

Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien

(Vorstand: Prof. Dr. G. Wiedermann) (1)

Abteilung für Tropenmedizin, Carl-Korth-Institut, Erlangen, BRD (2)

Malaria Division, Ministry of Health, Bangkok, Thailand (3)

Centre for Drug Research, University Sains Malaysia, Minden, Pulau Pinang, Malaysia (4)

## Prüfung der Artemisinin- und Halofantrinempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* in vitro

W. H. Wernsdorfer<sup>1, 4</sup>, G. Wernsdorfer<sup>2</sup>, W. Rooney<sup>3</sup>,

Krongthong Thimasarn<sup>3</sup>, Pairoh Yamokgul<sup>3</sup>, S. M. Mansor<sup>4</sup>

### Einleitung

Halofantrin, ein 9-Phenanthrenmethanol mit blutschizontozider Wirkung, wurde 1987 in Frankreich registriert (Halfan<sup>®</sup>, Smith Kline Beechman) und ist seit zwei Jahren auch in Österreich und der Bundesrepublik Deutschland erhältlich. Es dient ausschließlich der Therapie, vor allem der oralen Behandlung multiresistenter Falciparum-Malaria. Obgleich auch gegen andere Malariaformen wirksam, sind diese aus Kostengründen und wegen der Effizienz der Standardmittel keine Indikation zur Medikation mit Halofantrin.

Abgesehen von markanten individuellen Schwankungen der Bioverfügbarkeit (14) und vermuteter Korrelation zwischen Halofantrin- und Mefloquinempfindlichkeit (1) besteht Unklarheit über das natürliche primäre Sensibilitätsspektrum von *Plasmodium falciparum* gegenüber Halofantrin. In vivo Prüfungen sind für die Klärung dieses Sachverhalts ungeeignet, da der Behandlungserfolg von pharmakokinetischen Faktoren mitbestimmt wird und ein endgültiges Dosierungsschema noch nicht festgelegt ist. Die exakte Bestimmung der Halofantrinempfindlichkeit von *P. falciparum* ist nur durch die Prüfung in vitro möglich. Dieser stand jedoch die außerordentlich geringe Wasserlöslichkeit von Halofantrin entgegen.

Ähnliche technische Schwierigkeiten bestehen auch bei Artemisinin, einem aus *Artemisia annua* L. gewonnenen natürlichen Sesquiterpenlaktone mit blutschizontozider Wirkung. Artemisinin ist der Grundkörper und Ausgangsstoff verschiedener halbsynthetischer Derivate wie Artemäther, Arteäther und Na-Succinylester (Na-Artesunat). Diese Präparate sind zum Teil bereits in der Volksrepublik China und in Thailand registriert und stehen in einigen anderen Ländern in klinischer Prüfung. Es kann also in absehbarer Zeit auch mit ausgedehnter kommerzieller Einführung gerechnet werden, wobei als Hauptindikation die Therapie schwerer und komplizierter Falciparum-Malaria, als Zweitindikation die Behandlung unkomplizierter multiresistenter Falciparum-Malaria gelten werden. Über die Schwankungsbreite der Artemisininempfindlichkeit natürlicher *P. falciparum* Populationen ist bisher wenig bekannt. Es ist darum wünschenswert, derartige Basisuntersuchungen durchzuführen, bevor Arzneimittel dieser Körperklasse zur breiteren Anwendung gelangen. Hierdurch wird auch die Möglichkeit longitudinaler Studien nach Einsetzen des unvermeidlichen Arzneimitteldrucks eröffnet.

## Material und Methoden

Diese Studie war im vornherein auf die Erweiterung des von der WHO eingeführten Testsystems (9, 10, 13) ausgerichtet, in welchem die konzentrationspezifische Hemmung der Schizontenreifung von *P. falciparum* gemessen wird. Mittels einer Vorstudie im August 1991 in Bo Rai, Kanchanaburi Provinz, Thailand, wurde festgestellt, daß sich sowohl Artemisinin als auch Halofantrin grundsätzlich für dieses Testsystem eignen. Bei dieser Gelegenheit wurde auch der endgültige zu testende Konzentrationsbereich beider Substanzen festgelegt.

### Sensibilitätsprüfung in vitro

Die Testmethode ist eine Modifikation der von RIECKMANN et al. (8) ursprünglich für die Prüfung an *P. falciparum* Isolaten aus Dauerkulturen beschriebenen Technik. Alle für die Durchführung der Prüfung benötigten Materialien sind in den WHO Test Kits (13) enthalten. Mit Ausnahme der mit Halofantrin oder Artemisinin dosierten Platten kamen in dieser Studie ausschließlich die Materialien der WHO Test Kits zur Verwendung.

### Zusammenfassung des Untersuchungsverfahrens:

#### a) Vorauswahl geeigneter Patienten gemäß folgender Kriterien:

- Monoinfektion mit *P. falciparum*;
- Dichte asexueller Parasiten 1.000 - 80.000/µl;
- Keine Malariabehandlung während der vorangegangenen vier Wochen;
- Negativer Harntest für 4-Aminochinoline (Dill-Glazko oder Wilson-Edeson) und Sulfonamide (Lignintest). Der Test für 4-Aminochinoline erfaßt auch Chinin, Chinidin und Mefloquin.

b) Entnahme von 100 µl Blut aus der vordesinfizierten Fingerbeere mittels steriler heparinisierter Kapillaren und Aufnahme der Blutproben in RPMI-1640 LPLF Medium (Gibco) im Verhältnis 1 : 9.

c) Befüllen der vordosierten Testplatten (Falcon 3070 Becton Dickinson, 8 × 12, Flachboden) mit jeweils 50 µl der Blut-Medium-Mischung (BMM) pro Vertiefung, aufsteigend von Kontrolle bis zur höchsten Substanzkonzentration.

d) Abdecken der Testplatte mittels Sterildeckel (Falcon 3071), sanfte Agitation der geschlossenen Testplatte zur Lösung der Testsubstanzen, Verbringen der Platten in vorgewärmten Kerzentopf (Exsikkator), Entzünden der Kerze, Schließung des Kerzentopfs; nach Verlöschen der Kerze Schließung des Ventils. Verbringen des Kerzentopfs in Brutschrank. Bebrütung bei 37,5° C während 24 - 26 Stunden.

e) Entnahme der Platten, Dekantieren des überstehenden Mediums und Anfertigung von dicken Tropfen aus dem Sediment der Mikroulturen. Eine Testserie (1 Kontrolle, 7 Konzentrationen) findet auf einem Objektträger Platz.

f) Trocknung der Präparate während 24 Stunden, Giemsa-Färbung bei pH 6,8 - 7,0. Ablesung durch Ermittlung der Schizontenzahl pro 200 asexuelle Parasiten.

### Testplatten

Mit Hinsicht auf die relativ flachen Regressionslinien wurden die Testplatten für Artemisinin und Halofantrin nicht in der für viele Präparate üblichen geometrischen Progression von 2 dosiert, sondern in einer Annäherung zur Progression von 3, nämlich

WELL	HALOFANTRIN µmol/l BMM	ARTEMISININ µmol/l BMM
A	Kontrolle	Kontrolle
B	0,0001	0,01
C	0,0003	0,03
D	0,001	0,10
E	0,003	0,30
F	0,010	1,00
G	0,030	3,00
H	0,100	10,00

Die Platten enthielten die trockenen Wirksubstanzen in einer Form, welche die Wieder- auflösung in BMM begünstigt.

Artemisinin wurde als Repräsentant der gesamten Artemisiningruppe gewählt, da die in der Vorstudie durchgeführten Vergleiche mit Artemäther eine sehr enge Korrelation zwischen der Wirksamkeit beider Substanzen ergeben hatten. Die Verwendung des wasserlöslichen Na-Succinylesters von Artemisinin (Na-Artesunat) zur Resistenztestung ist nicht möglich, da diese Verbindung innerhalb von 30 Minuten vollständig zu Dihydro-Artemisinin hydrolysiert. Letzteres ist ausgesprochen instabil und verliert Struktur und Aktivität bei Zimmertemperatur und normaler Atmosphäre innerhalb weniger Minuten.

#### Krankengut

In vitro Prüfungen wurden zwischen September und Dezember 1991 in den Regionen von Chiang Mai, Kanchanaburi, Yala und Mae Sot (Thailand) durchgeführt. Insgesamt kamen 52 Isolate zur Testung. In Mae Sot wurden 22 Isolate von *P. falciparum* auch auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Mefloquin untersucht. In allen genannten Regionen ist *P. falciparum* gegen Chloroquin und Kombinationen von Sulfonamiden und Pyrimethamin hochgradig resistent.

#### Auswertung

Gemäß WHO Kriterien werden Tests mit einer Mindestzahl von 20 Schizonten pro 200 asexuelle Parasiten in der Kontrolle als gültig akzeptiert. Sämtliche erfolgreiche Prüfungen wurden individuell und gruppiert (in letzterem Fall gewichtet und ungewichtet) mittels einer EDV-Adaptation (5) des Verfahrens von LITCHFIELD und WILCOXON (8) ausgewertet. Dieses Verfahren basiert auf der Probitanalyse der Hemmwerte in Relation zu den logarithmischen Arzneimittelkonzentrationen.

### Ergebnisse

Von 52 angesetzten Testreihen waren 46 erfolgreich für Halofantrin und 45 für Artemisinin. Von den 22 Testreihen für Mefloquin waren 20 erfolgreich.

Die mit Halofantrin und Artemisinin erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt und in Abbildung 1 und Abbildung 2 graphisch wiedergegeben.

Mit Halofantrin wurde volle Hemmung bei 0,1 µmol/l BMM erreicht, mit Artemisinin bei 3,0 µmol/l BMM. Die  $EC_{50}$  Werte mit 0,0011 µmol/l BMM für Halofantrin und 0,1362 µmol/l BMM für Artemisinin liegen erheblich unter der vollen Hemmkonzentration, was sich aus dem relativ flachen Verlauf der Regressionsgeraden erklärt. Die  $Chi^2$ -Werte für Heterogenität der gewichteten Gruppendaten liegen im annehmbaren Bereich.

TABELLE 1

**Ergebnisse der in vitro-Sensibilitätsprüfungen mit Artemisinin und Halofantrin bei *Plasmodium falciparum* in Thailand. Logdosis-Probit Regressionen.**

	ARTEMISININ	HALOFANTRIN
Anzahl Isolate	45	46
% Hemmung der Schizontenreifung bei		
0.0001 $\mu\text{mol/l}$ BMM	—	13.73
0.0003 $\mu\text{mol/l}$ BMM	—	22.34
0.001 $\mu\text{mol/l}$ BMM	—	40.63
0.003 $\mu\text{mol/l}$ BMM	—	65.54
0.01 $\mu\text{mol/l}$ BMM	13.83	92.34
0.03 $\mu\text{mol/l}$ BMM	26.15	99.93
0.10 $\mu\text{mol/l}$ BMM	37.23	100.00
0.30 $\mu\text{mol/l}$ BMM	51.91	—
1.00 $\mu\text{mol/l}$ BMM	84.88	—
3.00 $\mu\text{mol/l}$ BMM	100.00	—
10.00 $\mu\text{mol/l}$ BMM	100.00	—
Interzept a	6.0276	4.9480
Steigung b	1.1876	1.3393
Chi <sup>2</sup> für Heterogenität	6.8846	5.3070
Erlaubtes Maximum	9.49	11.10
EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol/l}$ BMM)	0.1362	0.0011
EC <sub>90</sub> ( $\mu\text{mol/l}$ BMM)	1.6358	0.0090
EC <sub>99</sub> ( $\mu\text{mol/l}$ BMM)	3.3085	0.0597
Individueller Maximalwert für volle Hemmung ( $\mu\text{mol/l}$ )	3.0000	0.1000
Geometrischer Mittelwert für volle Hemmung ( $\mu\text{mol/l}$ )	1.6219	0.0102

## Diskussion

Die relativ hohe Erfolgsrate der Testreihen von 88% für Halofantrin, 87% für Artemisinin und 91% für Mefloquin dürfte auf die strikte Beachtung der Auswahlkriterien bei den zu testenden Isolaten zurückzuführen sein.

Der bereits in den Voruntersuchungen gewonnene Eindruck von Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Testsysteme für Halofantrin und Artemisinin konnte erhärtet werden.

Bei dem Vergleich der individuellen Maximalwerte und der geometrischen Mittelwerte für volle Hemmung fällt bei Artemisinin auf, daß diese Werte nahe beisammen liegen, während sie bei Halofantrin einen weiteren Bereich spannen. Dies kann als Hinweis auf höhere Heterogenität der individuellen Isolate hinsichtlich Halofantrinempfindlichkeit gedeutet werden.

Frühere Untersuchungen (2, 6) weisen darauf hin, daß sich Artemisinin in seinem Wirkungsmechanismus erheblich von den „klassischen“ Malariamitteln unterscheidet, zu

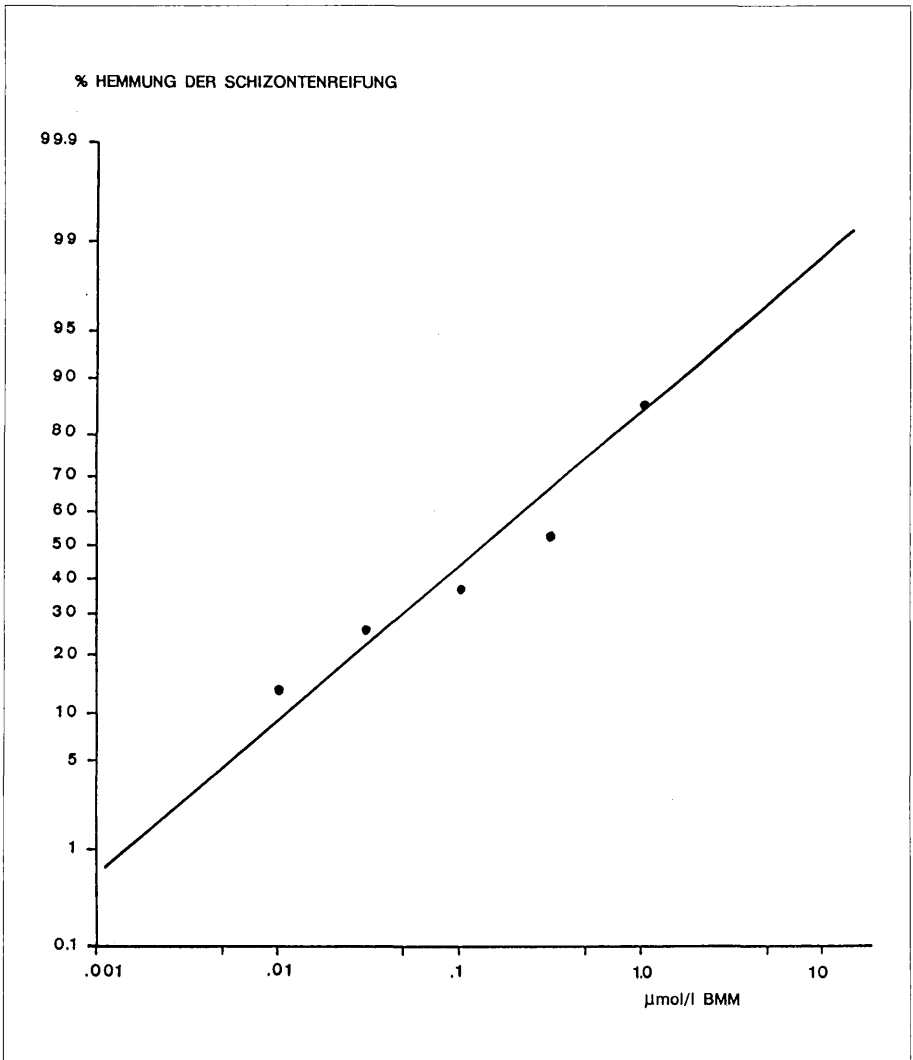


Abb. 1:

Artemisininempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* in Thailand.  
Gewichtete Mittelwerte von 45 frischen Isolaten. Logdosis/Probit-Regression.

welchen die 4-Aminochinoline und Chinin gehören. Diese wirken über Enzymhemmung und wahrscheinlich auch durch Änderungen intrazellulärer Transportmechanismen (12), während Artemisinin eine massive oxidative Wirkung zugeschrieben wird (3). Infolgedessen wäre es möglich, daß die Wirkungsparameter nicht einer linearen Verteilung der Logdosis/Probit-Werte entsprechen. In der Tat ergibt die Verarbeitung dieser Werte mittels nichtlinearer Analyse nach

$$y = a + bx + cx^2$$

eine wesentlich bessere Angleichung der beobachteten Hemmwerte an die Regressionslinie (Abb. 3), welche sich auch in einer Reduktion des Heterogenitätsparameters

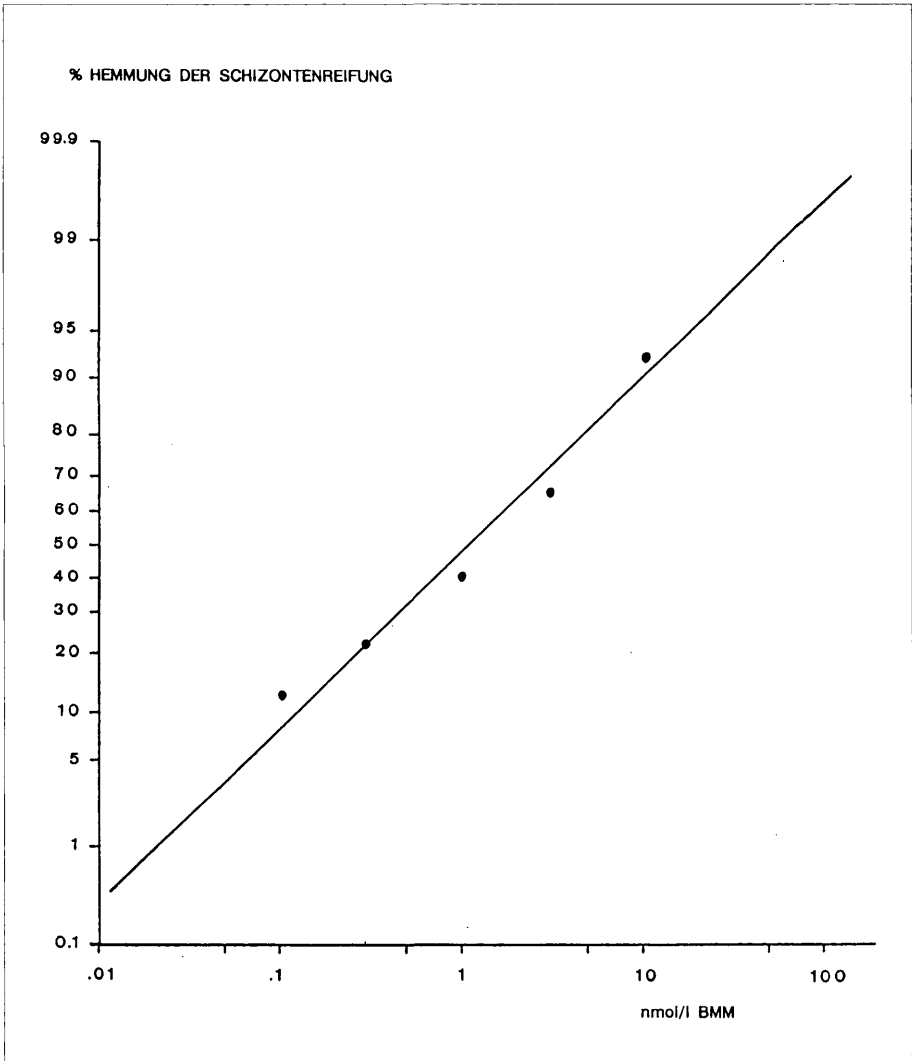


Abb. 2:

Halofantrinempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* in Thailand.  
Gewichtete Mittelwerte von 46 frischen Isolaten. Logdosis/Probit-Regression.

ausdrückt ( $\text{Chi}^2 = 1,78$ ; maximal zulässig 11,10). Dies ist ein Hinweis auf eine außerordentlich rasche Wirkungssteigerung zwischen 0,3 und 3,0  $\mu\text{mol/l}$  BMM, welche dem Bild oxidativer Schädigung mehr entspräche als dem der Enzymhemmung, welche gewöhnlich ein lineares Verhalten in der Logdosis/Probit Analyse zeigt.

Infolge dieser verbesserten Anpassung erhöht sich der  $\text{EC}_{50}$  Wert von 0,14  $\mu\text{mol/l}$  BMM bei Logdosis-normaler Verteilung auf 0,45  $\mu\text{mol/l}$  BMM in der nichtlinearen, während der  $\text{EC}_{99}$  Wert von 3,31  $\mu\text{mol/l}$  BMM in der Logdosis-normaler Verteilung auf 1,83  $\mu\text{mol/l}$  BMM in der nichtlinearen reduziert wird. Dies entspricht weitgehend den Beobachtungen und vor allem dem geometrischen Mittelwert für volle Hemmung.

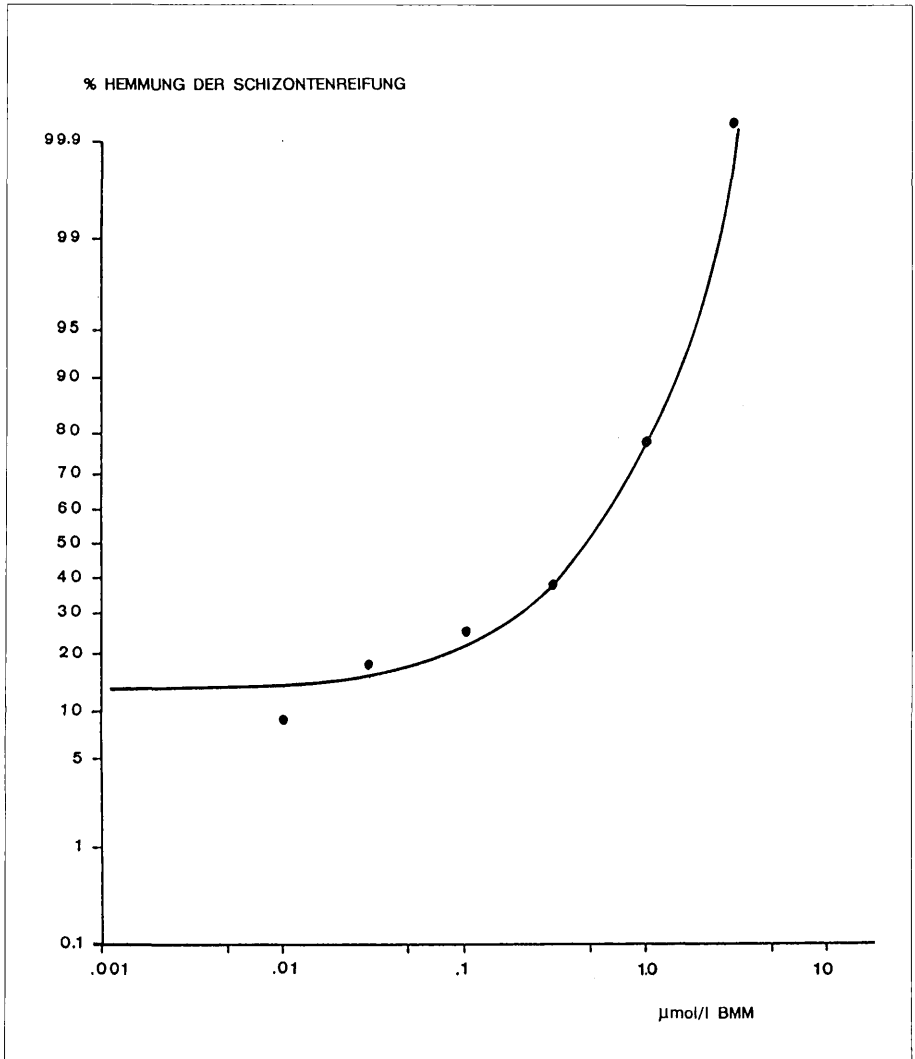


Abb. 3:

Artemisininempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* in Thailand.  
Ungewichtete Mittelwerte von 45 frischen Isolaten. Nicht-lineare Regression und Logdosis/Probit-Darstellung der Meßwerte.

In der Projektion auf die mit üblichen Artemisinin- oder Artemätherdosen erreichten Wirkstoffspiegel erklären diese Sensibilitätswerte allerdings auch die mit diesen Medikamenten beobachtete erhebliche Rückfallrate (4). Obgleich das lebensrettende Potential der Artemisiningruppe außer Zweifel steht, dürfte eine Ergänzungstherapie zur Elimination der Plasmodieninfektion notwendig sein, um ein rasches Aufkommen von Parasitenresistenz zu verhindern (11).

In den Vergleichsuntersuchungen mit Mefloquin und Halofantrin in Mae Sot (20 erfolgreich getestete Isolate) war mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,4550$  bei der  $EC_{50}$  eine positive Korrelation angedeutet. Bei der  $EC_{90}$  erhärtete sich der Eindruck: mit  $r = 0,7628$  konnte die Korrelation bei  $p < 0,01$  gesichert werden. Nach eingetretener

Resistenz gegen Mefloquin dürften sich dadurch die Aussichten auf langfristige Wirksamkeit von Halofantrin erheblich reduzieren. Gleiches gilt für den umgekehrten Fall, welcher als Folge breiter Anwendung von Halofantrin im frankophonen Westafrika in nicht zu ferner Zukunft eintreten dürfte.

## Zusammenfassung

Prüfsysteme zur Ermittlung der Halofantrin- und Artemisininresistenz von *Plasmodium falciparum* wurden als Ergänzung der WHO in vitro Tests zur Bestimmung der Arzneimittelempfindlichkeit entwickelt. In diesen Prüfsystemen wird die arzneimittelbedingte, konzentrationsabhängige Hemmung der Schizontenreifung gemessen. Die 46 in Thailand erfolgreich auf Halofantrinresistenz geprüften *P. falciparum*-Isolate ergaben eine  $EC_{50}$  von  $0,0011 \mu\text{mol/l}$  Blut-Medium-Mischung (BMM), eine  $EC_{99}$  von  $0,0597 \mu\text{mol/l}$  BMM, und volle generelle Hemmung bei  $0,1 \mu\text{mol/l}$  BMM. Für Artemisinin zeigte eine nichtlineare Analyse der Hemmprobiten gemäß Logdosis eine bessere Angleichung der beobachteten Hemmwerte an die Regressionslinie als die lineare Auswertung. Die nichtlineare Analyse zeitigte einen mittleren  $EC_{50}$  Wert von  $0,45 \mu\text{mol/l}$  BMM. Die  $EC_{99}$  lag bei  $1,83 \mu\text{mol/l}$  BMM und volle generelle Hemmung wurde bei  $3,0 \mu\text{mol/l}$  BMM beobachtet. Die Mefloquin- und Halofantrinempfindlichkeit bei *P. falciparum* korrelierte positiv mit  $r = 0,7628$  ( $n = 20$ ) bei  $p < 0,01$ .

## Schlüsselwörter

*Plasmodium falciparum*, Halofantrin, Artemisinin, Mefloquin, Arzneimittelresistenz.

## Summary

Tests for assessing the response of *Plasmodium falciparum* to artemisinin and halofantrine in vitro.

Systems for assessing the sensitivity of *Plasmodium falciparum* to halofantrine and artemisinin have been developed as a complement to the standardized in vitro test range introduced by WHO. In these tests the drug-induced, concentration-dependent inhibition of schizont maturation is measured. The 46 *P. falciparum* isolates tested in Thailand for halofantrine sensitivity yielded an  $EC_{50}$  of  $0.0011 \mu\text{mol/l}$  blood medium mixture (BMM) and an  $EC_{99}$  of  $0.0597 \mu\text{mol/l}$  BMM, with cut-off at  $0.1 \mu\text{mol/l}$  BMM. For artemisinin non-linear analysis of logdose probit data proved to be more suitable than linear fitting, yielding an  $EC_{50}$  of  $0.45 \mu\text{mol/l}$  BMM, an  $EC_{99}$  of  $1.83 \mu\text{mol/l}$  BMM and a cut-off at  $3.0 \mu\text{mol/l}$  BMM. The sensitivity of *P. falciparum* to halofantrine and mefloquine correlates positively with  $r = 0.7628$  ( $n = 20$ ) at  $p < 0.01$ .

## Key words

*Plasmodium falciparum*, halofantrine, mefloquine, drug sensitivity, artemisinin.

## Literatur

1. CANFIELD, C. J. (1980):  
Antimalarial aminoalcohol alternatives to mefloquine.  
*Acta Tropica* 37,232-237.
2. CHAWIRA, A. N., WARHURST, D. C., ROBINSON, B. L., PETERS, W. (1985):  
Development of resistance to qinghaosu (artemisinin) in rodent malaria.  
*Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79, 275.



3. CHINA COOPERATIVE RESEARCH GROUP ON QINGHAOSU AND ITS DERIVATIVES AS ANTIMALARIALS (1982):  
Chemical studies on Qinghaosu (artemisinin).  
J. Trad. Chin. Med. 2, 3-8.
4. CHINA COOPERATIVE RESEARCH GROUP ON QINGHAOSU AND ITS DERIVATIVES AS ANTIMALARIALS (1982):  
Clinical studies on the treatment of malaria with Qinghaosu and its derivatives.  
J. Trad. Chin. Med. 2, 45-50.
5. GRAB, B., WERNSDORFER, W. H. (1983):  
Evaluation of in vitro tests for drug sensitivity in Plasmodium falciparum: Probit analysis of logdose/response test from 3 - 8 points assay.  
WHO document WHO/MAL/83.990.
6. LI, Z. (1981):  
Effect of Qinghaosu on chloroquine-induced pigment clumping.  
J. Trad. Chin. Med. 1, 105-112.
7. LITCHFIELD, J. T., WILCOXON, F. (1949):  
A simplified method of evaluating dose-effect experiments.  
J. Pharmacol. Exp. Therapy 96, 99-113.
8. RIECKMANN, K. H., CAMPBELL, G. H., SAX, L. J., MREMA, J. E. (1978):  
Drug sensitivity of Plasmodium falciparum. An in vitro micro technique.  
Lancet 1, 22-23.
9. WERNSDORFER, W. H. (1980):  
Field evaluation of drug resistance in malaria. In vitro microtest.  
Acta Tropica 37, 222-227.
10. WERNSDORFER, W. H., PAYNE, D. (1988):  
Drug sensitivity tests in malaria parasites.  
In: Wernsdorfer, W. H., McGregor, I. A. (Eds.) Malaria. Principles and practice of malariology. Vol. 2, 1765-1800. Churchill Livingstone, Edinburgh.
11. WERNSDORFER, W. H., PAYNE, D. (1991):  
The dynamics of drug resistance in Plasmodium falciparum.  
Pharmac. Ther. 50, 95-121.
12. WERNSDORFER, W. H., TRIGG, P. I. (1988):  
Recent progress of malaria research: chemotherapy.  
In: Wernsdorfer, W. H., McGregor, I. A. (Eds.) Malaria. Principles and practice of malariology. Vol. 2, 1569-1674. Churchill Livingstone, Edinburgh.
13. WORLD HEALTH ORGANIZATION (1990):  
In vitro microtest (Mark II) for the assesement of the response of Plasmodium falciparum to chloroquine, mefloquine, quinine, sulfadoxine/pyrimethamine and amodiaquine.  
WHO document MAP/87.2 Rev. 1.
14. WORLD HEALTH ORGANIZATION (1990):  
Severe and complicated malaria.  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 84, Suppl. 2, 1-65.

KORRESPONDENZADRESSE:

Prof. Dr. W. H. Wernsdorfer

Cranachstraße 8

A-1130 Wien · Austria



# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1992

Band/Volume: [14](#)

Autor(en)/Author(s): Wernsdorfer Walther H., Wernsdorfer Gunther, Rooney W., Thimasarn Krongthong, Yamokgul Pairoh, Mansor S. ML

Artikel/Article: [Prüfung der Artemisinin- und Halofantrinempfindlichkeit von Plasmodium falciparum in vitro. 307-316](#)