
- Clausen, P.-H., Sidibe, I., Kaboré, I. und Bauer, B., 1992. Development of multiple drug resistance of *Trypanosoma congolense* in Zebu cattle under high natural tsetse fly challenge in the pastoral zone of Samorogouan, Burkina Faso. *Acta Tropica* 51, 229-236.
- Clausen, P.-H., 2005. Untersuchungen zur Diagnose, Entwicklung und Verbreitung von medikamentenresistenten Trypanosomen in Rinderherden an ausgewählten Standorten Ost- und Westafrikas. Habilitationsschrift, Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, Freie Universität Berlin.

-
- Clayton, C.E. und Michels, P., 1996. Metabolic compartmentation in African trypanosomes. *Parasitology Today* 12, 465-471.
- ClinicalTrials, 2009. Human African Trypanosomiasis: First in Man Clinical Trial of a New Medicinal Product, the Fexinidazole. ClinicalTrials.gov identifier: NCT00982904. Verfügbar im Internet unter:
<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=%22Trypanosomiasis%2C+African%22>
[2](#) [Abruf am 16.Oktober 2009].
- Cook, G.C., 1994. Sir David Bruce's elucidation of the aetiology of nagana - exactly one hundred years ago. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88, 257-258.
- Costa, C., Bertazzo, A., Allegri, G., Curcuruto, O. und Traldi, P., 1992. Indole alkaloids from the roots of an African plant *Securidaca Longipedunculata*. I: Isolation by column chromatography and preliminary structural characterization by mass spectrometry. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 29, 1641-1647.
- Croft, S.L., Barrett, M.P. und Urbina, J.A., 2005. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends in Parasitology* 21, 508-512.
- Cross, G.A.M., 1975. Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* 71, 393-417.
- De Koning, H.P., 2008. Ever-increasing complexities of diamidine and arsenical crossresistance in African trypanosomes. *Trends in Parasitology* 24, 345-349.
- De Tommasi, N., Piacente, S., De Simone, F. und Pizza, C., 1993. New sucrose derivatives from the bark of *Securidaca longipedunculata*. *Journal of Natural Products* 56, 134-137.
- Défago, G., 1977. Rôle des saponines dans la résistance des plantes aux maladies fongiques. *Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft* 87, 79-132.

- Delaude, C., 1992. Les polygalaceae et leurs saponines (Polygalaceae and their saponins). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 61, 245-288.
- Delay, C., Gavin, J.A., Aumelas, A., Bonnet, P.-A. und Roumestand, C., 1997. Isolation and structure elucidation of a highly haemolytic saponin from the Merck saponin extract using high-field gradient-enhanced NMR techniques. *Carbohydrate Research* 302, 67-78.
- Delespaux, V. und De Koning, H.P., 2007. Drugs and drug resistance in African trypanosomiasis. *Drug Resistance Updates* 10, 30-50.
- Delmas, F., Di Giorgio, C., Elias, R., Gasquet, M., Azas, N., Mshvildadze, V., Dekanosidze, G., Kemertelidze, E. und Timon-David, P., 2000. Antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, alpha-hederin, beta-hederin and hederacolchiside A1, as compared to their action on mammalian cells cultured *in vitro*. *Planta Medica* 66, 343-347.
- DNDi, 2008. The Drugs for Neglected Diseases initiative. *DNDi newsletter* 17, 8.
- Docampo, R., 1990. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chemico-Biological Interactions* 73, 1-27.
- Dove, A., 2001. Osteoporosis drugs show promise against malaria. *Nature Medicine* 7, 389.
- Duszenko, M., 1984. *Trypanosoma brucei* - Ein Beispiel parasitärer Lebensweise. *Biologie in unserer Zeit* 14, 33-41.
- Eisler, M.C., Brandt, J., Bauer, B., Clausen, P.-H., Delespaux, V., Holmes, P.H., Ilemobade, A., Machila, N., Mbwambo, H., McDermott, J., Mehlitz, D., Murilla, G., Ndung'u, J.M., Peregrine, A.S., Sidibe, I., Sinyangwe, L. und Geerts, S., 2001. Standardised tests in mice and cattle for the detection of drug resistance in tsetse-transmitted trypanosomes of African domestic cattle. *Veterinary Parasitology* 97, 171-182.

- Eisler, M.C., Dwinger, R.H., Majiwa, P.A.O. und Picozzi, K., 2004. Diagnosis and epidemiology of African animal trypanosomiasis. *In*: Maudlin, I., Holmes, P.H. und Miles, M.A., The trypanosomiasis. CABI Publishing, Wallingford, Cambridge.
- Engster, M., Pfohl, T., Herminghaus, S., Boshart, M., Wiegertjes, G., Heddergott, N. und Overath, P., 2007. Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes. *Cell* 131, 505-515.
- Eye of Science/Reutlingen, 2008. Parasiten: faszinierende Mitesser, Spiegelonline Fotostrecke. Verfügbar im Internet unter:
<http://www.spiegel.de/fotostrecke/fotostrecke-29679.html> [Abruf am 18. März 2009].
- Fairlamb, A.H., 2003. Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends in Parasitology* 19, 488-494.
- FAO, 1992. Training Manual for Tsetse Control Personnel. Tsetse biology, systematics and distribution, techniques. Volume 1. Verfügbar im Internet unter:
<http://www.fao.org/docrep/009/p5178e/P5178E00.htm> [Abruf am 19. August 2009].
- FAO, 2009. Animal Production and Health Division. Programme Against African Trypanosomiasis (PAAT). Verfügbar im Internet unter:
<http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/paat/home.html> [Abruf am 19. August 2009].
- FAOSTAT, 2007. Production, Live Animals. Verfügbar im Internet unter:
<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor> [Abruf am 22. Juli 2009].
- Ferella, M., Li, Z.H., Andersson, B. und Docampo, R., 2008. Farnesyl diphosphate synthase localizes to the cytoplasm of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei*. *Experimental Parasitology* 119, 308-312.

- Fiot, J., Sanon, S., Azas, N., Mahiou, V., Jansen, O., Angenot, L., Balansard, G. und Ollivier, E., 2006. Phytochemical and pharmacological study of roots and leaves of *Guiera senegalensis* J.F. Gmel. *Journal of Ethnopharmacology* 106, 173-178.
- Freiburghaus, F., Kaminsky, R., Nkunya, M.H. und Brun, R., 1996. Evaluation of African medicinal plants for their *in vitro* trypanocidal activity. *Journal of Ethnopharmacology* 55, 1-11.
- Freiburghaus, F., Jonker, S.A., Nkunya, M.H., Mwasumbi, L.B., Brun, R., 1997. *In vitro* trypanocidal activity of some rare Tanzanian medicinal plants. *Acta Tropica* 66, 79-83.
- Galeffi, C., Federici, E., Msonthi, J.D., Marini-Bettolo, G.B. und Nicoletti, M., 1990. New xanthenes from *Extiadiopis oblongifolia* and *Securidaca longepedunculata*. *Fitoterapia* 61, 79-80.
- Gall, Y., Woitag, T., Bauer, B., Sidibe, I., McDermott, J., Mehlitz, D. und Clausen, P.H., 2004. Trypanocidal failure suggested by PCR results in cattle field samples. *Acta Tropica* 92, 7-16.
- Geerts, S., Kageruka, P., De Deken, R., Brandt, J.R.A., Kazadi, J.M., Diarra, B., Eisler, M.C., Lemmouchi, Y., Schacht, E. und Holmes, P.H., 1997a. Extension of the prophylactic effects of isometamidium and ethidium using sustained release devices. Proceedings of the first Internet Conference on Salivarian Trypanosomes. Series title: FAO Animal Production and Health Papers 136, W5781/E. Verfügbar im Internet unter: <http://www.fao.org/docrep/w5781e/w5781e0d.htm> [Abruf am 03. September 2009].
- Geerts, S., Kageruka, P., De Deken, R., Brandt, J.R.A., Kazadi, J.M., Diarra, B., Eisler, M.C., Lemmouchi, Y., Schacht, E. und Holmes, P.H., 1997b. Prophylactic effects of isometamidium- and ethidium-sustained release devices against *Trypanosoma congolense* in cattle. *Acta Tropica* 65, 23-31.

-
- Geerts, S. und Holmes, P.H., 1998. Drug management and parasite resistance in bovine trypanosomiasis in Africa. PAAT Technical and Scientific Series No.1, FAO, Rome. Verfügbar im Internet unter:
<http://www.fao.org/docrep/003/W9791E/w9791e00.HTM> [Abruf am 03. September 2009].
- Germonprez, N., Maes, L., Van Puyvelde, L., Van Tri, M., Tuan, D.A. und De Kimpe, N., 2005. *In vitro* and *in vivo* anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from *Maesa balansae* and some chemical derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* 48, 32-37.
- Grace, D., 2005. Epidemiology and control of cattle trypanosomosis in villages under risk of trypanocide resistance in West Africa. Dissertation, Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, Freie Universität Berlin.
- Grishin, N.V., Osterman, A.L., Brooks, H.B., Phillips, M.A. und Goldsmith, E.J., 1999. X-ray structure of ornithine decarboxylase from *Trypanosoma brucei*: the native structure and the structure in complex with alpha-difluoromethylornithine. *Biochemistry* 38, 15174-15184.
- Ha, J.Y., Min, K.R., Kang, S.-H., Kim, J.S., Lee, G.-I., Kang, S.S. und Kim, Y., 1997. Suppressive effects of triterpenoids on CINC-1 induction in interleukin-1beta-stimulated rat fibroblast NRK-49F cells. *Archives of Pharmacal Research* 20, 234-238.
- Hager, K.M. und Hajduk, S.L., 1997. Mechanism of resistance of African trypanosomes to cytotoxic human HDL. *Nature* 385, 823-826.
- Hajduk, S.L., Hager, K.M. und Esko, J.D., 1994. Human high density lipoprotein killing of African trypanosomes. *Annual Review of Microbiology* 48, 139-162.
- Hänsel, R. und Haas, H., 1983. Therapie mit Phytopharmaka. Springer Verlag, Berlin.

- Hargrove, J.W., 2004. Tsetse population dynamics. *In*: Maudlin, I., Holmes, P.H. und Miles, M.A., The trypanosomiasis. CABI Publishing, Wallingford, Cambridge.
- Henschler, D., Hempel, K., Schultze, B. und Maurer, W., 1971. Zur Pharmakokinetik von Aescin [The pharmacokinetics of escin]. *Arzneimittelforschung* 21, 1682-1692.
- Herbert, W.J. und Lumsden, W.H., 1976. *Trypanosoma brucei*: a rapid "matching" method for estimating the host's parasitemia. *Experimental Parasitology* 40, 427-431.
- Hirumi, H., Doyle, J.J. und Hirumi, K., 1977. African trypanosomes: cultivation of animal-infective *Trypanosoma brucei* *in vitro*. *Science* 196, 992-994.
- Hoare, C.A., 1972. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Hoet, S., Opperdoes, F., Brun, R. und Quetin-Leclercq, J., 2004. Natural products active against African trypanosomes: a step towards new drugs. *Natural Product Reports* 21, 353-364.
- Holmes, P.H., Eisler, M.C. und Geerts, S., 2004. Current chemotherapy of animal trypanosomiasis. *In*: Maudlin, I., Holmes, P.H. und Miles, M.A., The trypanosomiasis. CABI Publishing, Wallingford, Cambridge.
- Hostettman, K. und Marston, A., 1995. Saponins (Chemistry and pharmacology of natural products). Cambridge University Press, New York, Melbourne.
- Hyde, M. und Wursten, B., 2009. Flora of Zimbabwe: Genus page: Securidaca. Verfügbar im Internet unter:
http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/genus.php?genus_id=825 [Abruf am 15. Mai 2009].
- ILRI, 1989. Annual Report of the International Laboratory for Research on Animal Diseases. Verfügbar im Internet unter:

-
- <http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/Fulldocs/Ilrad89/Trypano.htm> [Abruf am 20. Juli 2009].
- IPNI, 2009. The International Plant Names Index. Verfügbar im Internet unter: <http://www.ipni.org/> [Abruf am 23. März 2009].
- Irvine, F.R., 1961. Woody plants of Ghana. With special reference to their uses. Oxford University Press, London.
- Ishak, M.S., 1974. Some aspects on the chemistry of phlobaphenes from *Acacia nilotica* bark. Egyptian Journal of Chemistry 17, 699-703.
- Iten, M., Mett, H., Evans, A., Enyaru, J.C.K., Brun, R. und Kaminsky, R., 1997. Alterations in ornithine decarboxylase characteristics account for tolerance of *Trypanosoma brucei rhodesiense* to D,L- α -difluoromethylornithine. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 41, 1922-1925.
- Janssens, P.G. und Burke, J., 1992. Médecine et hygiène en Afrique Centrale de 1885 à nos jours. In: Janssens, P.G., Kivits, M. und Vuylsteke, J., Les trypanosomiasés africaines. Masson, S.A., Dürr und Kessler, Peeters, Paris, Bonn, Leuven.
- Jayasekara, T.K., Stevenson, P.C., Belmain, S.R., Farman, D.I. und Hall, D.R., 2002. Identification of methyl salicylate as the principal volatile component in the methanol extract of root bark of *Securidaca longepedunculata* Fres. Journal of Mass Spectrometry 37, 577-580.
- Jayasekara, T.K., Stevenson, P.C., Hall, D.R., Belmain, S.R., 2005. Effect of volatile constituents from *Securidaca longepedunculata* on insect pests of stored grain. Journal of Chemical Ecology 31, 303-313.
- Jensch, H., 1955. 4,4'-Diamidino-diazoaminobenzol, ein neues Mittel gegen Trypanosomen- und Babesien-Infektionen. Arzneimittel Forschung 5, 634-635.
- Kaminsky, R., Chuma, F. und Zwegarth, E., 1989. *Trypanosoma brucei brucei*: expression of drug resistance *in vitro*. Experimental Parasitology 69, 281-289.

- Kaur, K., Arora, S., Hawthorne, M.E., Kaur, S., Kumar, S. und Mehta, R.G., 2002. A correlative study on antimutagenic and chemopreventive activity of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. and *Acacia nilotica* (L.) Willd. Ex Del. Drug and Chemical Toxicology 25, 39-64.
- Khalid, S.A., Yagi, S.M., Khristova, P. und Duddeck, H., 1989. (+)-Catechin-5-galloyl ester as a novel natural polyphenol from the bark of *Acacia nilotica* of Sudanese origin. Planta Medica 55, 556-558.
- Kim, Y.C., Higuchi, R. und Komori, T., 1992. Thermal degradation of glycosides, VII. Application of hydrothermolysis to the studies on the constituents of the Merck saponin. Liebigs Annalen der Chemie 941-946.
- Kirira, P.G., Rukunga, G.M., Wanyonyi, A.W., Muregi, F.M., Gathirwa, J.W., Muthaura, C.N., Omar, S.A., Tolo, F., Mungai, G.M. und Ndiege, I.O., 2006. Anti-plasmodial activity and toxicity of extracts of plants used in traditional malaria therapy in Meru and Kilifi districts of Kenya. Journal of Ethnopharmacology 106, 403-407.
- Kobayashi, W., Miyase, T., Suzuki, S., Noguchi, H. und Chen, X.-M., 2000. Oligosaccharide esters from the roots of *Polygala arillata*. Journal of Natural Products 63, 1066-1069.
- Kobert, R., 1887. Über Quillajasäure. Ein Beitrag zur Kenntnis der Saponingruppe. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie 23, 233-272.
- Kogan, V.I., Gorbunov, V.D. und Rostotskii, B.K., 1970. Securinine from bark of *Securidaca longepedunculata*. Patent USSR: 277796, Chemical Abstracts 74, 91177.
- Kokwaro, J.O., 1976. Medicinal plants of East Africa. East African Literature Bureau, Nairobi, Kampala, Dar es Salaam.

- Kone, P.P., 1980. Études toxicologiques, électrophysiologiques et pharmacologiques du venin de *Naja nigrocollis* et d'une substance antivenineuse de la pharmacopée traditionnelle africaine (extrait de *Securidaca longepedunculata*). Thèse de Doctorat d'état et Sciences, Université Nationale de Côte d'Ivoire.
- Krauth-Siegel, R.L., Bauer, H. und Schirmer, R.H., 2005. Dithiolproteine als Hüter des intrazellulären Redoxmilieus bei Parasiten: alte und neue Wirkstoff-Targets bei Trypanosomiasis und Malaria. *Angewandte Chemie* 117, 698-724.
- Krauth-Siegel, R.L. und Comini, M.A., 2008. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780, 1236-1248.
- Krebs, K.G., Heusser, D. und Wimmer, H., 1967. Sprühreagenzien. *In*: Stahl, E., Dünnschichtchromatographie, ein Laboratoriumshandbuch. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Kucht, S., Gross, J., Hussein, Y., Grothe, T., Keller, U., Basar, S., König, W.A., Steiner, U. und Leistner, E., 2004. Elimination of ergoline alkaloids following treatment of *Ipomoea asarifolia* (convolvulaceae) with fungicides. *Planta* 219, 619-625.
- Kutney, J.P., Hewitt, G.M., Lee, G., Piotrowska, K., Roberts, R. und Rettig, S.J., 1992. Studies with tissue cultures of the Chinese herbal plant *Tripterygium wilfordii*. Isolation of metabolites of interest in rheumatoid arthritis, immunosuppression, and male contraceptive activity. *Canadian Journal of Chemistry* 70, 1455-1480.
- Lacaille-Dubois, M.-A. und Mitaine-Offer, A.-C., 2005. Triterpene saponins from polygalaceae. *Phytochemistry Reviews* 4, 139-149.
- Lacaille-Dubois, M.A., 2000. Biologically and pharmacologically active saponins from plants: Recent advances. *In*: Oleszek, W., Marston, A., Saponins in food, feedstuffs and medicinal Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.

- Latham, P., 2005. Photos of flowers and plants from Bas-Congo (D.R. Congo - Africa).
Verfügbar im Internet unter: <http://home.scarlet.be/~tsh77586/Latham2.htm>
[Abruf am 07. Juli 2009].
- Lee, J.S., Lee, C.M., Jeong, Y.I., Jung, I.D., Kim, B.H., Seong, E.Y., Kim, J.I., Choi, I.W., Chung, H.Y. und Park, Y.M., 2007. D-pinitol regulates Th1/Th2 balance via suppressing Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma. *FEBS Letters* 581, 57-64.
- Lee, J.S., Jung, I.D., Jeong, Y.I., Lee, C.M., Shin, Y.K., Lee, S.Y., Suh, D.S., Yoon, M.S., Lee, K.S., Choi, Y.H., Chung, H.Y., Park, Y.M., 2007. D-pinitol inhibits Th1 polarization via the suppression of dendritic cells. *International Immunopharmacology* 6, 791-804.
- Legros, D., Ollivier, G., Gastellu-Etchegorry, M., Paquet, C., Burri, C., Jannin, J. und Büscher, P., 2002. Treatment of human African trypanosomiasis-present situation and needs for research and development. *Lancet* 2, 437-440.
- Lucius, R. und Loos-Frank, B., 1997. Parasitologie. *In: Grundlagen für Biologen, Mediziner und Veterinärmediziner.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Lucius, R. und Loos-Frank, B., 2008. Biologie von Parasiten. Springer Verlag, Berlin.
- Luckins, A.G., 1992. Methods for diagnosis of trypanosomiasis in livestock. *World Animal Review* 70/71, 15-20.
- Lumsden, W.H., Kimber, C.D., Evans, D.A. und Doig, S.J., 1979. *Trypanosoma brucei*: Miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: Adaptation for field use. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73, 312-317.
- Maes, L., Vanden Berghe, D., Germonprez, N., Quirijnen, L., Cos, P., De Kimpe, N. und Van Puyvelde, L., 2004. *In vitro* and *in vivo* activities of a triterpenoid

-
- saponin extract (PX-6518) from the plant *Maesa balansae* against visceral leishmania species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 130-136.
- Magnus, E., Vervoort, T. und Van Meirvenne, N., 1978. A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale* 58, 169-176.
- Mahmood, N., Moore, P.S., De Tommasi, N., De Simone, F., Colman, S., Hay, A.J. und Pizza, C., 1993. Inhibition of HIV infection by caffeoylquinic acid derivatives. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 4, 135-140.
- Majester-Savornin, B., Elias, R., Diaz-Lanza, A.M., Balansard, G., Gasquet, M. und Delmas, F., 1991. Saponins of the ivy plant, *Hedera helix*, and their leishmanicidal activity. *Planta Medica* 57, 260-262.
- Malan, E., 1991. Derivatives of (+)-catechin-5-gallate from the bark of *Acacia nilotica*. *Phytochemistry Reviews* 30, 2737-2739.
- Mamoudou, A., Delespaux, V., Chepnda, V., Hachimou, Z., Andrikaye, J.P., Zoli, A. und Geerts, S., 2008. Assessment of the occurrence of trypanocidal drug resistance in trypanosomes of naturally infected cattle in the Adamaoua region of Cameroon using the standard mouse test and molecular tools. *Acta Tropica* 106, 115-118.
- McGeary, R.P., Bennett, A.J., Tran, Q.B., Cosgrove, K.L. und Ross, B.P., 2008. Suramin: clinical uses and structure-activity relationships. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 8, 1384-94.
- Mdachi, R.E., Thuita, J.K., Kagira, J.M., Ngotho, J.M., Murilla, G.A., Ndung'u, J.M., Tidwell, R.R., Hall, J.E. und Brun, R., 2009. Efficacy of the novel diamidine compound 2,5-Bis(4-amidinophenyl)-furan-bis-O-Methylamidoxime (Pafuramidine, DB289) against *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection in

- vervet monkeys after oral administration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 953-957.
- Mehlitz, D., 1978. Untersuchungen zur Empfänglichkeit von *Mastomys natalensis* für *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei gambiense*. [Investigations on the susceptibility of *Mastomys natalensis* to *Trypanosoma (trypanozoon) brucei gambiense* (author's transl)]. *Tropenmedizin und Parasitologie* 29, 101-107.
- Michel, J.-F., Dray, S., de La Rocque, S., Desquesnes, M., Solano, P., De Wispelaere, G. und Cuisance, D., 2001. 26th Meeting of the ISCTRC (International Scientific Council for Trypanosomiasis Research and Control), Ougadougou, Burkina Faso. Socio economics and use of gis. Verfügbar im Internet unter: <http://au-ibar.org/isctrc/26Meeting/Index.html> [Abruf am 20. Juli 2009].
- Mihok, S., Maramba, O., Munyoki, E. und Kagoiya, J., 1995. Mechanical transmission of *Trypanosoma* spp. by African Stomoxyinae (Diptera: Muscidae). *Tropical Medicine and Parasitology* 46, 103-105.
- Moore, A., 2008. Centers for Disease Control and Prevention. Traveler's health information about African trypanosomiasis. Verfügbar im Internet unter: <http://wwwn.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-5/human-african-trypanosomiasis.aspx> [Abruf am 19. August 2009].
- Mouzou, A.P., Bulteau, L. und Raymond, G., 1999. The effects of *Securidaca longepedunculata* root extract on ionic currents and contraction of cultured rat skeletal muscle cells. *Journal of Ethnopharmacology* 65, 157-164.
- Murray, M., Murray, P.K. und McIntyre, W.I.M., 1977. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 71, 325-326.
- Na'Isa, B.K., 1967. Follow-up of a survey on the prevalence of homidium-resistant strains of trypanosomes in cattle in Northern Nigeria and drug cross-resistance

-
- tests on the strains with Samorin and Berenil. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa* 15, 231-241.
- NECT, 2009. Nifurtimox-Eflornithine Combination Therapy, special edition. International Scientific Council for Trypanosomiasis Research and Control, 30th Meeting, Kampala, Uganda
- Neuwinger, H.D., 1998. *Afrikanische Arzneipflanzen und Jagdgifte*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. und Snader, K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products* 66, 1022-1037.
- Nihei, C., Fukai, Y. und Kita, K., 2002. Trypanosome alternative oxidase as a target of chemotherapy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1587, 234-239.
- O'Neill, M.J., Bray, D.H., Boardman, P., Phillipson, J.D. und Warhurst, D.C., 1985. Plants as sources of antimalarial drugs. Part 1. *In vitro* test method for the evaluation of crude extracts from plants. *Planta Medica* 51, 394-398.
- Oakenfull, D., 1981. Saponins in food. *Food Chemistry* 7, 19-40.
- Oakenfull, D.G. und Topping, D.L., 1983. Saponins and plasma cholesterol: A reply to the letter of Gibney, Pathirana and Smith. *Atherosclerosis* 48, 301-303.
- Oda, K., Matsuda, H., Murakami, T., Katayama, S., Ohgitani, T. und Yoshikawa, M., 2000. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biological Chemistry* 381, 67-74.
- Ogbadoyi, E.O., Abdulganiy, A.O., Adama, T.Z. und Okogun, J.I., 2007. *In vivo* trypanocidal activity of *Annona senegalensis* Pers. leaf extract against *Trypanosoma brucei brucei*. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 85-89.

- Okunji, C.O., Iwu, M.M., Jackson, J.E. und Tally, J.D., 1996. Biological activity of saponins from two *Dracaena* species. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 404, 415-428.
- Olajide, O.A., Awe, S.O. und Makinde, J.M., 1998. Pharmacological screening of the root extract of *Securidaca longepedunculata*. *Fitoterapia* 68, 245-248.
- Olajide, O.A., Ajayi, F.F., Ekhelar, A.I., Awe, S.O., Makinde, J.M. und Alada, A.R.A., 1999. Gastrointestinal tract effects of *Securidaca longepedunculata* root extract. *Pharmaceutical Biology* 37, 134-137.
- Oleszek, W. und Marston, A., 2000. Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Opperdoes, F.R. und Borst, P., 1977. Localisation of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Letters* 80, 360-364.
- Opperdoes, F.R., 1987. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annual Review of Microbiology* 41, 127-151.
- Paquet, C., Ancelle, T., Gastellu-Etchegorry, M., Castilla, J. und Harndt, I., 1992. Persistence of antibodies to *Trypanosoma brucei gambiense* after treatment of human trypanosomiasis in Uganda. *Lancet* 340, 250.
- Paris, J., Murray, M. und McOdimba, F., 1982. A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. *Acta Tropica* 39, 307-316.
- Pentreath, V.W. und Kennedy, P.G.E., 2004. Pathogenesis of human African trypanosomiasis. *In*: Maudlin, I., Holmes, P.H. und Miles, M.A., *The trypanosomiasis*. CABI Publishing, Wallingford, Cambridge.

-
- Pepin, J., Milord, F., Guerin, C., Mpia, B., Ethier, L. und Mansinsa, D., 1989. Trial of prednisolone for prevention of melarsoprol-induced encephalopathy in *gambiense* sleeping sickness. *Lancet* 1, 1246-1250.
- Peregrine, A.S. und Mamman, M., 1993. Pharmacology of diminazene: a review. *Acta Tropica* 54, 185-203.
- Peregrine, A.S., 1994. Chemotherapy and delivery systems: haemoparasites. *Veterinary Parasitology* 54, 223-248.
- Petkov, V., Georgiev, V., Roussinov, K., Grigorov, I., Slokoska, L., Angelova, M., Lazarova, M., Getova, D., Todorov, S. und Radomirov, R., 1984. On the pharmacology of the ergot alkaloid elymoclavine. *Biomedica Biochimica Acta* 43, 1305-1316.
- Phytogreen-ng, 2009. Phyto-green Nigeria limited. Verfügbar im Internet unter: http://www.phytogreen-ng.com/lang_en/index.htm [Abruf am 3. November 2009].
- Plock, A., Sokolowska-Kohler, W. und Presber, W., 2001. Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on *Leishmania* spp. *Experimental Parasitology* 97, 141-153.
- Pohlig, G., Bernhard, S., Blum, J., Burri, C., Mpanya Kabeya, A., Fina Lubaki, J.-P., Mpoo Mpoto, A., Fungula Munungu, G., Kambau Manesa Deo, G., Nsele Mutantu, P., Mbo Kuikumbi, F., Fukinsia Mintwo, A., Kayeye Munungi, A., Dala, A., Macharia, S. und Miaka, C., 2009. Phase 3 trial of pafuramidine maleate (DB289), a novel, oral drug, for treatment of first stage sleeping sickness: safety and efficacy. International Scientific Council for Trypanosomiasis Research and Control, 30th Meeting, Kampala, Uganda, presentation 3.20.
- Prakash, L. und Garg, G., 1981. Chemical constituents of the roots of *Millingtonia hortensis* Linn. and *Acacia nilotica* (Linn.) Del. *Journal of the Indian Chemical Society* 58, 96-97.

- Priotto, G., Kasparian, S., Mutombo, W., Ngouama, D., Ghorashian, S., Arnold, U., Ghabri, S., Baudin, E., Buard, V., Kazadi-Kyanza, S., Ilunga, M., Mutangala, W., Pohlig, G., Schmid, C., Karunakara, U., Torreele, E. und Kande, V., 2009. Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non inferiority trial. *Lancet* 374, 56-64.
- Prista, L.N. und Correia, A.A., 1958. Estude farmacognostico da *Securidaca longepedunculata*. *Garcia de Orta* 6, 131-147.
- Rahmathullah, S.M., Hall, J.E., Bender, B.C., McCurdy, D.R., Tidwell, R.R. und Boykin, D.W., 1999. Prodrugs for amidines: synthesis and anti-*Pneumocystis carinii* activity of carbamates of 2,5-bis(4-amidinophenyl)furan. *Journal of Medicinal Chemistry* 42, 3994-4000.
- Rakuambo, N.C., Meyer, J.J. und Hussein, A., 2004. Xanthone isolated from *Securidaca longepedunculata* with activity against erectile dysfunction. *Fitoterapia* 75, 497-499.
- Rao, A.V. und Kendall, C.W., 1986. Dietary saponins and serum lipids. *Food and Chemical Toxicology* 24, 441.
- Raper, J., Portela, M.P., Lugli, E., Frevert, U. und Tomlinson, S., 2001. Trypanosome lytic factors: novel mediators of human innate immunity. *Current Opinion in Microbiology* 4, 402-408.
- Ridout, C.L., Wharf, S.G., Price, K.R., Johnson, I.T. und Fenwick, G.R., 1988. UK mean daily intakes of saponins - intestine-permeabilizing factors in legumes. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 42, 111-116.
- Ridou, O., Di Giorgio, C., Delmas, F., Elias, R., Mshvildadze, V., Dekanosidze, G., Kemertelidze, E., Balansard, G. und Timon-David, P., 2001. *In vitro* antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, alpha-hederin, beta-

hederin and hederacolchiside A1, in association with pentamidine and amphotericin B. *Phytotherapy Research* 15, 298-301.

Rogers, D.J., 1988. A general model for the African trypanosomiasis. *Parasitology* 97, 193-212.

Rogers, D.J. und Robinson, T.P., 2004. Tsetse distribution. *In*: Maudlin, I., Holmes, P.H. und Miles, M.A., *The trypanosomiasis*. CABI Publishing, Wallingford, Cambridge.

Rougemont, A., Hien, M., Thylefors, B., Prost, A. und Rolland, A., 1984. Traitement de l'onchocercose par la suramine a faibles doses progressives dans les collectivites hyperendemiennes d'Afrique occidentale: 2. Resultats cliniques, parasitologiques et ophtalmologiques en zone de transmission controlee. *Bulletin of the World Health Organization* 62, 261-269.

Salem, M.M. und Werbovetz, K.A., 2006. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Current Medicinal Chemistry* 13, 2571-2598.

SANBI, 2009. South African National Biodiversity Institute South Africa. Verfügbar im Internet unter:
<http://www.plantzafrica.com/plantqrs/plimagesqrs/securidlong2.jpg> [Abruf am 22. Mai 2009].

Sanger Institute, 2009. Sequencing genomics projects, Wellcome Trust Sanger Institute. Verfügbar im Internet unter: <http://www.sanger.ac.uk/Projects/> [Abruf am 18. März 2009].

Sanofi-Aventis, 2006. Sanofi-Aventis stärkt die Zusammenarbeit mit der Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Kampf gegen vernachlässigte Tropenkrankheiten. Pressemitteilung, Sanofi-Aventis, Genf.

- Scandola, M., Games, D.E., Costa, C., Allegri, G., Bertazzo, A., Curcuruto, O. und Traldi, P., 1994. Structural study of alkaloids from *Securidaca longipedunculata* roots. II. Isolation and characterization by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 31, 219-224.
- Sehnert, C., 2001. Bayer stellt Medikamente gegen Schlafkrankheit kostenlos zur Verfügung. Innovationsreport, Forum für Wissenschaft, Industrie und Wirtschaft. Verfügbar im Internet unter: http://www.innovations-report.de/html/berichte/medizin_gesundheit/bericht-3123.html [Abruf am 25. August 2009].
- Seifert, H.S.H., 1992. Tropentierhygiene. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.
- Simarro, P.P., Jannin, J. und Cattand, P., 2008. Eliminating human African trypanosomiasis: Where do we stand and what comes next? *PLoS Medicine* 5, 174-180.
- Smith, D.H., Bailey, J.W. und Welde, B.T., 1998. Immunodiagnostic tests on cerebrospinal fluid in the diagnosis of meningoencephalitic *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 83, 91-97.
- Steuber, S. und Kroker, R., 2006. Antiprotozoika. In: Löscher, W., Ungemach, F.R. und Kroker, R., Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Parey, Stuttgart.
- Stevens, J.R. und Brisse, S., 2004. Systematics of trypanosomes of medical and veterinary importance. In: Maudlin, I., Holmes, P.H. und Miles, M.A., The trypanosomiasis. CABI Publishing, Wallingford, Cambridge.
- Steverding, D. und Tyler, K.T., 2005. Novel antitrypanosomal agents. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 14, 939-955.
- Stich, A. und Firmenich, P., 2001. Afrikanische Schlafkrankheit: Die Karriere eines Medikaments. *Deutsches Ärzteblatt* 98, A-1735 / B-1489 / C-1381.

-
- Stich, A. und Steverding, D., 2002. Die Rückkehr einer Seuche: Trypanosomen. *Biologie in unserer Zeit* 32, 294-302.
- Sultana, B., Anwar, F. und Przybylski, R., 2007. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. *Food Chemistry* 104, 1106-1114.
- Swallow, 1997. Impacts of trypanosomiasis on African agriculture. Paper presented at the International Scientific Council for Trypanosomosis Research and Control, Maputo, Mozambique, September 29-October 4.
- Tarimo, S.A., Snow, F.W., Butler, L. und Dransfield, R., 1985. The probability of tsetse acquiring trypanosome infection from single blood meal in different localities in Kenya. *Acta Tropica* 42, 199-207.
- Taylor, K. und Authié, E.M.-L., 2004. Pathogenesis of animal trypanosomiasis. *In*: Maudlin, I., Holmes, P.H. und Miles, M.A., *The trypanosomiasis*. CABI Publishing, Wallingford, Cambridge.
- Teuscher, E., Melzig, M.F. und Lindequist, U., 2004. *Biogene Arzneimittel*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Tielens, A.G.M. und Van Hellemond, J.J., 1999. Differences in energy metabolism between trypanosomatidae. *Parasitology Today* 14, 265-271.
- Torr, S., Vale, G., Mangwiro, C., Hall, D., Morton, J., Van Munster, B. und Hargrove, J., 2008. Programmes and information to assist in the planning and implementation of tsetse control operations. Verfügbar im Internet unter: www.tsetse.org [Abruf am 18. März 2009].
- Tsukitani, Y. und Shoji, J., 1973. Studies on the constituents of Senegae Radix. III. The structures of Senegin-III and -IV, saponins from *Polygala senega* LINNE var. *latifolia* TORRY et GRAY. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 21, 1564-1574.

- Tubery, P., 1974. Antiinflammatory triterpenic alcohol acids. Fr Demande Patent: 2202683. Chemical Abstracts 82, 103132.
- Ulienbergh, G., 1998. A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of African animal trypanosomosis. M-27, ISBN 92-5-104238-1, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Umezumi, T., 1991. Saponins and surfactants increase water flux in fish gills. Nippon Suisan Gakkai Shi. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 57, 1891-1896.
- Verlinden, C.L., Hannaert, V., Blonski, C., Willson, M., Perie, J.J., Fothergill-Gilmore, L.A., Opperdoes, F.R., Gelb, M.H., Hol, W.G. und Michels, P.A., 2001. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. Drug Resistance Updates 4, 50-56.
- Vogel, G., 1963. Zur Pharmakologie von Saponinen. Planta Medica 11, 362-376.
- Von Maydell, H.-J., 1983. Arbres et arbustes du Sahel. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ), Eschborn.
- Wagner, H., Bladt, S. und Zgainski, E.M., 1983. Drogenanalyse. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Wagner, H. und Bladt, S., 1996. Plant drug analysis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Walker, P.J., 1972. Capillary concentration technique applicable to infections of *T. congolense* in cattle. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 66, 348.
- Watson, L. und Dallwitz, M.J., 1992 onwards. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval. Verfügbar im Internet unter:

<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/delta/angio/www/polygala.htm>

oder <http://delta-intkey.com/angio/www/polygala.htm> [Abruf am 08. Mai 2009].

Watt, J.M. und Breyer-Brandwijk, M.G., 1962. The medicinal and poisonous plants of Southern and Eastern Africa. Being an account of their medicinal and other uses, chemical composition, pharmacological effects and toxicology in man and animal. E. & S. Livingstone, Edinburg, London.

Wegner, D.H. und Rohwedder, R.W., 1972. The effect of nifurtimox in acute Chagas' infection. *Arzneimittelforschung* 22, 1624-1635.

Weiss, N., Pelikan, J. und Tanner, M., 2006. STI, Lernprogramm Infektionsbiologie und Epidemiologie. *Trypanosoma brucei rhodesiense/gambiense*. Verfügbar im Internet unter:

http://www.infektionsbiologie.ch/seiten/modellparasiten/seiten/trypanosoma/steckbrief_tryps.html [Abruf am 20. Juli 2009].

Welburn, S.C., Fèvre, E.M., Coleman, P.G., Odiit, M. und Maudlin, I., 2001. Sleeping sickness: a tale of two diseases. *Trends in Parasitology* 17, 19-24.

Welburn, S.C., Fèvre, E.M., Goleman, P.G. und Maudlin, I., 2004. Epidemiology of human African trypanosomiasis. *In: Maudlin, I., Holmes, P.H. und Miles, M.A., The trypanosomiasis*. CABI Publishing, Wallingford, Cambridge.

Welt Online, 2005. Impfstoff gegen Schlafkrankheit. Verfügbar im Internet unter:

http://www.welt.de/print-welt/article677929/Impfstoff_gegen_Schlafkrankheit.html [Abruf am 28. Juni 2009].

Weng, A., Bachran, D., Görick, C., Bachran, C., Fuchs, H. und Melzig, M.F., 2009. A simple method for isolation of Gypsophila saponins for the combined application of targeted toxins and saponins in tumor therapy. *Planta Medica* 75, 1421-1422.

- Wenzler, T., Boykin, D.W., Ismail, M.A., Hall, J.E., Tidwell, R.R. und Brun, R., 2009. New treatment option for second-stage African sleeping sickness: *in vitro* and *in vivo* efficacy of aza analogs of DB289. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 4185-4192.
- WHO, 1986. Epidemiology and control of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organization. Technical Report Series 739, Geneva, Switzerland.
- WHO, 1998. Control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organization. Technical Report Series 881, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2004. Programmes and projects, health statistics and health information systems, Global Burden of Disease (GBD), mortality and morbidity, world bank regions, Sub-Saharan Africa. Verfügbar im Internet unter:
http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates_regional/en/index.html [Abruf am 11. Oktober 2009].
- WHO, 2005. Control of human African trypanosomiasis: A strategy for the African region, Regional Committee for Africa, AFR/RC55/11. Verfügbar im Internet unter: http://www.who.int/trypanosomiasis_african/resources/en/ [Abruf am 18. März 2009].
- WHO, 2006. African trypanosomiasis (sleeping sickness). Fact Sheet No. 259. Verfügbar im Internet unter:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/> [Abruf am 15. Mai 2009].
- WHO, 2008. Traditional medicine. Fact sheet No. 134. Verfügbar im Internet unter:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/index.html> [Abruf am 15. Mai 2009].
- WHO, 2009a. Programmes and projects, human African trypanosomiasis, drugs. Verfügbar im Internet unter:

-
- http://www.who.int/trypanosomiasis_african/drugs/en/ [Abruf am 18. März 2009].
- WHO, 2009b. Programmes and projects, human African trypanosomiasis, the vector (tsetse fly). Verfügbar im Internet unter:
http://www.who.int/trypanosomiasis_african/vector/en/ [Abruf am 16. Juli 2009].
- WHO, 2009c. WHO report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases - African trypanosomiasis. Verfügbar im Internet unter:
http://www.who.int/csr/resources/publications/CSR_ISR_2000_1tryps/en/index.html [Abruf am 18. März 2009].
- Windaus, A., 1909. Über die Entgiftung der Saponine durch Cholesterin. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 42, 238-246.
- Woo, P.T., 1970. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. Acta Tropica 27, 384-386.
- Woolhouse, M.E.J., Hargrove, J.W. und McNamara, J.J., 1993. Epidemiology of trypanosome infections of the tsetse fly *Glossina pallidipes* in the Zambezi Valley. Parasitology 106, 479-485.
- Wrobel, J.T., Matuszewska, M., Szychowski, J., Bertazzo, A., Traldi, P., Costa, C.V. und Allegri, G., 1996. Indole alkaloids and other constituents from the plant *Securidaca longipedunculata* Fres. Advances in Experimental Medicine and Biology 398, 685-689.
- Wursten, B., 2009. Flora of Zimbabwe. Verfügbar im Internet unter:
http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/species.php?species_id=133960 [Abruf am 07. Juli 2009].
- Yabu, Y., Yoshida, A., Suzuki, T., Nihei, C., Kawai, K., Minagawa, N., Hosokawa, T., Nagai, K., Kita, K. und Ohta, N., 2003. The efficacy of ascofuranone in a

- consecutive treatment on *Trypanosoma brucei brucei* in mice. *Parasitology International* 52, 155-64.
- Yamamoto, M., Kumagai, A. und Yamamura, Y., 1975. Structure and actions of saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum* L. I. Anti-inflammatory action of saikosaponins. *Arzneimittelforschung* 25, 1021-1023.
- Yamashita, K., Lu, H., Lu, J., Chen, G., Yokoyama, T., Sagara, Y., Manabe, M. und Kodama, H., 2002. Effect of three triterpenoids, lupeol, betulin, and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils. *Clinica Chimica Acta* 325, 91-96.
- Yoshikawa, M., Murakami, T., Ueno, T., Kadoya, M., Matsuda, H., Yamahara, J. und Murakami, N., 1995. Bioactive saponins and glycosides. I. *Senegae radix*. (1): E-senegasaponins a and b and Z-senegasaponins a and b, their inhibitory effect on alcohol absorption and hypoglycemic activity. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 43, 2115-2122.
- Yoshikawa, M., Murakami, T., Matsuda, H., Ueno, T., Kadoya, M., Yamahara, J. und Murakami, N., 1996. Bioactive saponins and glycosides. II. *Senegae Radix*. (2): Chemical structures, hypoglycemic activity, and ethanol absorption-inhibitory effect of E-senegasaponin c, Z-senegasaponin c, and Z-senegins II, III, and IV. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 44, 1305-1313.
- Yoshinobu, A., Hidetaka, Y. und Kiyoshi, T., 1971. Studies on glycon moiety of senega saponins. I. Isolation and purification of the senega saponins [in Japanese]. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 91, 1178-1181.
- Youan, B.B.C., Coulibaly, S., Miezán, T.B., Doua, F. und Bamba, M., 1997. *In vivo* evaluation of sixteen plant extracts on mice inoculated with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Bulletin of the World Health Organization* 75, 343-348.

Zentrum für Reisemedizin, 2009. Schlafkrankheit bei Serengetitouristen. Verfügbar im Internet unter: <http://www.reisemed.at/newsmain01.htm> [Abruf am 28. Juni 2009].

Ziegelbauer, K., 1994. Afrikanische Trypanosomosen. *In*: Röllinghoff, M. und Rommel, M., Immunologische und molekulare Parasitologie. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.

EIGENE PUBLIKATIONEN

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bisher wie folgt publiziert

Originalarbeiten

Aderbauer, B. und Melzig, M.F., 2007.

Securidaca longepedunculata Fres. Der Wilde Veilchenbaum
(*Securidaca longepedunculata* Fres., the violet tree).

Zeitschrift für Phytotherapie 28, 97-102.

Aderbauer, B., Clausen, P.-H., Kershaw, O., Melzig, M.F., 2008.

In vitro and *in vivo* trypanocidal effect of lipophilic extracts of medicinal plants from
Mali and Burkina Faso.

Journal of Ethnopharmacology 119, 225–231.

Vortrag

Doktorandentagung der DPhG

6.-8. September 2006, Nürnberg Heroldsberg

Aderbauer, B., Clausen, P.-H., Melzig, M.F.

Screening of medicinal plants from Mali for antitrypanosomal activity.

Posterpräsentationen

22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie

22.-25. Februar 2006, Wien, Österreich

Aderbauer, B., Melzig, M.F., Clausen, P.-H.

Untersuchungen zum Nachweis der Wirksamkeit afrikanischer Arzneipflanzen gegen
Trypanosomen.

Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft (DPhG), Landesgruppe Berlin-Brandenburg:

Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor

14. Juli 2006, Berlin

Aderbauer, B., Melzig, M.F., Clausen, P.-H.

Untersuchungen zum Nachweis der Wirksamkeit afrikanischer Arzneipflanzen gegen Trypanosomen.

International Congress and 54th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research

29. August – 2. September 2006, Helsinki, Finnland

Aderbauer, B., Clausen, P.-H., Melzig, M.F.

Screening of medicinal plants from Mali for antitrypanosomal activity.

Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft (DPhG), Landesgruppe Berlin-Brandenburg:

Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor

4. Juli 2008, Berlin

Aderbauer, B. und Melzig, MF

Wirksamkeit von Saponinen gegenüber Trypanosomen.

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. M.F. Melzig, der sich im Laufe meiner Arbeit jederzeit für Rücksprachen und Fragen Zeit nahm und mir einen Einblick in die Möglichkeiten der wissenschaftlichen Arbeit über die Grenzen meiner Dissertation hinaus geben konnte.

Herrn PD Dr. P.-H. Clausen für die Einführung in das spannende Gebiet der Trypanosomenbekämpfung, und die Betreuung der *in vitro*- und *in vivo*-Versuche meiner Arbeit.

Beiden Betreuern für das interessante und nette Umfeld mit Doktoranden unterschiedlicher Kulturkreise. Und besonders für das Verständnis und die Freude über meinen Sohn Matthias, der 2007 geboren wurde und über meine zweite Schwangerschaft, die zu einer terminlichen Brisanz zum Ende der Arbeit hin führte.

Herrn Dr. Nsekuye Bizimana für die Überlassung des Pflanzenmaterials, die Einführung in das Thema und das Ausleihen von Büchern aus seinem privaten Bestand.

Frau PD Dr. Kristina Jennett-Siems für die Spektreninterpretation und die fachliche Unterstützung bei den phytochemischen Untersuchungen.

Für die pathologischen Untersuchungen der Mäuse Frau Dr. Olivia Kershaw.

Für die Aufnahme von NMR-Spektren den Mitarbeitern der analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazie der FU Berlin und für die Aufnahme und Entschlüsselung der Massenspektren Frau Ursula Ostwald aus dem Institut für Chemie, der FU Berlin.

Den Tierpflegern, Frau Gabriele Schröter und Herrn Dieter Schmidt für die Hege und Pflege der Mäuse.

Den beiden Arbeitskreisen mit meinen Betreuern, wissenschaftlichen Mitarbeitern, technischen Assistenten, und Doktoranden für den Austausch, die gemeinsamen Mittagspausen und Feste.

Für die Durchsicht meiner Arbeit Frau Cornelia Görick und Herrn Michael Dressel. Für die Überarbeitung des Summarys Herrn Erick Mungube und Herrn Dr. Burkhard Bauer.

Für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotionszeit meinen Eltern und für das Promotionsabschlussstipendium der Hans und Stefan Bernbeck-Stiftung.

LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 11. November 2009

Birgit Aderbauer