

Institut für Allgemeine Hygiene und Tropenhygiene der Universität Göttingen
(ehem. Leiter: Prof. Dr. W. Bommer) (1)
Abteilung Hämatologie/Onkologie, Klinikum der Universität Göttingen
(komm. Leiter: Prof. Dr. F. Scheeler) (2)
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie Göttingen (Prof. Dr. H. Eibl) (3)

Ein neues Phospholipid-Derivat: In vitro- und in vivo-Aktivität gegen *Leishmania donovani*

A. Kuhlencord¹, T. Maniera², H. Eibl³, C. Unger²

Einleitung

Zur Therapie der systemischen Leishmaniasen (Kala Azar) werden heute in erster Linie fünfwertige Antimonverbindungen (Natriumstiboglukonat und N-Methylglukamin-antimonat), Pentamidin und Amphotericin B verwendet. Alle genannten Verbindungen sind relativ toxisch und können nur parenteral angewendet werden. Zunehmende Resistenzentwicklungen in Kenia und Indien (23) sowie Therapieversager bei gleichzeitig mit HIV infizierten Patienten (13, 24) verdeutlichen die Notwendigkeit, nach neuen therapeutischen Alternativen zu suchen. Inhibitoren der Ergosterolsynthese (Ketoconazol), Hypoxanthin-Analoga (Allopurinol) oder Inosin-Analoga (Formycin B) wurden in mehreren tierexperimentellen und klinischen Studien getestet, jedoch mit unterschiedlichen und meist nicht befriedigenden Resultaten (3, 15, 16).

Hexadecylphosphocholin (He-PC [Abb. 1]) ist eine neue Substanz, die zur Zeit in der Onkologie klinisch geprüft wird (9). Bereits CROFT und Mitarbeiter (7) konnten eine deutliche in vitro Wirksamkeit gegen Leishmaniasen nachweisen. Bei subkutaner Applikation an mit Leishmanien infizierten Mäusen war die Substanz zu toxisch. In eigenen Untersuchungen konnten wir zeigen, daß He-PC nach oraler Gabe gut verträglich ist und aus dem Gastrointestinaltrakt praktisch vollständig resorbiert wird (5). Eine ausgeprägte Anreicherung von He-PC ließ sich besonders in den Zielorganen der Leishmanien (Leber, Milz) nachweisen. Ziel unserer Untersuchungen war es, die in vitro und in vivo Wirksamkeit nach oraler Applikation von He-PC an mit *Leishmania donovani* infizierten Mäusen zu untersuchen.

Methoden

Parasiten

Stammkulturen von *Leishmania donovani* (MHOM/IN/54/LRC-L.51) wurden vom Frauenhofer-Institut, Hannover, und *Leishmania donovani* (MHOM/IN/80/DD8) vom Schweizerischen Tropeninstitut, Basel, zur Verfügung gestellt. Die Kulturen wurden bei 26° C in einem Gemisch aus einem Teil HOSMEM (1) und einem Teil RPMI-1640 (Gibco), supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum, in 25 cm² Gewebekulturflaschen kultiviert.

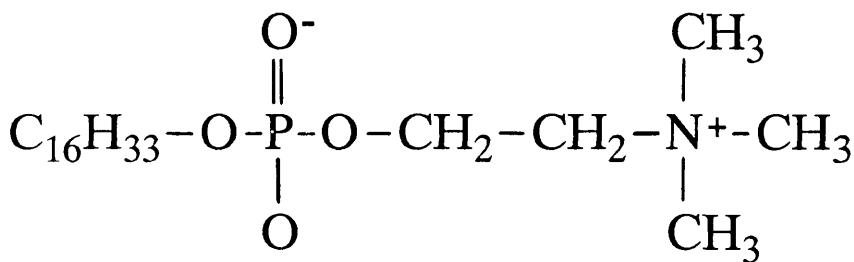


Abb. 1: Hexadecylphosphocholin

Hexadecylphosphocholin

Hexadecylphosphocholin wurde nach dem von EIBL et al. (9) beschriebenen Verfahren synthetisiert.

In vitro-Untersuchungen

In vitro-Untersuchungen wurden in Anlehnung an BERMAN et al. (4) an promastigoten Entwicklungsstadien in 24-Napf-Platten durchgeführt. Jede Versuchsreihe wurde in Doppelbestimmungen dreifach wiederholt. Nach 96stündiger Inkubation wurde die Leishmanienzahl/ μ l in einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. Die IC₅₀ (50%ige Wachstumshemmung nach 96stündiger Inkubation) wurde graphisch ermittelt.

In vivo-Versuch

18 - 22 g schwere weibliche BALB/c Inzuchtmäuse (Charles River Wiga, D-8741 Sulzfeld) wurden mit je 10⁷ Amastigoten (frisch aus einer ausgeprägt infizierten Leber oder Milz isoliert) und 10⁷ Promastigoten (spät logarithmische bis stationäre Wachstumsphase) intravenös infiziert. Sieben Tage post infectionem (p. i.) wurde mit der Therapie begonnen. Hexadecylphosphocholin wurde fünfmal pro Woche über eine Magensonde intragastral appliziert. Nach ein, zwei, drei bzw. vier Wochen wurden die Mäuse mittels Äther narkotisiert und getötet. Die Parasitenlast in Leber und Milz wurde in nach Giemsa gefärbten Abtupfpräparaten pro 1.000 Organzellen mikroskopisch ausgezählt und nach der Formel von STAUBER et al. (17) ermittelt. Unbehandelte sowie mit Natriumstiboglikonat (Pentostam®) behandelte Mäuse dienten als Kontrolle. Die Stiboglikonat (Sb^V)-Behandlung bestand aus der Applikation von 120 mg Sb^V/kg subkutan fünfmal pro Woche entsprechend den Angaben von PETERS et al. (14). Zur Bestätigung der Ergebnisse und Beurteilung der Vitalität der Leishmanien wurden Milz- und Leberhomogenate der Versuchstiere in Kulturmedium gegeben und bis zu 21 Tage nach Beimpfen kontrolliert.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der in vitro-Untersuchungen zeigen, daß IC₅₀-Werte für den Stamm DD8 von 0,89 ± 0,08 und für den Stamm LRC-L.51 von 2,07 ± 0,23 mg/l erhalten wurden. Aus den IC₅₀-Werten ist ersichtlich, daß beide getesteten Leishmanienstämme eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber dem Alkylphosphocholin Hexadecylphosphocholin aufweisen. Dabei zeigt sich, daß der Leishmanienstamm DD8 in vitro um den Faktor 2,1 empfindlicher als der Stamm LRC-L.51 ist.

TABELLE 1

Entwicklung der Parasitenlast in Leber und Milz von BALB/c Mäusen nach i.v.-Infektion mit dem Leishmanienstamm LRC-L.51
(n = 3 Mäuse, Mittelwert ± SD)

Tage nach Infektion	Leishmanien/Leber [× 10 ⁶]	Leishmanien/Milz [× 10 ⁶]	Milzgewicht [mg]
0	± 0	0,0 ± 0	90 ± 10
7	140 ± 20	1,8 ± 0,2	96 ± 10
14	579 ± 47	11,8 ± 2,8	130 ± 30
21	643 ± 32	17,4 ± 3,5	280 ± 10
28	538 ± 19	80,7 ± 12,4	600 ± 50
35	929 ± 90	120,6 ± 33,2	820 ± 30

TABELLE 2

Reduktion der Parasitenlast in Leber und Milz nach fünftagiger Therapie mit He-PC für die Stämme *L. donovani* LRC-L.51 und *L. donovani* DD8
(n = 3 Mäuse/Gruppe)

		120 mg Sbv/kg	10 mg He-PC/kg	20 mg He-PC/kg
Leber:	LRC-L.51	97,2%	92,3%	97,8%
	DD8	99,6%	89,5%	99,8%
Milz:	LRC-L.51	82,8%	97,6%	98,7%
	DD8	66,1%	96,4%	> 99,0%

Die von uns durchgeführte i. v.-Injektion mit einer Suspension bestehend aus 10⁷ Ama-stigoten und 10⁷ Promastigoten führte zu einer reproduzierbaren Infektionsrate in BALB/c Mäusen. Die Entwicklung der Parasitenlast für Leber und Milz ist der Tabelle 1 zu entnehmen. Zur Behandlung von infizierten Mäusen wurden drei Therapiegruppen aus je drei Tieren gebildet. Sieben Tage p. i. erhielt eine Gruppe 120 mg Sb^V/kg subku-tan fünfmal pro Woche, die zweite Gruppe erhielt He-PC 10 mg/kg und eine dritte Gruppe 20 mg/kg oral fünfmal pro Woche. Die Therapie mit He-PC wurde von den Mäusen sehr gut toleriert. Es wurden weder Verhaltensstörungen noch gastrointestinale Symptome registriert. Die erzielten Therapieergebnisse sind in Tabelle 2 aufge-führt.

Alle drei Therapiemodalitäten führten zu einer signifikanten Verminderung der Parasitenlast in der Leber mit vergleichbaren Resultaten. Dagegen zeigte sich in der Milz ein signifikanter Therapieunterschied zwischen der Stiboglukonat- im Vergleich zur He-PC-Therapie. Sowohl 10 mg als auch 20 mg He-PC/kg zeigten eine weitaus höhere Wirksamkeit im Vergleich zu Stiboglukonat.

Zur Bestimmung der ED₅₀ (Nachweis einer Reduktion der Parasitenlast um 50% im Vergleich zur Kontrolle) erhielten mit dem Leishmanienstamm LRC-L.51 infizierte Mäuse täglich über fünf Tage oral eine Dosis von 0,1; 0,5; 1; 5 und 10 mg He-PC/kg Körpergewicht. Über Regressions- und Schnittpunktberechnungen wurde eine ED₅₀ für Leber und Milz von 2,66 bzw. 0,98 mg He-PC/kg ermittelt.

Die Ergebnisse für die Therapiedauer von 1, 2, 3 bzw. 4 Wochen sind in der Abbildung 2 dargestellt. Während in den mit Antimon behandelten Tieren die Parasitenlast der

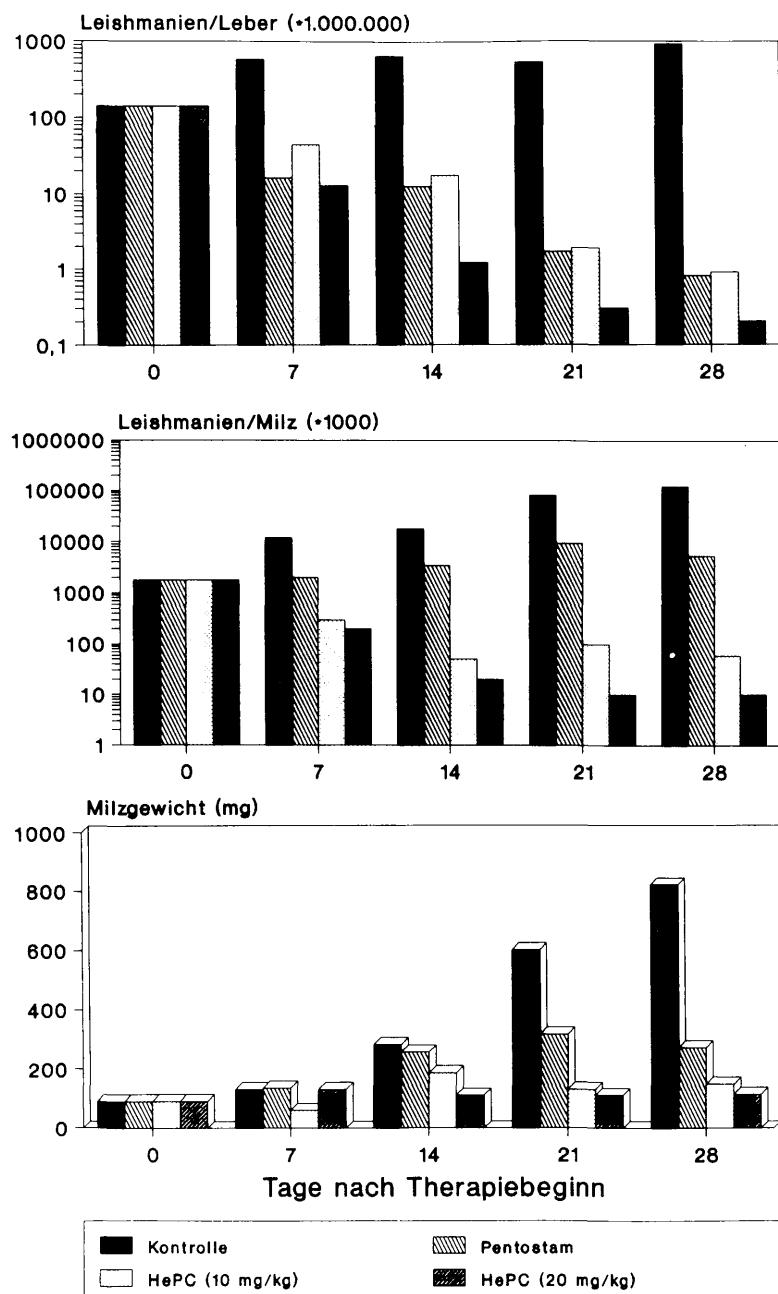


Abb. 2:

Parasitenlast in Leber und Milz sowie Milzgewicht unter Therapie mit Sb^V (Pentostam) und He-PC. Behandlungsgruppen aus je 3 Mäusen wurden mit Sb^V (120 mg/kg an 5 Tagen/Woche über 7, 14, 21 und 28 Tage) und He-PC (10 bzw. 20 mg/kg oral über 5 Tage/Woche ebenfalls über 7, 14, 21 und 28 Tage) behandelt.

Leber im Verlauf der Behandlung kontinuierlich abnimmt, steigen die Parasitenlast der Leber und das Milzgewicht weiter an, wenn auch in geringerem Umfang als in der Kontrollgruppe. Im Gegensatz zu lediglich geringen Unterschieden zwischen der Sb^V-behandelten Gruppe und den He-PC-behandelten Gruppen in Bezug auf die Reduktion der Leberparasitämie, zeigt He-PC in der Milz eine ausgeprägt bessere Wirksamkeit als die Sb^V-Therapiegruppe ($p < 0,01$). Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in den Milzgewichten wieder. Eine Therapie mit 20 mg He-PC/kg zeigt über die gesamte Therapiedauer Milzgewichte, wie sie bei nicht infizierten Mäusen beobachtet werden.

Diskussion

Alkylphosphocholine stellen eine neue Substanzklasse dar, die in unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurde (8, 10, 19). Alkylphosphocholine zeigen selektive antineoplastische Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* (10). Darüber hinaus wurden differenzierende Wirkungen auf Leukämie-Zellen *in vitro* (12) sowie auf Mammakarzinom-Zellen *in vivo* beobachtet (11). Kürzlich konnte nachgewiesen werden, daß He-PC eine amplifizierende Wirkung auf das G-CSF abhängige Kolonienwachstum menschlicher Knochenmarksprogenitorzellen (21) sowie eine co-stimulatorische Aktivität auf humane T-Lymphozyten (22) besitzt. Klinische Untersuchungen zeigen, daß He-PC auch Wirksamkeit an menschlichen Tumoren aufweist (20).

CROFT et al. (7) konnten zeigen, daß Alkylphosphocholin-Derivate eine deutliche Aktivität gegen *Leishmania donovani* (Stamm MHOM/ET/67/L82; LV9) besitzen. Jedoch zeigten die untersuchten Verbindungen bei subkutaner Applikation nicht akzeptable Nebenwirkungen, wie ödematöse Hautschwellungen und Nekrosen. Diese Ergebnisse von CROFT et al. konnten durch unsere Untersuchungen bestätigt werden.

Auf Grund vorausgegangener pharmakologischer Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und Organverteilung (5) war uns bekannt, daß Hexadecylphosphocholin nach oraler Gabe gut resorbiert wird und zu einer hohen Wirkstoffkonzentration unter anderem in Leber und Milz führt. Wir konnten jetzt erstmals eine ausgeprägte *in vivo* Wirksamkeit von He-PC nach oraler Gabe an mit Leishmanien infizierten Mäusen nachweisen. Besonders eindrucksvoll ist die Beobachtung, daß die Reduktion der Parasitenlast in der Milz signifikant stärker ist als bei den mit Antimon therapierten Tieren. Da die mangelnde Eliminierung der Parasiten in der Milz bei einer Antimon-Therapie für Rückfälle verantwortlich gemacht wird, ist dieses Problem mit Hexadecylphosphocholin möglicherweise zu lösen. Für die Antimon-Therapie haben CARTER et al. (6) gezeigt, daß eine Dosissteigerung des Antimons nur zu einer unzureichenden Reduktion der Parasitenlast in Milz und Knochenmark führt. Insofern stellt die Antimon-Therapie zumindest für die Milz eine nicht befriedigende Therapieform dar.

Ein besonderer Vorteil von He-PC liegt zusätzlich in der Verabreichungsform. Während Antimonpräparate, Pentamidine und Amphotericin B nur parenteral verabreicht werden können, stellt die orale Gabe einen wesentlichen Vorteil dar. Neben einer Vermeidung sekundärer Infektionsrisiken ermöglicht sie eine ambulante Therapie und wäre somit auch in Entwicklungsländern einfach durchführbar.

Untersuchungen zur Wirkungsweise von He-PC an Leishmanien werden derzeit durchgeführt. Aus eigenen Studien ist bekannt, daß neben einer Interferenz mit dem Phospholipidstoffwechsel (2) auch immunmodulatorische Wirkungen beobachtet werden (21, 22). Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang sind Untersuchungen, daß He-PC in die Signaltransduktion proliferierender Zellen eingreifen kann (22, 18).

Die potentiellen Targetstrukturen der antiparasitären Wirksamkeit von He-PC an Leishmanien müssen mit Vorrang bearbeitet werden, da sie Rückschlüsse auf mögliche Folgesubstanzen mit weiter verbesserter Wirksamkeit zulassen können.

Danksagung

Dieses Projekt erhielt finanzielle Unterstützung von der UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), ID Nr. 910025.

Zusammenfassung

Hexadecylphosphocholin (He-PC), ein Phospholipid-Derivat, wurde auf die in vitro-Aktivität an Promastigoten und in vivo-Aktivität an mit *Leishmania donovani* infizierten BALB/c Mäusen untersucht. In vitro konnten IC₅₀-Werte zwischen 0,9 und 2,1 mg/l ermittelt werden. In vivo wurde nach oraler Gabe eine ausgeprägte Aktivität in mit Leishmanien infizierten Mäusen nachgewiesen. Besonders ausgeprägt ist die bessere Wirksamkeit in der Milz im Vergleich zu Antimonpräparaten.

Schlüsselwörter

Leishmania donovani, Hexadecylphosphocholin, Alkylphosphocholin.

Summary

A new phospholipid derivative: in vitro and in vivo activity against *Leishmania donovani*

Hexadecylphosphocholine, a novel phospholipid derivative, was tested against *Leishmania donovani* in vitro and in vivo. In vitro IC₅₀-values could be determined between 0.9 and 2.1 mg/l for different leishmanial strains. A marked antileishmanial activity in infected BALB/c mice could be demonstrated after oral administration of He-PC. A superior reduction of parasite load in the spleen was observed in comparison to mice treated with sodium stibogluconate.

Key words

Leishmania donovani, Hexadecylphosphocholine, Alkylphosphocholine.

Literatur

1. BERENS, R. L., MARR, J. J. (1978):
An easily prepared defined medium for cultivation of *Leishmania donovani* promastigotes.
J. Parasitol. 64, 160.
2. BERKOVIC, D., FLEER, E. (1991):
Effects of hexadecylphospholine on cellular function.
Progr. Exp. Tumor Res. (im Druck).
3. BERMAN, J. D. (1988):
Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies.
Rev. Infect. Dis. 10, 560-586.
4. BERMAN, J. D., WYLER, D. J. (1980):
An in vitro model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis.
J. Infect. Dis. 142, 83.
5. BREISER, A., KIM, D.-J., FLEER, E. A. M., DAMENZ, W., DRUBE, A., BERGER, M., NAGEL, G. A., EIBL, H., UNGER, C. (1987):
Distribution and metabolism of hexadecylphosphocholine in mice.
Lipids 22, 925-926.

6. CARTER, K. C., BAILIE, A. J., ALEXANDER, J., DOLAN, T. F. (1988):
The therapeutic effect of sodium stibogluconate in BALB/c mice infected with Leishmania donovani is organdependent.
J. Pharm. Pharmacol. 40, 370-373.
7. CROFT, S. L., NEAL, R. A., PENDERGAST, W., CHAN, J. H. (1987)
The activity of alkylphosphorylcholines and related derivatives against Leishmania donovani.
Biochem. Pharmacol. 36, 2633-2636.
8. EIBL, H., UNGER, C.:
Phospholipide — Ein neues Konzept. In:
NAGEL, G. A., (Hrsg.) *Mammakarzinom — Neue Perspektiven experimenteller und klinischer Therapieforschung*.
Springer, Berlin, 1986.
9. EIBL, H., ENGEL, J. (1992):
Synthesis of hexadecylphosphocholine.
Progress Exp. Tumor Res. (im Druck).
10. EIBL, H., UNGER, C. (1990):
Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug.
Cancer Treat. Rev. 17, 232-242.
11. HILGARD, P., STEKAR, J., VOEGELI, R., ENGEL, J., SCHUMACHER, W., EIBL, H., UNGER, C., BERGER, M. R. (1988):
Characterization of the antitumor activity of hexadecylphosphocholine (D 18506).
Eur. J. Clin. Oncol. 24, 1457-1467.
12. HOCHHUTH, C., BERKOVIC, D., EIBL, H., UNGER, C., DOENECKE, D. (1990):
Effects of antineoplastic phospholipids on parameters of cell differentiation in U937 cells.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 116, 459-466.
13. PETERS, B. S., FISH, D., GOLDEN, R., EVANS, D. A., BRYCESON, A. D. M., PINCHING, A. J. (1990):
Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical features and response to therapy.
Quart. J. Med. 77 (283), 1101-1111.
14. PETERS, W., TROTTER, E. R., ROBINSON, B. L. (1980):
The experimental chemotherapy of leishmaniasis, V. The activity of potential leishmanicides against *L. infantum* LV9 in NMRI mice.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 74, 289-298.
15. SAENZ, R. E., PAZ, H. M., JOHNSON, C. M., MARR, J. J., NELSON, D. J., PATTISHALL, K. H., ROGERS, M. D. (1989):
Treatment of american cutaneous leishmaniasis with orally administered allupurinol riboside.
J. Infect. Dis. 160, 153-158.
16. SAENZ, R. E., PAZ, H., BERMAN, J. D. (1990):
Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis.
Amer. J. Med. 89, 147-155.
17. STAUBER, L. A., FRANCHINO, E. M., GRUN, J. (1958):
An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the golden hamster.
J. Protozool. 5, 269-273.
18. ÜBERALL, F., OBERHUBER, H., MALY, K., ZAKNUN, J., DEMUTH, L., GRUNICKE, H. H. (1991):
Hexadecylphosphocholine inhibits inositol phosphate formation and protein kinase C activity.
Cancer Res. 51, 807-812.
19. UNGER, C.:
Alkylphosphocholine: Entwicklung einer neuen Substanzgruppe mit antineoplastischer Wirksamkeit.
Thieme Copythek, Stuttgart, 1989.
20. UNGER, C., PEUKERT, M., SINDERMANN, H., HILGARD, P., NAGEL, G., EIBL, H. (1990):
Hexadecylphosphocholine in the topical treatment of skin metastases in breast cancer patients.
Cancer Treat. Rev. 17, 243-246.
21. VEHMEYER, K., EIBL, H., UNGER, C. (1992):
Hexadecylphosphocholine stimulates the colony-stimulating factor-dependent growth of hemopoietic progenitor cells.
Exp. Hematology 20, 1-5.

22. VEHMEYER, K., SCHEURICH, P., EIBL, H., UNGER, C. (1991):
Hexadecylphosphocholine — Mediated enhancement of T-cell response to interleukin-2.
Cell. Immunol. 137, 232–238.
23. WHO (1990):
Antimonials: large-scale failure in leishmaniasis “alarming”.
TDR news 34, 1 und 7.
24. WHO (1991):
AIDS, leishmaniasis dangers of clash highlighted.
TDR news 36, 1 und 11.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. med. A. Kuhlencord
Institut für Allgemeine Hygiene und Tropenhygiene
Windausweg 2
D-W 3400 Göttingen · Bundesrepublik Deutschland

ZOBODAT - 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): Kuhlencord A., Maniera T., Eibl H.,linger C.

Artikel/Article: [Ein neues Phospholipid-Derivat: In vitro- und in vivo-Aktivität gegen Leishmania donovani. 231-238](#)