

3 Material und Methoden

3.1 Protozoen und Zelllinien

Plasmodium falciparum: *P. falciparum* NF 54 (keine Resistenz vorhanden), an Permanentkultur adaptiert im STI Basel, isoliert von T. Ponnudurai (Kayser et al 2001); *P. falciparum* K1 (chloroquin- und pyrimethaminresistent), an Permanentkultur adaptiert im STI Basel, isoliert durch S. Thaithong, China (Kayser et al 2001)

Trypanosoma cruzi: *T. cruzi* (Tulahuen-Stamm), transfiziert mit β -Galactosidase-Gen aus *Escherischia coli*, erhalten von Dr. F. S. Buckner, University of Washington, Seattle (Buckner et al 1996)

Trypanosoma brucei rhodesiense: *T. brucei rhodesiense* STIB 900, 1982 isoliert aus einem Patienten in Tansania, an axenische Permanentkultur adaptiert im STI Basel nach 22 Maus- und einer Fliegenpassage (Kaminsky et al 1996)

Trypanosoma evansi: *T. evansi* STIB 806 DKC, isoliert durch Jin Hua, China, an axenische Permanentkultur adaptiert im STI Basel nach einer Mauspassage (Kaminsky et al 1996)

Leishmania donovani: *L. donovani* MHOM/ET/67/HU3, an axenische Permanentkultur adaptiert im STI Basel (Blaxter et al 1988)

Säugetierzellen:

- L-6 (Myofibroblasten, Ratte)
- Makrophagen (Maus)
- Neuro-2a (Neuroblastom, Maus)

Humane Zelllinien:

- HT29 (kolorektales Adenokarzinom)
- MRC-5 (Lungenfibroblasten)
- Hep G2 (hepatozelluläres Karzinom)

Säugetiere:

- CD1-Mäuse (weiblich)

3.2 Materialien

Referenzmedikamente

- Radanil (Benznidazol), Hoffmann-LaRoche, Basel, CH
- Pentostam (Natriumstibogluconat), Wellcome, UK
- Arsobal (Melarsoprol), Specia, Paris, F
- Chloroquin (Chloroquindiphosphat), Sigma-Aldrich, CH
- Lariam (Mefloquin), Hoffmann-LaRoche, Basel, CH

Chemikalien und Lösungen

- Alamar Blue-Fluoreszenzfarbstoff (Trinova Biochem, Giessen, D)
- Albu max Rinderserumalbumin (Life Tech)

- Betaplate Szintillationsflüssigkeit (Wallac)
- Chlorophenolrot- β -Galactopyranosid CPRG (Böhringer, Mannheim)
- Dimethylsulfoxid DMSO
- Erythrozytenkonzentrat Blutgruppe A, rhesuspositiv (Blutspendezentrum Basel)
- Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert (Life Tech)
- Glutaminlsg. 200 mM/100 ml (Life Tech)
- ^3H -Hypoxanthin (Amersham Pharmacia Biotech, UK)
- HEPES (Life Tech)
- Giemsa-Stammlösung
- MEM Minimum Essential Medium Eagle
- Mercaptoethanol
- Neomycin-Lsg. 10000 U/ml (Life Tech)
- Phenolrot
- Phosphatgepufferte Salzlösung PBS (Life Tech)
- Pferdeserum, hitzeinaktiviert
- RPMI 1640 (Life Tech)
- Titriplex III EDTA
- Trypanblau (Chroma- Gesellschaft Schmidt u. Co)
- Trypsin

Hersteller: Life Tech, Karlsruhe, D; Bioconcept, Allschwil, CH ; Wallac, UK

Substanzen ohne Herstellerangabe wurden bezogen von: Fluka Chemie AG, Buchs, CH; Merck KGaA, Darmstadt, D; Sigma, Buchs, CH

Sonstiges Material

- Betaplate-Zellharvester (Wallac)
- Betaplate-Szintillationscounter (Wallac)
- Cytofluor-2300-Fluoreszenzreader (Millipore)
- Eppendorftubes (Eppendorf)
- 16-Kammer-Objektträger (LabTec)
- 96-Well-Mikrotiterplatten (Costar)
- 20-ml-Petrischalen (Falcon)
- 24-Well-Zellkulturcluster (Falcon)
- 25-ml-Zellkulturflaschen (Falcon)

Hersteller:

Falcon Becton-Dickinson, Basel, CH; Costar Corning Inc., NY, USA

Fotos mit Leica DC 20 Digitalkamera, Fluoreszenzfarbstoff: Acridinorange

Computerprogramme: Microsoft Office 97: Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft Photo Editor. Statistik: SPSS.

3.2.1 Medien

Kulturmedium für P. falciparum:

- 50 mg Hypoxanthin
- 5,94 g HEPES
- 10,44 g RPMI 1640 mit L-Glutamin, ohne NaHCO₃
- 5 g Albu max

Aqua dest. ad 1000 ml

Sterilfiltrieren, bei 4°C aufbewahren, vor Gebrauch versetzen mit

- 42 ml NaHCO₃-Lsg. 5%
- 10 ml Neomycin-Lsg. 10000 UG/ml

Screeningmedium für P. falciparum:

- Kulturmedium ohne Hypoxanthin

Waschmedium für P. falciparum

- Kulturmedium ohne Hypoxanthin und Albu max

Erythrozytensuspension für P. falciparum

- Erythrozytenkonzentrat Blutgruppe A, rhesuspositiv
- Waschmedium, Screeningmedium

Je 30 ml des Konzentrates in 50-ml-Tubes bei 2000 rpm 10 min abzentrifugieren. Plasma und Leukozyten absaugen, mit Waschmedium auf je 50 ml auffüllen. Resuspendieren, zentrifugieren wie zuvor, Überstand absaugen. Waschen zwei- bis dreimal wiederholen.

Pellet 1:1 mit Screeningmedium auffüllen, bei 4°C max. 7 Tage aufbewahren

Kultur- und Screeningmedium für T. cruzi und L-6-Myofibroblasten

- 100 ml hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum
- 8,5 ml Glutamin-Log. (200mM)

RPMI 1640 ad 1000ml. Bei 4°C aufbewahren.

Kulturmedium für L. donovani

- 500 ml SDM-Medium (Brun und Schöneberger 1979)
- 500 ml SM-Medium (Cunningham 1977)

Mit 4 N NaOH auf pH 5,4 einstellen

Screeningmedium für L. donovani, Makrophagen und HepG2

- 100 ml hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum

RPMI 1640 ad 1000 ml. Bei 4°C aufbewahren.

Screening- und Kulturmedium für HT29, MRC-5, Neuro-2a

- 100 ml FCS

MEM ad 1000 ml. Bei 4°C aufbewahren.

Screening- und Kulturmedium für T. evansi und T. b. rhodesiense

- 150 ml hitzeinaktiviertes Pferdeserum

- 10 ml Mercaptoethanol-Lösung (14 µl Mercaptoethanol in 10 ml H₂O)
- 10 ml Baltz'-Lösung

MEM ad 1000 ml. Bei 4°C aufbewahren

3.2.2 Weitere Lösungen

CPRG-Lösung

- 15,19 mg CPRG
- 250 µl Nonidet P40
- 100 ml PBS

Sterilfiltrieren, bei 4°C im Dunkeln aufbewahren

Earle's Balanced Salt Solution EBBS

- 0,4 g KCl
- 6,8 g NaCl
- 2,2 g NaHCO₃
- 0,14 g NaH₂PO₄·H₂O
- 1 g Glucose
- 0,01 g Phenolrot

Aqua dest ad 1000 ml. Sterilfiltrieren und portioniert bei –20°C lagern.

Giemsa-Lösung

- 20 ml Giemsa-Stammlösung 8%
- 220 ml Puffer (4,2 g KH₂PO₄, 10 g NaH₂PO₄, Aqua dest. ad 10 l)

Trypsinlösung

- 8 g NaCl
- 0,4 g KCl
- 0,35 g NaHCO₃
- 1 g Glucose
- 1g Phenolrot

Aqua dest ad 1000 ml, Zugabe von

- 200 mg Titriplex III (EDTA)
- 500 mg Trypsin

Mit 1 N NaOH auf pH 7,7 einstellen, sterilfiltrieren und bei –20°C lagern

Baltz'-Lösung

- 6,8 g Hypoxanthin

In 1N NaOH lösen.

- 11g Na-Pyruvat

Aqua dest. ad 100 ml. Sterilfiltrieren und bei –20°C aufbewahren.

3.2.3 Testsubstanz-Stammlösungen

Für alle Tests wurden Stammlösungen des Antidesmons, seiner Derivate und der Referenzsubstanzen zu 10 mg/ml in DMSO hergestellt. Deferiprone wurde in 10% Ethanol gelöst. Die Stammlösungen wurden in Eppendorftubes bei -20°C gelagert und für jeden Testansatz neue Verdünnungen in dem jeweiligen Medium hergestellt.

3.3 Testmethoden

3.3.1 *Trypanosoma cruzi*

Kultivierung

Die Kultivierung der Parasiten erfolgte in 25-ml-Zellkulturflaschen mit einer L-6-Myofibroblasten-Zellschicht als Wirtszellen. Die Inkubation sowohl der Kulturen als auch der Testansätze fand im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 in angefeuchteter Luft statt. Dreimal wöchentlich wurden die Kulturen mikroskopisch kontrolliert, das Medium gewechselt und mit 1-3 ml des Mediums (je nach Parasitendichte) eine neue L-6-Zelllage infiziert. Überwogen die Epimastigoten in der Kultur, wurde sie verworfen.

Testmethode (nach Buckner et al. 1997)

Am ersten Tag des Versuchs erfolgte die Aussaat der Wirtszellen auf der Testplatte. Dazu wurde aus einer L-6-Zellkulturflasche das Medium entfernt und mit EBBS gespült. Die Zellen wurden trypsinisiert und in Kulturmedium resuspendiert, anschließend mit Trypanblau-Lösung 0,9% in PBS angefärbt und die Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde mit Medium auf eine Dichte von 2×10^3 Zellen/ml verdünnt und je 100 μl in jede Vertiefung einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben (Abb. 38). Es folgte eine Inkubation für 24 Stunden. Dann wurde das Medium aus einer Zellkulturflasche mit Trypanosomen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, entfernt und dessen Parasitendichte, mit der gleichen Methode wie bei den L-6-Zellen beschrieben, bestimmt sowie auf 5×10^3 Trypanosomen/ml eingestellt. Hierauf folgte das Einbringen von je 50 μl der Suspension in alle Vertiefungen der inkubierten Mikrotiterplatte bis auf die der Reihen 3,6,9, und 12. Diese blieben parasitenfrei und dienten als Negativ- und Hintergrundkontrolle. Es schloss sich eine Inkubation für 48 Stunden an. Am vierten Tag wurde das Medium aus allen Vertiefungen entfernt und in die Reihen A-G der Platte frisches Kulturmedium gegeben. Die Testsubstanz-Stammlösungen wurden mit Kulturmedium auf die gewünschte Anfangskonzentration (AK) verdünnt und je 150 μl einer Verdünnung in drei nebeneinander liegende Vertiefungen der Reihe H gegeben. Aus der letzten Reihe wurden mit einer Zwölf-Schacht-Serienpipette jeder Kammer 50 μl entnommen und in Reihe G gegeben, gut gemischt und wiederum 50 μl aus Reihe G in Reihe F eingebracht. So wurde bis zu der Reihe C verfahren und die restlichen 50 μl verworfen. Es ergab sich eine Serienverdünnung von 1:3 von Reihe H bis Reihe C. A und B blieben frei von Testsubstanz und dienten als Kontrolle. Auf diese

Weise konnten pro Platte vier Substanzen im Parallelansatz und in je sechs Konzentrationen untersucht werden.

	A	B	C	D	E	F	G	H
	Kein Med.		1/ 243 AK	1/81 AK	1/27 AK	1/9 AK	1/3 AK	AK
<i>T. cruzi</i> + L-6	Positiv-Kontrolle							1
								2
L-6	Negativ-Kontrolle							3
<i>T. cruzi</i> + L-6 ...								4 ...

Abbildung 38: Schema der Mikrotiterplatten-Aufteilung im *T. cruzi*-Assay (AK= Anfangskonzentration)

Nach einer 72stündigen Inkubation wurde die Platte unter einem Umkehrmikroskop bei 200facher Vergrößerung betrachtet, um eventuelle zytotoxische Effekte der Medikamente auf die Wirtszellen in den Kontrollreihen ohne Parasiten festzustellen, die das Versuchsergebnis verfälschen könnten.

Auswertung

Jede Vertiefung erhielt anschließend 50 µl der CPRG- Lösung, des Substrats für die Farbreaktion. Nach 2-6 Stunden Inkubationszeit konnte die Intensität der Reaktion als Extinktion bei 540 nm mit dem Elisa-Reader abgelesen werden. Die Daten wurden in Excel-Format konvertiert und mit Hilfe von Excel als Hemmkurven in halblogarithmischer Auftragung dargestellt. Hierzu wurden für jede Substanz die Intensitätswerte der Parallelansätze gemittelt. Der Extinktionswert der Negativkontrolle für die entsprechende Substanzkonzentration wurde von diesem Mittel abgezogen. Das Mittel der Positivkontrolle wurde als 100prozentiges Wachstum definiert und alle anderen Werte dazu in Bezug gesetzt.

3.3.2 *Trypanosoma brucei rhodesiense* und *Trypanosoma evansi*

Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte in 24-Well-Platten in jeweils 4 Parasitenkonzentrationen zu je 1 ml in oben erwähntem Kulturmedium. Die Inkubation sowohl der Kulturen als auch der Testansätze fand im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in angefeuchteter Luft statt.

Dreimal pro Woche wurden Trypanosomen in der logarithmischen Wachstumsphase den Wells entnommen und vier neue Verdünnungen (in Zehnerschritten) in frischem Medium hergestellt.

Testmethode (nach Rüz et al. 1997)

In jede Vertiefung eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 50 µl Medium gegeben, Zeile H blieb frei. Jeweils drei nebeneinander liegende Vertiefungen dieser Zeile erhielten 100 µl Medium mit der doppelten Startkonzentration einer Substanz. Mit 50 µl aus der letzten Zeile wurden Serienverdünnungen von 1:2 bis zur Zeile C angefertigt. Die Zeilen A und B dienten als Kontrolle ohne Testsubstanz. Auf diese Weise konnten vier Substanzen pro Platte in sechs Konzentrationen und im Parallelansatz getestet werden. In die Reihen 3,6,9 und 12 wurde anschließend 50 µl

Medium ohne Trypanosomen gegeben. Diese Reihen dienten als Hintergrundkontrolle ohne Parasiten. Die übrigen Reihen erhielten 50 µl einer Trypanosomensuspension in Medium pro Vertiefung; die Parasitenkonzentration wurde bei *T. b. rhodesiense* auf 4×10^4 /ml, bei *T. evansi* auf 2×10^4 /ml eingestellt. Es folgte eine Inkubation für 72 Stunden.

Auswertung

Nach der Inkubation erhielt jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 10 µl des Fluoreszenzfarbstoffs Alamar Blue. Es folgte eine Inkubation für 2 Stunden. Anschließend wurde die Platte in einem Fluoreszenzreader bei 530 nm Exzitation und 590 nm Emission gelesen, die Daten in Excel-Format konvertiert und mit Hilfe von Excel die IC50 bestimmt.

3.3.3 *Leishmania donovani*

Kultivierung

Die Kultivierung der Parasiten erfolgte axenisch in der amastigoten Form mit oben erwähntem Medium in Zellkulturflaschen. Kulturen und Testansätze wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dreimal wöchentlich wurde das Medium der laufenden Kulturen gewechselt und bei Bedarf die Kulturen verdünnt.

Testmethode (nach Neal und Croft 1984)

Als Wirtszellen dienten Makrophagen aus CD1-Mäusen. Die Zellen wurden durch peritoneale Waschung mit 5 ml Screeningmedium aus einer zuvor getöteten Maus gewonnen, der am vorhergehenden Tag eine sterile zweiprozentige Stärkelösung in destilliertem Wasser intraperitoneal gespritzt wurde. Die Spülflüssigkeit wurde bei 1500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Bodensatz anschließend in 5 ml frischem Medium aufgenommen. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte nach Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer. Die Suspension wurde auf eine Konzentration von 4×10^5 Zellen/ml verdünnt. Je 100 µl dieser Suspension wurde in die Kammern eines 16-Kammer-Objektträgers gegeben und anschließend für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde die Zelldichte einer axenischen Amastigotenkultur mit Hilfe eines Zellzählautomaten (Casy Counter) bestimmt und mit Screeningmedium auf $1,2 \times 10^6$ Flagellaten/ml eingestellt. Jede Kammer des Objektträgers erhielt 100 µl der Leishmaniensuspension. Nach 4 - 6 Stunden Inkubation wurde die Flüssigkeit aus allen Kammern abgesaugt und durch 200 µl frisches Medium ersetzt. Es folgte eine erneute 24stündige Inkubation, nach der das Medium wieder entfernt und durch 200 µl frisches ersetzt wurde. Die Testsubstanz-Stammlösungen wurden mit Screeningmedium auf ein Dreifaches der gewünschten Anfangskonzentration (AK) verdünnt. Je zwei Kammern der Reihe A des Objektträgers erhielten 100 µl einer Verdünnung (Abb. 39). Vier Kammern blieben ohne Medikament und dienten als Positivkontrolle. Mit einer Serienpipette wurde nun allen Kammern der Reihe A 100 µl entnommen und in die Reihe B gegeben. Es ergab sich eine Weiterverdünnung auf ein Drittel der Anfangskonzentration. Auf diese Weise konnten drei Substanzen pro Objektträger in zwei

Verdünnungen und im Parallelansatz getestet werden. Zeigten Substanzen im ersten Versuch Aktivität, so wurde der Versuch mit vier Verdünnungen im Parallelansatz wiederholt. Jeder Testansatz wurde 96 Stunden inkubiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Referenz-Substanz		Testsubstanz 1		Testsubstanz 2		Positiv-Kontrolle	
A	AK							
B	1/3 AK							

Abbildung 39: Schema der Objektträger-Aufteilung im *L.-donovani*-Assay

Nach dieser Zeit wurde das Medium abgesaugt, die Kammern des Objektträgers entfernt und dieser mit reinem Ethanol fixiert und anschließend mit Giemsa-Lösung gefärbt.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch mit einem 50fach-Immersionöl-Objektiv. Hierbei wurden zunächst in dem Positivkontrollfeld etwa 200 Makrophagen ausgezählt und das Verhältnis von infizierten zu nichtinfizierten Zellen bestimmt. Dieser Prozentsatz diente als Bezugswert für die Hemmwirkung der getesteten Substanzen. Mit den Feldern, in denen die Leishmanien den Testsubstanzen ausgesetzt waren, wurde ebenso verfahren. Neben der Ermittlung der Verhältnisse von infizierten zu uninfizierten Makrophagen wurde nach morphologischen Veränderungen der Makrophagen als Zeichen eventueller zytotoxischer Wirkung der Substanz gesucht. Die prozentuale Hemmung im Parallelansatz wurde gemittelt. Es ergaben sich zwei bis sechs Hemmwerte pro Substanz, je nach Zahl der Verdünnungsschritte. Die IC₅₀ wurde mit anhand dieser Werte bestimmt (s. Kapitel 3.3.7).

3.3.4 *Plasmodium falciparum*

Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte in 20-ml-Petrischalen mit Kulturmedium und 5% humanen Erythrozyten. Die Inkubation sowohl der Kulturen als auch der Testansätze fand im Brutschrank bei 37°C und 3% O₂, 4% CO₂ und 93% N₂ statt. Das Medium wurde täglich gewechselt. Dreimal wöchentlich wurde ein Ausstrich der Parasitenkulturen hergestellt, mit reinem Methanol fixiert und mit Giemsa-Lösung gefärbt. Der prozentuale Erythrozytenbefall wurde mikroskopisch mit einem 100fach-Immersionöl-Objektiv ermittelt und die Kulturen verdünnt, falls die Parasitämie über 10% lag.

Testmethode (nach Desjardins et al. 1979).

Für den Testansatz wurde zunächst ein Ausstrich der beiden Plasmodienkulturen hergestellt und die Parasitämie bestimmt. Anschließend wurde durch Zugabe von Screeningmedium und Erythrozytenkonzentrat für beide Stämme je eine Parasitensuspension mit 0,3% Parasitämie und 2,5% Erythrozyten hergestellt. Es folgte eine Verdünnung der Substanzstammlösungen mit Screeningmedium auf ein Vierfaches der gewünschten Anfangskonzentration. Der Testansatz wurde immer mit zwei Platten für die zwei unterschiedlichen Plasmodienstämme durchgeführt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Positivkontrolle								Negativkontrolle			
B	Referenz-Substanz 1		Referenz-Substanz 2		Test-Substanz 1		Test-Substanz 2		Test-Substanz 3		Test-Substanz 4	
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Abbildung 40: Schema der Mikrotiterplatten-Aufteilung im *P.falciparum*-Assay

Jede Vertiefung einer 96-Well-Mikrotiterplatte erhielt nun 100 µl Screeningmedium (Abb. 40). In je zwei nebeneinander liegende Kammern der Reihe H wurden dann 100 µl der Anfangsverdünnung einer Substanz gegeben. Durch Umpipettieren von 100 µl aus dieser Reihe in die darüber liegende ergab sich eine Serienverdünnung von 1:2. So wurde bis zur Reihe B verfahren und der Überstand verworfen. Reihe A blieb ohne Substanz. Auf diese Weise konnten sechs Substanzen pro Platte in je sieben Konzentrationen untersucht werden. In sämtliche Vertiefungen der Platte bis auf A9-A12 wurden anschließend 100 µl der vorbereiteten Plasmodiensuspension eines Stammes gegeben. Die Kammern A9-A12 erhielten 100 µl einer 2,5%igen Erythrozytensuspension in Screeningmedium als Negativkontrolle, A1-A9 dienten als Positivkontrolle. Die Ansätze wurden 48 Stunden unter den oben angegebenen Bedingungen inkubiert. Danach wurde jeder Kammer der Platten 50 µl ³H-Hypoxanthin-Lösung hinzugefügt und erneut für 24 Stunden inkubiert.

Auswertung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Testplatten in einen Zellharvester gegeben, der die Zellen hämolysierte und auf eine Glasfaser-Filtermatte transferierte. Diese wurde mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in eine Folie eingeschweißt und in einen Szintillationscounter gegeben. Nach Konvertierung der Daten in Excel-Format erfolgte die Ermittlung der IC50. Werte.

3.3.5 Toxizitätsprüfung *in vitro*

Kultivierung

Die Säugetierzellen wurden in dem jeweiligen Kulturmedium in 20-ml-Zellkulturflaschen als Monolayer gezüchtet. Die Inkubation sowohl der Kulturen als auch der Testansätze erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Dreimal wöchentlich wurde das Medium gewechselt und Zellkulturen mit mehr als einer Zelllage verworfen.

Testmethode

Zellen aus einer laufenden Zellkultur wurden wie bei dem *Trypanosoma-cruzi*-Test mit EBBS-Lösung gewaschen und anschließend trypsiniert, dann in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und die Zelldichte nach Färbung mit Trypanblau-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die

Suspension wurde mit Medium auf $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt. In die Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurde je 50 μ l der Zellsuspension gegeben (Abb. 41). Die Reihen 3,6,9, und 12 blieben frei und erhielten anschließend 50 μ l Medium als Negativkontrolle. Es folgte eine Inkubation für 24 Stunden. Danach wurde die Flüssigkeit aus allen Reihen entfernt und in Reihe A-G durch 100 μ l frisches Medium ersetzt. Die Testsubstanzen wurden mit Medium auf die gewünschte Anfangskonzentration (AK) verdünnt und 150 μ l dieser Lösung in Reihe H gegeben. Durch Umpipettieren von je 50 μ l von Reihe H zur Reihe C ergab sich eine Serienverdünnung im Verhältnis 1:3. Die restlichen 50 μ l wurden verworfen. Die Reihen A und B blieben frei von Testsubstanz und dienten als Positivkontrolle. Es schloss sich eine Inkubation für 48 Stunden an.

	A	B	C	D	E	F	G	H	
	Keine Substanz		1/243	1/81 AK	1/27 AK	1/9 AK	1/3 AK	AK	
L-6	Positiv-Kontrolle								1
L-6									2
Zellfrei	Negativ-Kontrolle								3
L-6									4..

Abbildung 41: Schema der Mikrotiterplatten-Aufteilung im Zytotoxizitäts-Assay

Auswertung

Nach der Inkubation erhielt jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 10 μ l des Fluoreszenzfarbstoffs Alamar Blue. Es folgte eine Inkubation für 2 Stunden. Anschließend wurde die Platte in einem Fluoreszenzreader bei 530 nm Exzitation und 590 nm Emission gelesen, die Daten in ein Excel-Format konvertiert und die IC50-Werte bestimmt (s. Kapitel 3.3.7).

3.3.6 Toxizitätsprüfung *in vivo*

Zwei CD-1-Mäusen wurden je 250 μ l einer Verdünnung von DMSO-gelöstem Antidesmon in destilliertem Wasser intraperitoneal gespritzt. Die Mäuse erhielten am ersten Tag eine Dosis von 5 mg/kg und wurden anschließend 48 Stunden auf Anzeichen einer toxischen Wirkung beobachtet. Traten keine Symptome auf, wurde nach 48 Stunden die Konzentration von Antidesmon verdoppelt und die Mäuse wiederum 48 Stunden beobachtet. Die Dosis wurde gesteigert, bis toxische Wirkung zu beobachten war. War eine toxische Dosis ermittelt, wurde einer weiteren CD1-Maus die entsprechende Höchstkonzentration von DMSO i.p. gespritzt, um einen eventuellen toxischen Effekt des Lösungsmittels festzustellen.

3.3.7 Berechnung der IC50-Werte und statistische Auswertung

Als Endergebnis aller *In-vitro*-Tests wurde die IC50, die Substanzkonzentration, bei der eine 50prozentige Wachstumshemmung der Parasiten eintrat, mittels folgender Formel aus den ermittelten Daten errechnet.

<p>IC50-Berechnung in der Auswertung der Parasiten- und Zytotoxizitäts-<i>in-vitro</i>-Assays</p> $\text{EXP} \{[\text{LOG}(X_1) + \{(Y_1 - 0,5) / (Y_1 - Y_2)\} \times [\text{LOG}(X_1) - \text{LOG}(X_2)]] \times \text{LN}(10)\}$ <p>Y_1= kleinster der Hemmwerte größer 50%; X_1=entsprechende Konzentration der Testsubstanz Y_2=größter der Hemmwerte kleiner 50%; X_2=entsprechende Konzentration der Testsubstanz</p>
--

Abb. 42: Bestimmung des IC-50-Wertes

Konnte keine IC50 festgestellt werden, wurde der Versuch mit entsprechend veränderter Anfangskonzentration wiederholt. Wirkte eine Substanz stark hemmend auf das Parasitenwachstum, so dass bei den gegebenen Konzentrationen kein Wachstum von mehr als 50 Prozent der Positivkontrolle festgestellt werden konnte, wurde der IC50-Wert mittels linearer Regressionsanalyse ermittelt. Ebenso wurde verfahren, wenn eine Substanz das Parasitenwachstum nur in geringem Maße reduzierte, so dass keine Wachstumsreduktion auf weniger als 50 Prozent der Positivkontrolle verzeichnet wurde. Wenn das Wachstum der Parasiten von einer Substanz in allen Konzentrationen auf Werte unter 10 Prozent reduziert wurde, unterblieb eine Bestimmung und der Versuch wurde wiederholt. Die Beurteilung der Substanzen als aktiv, schwach und nicht aktiv entsprechend der IC50-Werte wurde gemäß der Festlegung der Drug Discovery Research Group von TDR/WHO getroffen (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. R. Brun, STI Basel, 2003) Der statistische Vergleich der IC50-Werte wurde mit dem SPSS-Programm durchgeführt. Es wurde der nichtparametrische Test nach Friedman benutzt. Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgte mit Microsoft Office EXCEL.