

Aus dem  
Institut für Medizinische Mikrobiologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Direktor: Prof. Dr. Dr. A.S. Kekulé

**Neue antiparasitäre Substanzen  
mit Wirkung auf humanpathogene Protozoen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von  
Anke Häring  
geboren am 10.06.1974 in Hagen/ Westfalen

Gutachter:

1. Prof. Dr. A. Kekulé
2. Prof. Dr. Ockert
3. Prof. Dr. Rodloff (Leipzig)

eingereicht am: 18.05.2004, verteidigt am: 10.02.2005

**urn:nbn:de:gbv:3-000008513**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008513>]

## Kurzreferat

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Antidesmon, einem neuartigen pflanzlichen Alkaloid, auf humanpathogene Protozoen *in vitro* getestet. Dabei wurde eine bisher unbekannte Wirkung auf *Trypanosoma cruzi*, den Erreger der Chagas-Krankheit, gefunden. Antidesmon war gegen *T. cruzi* wirksamer als das Standardmedikament Benznidazol. Der IC50-Wert (der die Substanzkonzentration angibt, bei der das Parasitenwachstum auf die Hälfte reduziert wird) betrug 0,04 µg/ml für Antidesmon und 0,6 µg/ml für Benznidazol. Antidesmon zeigte keine wesentliche Wirkung *in vitro* gegen zwei andere pathogene Trypanosomenspezies, *T. brucei rhodesiense* und *T. evansi*. Die Bioaktivität des Antidesmons ist für *T. cruzi* spezifisch. Um diese für einen Naturstoff ungewöhnlich hohe Aktivität genauer zu untersuchen, wurden sieben neu synthetisierte Antidesmon-Derivate sowie zwei natürliche Derivate vergleichend mit Antidesmon und einer Referenzsubstanz auf ihre Aktivität untersucht. Das Derivat AdOMeb wirkte in einer 90fach niedrigeren Konzentration als Benznidazol auf *T. cruzi* und übertraf mit einem IC50-Wert von 0,007 µg/ml die Wirksamkeit der Muttersubstanz Antidesmon. Zwei weitere Derivate, AdOL und AdAc, wirkten ebenfalls in niedrigerer Konzentration als Benznidazol. Es konnte ausgeschlossen werden, daß die Aktivität der Substanzen auf einer Schädigung der murinen Wirtszellen der Parasiten beruht. Für Antidesmon und AdOMeb ergaben sich hohe Werte für den Selektivitätsindex, ein Hinweis auf eine spezifische antiparasitäre Wirkung. Gegen *Leishmania donovani*, einen Erreger der viszeralen Leishmaniose, zeigten lediglich Antidesmon und AdOMeb schwache Wirksamkeit. Die Zytotoxizitätsprüfung mit den Wirtszellen der Leishmanien ergab, dass die Wirkung von Antidesmon auf diese Parasiten eher auf allgemeiner als auf spezifischer Toxizität beruht; bei AdOMeb dagegen ist eine spezifische Aktivität anzunehmen. Keine der Testsubstanzen erwies sich als aktiv gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum*. Im Zytotoxizitätstest mit humanen und murinen Zelllinien lag die Toxizität von Antidesmon zwischen der für Benznidazol und Mefloquin. Vorbereitend für Versuche an *T. cruzi*-infizierten Mäusen wurde in einem *in-vivo*-Experiment an gesunden Mäusen die höchste tolerierte Dosis von Antidesmon bei i.p.-Applikation mit 20 mg/kg festgestellt.

Weltweit sind etwa 16-18 Millionen Menschen mit *T. cruzi* infiziert. Bis heute existiert keine befriedigende Therapiemöglichkeit für die Chagaskrankheit. Mit Antidesmon wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Leitstruktur zur Entwicklung dringend benötigter Medikamente gegen *T. cruzi* gefunden. Der Wirkungsmechanismus von Antidesmon ist noch unklar, da es sich um eine neue Substanzklasse mit antiparasitärer Wirkung handelt. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Aktivität des Alkaloids spezifisch für *T. cruzi* ist und nicht auf allgemeiner Toxizität beruht. Durch N-Methylierung am ersten Ring des Bicyclus konnte die Wirksamkeit der Muttersubstanz um das Fünffache gesteigert werden; gleichzeitig verringerte sich die Toxizität für Säugetierzellen. Für die antiparasitäre Wirkung von Antidesmon und seinen Derivaten wurde in Deutschland und international ein Patent erteilt.

## Bibliographische Angaben

Häring, Anke: Neue antiparasitäre Substanzen mit Wirkung auf humanpathogene Protozoen  
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2004

## Gliederung

	Seite
<b>1 Einleitung und Zielstellung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Charakterisierung der untersuchten Substanz: Antidesmon</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Charakterisierung der untersuchten Krankheitserreger</b>	<b>3</b>
1.2.1 Familie der <i>Trypanosomatidae</i>	4
1.2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.2.3 <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	8
1.2.4 <i>Trypanosoma evansi</i>	9
1.2.5 <i>Leishmania donovani</i>	10
1.2.6 <i>Plasmodium falciparum</i>	11
<b>2 Ergebnisse</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Validierung der Testmethoden</b>	<b>12</b>
2.1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
2.1.2 <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> und <i>Trypanosoma evansi</i>	13
2.1.3 <i>Leishmania donovani</i>	14
2.1.4 <i>Plasmodium falciparum</i>	14
2.1.5 Zytotoxizitätstests	17
<b>2.2 Bioaktivitätsuntersuchungen</b>	<b>17</b>
2.2.1 Wirkung von Antidesmon auf <i>T. cruzi</i>	18
2.2.2 Wirkung von Antidesmon auf <i>T. b. rhodesiense</i> und <i>T. evansi</i>	20
2.2.3 Synthese und Struktur der Antidesmon-Derivate	23
2.2.4 Wirkung der Antidesmon-Derivate auf <i>T. cruzi</i>	25
2.2.5 Selektivitätsindices von Antidesmon und seinen Derivaten für <i>T. cruzi</i>	34
2.2.6 Wirkung von Antidesmon und seinen Derivaten auf <i>L. donovani</i>	36
2.2.7 Selektivitätsindices von Antidesmon und seinen Derivaten für <i>L. donovani</i>	41
2.2.8 Wirkung von Antidesmon und seinen Derivaten auf <i>P. falciparum</i>	43
2.2.9 Toxizitätsprüfung von Antidesmon <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	46
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>50</b>
<b>3.1 Protozoen und Zelllinien</b>	<b>50</b>
<b>3.2 Materialien</b>	<b>50</b>
3.2.1 Medien	52
3.2.2 Weitere Lösungen	53
3.2.3 Testsubstanz-Stammlösungen	54

<b>3.3</b>	<b>Testmethoden</b>	<b>54</b>
3.3.1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	54
3.3.2	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> und <i>Trypanosoma evansi</i>	55
3.3.3	<i>Leishmania donovani</i>	56
3.3.4	<i>Plasmodium falciparum</i>	57
3.3.5	Toxizitätsprüfung <i>in vitro</i>	58
3.3.6	Toxizitätsprüfung <i>in vivo</i>	59
3.3.7	Berechnung der IC50-Werte und statistische Auswertung	60
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>Thesen</b>	<b>80</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Anfangskonzentration
IC50	50% inhibitorische Konzentration
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Konz.	Konzentration
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuche
n.e.	nicht ermittelbar
n.u.	nicht untersucht
%NIZ	% nichtinfizierte Zellen
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
SI	Selektivitätsindex
STI	Schweizer Tropeninstitut
<i>T. b. rhodesiense</i>	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. evansi</i>	<i>Trypanosoma evansi</i>
TR	Trypanothionreduktase
$\sigma$	Standardabweichung