

### 3 Diskussion

#### 3.1 Untersuchungen von *Exostema mexicanum* GRAY (Rubiaceae)

In Mexiko und Guatemala wird die Rindendroge der Rubiaceen-Art *Exostema mexicanum* GRAY in der traditionellen Phytotherapie zur Behandlung von Malaria eingesetzt (Morton, 1981, Standley *et al.*, 1975). Aus der phytochemisch wenig untersuchten Art *E. mexicanum* wurden bisher verschiedene Triterpene (Cucurbitacine) sowie ein 4-Phenylcumarin isoliert (Mata *et al.*, 1990).

Im Rahmen der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung der Droge von *E. mexicanum* zeigte der lipophile Rohextrakt eine antiplasmodiale Hemmwirkung mit IC<sub>50</sub>-Werten von 11,5 µg/ml gegenüber dem Chloroquin-sensitiven Stamm PoW und 9,0 µg/ml gegenüber dem Chloroquin-resistenten Klon Dd2. Die antiparasitäre Wirkung der Droge konnte *in vitro* somit bestätigt werden. Ein methanolischer Rohextrakt der Droge erwies sich jedoch als inaktiv. Eine Verlängerung der Testdauer von 42 auf 72 Stunden hatte keine Auswirkung auf die Aktivität des lipophilen Extraktes, jedoch auf die des methanolischen Rohextraktes. Hier konnte nach einer 72stündigen Exposition gegenüber dem Parasiten eine moderate Hemmwirkung mit IC<sub>50</sub>-Werten von 19,4 µg/ml [PoW] und 32,1 µg/ml [Dd2] beobachtet werden. Der verzögerte Wirkungseintritt ist vermutlich auf enthaltene Inhaltsstoffe zurückzuführen, die erst nach einem längeren Zeitraum eine biologische Aktivität aufweisen.

Die phytochemische Aufarbeitung aktiver Fraktionen des lipophilen und methanolischen Rohextraktes führte zur Isolierung der folgenden sieben 4-Phenylcumarine: 3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (**1**), 4'-Hydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (**2**), 4',5,7,8-Tetramethoxy-4-phenylcumarin [O-Methyl-exostemin] (**3**), 4',8-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin [Exomexin A] (**4**), 3',4'-Dihydroxy-5,7,8-trimethoxy-4-phenylcumarin [Exomexin B] (**5**), 3',4',8-Trihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (**6**) und 3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin (**7**). Diese 4-Phenylcumarine konnten erstmalig aus *E. mexicanum* isoliert werden. Bei den Verbindungen **3**, **4** und **5** handelt es sich um neue Naturstoffe. Wir bezeichneten Verbindung **4** als Exomexin A und Verbindung **5** als Exomexin B. In der Literatur wurde 4',5,7,8-Tetramethoxy-4-phenylcumarin [O-Methyl-exostemin] (**3**) bisher nur als Partialsynthetikum beschrieben (Sánchez-Viesca, 1969).

Von den isolierten Naturstoffen besaß 4',5,7,8-Tetramethoxy-4-phenylcumarin (**3**) die höchste Aktivität gegenüber *P. falciparum* mit IC<sub>50</sub>-Werten von 10,5 µM [PoW] und 4,7 µM [Dd2]. Eine moderate bis geringfügige antiplasmodiale Hemmwirkung mit IC<sub>50</sub>-Werten zwischen 40,7 µM und 54,5 µM (jeweils Dd2) zeigten 3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (**1**), 4',8-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (**4**), 3',4'-Dihydroxy-5,7,8-trimethoxy-4-phenylcumarin (**5**) und 3',4',8-Trihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (**6**). Die beiden Verbindungen 4'-Hydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (**2**) und 3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin (**7**) erwiesen sich als inaktiv. Die erhöhte antiplasmodiale Aktivität von 4',5,7,8-Tetramethoxy-4-phenylcumarin ist vermutlich auf den lipophilen Charakter des Naturstoffes zurückzuführen. Möglicherweise kann der Naturstoff aufgrund seiner erhöhten Lipophilie leichter die Zellmembran der Erythrozyten und die des Parasiten passieren.

Über die *in-vitro*-Wirkung von Phenylcumarinen gegenüber *P. falciparum* wurde bereits zuvor berichtet. So gelang Noster und Mitarbeiter (1990) die Isolierung des antiplasmodial wirkenden 4',5'-Dihydroxy-7-methoxy-4-phenyl-5,2'-oxidocumarins aus der verwandten Art *Exostema caribaeum* ROEM. ET SCHULT (Rubiaceae). Diese Verbindung zeigte auf dem Chloroquin-sensiblen Stamm FCH-5/Tansania einen IC<sub>50</sub>-Wert von 55,4 µM.

Da aus der Literatur nur wenig über die biologischen Wirkungen von Phenylcumarinen bekannt ist, wurde die antiplasmodiale Wirkung der isolierten Verbindungen aus *E. mexicanum* mit der antiparasitären Aktivität von Cumarinen verglichen. Oftmals wurde die antiplasmodiale Hemmwirkung von Cumarinen in Abhängigkeit von deren Methoxylierungsgrad beschrieben. So zeigte ein aus *Artemisia abrotatum* L. (Asteraceae) isoliertes 7-Hydroxy-6,8-dimethoxycumarin [Isofraxidin] eine Aktivität mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 35,8 µM gegenüber dem Chloroquin-resistenten Klon K1, wohingegen sich 7-Hydroxy-6-methoxycumarin [Scopoletin] als inaktiv erwies (Cubukcu *et al.*, 1990). In einer weiteren Studie wurden verschiedene Cumarine auf ihre Hemmwirkung gegenüber *P. falciparum* untersucht, wobei 5,6,7-Trimethoxycumarin, isoliert aus *Diosma pilosa* I. WILLIAMS (Rutaceae), mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 4,2 µM gegenüber dem Chloroquin-resistenten Klon FCR<sub>3TC</sub>, die höchste Aktivität zeigte (Khalid *et al.*, 1986). Die Gesamtheit der Daten lassen vermuten, dass ein höherer Methoxylierungsgrad der Cumarine mit einer Erhöhung der antiplasmodialen Wirkung einhergeht.

Interessanterweise besaßen im vorliegenden Testsystem alle biologisch aktiven Phenylcumarine geringere IC<sub>50</sub>-Werte gegenüber dem Chloroquin-resistenten Klon [Dd2]. Es ist zu vermuten, dass die Verbindungen gegenüber dem Parasiten ein anderes

Wirkprofil besitzen als Chloroquin. Ein ähnliches Phenomen wurde bei Bisindolalkaloiden verschiedener *Alstonia*-Arten beobachtet (Keawpradub *et al.*, 1999).

Um genauere Aussagen über den antiplasmodialen Mechanismus der isolierten Verbindungen machen zu können, wurden mit einzelnen 4-Phenylcumarinen weitergehende Versuche durchgeführt. Am Beispiel von 3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (**1**) wurde untersucht, ob diese Verbindung aufgrund der *ortho*-ständigen Hydroxygruppen das Wachstum von *P. falciparum* mittels eines Fe-chelatisierenden Effektes hemmt. Sollte **1** einen chelatisierenden Effekt auf eisenhaltige Metallenzyme des Parasiten ausüben, würde dies zu einem verminderten Parasitenwachstum führen. Im Rahmen der Studie wurde die antiplasmodiale Aktivität von 3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (**1**) in Gegenwart von  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$  gegenüber dem Chloroquin-resistenten Klon Dd2 bestimmt. Jedoch zeigte ein 1:1-Gemisch aus 3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (**1**) und  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$  keinen höheren  $\text{IC}_{50}$ -Wert als die reine Verbindung **1**. Bei einer chelatisierenden Wirkung von **1** wäre zu erwarten gewesen, dass sich die Hemmwirkung von **1** verringert (= höhere  $\text{IC}_{50}$ -Werte), da durch die Fe-Zugabe für die parasiteneigenen Enzyme ausreichend Eisen zur Verfügung stünde und die funktionellen Gruppen der Verbindung **1** besetzt wären.

Inwieweit Metaboliten der 4-Phenylcumarine für die biologische Aktivität der Verbindungen verantwortlich sind, konnte im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen an *E. mexicanum* nicht festgestellt werden. Aus der Literatur sind einzig Metabolisierungsstudien von Calophyllolid, einem 5,6,7,8-tetrasubstituierten-4-Phenylcumarin sowie von zwei strukturell ähnlichen Verbindungen bekannt (Crew *et al.*, 1976). Bei Gabe von methoxylierten 4-Phenylcumarinen wurden im Urin von Versuchstieren demethylierte Metaboliten gefunden. Ungefähr 30% der Verbindung wurde nicht verstoffwechselt. Von den Autoren wurden keine Angaben über eine Oxidation bzw. Öffnung des Lactonringes gemacht. Aussagen zur Verweildauer von 4-Phenylcumarinen im menschlichen Körper liegen bisher nicht vor.

Im Hinblick auf weiterführende Untersuchungen an *E. mexicanum* wurden von allen isolierten Phenylcumarinen mittels Computerkalkulationen die log P-Werte bestimmt (siehe Kap. 2.6.2.). Für alle Verbindungen lagen die berechneten log P-Werte zwischen 3,3 und 3,9. Laut Literaturangaben kann dies als ein Hinweis auf ein moderates bis gutes

Membranpermeationsvermögen angesehen werden (Toon *et al.*, 1983, Lipinsky *et al.*, 1997).

Um feststellen zu können, ob die *in-vitro*-Aktivität der Phenylcumarine auf eine spezifische Hemmung von *P. falciparum* oder auf eine allgemeine Zelltoxizität zurückzuführen ist, wurde von den antiplasmodial aktiven Verbindungen die zytotoxische Wirkung an der humanen Endothelzelllinie ECV 304 untersucht und der Selektivitätsindex (SI) ermittelt. Alle getesteten 4-Phenylcumarine zeigten eine signifikante zytotoxische Aktivität gegenüber der Endothelzelllinie ECV 304 mit IC<sub>50</sub>-Werten zwischen 1,2 µM und 10,0 µM. Die antiplasmodiale Hemmwirkung aller Verbindungen war im Vergleich zu deren zytoxischen Wirkung wesentlich geringer. Dieser Effekt wurde auch am SI-Index ersichtlich, der für alle Verbindungen bei SI ≤ 0,40 lag. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass die *in-vitro*-Aktivität der 4-Phenylcumarine auf einer allgemeinen Membrantoxizität beruht (Melzig, 2002). Bereits in einer früheren Studie wurde die zytotoxische Wirkung von 4-Phenylcumarinen, welche aus den Wurzeln von *E. acuminatum* URB. isoliert wurden, beschrieben (Ito *et al.*, 2000).

Aufgrund der signifikanten Zytoxität der isolierten Verbindungen scheint eine phytotherapeutische Verwendung von *E. mexicanum* gegen Malaria als nicht geeignet. Es sollte jedoch beachtet werden, dass auf der Grundlage dieses einen *in-vitro*-Zytotoxizitätstests, ohne das Vorliegen von *in-vivo*-Daten, die Relevanz von *E. mexicanum* als traditionelle Heilpflanze nicht vollständig bewertet werden kann. Vielmehr sollte aufgrund der Diskrepanz zwischen der traditionellen Anwendung (Einsatz der Droge in der phytotherapeutischen Malariatherapie) und der signifikanten *in-vitro*-Zytotoxizität der isolierten Verbindungen die ethnobotanische Information überprüft werden. Im Hinblick auf zukünftige Untersuchungen an *E. mexicanum* wären genaue Aussagen über die traditionelle Zubereitungsform, die Dauer der Anwendung bzw. Angaben zur Dosierung von Bedeutung. Die im Rahmen unserer Untersuchungen erhaltenen *in-vitro*-Daten deuten jedoch daraufhin, dass eine uneingeschränkte phytotherapeutische Anwendung von *E. mexicanum* nicht zu empfehlen ist.

### 3.2 Untersuchungen von *Calea tenuifolia* KUNTH (Asteraceae)

*Calea tenuifolia* KUNTH (syn.: *C. zacatechichi* SCHLECHT., Asteraceae) ist in der traditionellen Heilkunde und Ethnobotanik Mexikos unter vielen volkstümlichen Namen bekannt. In Mexiko wird zur Behandlung von Malaria ein wässriger Infus des getrockneten

Krautes verabreicht (Martinez, 1959, Heinrich, 1989). Im Rahmen verschiedener phytochemischer Untersuchungen wurden aus *C. tenuifolia* (publiziert unter dem Synonym *C. zacatechichi*) zahlreiche Sesquiterpenlaktone (Bohlmann *et al.*, 1977, Quijano *et al.*, 1979, Ortega *et al.*, 1970, Quijano *et al.*, 1978, Herz *et al.*, 1980) und zwei Flavone (Herz *et al.*, 1980) isoliert.

Zu Beginn der phytochemischen Untersuchungen wurde ein lipophiler Rohextrakt der Blattdroge auf seine Hemmwirkung gegenüber *P. falciparum* getestet und erwies sich mit  $IC_{50}$ -Werten von 24,3  $\mu\text{g/ml}$  gegenüber Dd2 und 10,4  $\mu\text{g/ml}$  gegenüber PoW als aktiv. Der *in-vitro*-antiplasmodiale Effekt von *C. tenuifolia* konnte somit bestätigt werden.

Die phytochemische Aufarbeitung aktiver Fraktionen des lipophilen Rohextraktes der untersuchten Blattdroge führte zur Isolierung von sieben Inhaltsstoffen: den Flavonen 5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavon [Luteolin-3',4'-dimethylether] (**8**), 4',5,7-Trihydroxyflavon [Apigenin] (**9**), 4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon [Genkwanin] (**10**), 5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavon [Luteolin-3',4',7-trimethylether] (**11**), 5-Hydroxy-4',7-dimethoxyflavon [7-Methylacacetin] (**12**), sowie den Fettsäuren Octadeca-9Z,12Z,15Z-triensäure [ $\alpha$ -Linolensäure] (**13**) und Octadeca-9Z,12Z-diensäure [Linolsäure] (**14**). Mit Ausnahme von 7-Methylacacetin (**12**) wurde keine dieser Verbindungen zuvor aus *C. tenuifolia* isoliert.

Wie bereits erwähnt, isolierte man aus der mexikanischen Asteraceen-Art *C. tenuifolia* mehrfach verschiedene Sesquiterpenlaktone. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnten aus keiner der aktiven Fraktionen des lipophilen und methanolischen Rohextraktes Sesquiterpenlaktone gewonnen werden. Auch in den inaktiven Fraktionen des lipophilen und methanolischen Rohextraktes konnten mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen keine Sesquiterpenlaktone detektiert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass es sich bei der hier untersuchten Blattdroge aus El Salvador um eine spezielle, bisher nicht phytochemisch untersuchte Unterart von *C. tenuifolia* handelte, die keine Sesquiterpenlaktone enthält (Berendsohn, 2001).

Alle isolierten Verbindungen zeigten eine antiplasmodiale *in-vitro*-Wirkung, wovon 5-Hydroxy-4',7-dimethoxyflavon [7-Methylacacetin] (**12**) die höchste Hemmwirkung gegenüber *P. falciparum* mit  $IC_{50}$ -Werten von 20,1  $\mu\text{M}$  [PoW] und 17,1  $\mu\text{M}$  [Dd2] besaß. Die Flavone 5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavon [Luteolin-3',4'-dimethylether] **8**, 4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon [Genkwanin] **10** und 5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavon

[Luteolin-3',4',7-trimethylether] **11** wiesen eine gute bis moderate antiplasmodiale Aktivität mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen 18,0  $\mu\text{M}$  und 43,3  $\mu\text{M}$  auf [PoW]. 4',5,7-Trihydroxyflavon [Apigenin] (**9**), die Verbindung mit der höchsten Polarität, besaß die geringste antiparasitäre Hemmwirkung mit  $IC_{50}$ -Werten von 54,0  $\mu\text{M}$  gegenüber PoW und 92,5  $\mu\text{M}$  gegenüber Dd2. Von den isolierten Fettsäuren wies Octadeca-9Z,12Z-diensäure [Linolsäure] (**14**) eine wesentlich höhere Aktivität mit  $IC_{50}$ -Werten von 21,8  $\mu\text{M}$  [PoW] und 31,1  $\mu\text{M}$  [Dd2] auf als Octadeca-9Z,12Z,15Z-triensäure [ $\alpha$ -Linolensäure] (**13**) mit  $IC_{50}$ -Werten von 49,6  $\mu\text{M}$  [PoW] und 142,1  $\mu\text{M}$  [Dd2].

Die *in-vitro*-Wirkung von Flavonoiden gegenüber *P. falciparum* wurde bereits in früheren Untersuchungen beschrieben (Khalid *et al.*, 1986, Divo *et al.*, 1985). Dabei besaß zwar das Flavon Quercetin eine Hemmwirkung gegenüber dem Chloroquin-resistenten Stamm FCR<sub>3TC</sub> ( $IC_{50}$ -Wert: 21,2  $\mu\text{M}$ ), jedoch nicht die glykosidische Verbindung Rutin (Khalid *et al.*, 1986). Von Elford und Mitarbeitern (1987) wurde ein synergistischer Effekt von polymethoxylierten Flavonen aus *A. annua* L. (Asteraceae) beobachtet. So potenzieren diese Flavone die Aktivität von Artemisinin (Elford *et al.*, 1987, Liu *et al.*, 1989), zeigten jedoch als getestete Einzelverbindung nur eine moderate *in-vitro*-Hemmwirkung gegenüber dem Parasiten mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen 24  $\mu\text{M}$  und 65  $\mu\text{M}$  (Tan *et al.*, 1998). Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde für Genkwanin (**10**) beobachtet, dass die *in-vitro*-Wirkung der Verbindung vom Entwicklungsstadium von *P. falciparum* abhängig ist. So zeigte **10** einen stärkeren antiplasmodialen Effekt ( $IC_{50}$ -Werte: 19,0  $\mu\text{M}$  [PoW], 28,5  $\mu\text{M}$  [Dd2]), wenn sich zu Testbeginn eine hohe Anzahl von Schizonten in der Parasitenkultur befand. Dagegen führte eine hohe Anzahl von Ringstadien in der Kultur zu Beginn des Tests zu einer geringeren Hemmwirkung von **10** ( $IC_{50}$ -Werte: 78,5  $\mu\text{M}$  [PoW], 81,3  $\mu\text{M}$  [Dd2]). Aufgrund dieses beobachteten Effekts wurde vermutet, dass **10** die Membrandurchlässigkeit der Erythrozyten beeinflusst. Demnach würden nach der Ruptur der Schizonten die freigesetzten Merozoiten schlechter die Erythrozytenmembran passieren können. Dies würde zu einer Herabsetzung der Parasitämie führen, was sich in kleineren  $IC_{50}$ -Werten von **10** widerspiegelt.

In der Literatur ist bereits die antiplasmodiale Wirkung von ungesättigten Fettsäuren beschrieben worden. Kumaratilake und Mitarbeiter (1992) konnten zeigen, dass ungesättigte Fettsäuren konzentrationsabhängig und in Abhängigkeit von der Anzahl der Doppelbindungen die Entwicklung der Plasmodien in den Erythrozyten hemmen. Während

der Metabolisierung der ungesättigten Fettsäuren entstehen oxidativ wirkende Produkte, die auf das intraerythrozytäre Parasitenwachstum eine Hemmung ausüben. Am empfindlichsten gegenüber diesem oxidativen Stress reagieren die parasitären Ringstadien (Umlawski, 1998).

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnte jedoch nicht beobachtet werden, dass das Ausmaß der Parasitenhemmung mit der Anzahl der Doppelbindungen der Fettsäuren zunahm. Für Octadeca-9Z,12Z-diensäure [Linolsäure] (**14**) ermittelten wir in unserem Testsystem die IC<sub>50</sub>-Werte 21,8 µM [PoW] und 31,1 µM [Dd2]. Octadeca-9Z,12Z,15Z-triensäure [ $\alpha$ -Linolensäure] (**13**) zeigte eine geringere Aktivität mit IC<sub>50</sub>-Werten von 49,6 µM [PoW] und 142,1 µM [Dd2].

Um die *in-vitro*-Wirkung der traditionellen Zubereitungsform der Blattdroge bestätigen zu können, wurde aus den Blättern von *C. tenuifolia* ein wässriger Infus hergestellt. Dieser erwies sich jedoch nicht als antiplasmodial aktiv. Der Rückstand wurde anschließend mittels einer RP-18-Säule aufgearbeitet, wobei sich die erhaltenen Fraktionen 10 und 11 als geringfügig aktiv gegenüber *P. falciparum* erwiesen. In diesen beiden Fraktionen konnten die antiplasmodial wirkenden Flavone Luteolin-3',4'-dimethylether (**8**) und Genkwanin (**10**) mit Hilfe spektroskopischer Messungen (<sup>1</sup>H-NMR, EI-MS) nachgewiesen werden.

Da aus allen aktiven Fraktionen des lipophilen und methanolischen Rohextraktes Flavone mit einer Hemmwirkung gegenüber dem Parasiten isoliert wurden, bzw. im wässrigen Auszug detektiert wurden, stellen diese Naturstoffe vermutlich das antiplasmodiale Wirkprinzip der hier untersuchten Blattdroge dar.

Aufgrund der großen Vielfalt in der Natur vorkommender Flavonoide und deren breitem Spektrum an biologischen Wirkungen (z.B. antioxidative Eigenschaften) ist diese Naturstoffklasse bereits gut untersucht worden (Heilmann *et al.*, 1998). Bei den beschriebenen biologischen Aktivitäten wurde oftmals die starke Verstoffwechslung der Flavonoide im menschlichen Körper unberücksichtigt gelassen, bzw. Angaben bzgl. ihrer Resorption und Metabolisierung sind meist widersprüchlich. Allgemein sprechen die bisherigen Untersuchungen zur Resorption von Flavonoiden dafür, dass Aglyka sowohl intakt aus der Nahrung resorbiert werden können, zum größten Teil aber durch gastrointestinale Bakterien metabolisiert werden (Bokkenheuser *et al.*, 1987). Bei der Abschätzung der *in-vivo*-Wirkung von Flavonoiden muss auch deren kurze Verweildauer im menschlichen Körper beachtet werden. So wurde für Quercetin eine Halbwertszeit von

weniger als 2 Stunden festgestellt, sowie die Ausscheidung von 52% nichtmetabolisiertem Quercetin (Graefe *et al.*, 1999). Bisher sind nur die Metaboliten für einige häufig vorkommende Flavone bekannt (Scheline, 1991). So wurden für Apigenin die Metaboliten 4-Hydroxybenzoesäure, 4-Hydroxyphenylpropionsäure und 4-Hydroxyzimtsäure gefunden (Griffiths *et al.*, 1972). Basierend auf diesen Daten, testeten wir synthetische 4-Hydroxyzimtsäure (MERCK), welche sich als inaktiv gegenüber dem Parasiten erwies.

Im Rahmen einer weiteren Studie in unserem Arbeitskreis wurden Flavonoiddrogen wie Birkenblätter [Betulae folium Caelo, Stammpflanze *Betula pendula* ROTH und *B. pubescens* EHRH., Betulaceae] und Orthosiphonblätter [Orthosiphonis folium Caelo, Stammpflanze *Orthosiphon aristatus* (BL.) MIQ., Lamiaceae] auf ihre antiplasmodiale Wirkung gegenüber *P. falciparum* untersucht. Im Laufe der aktivitätsgeleiteten Fraktionierungen der Drogen wurden mehrere polymethoxylierte Flavone isoliert, die eine antiplasmodiale Aktivität zeigten mit IC<sub>50</sub>-Werten zwischen 6,1 µM [Dd2] und 61,7 µM [Dd2] (Jenett-Siems, 2002).

Im Rahmen einer Untersuchung von *Artemisia afra* JACQ. (Asteraceae) wurden ebenfalls methoxylierte Flavone mit einer vergleichbaren Hemmwirkung gegenüber dem Parasiten isoliert (Kraft *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass bei phytotherapeutisch genutzten Heilpflanzen in der Malariatherapie oftmals enthaltene Flavonderivate oder auch Flavonoide eine moderate antiplasmodiale Aktivität bewirken.

Im Laufe weiterführender Untersuchungen an *C. tenuifolia* sollte festgestellt werden, inwiefern Flavon-Fettsäure-Gemische unterschiedlicher Zusammensetzung einen synergistischen Effekt besitzen und somit die antiplasmodiale Hemmwirkung beeinflussen. Als Testsubstanzen wurden die Flavone Apigenin<sup>®</sup> (MERCK) und 4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon [Genkwanin] (**10**) und die Fettsäure Palmitinsäure<sup>®</sup> (MERCK) verwendet. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigten, dass die IC<sub>50</sub>-Werte sowohl im Fall der untersuchten Apigenin-Palmitinsäure-Gemische, als auch bei den getesteten Genkwanin-Palmitinsäure-Gemischen den IC<sub>50</sub>-Werten der Einzelverbindungen sehr ähnlich waren. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde vermutet, dass bei den getesteten Flavon-Fettsäure-Gemischen unterschiedlicher Zusammensetzung keine synergistischen Effekte bezüglich der Hemmwirkung gegenüber *P. falciparum* bestehen.

Im Hinblick auf zukünftige Untersuchungen von isolierten Inhaltsstoffen von *C. tenuifolia* wurde von einigen Flavonen das Absorptions- und Permeationsvermögen theoretisch



ermittelt. Durch Computerkalkulationen wurden von den Flavonen **8–10** die log P–Werte bestimmt (siehe Kap. 2.6.2.). Die berechneten Werte lagen in einem Bereich zwischen 3,5 und 4,1. Diese Daten können als Hinweis auf ein moderates Resorptionsvermögen der Verbindungen bewertet werden.

Weiterhin wurde von den isolierten Flavone **8–12** und der Fettsäure **14** die Wirkung gegenüber der humanen Endothelzelllinie ECV 304 untersucht. Hierbei erwies sich 5,7–Dihydroxy–3',4'–dimethoxyflavon [Luteolin–3',4'–dimethylether] (**8**) als nicht zytotoxisch (IC<sub>50</sub>–Wert: 435,9 µM) bei einer dreizehnfach höheren antiplasmodialen Aktivität (IC<sub>50</sub>–Wert: 33,4 µM [Dd2]). Einen geringen zytotoxischen Effekt besaß 4',5–Dihydroxy–7–methoxyflavon [Genkwanin] **10** (106,2 µM). Im Vergleich dazu zeigte **10** eine vierfach höhere Hemmwirkung gegenüber *P. falciparum* (IC<sub>50</sub>–Wert: 28,5 µM). 5–Hydroxy–3',4',7–trimethoxyflavon [Luteolin–3',4',7–trimethylether] **11** besaß eine moderate Zytotoxizität (IC<sub>50</sub>–Wert: 48,1 µM) bei einer dreifach höheren antiparasitären Wirkung mit einem IC<sub>50</sub>–Wert von 18,0 µM [PoW]. Als moderat zytotoxisch erwies sich Apigenin (**9**) mit einem IC<sub>50</sub>–Wert von 82,1 µM. Die antiplasmodiale Hemmwirkung von **9** war jedoch geringer (IC<sub>50</sub>–Wert: 92,5 µM [Dd2]). Das Flavon 7–Methylacacetin (**12**) zeigte einen starken zytotoxischen Effekt gegenüber der Zelllinie ECV 304 (IC<sub>50</sub>–Wert: 26,8 µM). Linolsäure (**14**) erwies sich ebenfalls als zytotoxisch in diesem Testsystem (IC<sub>50</sub>–Wert: 27,1 µM). Um eine genauere Aussage bzgl. der Zytotoxizität der isolierten Naturstoffe machen zu können, müßten die Verbindungen weiteren Zytotoxizitätstests zugeführt werden. Widersprüchlich erscheinen die erhaltenen Daten der in unserem Testsystem zytotoxisch wirkenden Linolsäure (**14**) mit einem IC<sub>50</sub>–Wert von 27,1 µM gegenüber ECV 304. Diese Fettsäure ist in vielen Nahrungsmitteln enthalten, deren täglicher Verzehr als unbedenklich gilt.

Aus der Gesamtheit aller Daten wurde geschlussfolgert, dass auf der Grundlage dieses einen *in-vitro*–Tests, ohne Kenntnisse einer nachweislichen *in-vivo*–Aktivität, die Relevanz von *C. tenuifolia* als traditionelle Heilpflanze in der Malariatherapie nicht vollständig bewertet werden kann. Bei der Einschätzung der biologischen Wirkung einer Pflanzendroge muss weiterhin berücksichtigt werden, dass erhaltene *in-vitro*–Daten nicht immer mit den *in-vivo*–Daten vergleichbar sind. So konnten Muñoz und Mitarbeiter feststellen, dass einige Pflanzendrogen (z.B. *Nectandra cuspidata* NEES, Lauraceae und *Prunus amplifolia* PILGER, Rosaceae), die keine *in-vitro*–Wirkung besaßen, dennoch *in-vivo*–aktiv waren (Muñoz *et al.*, 2000a). Es sollte somit aus einer moderaten *in-vitro*–Hemmwirkung eines Rohextraktes bzw. einer Verbindung nicht sofort auf eine *in-vivo*–

Inaktivität geschlossen werden. Vielmehr sollte man die Extrakte der Droge bzw. isolierter Inhaltsstoffe weiteren *in-vitro*- und *in-vivo*-Testsystemen zuführen. Die von uns im Rahmen dieser Studie erhaltenen Ergebnisse können nur als Anhaltspunkt bei der Bewertung der phytotherapeutischen Relevanz von *C. tenuifolia* dienen. Jedoch deuten sämtliche *in-vitro*-Daten daraufhin, dass von einer uneingeschränkten bzw. langfristigen Anwendung dieser Droge in der traditionellen Malariatherapie Abstand genommen werden sollte.

### 3.3 Untersuchungen von *Microglossa pyrifolia* (LAM.) KUNTZE (Asteraceae)

Die Heilpflanze *Microglossa pyrifolia* (LAM.) KUNTZE (Asteraceae) ist aus der traditionellen Medizin Westafrikas bekannt und ihre Verwendung ist sehr vielseitig. Aus Ghana liegen detaillierte ethnobotanische Informationen über den Gebrauch der Blattdroge in der phytotherapeutischen Malariatherapie vor. So wird ein wässriger Dekokt der Blätter gegen Fieber und Malaria eingesetzt (Abbiw, 1990, Bruce, 2000). Aus den oberirdischen Pflanzenteilen von *M. pyrifolia* wurden mehrere Acetylene, Furanoditerpene und Geranylgeraniol-Derivate isoliert (Rücker *et al.* 1992 und 1994, Zdero *et al.* 1990).

Im Rahmen der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung von *M. pyrifolia* zeigte der lipophile Rohextrakt (PE-EtOAc 1:1) der oberirdischen Pflanzenteile eine antiplasmodiale Hemmwirkung mit  $IC_{50}$ -Werten von 10,5  $\mu\text{g/ml}$  gegenüber PoW und von 13,1  $\mu\text{g/ml}$  gegenüber Dd2. Der lipophile Wurzelextrakt besaß mit  $IC_{50}$ -Werten von 8,3  $\mu\text{g/ml}$  [PoW] und 11,4  $\mu\text{g/ml}$  [Dd2] ebenfalls eine Aktivität gegenüber dem Parasiten. Die antiplasmodiale Wirkung von *M. pyrifolia* konnte somit *in vitro* nachgewiesen werden. Die methanolischen Rohextrakte der oberirdischen Pflanzenteile und der Wurzeln erwiesen sich jedoch als inaktiv.

Die phytochemische Aufarbeitung aktiver Fraktionen des lipophilen Rohextraktes der oberirdischen Pflanzenteile (Ernte 2000) führte zur Isolierung von Umbelliferon (**15**), Sinapylidiangelat (**16**), 6*E*,10*E*,14*E*-Geranylgeraniol-19-carbonsäure (**17**) und 2*E*-Phytol (**18**). Weiterhin wurde in einer der aktiven Fraktionen Linolsäure (**14**) nachgewiesen. Aus dem lipophilen Wurzelextrakt (Ernte 2000) wurde Stigmasterol (**19**) erhalten. Bei Sinapylidiangelat (**16**) handelt es sich um einen neuen Naturstoff.

Im Rahmen einer weiteren phytochemische Untersuchung von *M. pyrifolia* (Ernte 2001) wurden aus dem aktiven lipophilen Rohextraktes der oberirdischen Pflanzenteile ( $IC_{50}$ -Wert: 21,8  $\mu\text{g/ml}$  [PoW], 40,4  $\mu\text{g/ml}$  [Dd2]) erneut die Verbindungen **14** und **17** erhalten.

Weiterhin konnten die folgenden Naturstoffe isoliert werden: Benzyl-2,6-dimethoxybenzoat (**20**), Acacetin (**21**), 13-Hydroxy-9Z,15Z,11E-octadecatriensäure (**22**), zwei Isomere von 1-Hydroxycalamenen (**23** und **24**), die Furanoditerpene Strictinsäure (**25**), 10 $\alpha$ -Nidoresedasäure (**26**), 10 $\beta$ -Nidoresedasäure (**27**) und Hardwickiasäure (**28**) sowie die beiden Geranylgeraniol-Derivate 1-Acetyl-6E,10E,14E-geranylgeraniol-19-carbonsäure (**29**) und 19-Oxo-6E,10E,14E-geranylgeraniol (**30**). Bei 1-Acetyl-6E,10E,14E-geranylgeraniol-19-carbonsäure (**29**) und 19-Oxo-6E,10E,14E-geranylgeraniol (**30**) handelt es sich um neue Naturstoffe.

Der lipophile Wurzelextrakt (Ernte 2001) zeigte ebenfalls eine moderate Hemmwirkung gegenüber dem Parasiten (IC<sub>50</sub>-Wert: 17,3  $\mu$ g/ml [PoW], 40,2  $\mu$ g/ml [Dd2]). Die phytochemische Aufarbeitung führte zur Isolierung von Verbindung **19** und 8-Methyl- $\beta$ -naphthol (**31**). Weiterhin konnte in einer der aktiven Fraktionen ein Acetylgemisch detektiert werden.

Mit Ausnahme von 6E,10E,14E-Geranylgeraniol-19-carbonsäure (**17**) wurden alle Verbindungen erstmals aus *M. pyrifolia* isoliert.

Von den erhaltenen Naturstoffen erwiesen sich vorrangig die aliphatischen Verbindungen als antiplasmodial aktiv. 2E-Phytol (**18**) und 6E,10E,14E-Geranylgeraniol-19-carbonsäure (**17**) zeigten den stärksten antiparasitären Effekt mit IC<sub>50</sub>-Werten von 8,4  $\mu$ M [PoW] und 11,4  $\mu$ M [Dd2] für **18** und mit IC<sub>50</sub>-Werten von 13,4  $\mu$ M [PoW] und 16,3  $\mu$ M [Dd2] für **17**. Die antiparasitäre Aktivität (IC<sub>50</sub>-Werten: 21,8  $\mu$ M [PoW] und 31,1  $\mu$ M [Dd2]) von Linolsäure (**14**) wurde bereits im Rahmen der Studie an *C. tenuifolia* bestimmt. Die Verbindung wurde als gut antiparasitär wirkend beurteilt. Die oxidierte Fettsäure 13-Hydroxy-9Z,15Z,11E-octadecatriensäure (**22**) zeigte eine moderate Aktivität gegenüber dem Parasiten mit IC<sub>50</sub>-Werten von 22,8  $\mu$ M auf PoW und 46,6  $\mu$ M gegenüber Dd2. Die Verbindung Benzyl-2,6-dimethoxybenzoat (**20**) zeigte nur gegenüber PoW eine moderate Hemmung (IC<sub>50</sub>-Wert: 33,1  $\mu$ M).

Neben den Inhaltsstoffen **15**, **16**, **21**, **25**, **26**, **27** und **28** erwiesen sich auch die beiden Isomere von 1-Hydroxycalamenen (**23** und **24**) im vorliegenden Testsystem als inaktiv. Thebtaranonth und Mitarbeiter (1995) isolierten 10,12-Peroxycalamenen aus *Cyperus rotundus* L. (Cyperaceae), das eine Hemmwirkung gegenüber dem Chloroquin-resistenten Stamm K1 zeigte (IC<sub>50</sub>-Wert: 0,53  $\mu$ g/ml). Offensichtlich ist die im Molekül enthaltene Peroxygruppe für die antiparasitäre Wirkung dieses Sesquiterpens vom Cadinantyp verantwortlich.

Die *in-vitro*-Wirkung ungesättigter, oxidierter Fettsäuren ist bereits in der Literatur beschrieben worden. Hierbei wurde festgestellt, dass oxidierte Fettsäuren das Wachstum des Parasiten wesentlich stärker hemmen, als die entsprechenden nichtoxidierten Verbindungen (Kumaratilake *et al.*, 1992).

Um die *in-vitro*-Aktivität der traditionellen Teezubereitung der Droge nachweisen zu können wurde aus den oberirdischen Pflanzenteilen von *M. pyrifolia* ein wässriger Auszug hergestellt, der sich jedoch als inaktiv erwies. Der Rückstand wurde auf einer RP-18-Säule fraktioniert. Vier der gewonnenen Fraktionen zeigten eine moderate Hemmwirkung gegenüber *P. falciparum*. Mittels  $^1\text{H-NMR}$ - und MS-Spektren konnten in diesen Fraktionen die Verbindungen **8**, **17** und **25** detektiert werden. Dies zeigt, dass durch die Fraktionierung des antiplasmodial unwirksamen wässrigen Auszuges biologisch aktive Fraktionen erhalten werden können. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass auch in der traditionellen Zubereitungsform der Droge, dem wässrigen Auszug, antiplasmodial wirkende Inhaltsstoffe enthalten sind.

Wie bereits erwähnt, lassen die erhaltenen Ergebnisse vermuten, dass in erster Linie die isolierten aliphatischen Naturstoffe aus *M. pyrifolia* eine antiplasmodiale Aktivität besitzen. Da diese Verbindungen besonders im lipophilen Rohextrakt angereichert sein sollten, wäre dies eine mögliche Erklärung für die Inaktivität des methanolischen Rohextraktes der oberirdischen Pflanzenteile. Die antiplasmodial wirksame 6*E*,10*E*,14*E*-Geranylgeraniol-19-carbonsäure (**17**) wurde aus verschiedenen aktiven Fraktionen von *M. pyrifolia* erhalten bzw. im wässrigen Auszug der Droge detektiert. Aus diesem Grund ist zu vermuten, dass vorrangig Verbindung **17** für die antiprotozoale Wirkung dieser Heilpflanze verantwortlich ist.

Im Rahmen weiterführender Untersuchungen wurde aus 6*E*,10*E*,14*E*-Geranylgeraniol-19-carbonsäure (**17**) durch Umsetzung mit  $\text{LiAlH}_4$  / Diethylether das Partialsynthetikum 19-Hydroxy-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol (**32**) erhalten. Verbindung **32** zeigte eine Hemmwirkung gegenüber *P. falciparum* mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten von 18,6  $\mu\text{M}$  [PoW] und 52,9  $\mu\text{M}$  [Dd2]. Ein Vergleich der  $\text{IC}_{50}$ -Werte der drei Geranylgeraniol-Derivate **17**, **29** und **32** läßt vermuten, dass die antiplasmodiale Aktivität von den Substituenten an Position 1 und 19 abhängig ist. So erwiesen sich die Verbindungen 6*E*,10*E*,14*E*-Geranylgeraniol-19-carbonsäure **17** und 19-Hydroxy-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol **32** als aktiv. Die unpolarste Verbindung 1-Acetyl-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol-19-carbonsäure **29** zeigte dagegen keine Hemmwirkung.

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit ein Synergismus zwischen dem Naturstoff **17** und Chloroquin bzgl. ihrer jeweiligen antiplasmodialen *in-vitro*-Aktivität besteht. Die Ergebnisse zeigten, dass sich in Gegenwart von Chloroquin die antiplasmodiale Hemmwirkung von 6*E*,10*E*,14*E*-Geranylgeraniol-19-carbonsäure (**17**) geringfügig änderte. So konnte bei einer Kombination von **17** und 0,01 µg/ml Chloroquin eine 40%ige bis 50%ige Hemmwirkung über einen größeren Konzentrationsbereich gehalten werden, als bei der reinen Verbindung **17**. Es ist zu vermuten, dass sich 6*E*,10*E*,14*E*-Geranylgeraniol-19-carbonsäure (**17**) und Chloroquin in ihrer jeweiligen *in-vitro*-Aktivität geringfügig synergistisch verhalten. Diese Beobachtung müsste jedoch in weiteren Studien, z.B. mit anderen isolierten Naturstoffen aus *M. pyrifolia*, noch eingehender untersucht werden.

Unter Berücksichtigung der ein- bis zweimonatigen Halbwertszeit von Chloroquin (Mutschler, 1996) können somit möglicherweise auch geringe Konzentrationen von Chloroquin im Blut einen Einfluß auf die antiplasmodiale Wirkung von Pflanzeninhaltsstoffen ausüben. Um den antiplasmodialen Effekt von Heilpflanzen bestätigen zu können, sollte sichergestellt werden, dass die phytotherapeutische Behandlung des Patienten nicht unmittelbar auf eine Chemotherapie erfolgte. Dies sollte auch bei der Durchführung ethnobotanischer Studien berücksichtigt werden, die zum Auffinden antiplasmodial wirkender Heilpflanzen dienen. Somit könnten Pflanzenarten, deren Inhaltsstoffe eine signifikante Hemmung von *P. falciparum* bewirken, eindeutiger evaluiert werden.

Die Gesamtheit der erhaltenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten jedoch daraufhin, dass die antiplasmodiale Eigenschaft von *M. pyrifolia* auf aktive Inhaltsstoffe zurückzuführen ist.

Mit Blick auf zukünftige Untersuchungen wurden für die antiplasmodial aktiven Verbindungen **17**, **20** und **22** mittels Computerkalkulationen die log P-Werte und log D-Werte bestimmt (siehe Kap. 2.6.2.). Für alle drei Inhaltsstoffe lagen die berechneten Daten zwischen 3,0 und 6,0. Diese Werte können als ein Hinweis auf moderate bis gute Absorptionseigenschaften bei einem physiologischen pH-Wert angesehen werden.

Um feststellen zu können, ob die *in-vitro*-Wirkung der aktiven Verbindungen **14**, **17**, **20** und **22** aus *M. pyrifolia* sowie des Partialsynthetikums **32** auf eine spezifische Hemmung von *P. falciparum* oder auf eine allgemeine Zelltoxizität zurückzuführen ist, wurde der

zytotoxische Effekt gegenüber der Endothelzelllinie ECV 304 untersucht. 13-Hydroxy-9Z,15Z,11E-octadecatriensäure (**22**) zeigte keinen zytotoxischen Effekt ( $IC_{50}$ -Wert  $> 680 \mu\text{M}$ ) bei einer um den Faktor vierzehn höheren antiparasitären Wirkung ( $IC_{50}$ -Wert:  $46,6 \mu\text{M}$  gegenüber Dd2). Benzyl-2,6-dimethoxybenzoat (**20**) und das Partialsynthetikum 19-Hydroxy-6E,10E,14E-geranylgeraniol (**32**) besaßen eine geringfügige Zytotoxizität mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $200,2 \mu\text{M}$  für **20** und einem  $IC_{50}$ -Wert von  $143,7 \mu\text{M}$  für **32**. Dabei zeigten beide Verbindungen stärkere antiplasmodiale Hemmwirkungen mit einem  $IC_{50}$ -Wert  $33,1 \mu\text{M}$  gegenüber PoW für **20** und einem  $IC_{50}$ -Wert von  $52,9 \mu\text{M}$  gegenüber Dd2 für **32**. 6E,10E,14E-Geranylgeraniol-19-carbonsäure (**17**) besaß eine moderate zytotoxische Wirkung ( $IC_{50}$ -Wert:  $95,6 \mu\text{M}$ ) bei einer sechsfach höheren antiplasmodialen Aktivität ( $IC_{50}$ -Wert von  $16,3 \mu\text{M}$  gegenüber Dd2). Wie bereits erwähnt, zeigte Linolsäure (**14**) einen stark zytotoxischen Effekt gegenüber der Zelllinie ECV 304 ( $IC_{50}$ -Wert:  $27,2 \mu\text{M}$ ).

Bei der Bewertung dieser Ergebnisse muß berücksichtigt werden, dass auf der Grundlage eines *in-vitro*-Tests der zytotoxische Effekt der Verbindungen nur teilweise bewertet werden kann. Um allgemein die Relevanz von *M. pyrifolia* als Heilpflanze beurteilen zu können, sollten die Extrakte der Droge bzw. Die isolierten Inhaltsstoffe weiteren *in-vitro*-Zytotoxizitätstests (bzw. auch *in-vivo*-Tests) zugeführt werden. Die im Laufe dieser Untersuchungen erhaltenen *in-vitro*-Daten der Rohextrakte und daraus isolierter Verbindungen lassen jedoch vermuten, dass die Droge eine moderate antiplasmodiale Hemmwirkung besitzt. Gleichzeitig wurde für die aktiven Verbindungen eine moderate bis geringfügige Zytotoxizität gegenüber der humanen Endothelzelllinie ECV 304 beobachtet. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse kann jedoch nicht eingeschätzt werden, ob *M. pyrifolia* für eine uneingeschränkte bzw. langfristige Anwendung in der phytotherapeutischen Malariatherapie geeignet ist.

### 3.4 Bedeutung von Heilpflanzen in der traditionellen Malariatherapie

Die Behandlung der Malaria mit traditionellen Heilpflanzen ist in vielen Endemiegebieten weit verbreitet. Auf der Grundlage einer umfangreichen Literaturstudie wurde postuliert, dass sich weltweit ca. ein Viertel der Malariapatienten mit pflanzlichen Drogen selbst behandeln bzw. von einem Phytotherapeuten behandeln lassen (Müller *et al.*, 2001). Hierbei muss berücksichtigt werden, dass in ärmeren, ländlichen Gebieten traditionelle Heilpflanzen meist verfügbar und bezahlbar sind. Da in diesen Regionen der Anteil naturwissenschaftlich orientierter Basisgesundheitsdienste und Krankenhäuser oftmals

gering ist, besitzt die traditionelle Medizin einen hohen Stellenwert. Somit sind Fragen bezüglich der Wirkung und Toxizität der traditionell genutzten Drogen von großer Bedeutung, um deren phytotherapeutische Anwendung bewerten zu können.

Zur Beurteilung der Relevanz dieser Heilpflanzen sind, neben botanischen, ethnopharmakologischen und phytochemischen Studien auch verschiedene pharmakologische, klinische und epidemiologische Untersuchungen wichtig. Zu beachtende Faktoren wären hierbei z.B.:

- die genaue Identifikation der Pflanzenart,
- die Zubereitung, Dosierung und Anwendungsdauer der Droge,
- neben der qualitativen auch eine quantitative Untersuchung der aktiven Inhaltsstoffe
- *in-vitro*- und *in-vivo*-Testung der isolierten biologisch wirkenden Verbindungen
- Untersuchungen von (unerwünschten) Nebenwirkungen und Synergismen
- Umfragen zur Akzeptanz und Verfügbarkeit traditioneller und schulmedizinischer Anti-Malariamittel
- Vorkommen von *P. falciparum* in der Region und auftretende Resistenzerscheinungen.

Hiermit wird deutlich, dass zur Einschätzung von traditionellen pflanzlichen Drogen in der Malariatherapie multidisziplinäre Untersuchungen notwendig sind. Dabei ist ein intensiver, fachübergreifender, internationaler Erfahrungsaustausch zwischen den Wissenschaftlern von großer Bedeutung. Besonders für Arbeitskreise in Entwicklungs- und Schwellenländern stellt hierbei das Internet ein wichtiges Medium zum internationalen Informationsaustausch dar (Angus, 2001).

Eine Vielzahl von ethnopharmakologischen und phytochemischen Studien zur Evaluierung antiplasmodial wirkender Pflanzenarten wurde bereits durchgeführt (Neuwinger, 2000). Es liegen jedoch kaum klinische Studien zu Heilpflanzen gegen Malaria vor. Durch die "Research Initiative on Traditional Antimalarial Methods" (RITAM), die 1999 unter Mitarbeit der WHO gegründet wurde, werden klinische Studien über Heilpflanzen gegen Malaria verstärkt diskutiert (Müller *et al.*, 2001).

Viele der traditionell verwendeten Drogen in der Malariatherapie besitzen nur eine moderate *in-vitro*-Aktivität gegenüber dem Parasiten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 69 Rohextrakte dem antiplasmodialen Testsystem zugeführt, von denen 24 (meist lipophile bzw. methanolische) Rohextrakte eine gute bis moderate *in-vitro*-Wirkung zeigten. Im Laufe der biologischen Fraktionierungen der drei Pflanzenarten *E. mexicanum*, *C. tenuifolia* und *M. pyrifolia* wurden aktive Inhaltsstoffe verschiedener Naturstoffklassen

isoliert. Hierbei war der für die biologische Wirkung der Verbindungen charakteristische  $IC_{50}$ -Wert maximal eine Zehnerpotenz geringer als der  $IC_{50}$ -Wert des entsprechenden Rohextraktes. Als Beispiel wäre *E. mexicanum* zu erwähnen: der lipophile Rohextrakt der Rindendroge besaß einen  $IC_{50}$ -Wert von 11,5 µg/ml [Dd2], für die isolierte Verbindung 4',5,7,8-Tetramethoxy-4-phenylcumarin [O-Methyl-exostemin] wurde ein  $IC_{50}$ -Wert von 1,6 µg/ml [Dd2] ermittelt.

Auch aus der Literatur sind viele Untersuchungen bekannt, in denen die  $IC_{50}$ -Werte der isolierten aktiven Inhaltsstoffe maximal eine Zehnerpotenz geringer sind, als die der Rohextrakte. Beispiele hierfür wären die aktivitätsgeleiteten Fraktionierungen von *Reneilmia cincinnata* (K. SCHUM.) BAK. (Zingiberaceae) (Tchuendem *et al.*, 1999), *Cryptolepis sanguinolenta* (LINDL.) (Periplocaceae) (Paulo *et al.*, 2000), *Alstonia macrophylla* WALL. EX G. DON (Apocynaceae) (Keawpradub *et al.*, 1999) und verschiedener *Uvaria*-Arten (Nkunya *et al.*, 1991).

Es ist zu vermuten, dass Patienten mit einer Semiimmunität gegen Malaria die Symptome der Erkrankung durch Anwendung von Pflanzendrogen mit einer moderaten antiplasmodialen Wirkung behandeln können. Jedoch sollte Risikopatienten (Personen ohne Semiimmunität, z.B. Touristen, Kleinkinder, Schwangere) von einer phytotherapeutischen Behandlung mit Heilpflanzen moderater antiplasmodialer Aktivität abgeraten werden.

### **3.5 Antiplasmodiale Wirkung von monomeren Ergolinen und ihren semi-synthetischen *N,N'*-verknüpften oligomeren Derivaten**

Indolalkaloide vom Ergolin-Typ besitzen eine Vielzahl biologisch-pharmakologischer Wirkungen. Ergoline werden mit unterschiedlicher Affinität an  $\alpha_1$ -adrenerge,  $\alpha_2$ -adrenerge, 5-HT<sub>1</sub>-serotoninerge, 5-HT<sub>2</sub>-serotoninerge, D<sub>1</sub>- und D<sub>2</sub>-dopaminerge Rezeptoren gebunden. Je nach ihrer Struktur, dem betroffenen Organ und dessen Funktionszustand üben sie partiell agonistische oder antagonistische Wirkungen aus.

In der von uns durchgeführten Studie wurde die antiplasmodiale *in-vitro*-Aktivität von monomeren Ergolinen und semi-synthetischen *N,N'*-verknüpften Oligomeren, mit Festuclavin, Tergurid und Pergolid als Monomer, bestimmt. Ziel dabei war es, Struktur-Wirkungs-Beziehungen festzustellen und die Verbindungen zu evaluieren, die eine spezifische Hemmung gegenüber *P. falciparum* zeigten.



In früheren Untersuchungen konnte bereits festgestellt werden, dass Festuclavin und die semi-synthetischen Festuclavinderivate 1-Methylfestuclavin, 1-Allylfestuclavin, 1-Propylfestuclavin und 1-Hydroxymethylfestuclavin eine Hemmwirkung gegenüber *P. falciparum* besitzen. Die  $IC_{50}$ -Werte der getesteten Verbindungen lagen zwischen 4,2  $\mu\text{M}$  [Dd2] und 23,5  $\mu\text{M}$  [PoW] (Köhler *et al.*, 2000). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse sollte nun ermittelt werden, inwieweit eine Oligomerisierung von Ergolinderivaten durch *N*-1,*N*-1'- bzw. *N*-6,*N*-6'- oder *N*-1,*N*-6'-Verknüpfung zu einer Erhöhung der antiplasmodialen Aktivität führt.

Im vorliegenden Testsystem zeigten die drei Monomere Festuclavin (**2**) und Pergolid (**3**) nur eine geringe antiplasmodiale Wirkung mit  $IC_{50}$ -Werten im Bereich von 8,80  $\mu\text{M}$  [PoW] bis 14,90  $\mu\text{M}$  [Dd2]. Tergurid (**1**) erwies sich als inaktiv gegenüber dem Parasiten. Interessanterweise führte die Dimerisierung von **1**, **2** und **3** zu einer Erhöhung der antiplasmodialen Aktivität. Vermutlich führt ein kurzer aliphatischer Linker, wie bei **1a** oder **2a**, zu Dimeren mit einer moderaten Hemmwirkung mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen 0,95  $\mu\text{M}$  [Dd2] und 3,90  $\mu\text{M}$  [PoW]. Zu einer weiteren Erhöhung der Aktivität gegenüber *P. falciparum* scheinen Verbindungen mit aliphatischen Linkern mit sechs C-Atomen zu führen (z.B. **1b** oder **2b**). Eine gute Hemmwirkung wurde auch für das Festuclavintrimer **2f**, ein Ergolinoligomer mit einem aromatischen Linker ( $IC_{50}$ -Wert: 0,43  $\mu\text{M}$  [PoW], 0,75  $\mu\text{M}$  [Dd2]) beobachtet. Die höchste Hemmwirkung gegenüber *P. falciparum* besaß das *N*-6,*N*-6'-verknüpfte Dimer **3i** mit Depropylpergolid als Monomer ( $IC_{50}$ -Wert: 0,14  $\mu\text{M}$  [PoW], 0,13  $\mu\text{M}$  [Dd2]).

In einer weiteren Untersuchung wurden die Verbindungen evaluiert, bei denen die erhöhte Wirkung gegenüber dem Parasiten mit einer verminderten Zytotoxizität einhergeht. Hierzu wurde der zytotoxische Effekt der getesteten monomeren Ergoline und den semi-synthetischen *N,N'*-verknüpften Ergolin-Oligomeren an der murinen Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 untersucht. In diesem *in-vitro*-Zytotoxizitätstest zeigten Tergurid (**1**) und die *N*-1,*N*-1'-substituierten Terguriddimere **1c**, **1d** und **1e** eine moderate zytotoxische Wirkung mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen 15,7  $\mu\text{M}$  und 50,1  $\mu\text{M}$ . Festuclavin **2** und Pergolid **3** sowie die *N*-1, *N*-1'-verknüpften Ergolinoligomere **1a**, **1f**, **1g**, **1h**, **2f**, **2h** und das *N*-1,*N*-6'-verknüpfte Dimer **3k** erwiesen sich als nicht zytotoxisch mit  $IC_{50}$ -Werten  $> 100 \mu\text{M}$ . Alle anderen Verbindungen zeigten sich als hoch zytotoxisch wirkend mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen 0,1  $\mu\text{M}$  und 2,7  $\mu\text{M}$ . Im Hinblick auf zukünftige Untersuchungen zur

Evaluierung antiplasmodial wirkender semi-synthetischer  $N,N'$ -verknüpfter Ergolinoligomere wären die Verbindungen **1g** und **2f** von Interesse. Das  $N-1,N-1'$ -verknüpfte Tergurid-Tetramer **1g** besaß keine zytotoxische Wirkung an der Zelllinie NIH 3T3 und zeigte gleichzeitig eine moderate antiplasmodiale Aktivität ( $IC_{50}$ -Werte: 0,84  $\mu$ M [PoW] und 1,53  $\mu$ M [Dd2]). Das nicht zytotoxisch wirkende  $N-1,N-1'$ -substituierte Festuclavin-Trimer **2f** wies eine vergleichbare antiparasitäre Hemmwirkung auf ( $IC_{50}$ -Werte: 0,75  $\mu$ M [PoW] und 0,54  $\mu$ M [Dd2]).

Inwieweit diese Verbindungen als Leitstrukturen für neue Anti-Malariamittel von Bedeutung sind, sollte nur unter Berücksichtigung weiterer *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen beurteilt werden. Besonders am Beispiel von Festuclavin wird deutlich, dass eine Aussage bzgl. der Zytotoxizität nicht anhand der Ergebnisse eines Tests möglich ist. Im Rahmen unserer Untersuchung an der murinen Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 erwies sich Festuclavin **2** als nicht zytotoxisch, jedoch wurde eine zytostatische Wirkung im L 5178y-Mäuse lymphom-Zellsystem für diese Verbindung nachgewiesen (Eich *et al.*, 1984).

### 3.6 Ausblick

Im Hinblick auf zukünftige Untersuchungen an pflanzlichen Drogen der traditionellen Malariatherapie sollte berücksichtigt werden, dass auch entzündungshemmende und fiebersenkende Zubereitungen therapeutisch relevant sein können. Um das Wirkprofil der zu untersuchenden Pflanzenart evaluieren zu können, sollten die jeweiligen Rohextrakte bzw. isolierte Verbindungen neben antiplasmodialen Testsystemen und Zytotoxizitätstest auch antiphlogistischen Testmodellen zugeführt werden.

Aus den aktiven Fraktionen von *Exostema mexicanum* GRAY (Rubiaceae) wurden im Laufe dieser Untersuchung ausschließlich 4-Phenylcumarine isoliert. Da in den biologisch inaktiven Fraktionen weitere 4-Phenylcumarine enthalten sein können, sollte die phytochemische Aufarbeitung dieser Fraktionen angestrebt werden. Es ist zu vermuten, dass auch glykosidisch verknüpfte 4-Phenylcumarine aus diesen hydrophileren Fraktionen isoliert werden können. Es wäre von Interesse, ob diese 4-Phenylcumaringlykoside auch eine biologische Wirkung besitzen, oder ob nur die Aglyka aktiv sind. Da diese Naturstoffe in ihren biologischen Eigenschaften bisher kaum charakterisiert wurden, sollten die erhaltenen 4-Phenylcumarine weiteren biologischen Testsystemen zugeführt werden. So wären *in-vivo*-Studien zur Metabolisierung dieser Verbindungen von Interesse, um die

Bedeutung der 4-Phenylcumarine als biogene Arzneistoffe beurteilen zu können. Weiterhin sollte die zytotoxische Wirkung von 4-Phenylcumarinen gegenüber weiteren Zelllinien untersucht werden. Von Verbindungen mit einer geringfügigen zytotoxischen *in-vitro*-Wirkung sollten die entsprechenden *in-vivo*-Werte ermittelt werden. Nur aus der Gesamtheit dieser Daten kann die Relevanz von *E. mexicanum* als traditionelle Heilpflanze bewertet werden.

Aufgrund der geringen Menge an Pflanzenmaterial war die Zubereitung eines wässrigen Auszuges der Rindendroge sowie dessen phytochemische Aufarbeitung nicht möglich. Unter Beachtung der Untersuchungen von wässrigen Auszügen der Drogen *C. tenuifolia* und *M. pyrifolia* sollte überprüft werden, ob durch eine Fraktionierung des inaktiven wässrigen Rückstandes von *E. mexicanum* biologisch aktive Fraktionen erhalten werden und welche Inhaltsstoffe dafür verantwortlich sein könnten.

Die Untersuchungen an *Calea tenuifolia* KUNTH (Asteraceae) zeigten, dass ubiquitäre Naturstoffe, wie z.B. Flavone und Fettsäuren, eine moderate Hemmwirkung gegenüber *P. falciparum* besitzen. Die weiterführenden Untersuchungen an Flavonoiddrogen (Birkenblätter und Orthosiphonblätter) deuteten ebenfalls daraufhin, dass enthaltene Flavone für die antiplasmodiale Aktivität der Drogen verantwortlich sind. Es wäre somit sinnvoll, im Rahmen eines Screeningprogrammes eine Vielzahl von Flavonen auf ihre antiplasmodiale Wirkung hin zu testen und Struktur-Wirkungsbeziehungen zu untersuchen. Desweiteren sollten diese Naturstoffe mehreren *in-vitro*-Zytotoxizitätstests (bzw. auch *in-vivo*-Tests) zugeführt werden, um deren zytotoxisches Potential besser beurteilen zu können. Zusätzlich sollten auch Metabolisierungsstudien dieser Verbindungen durchgeführt werden, um die biologische Wirkung der Flavone in Bezug auf ihre Bioverfügbarkeit bewerten zu können. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse könnte die Relevanz von flavonhaltigen Drogen, die in der phytotherapeutischen Malariatherapie verwendet werden, zu einem früheren Zeitpunkt der phytochemischen Untersuchung der jeweiligen Pflanzenart bewertet werden.

In den oberirdischen Pflanzenteilen von *Microglossa pyrifolia* (LAM.) KUNTZE (Asteraceae) scheinen neben den in dieser Arbeit isolierten Furanoditerpenen und Geranylgeraniolderivaten noch weitere Verbindungen mit ähnlichen Molekülgrundstrukturen enthalten zu sein. Die Isolierung dieser Naturstoffe war im Rahmen unserer Untersuchung aufgrund der geringen Menge an Pflanzenmaterial nicht realisierbar. Da von Bohlmann

und Mitarbeitern bereits zahlreiche Asteraceen–Arten phytochemisch untersucht wurden, wären im Hinblick auf zukünftige Arbeiten an *M. pyrifolia* aktivitätsgeleitete Fraktionierungen auf anderen Gebieten (z.B. in Bezug auf eine analgetische Wirkung) von Interesse. Diese könnten zum Auffinden neuer aktiver Naturstoffe führen und somit die Bedeutung der traditionellen Heilpflanze in der Phytotherapie Westafrikas bestätigen.