

Pyronaridinempfindlichkeit von Plasmodium falciparum in Thailand

Yelena-Marietta Tiedt¹, S. Prajakwong², G. Wiedermann¹, H. Kollaritsch¹,
W. H. Wernsdorfer^{1,3}, G. Wernsdorfer³

Einleitung Pyronaridin ist der generische Name von 2-Methoxy-6-chloro-9[3,5-bis(1-pyrolidinylmethyl)-4-hydroxy]anilino-1-aza-acridin. Diese Verbindung (Abb. 1) gehört zu den Mannich-Basen und hat blutschizontozide Wirkung. Sie wurde Anfang der 70er Jahre am Institut für Parasitäre Krankheiten, Chinesische Akademie für Präventivmedizin, in Shanghai synthetisiert. Hier wurden auch experimentelle Studien an *Plasmodium berghei* / Maus und *P. knowlesi* / *Macaca mulatta* Modellen durchgeführt (5). Zu klinischen Prüfungen bei Patienten mit natürlich zugezogenen Infektionen mit *Plasmodium falciparum* oder *P. vivax* wurde zunächst die wässrige Lösung von Pyronaridintetraphosphat intravenös verabreicht, da man auf Grund von Vorversuchen mit einer Tablettenformulation angenommen hatte, daß das Mittel im Gastrointestinaltrakt schlecht absorbiert wird. Mangels geeigneter Methoden für die Messung von Pyronaridinkonzentrationen in biologischem Material blieb diese Ansicht bestehen bis es sich schließlich herausstellte, daß die geringe Absorption auf ungenügende Freigabe des Mittels aus der Tablettenformulation zurückzuführen war. Dieser Fehlschluß dürfte die weitere Entwicklung von Pyronaridin erheblich verzögert haben, zumal klinisch-pharmakologische, mit der alten Tablettenformulation durchgeführte Prüfungen bei multi-resistenter Falciparum-Malaria nur mittelmäßige Ergebnisse erbracht hatten (4). Durch die Schaffung eines empfindlichen und zuverlässigen Messverfahrens (HPLC-UV) und die Ergebnisse neuer pharmakokinetischer Untersuchungen haben sich die Perspektiven für Pyronaridin wesentlich gebessert. Pyronaridin gilt daher wieder als Kandidat für eine weitere Entwicklung. Hierbei wird auch die Suche nach einem geeigneten Partnermedikament wichtig sein, da sich bei Tiermodellen und bei *P. falciparum* in vitro eine Resistenz unschwer induzieren läßt (8). Als Mannich-Base läßt Pyronaridin einen den 4-Aminochinolinen nahestehenden Wirkungsmechanismus erwarten. Hierfür gibt es Hinweise (6, 7). Pyronaridin entspricht in seiner Wirkungsweise und Pharmakokinetik einem antimetabolischen Malariamittel. Die Aussichten auf die praktische Wirksamkeit von Pyronaridin, insbesondere in der Behandlung der Falciparum-Malaria werden daher weitgehend vom Konzentrationsprofil und der Sensibilität der Parasiten bestimmt. Deshalb ist es sinnvoll, Sensibilitätsprüfungen in verschiedenen Gebieten und jeweils an einer repräsentativen Anzahl von *P. falciparum*-Isolaten durchzuführen. Eine geeignete in vitro Methodik wurde bereits entwickelt (6).

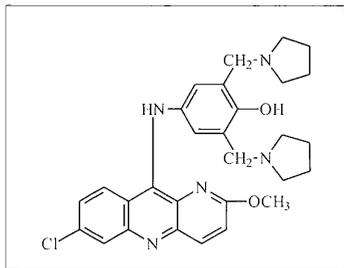


Abbildung 1:
Pyronaridin.

Material und Methoden

Die Studie hatte das Ziel, die Pyronaridinempfindlichkeit natürlicher Isolate von *P. falciparum* in einem Gebiet mit hoher Resistenz gegen 4-Aminochinolone und Antifolate sowie beginnender Resistenz gegen 4-Chinolinmethanole zu prüfen. Die Arbeiten wurden zwischen Mai und August 1996 in der Provinz Mae Hong Son, im Nordwesten Thailands, durchgeführt. Das Studiengebiet grenzt an den Shan Staat der Union von Myanmar (Burma). Vergleichsuntersuchungen mit Chloroquin waren Teil des Arbeitsprogramms.

Es wurden insgesamt 28 frische Isolate von *P. falciparum* erfolgreich auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Pyronaridin geprüft. Diese Isolate stammten von Patienten mit klinisch manifester Malaria, welche die Malariaklinik des Sektors 8 oder das Ambulatorium des Provinzkrankenhauses zwecks Diagnose und Behandlung aufgesucht hatten. Parasitologische Kriterien für die in vitro Untersuchung waren *P. falciparum* Monoinfektion und eine Dichte von 1000 - 80000 asexuellen Parasiten pro μ l Blut. Ausgeschlossen waren Isolate von Patienten mit Vorbehandlung während der vorangegangenen 9 Wochen.

Die Parasitendichte wurde durch Parallelzählung von asexuellen Parasiten und Leukozyten nach dem Standardverfahren ermittelt (11). Die in vitro Prüfung auf Arzneimittelempfindlichkeit folgte der WHO Standardmethode zur Ermittlung der Schizontenreifungshemmung (10). Mit Ausnahme der mit Pyronaridin vordosierten Mikrotiterplatten stammte das dazu erforderliche Material aus WHO-Testsätzen. Die Anordnung auf diesen Mikrotiterplatten (FALCON 3070) entsprach dem üblichen Muster, d. h. medikamentfreie Kontrolle in Vertiefung A, ansteigende Pyronaridinmengen zwischen 0,1 und 6,4 pmol zwischen Vertiefungen B und H, entsprechend Pyronaridinkonzentrationen von 2 - 128 nmol / l Blut-Medium-Mischung (BMM). Ein Test bestand also aus einer Kontrolle (A) und sieben Arzneimittelkonzentrationen (B-H).

Zur Durchführung des Tests wurde dem Patienten mittels heparinisierter Mikropipette Blut aus der Fingerbeere abgenommen und dieses mit der neunfachen Menge RPMI-1640 LPLF-Nährmedium verdünnt und die so entstandene Blut-Medium-Mischung (BMM) durch vorsichtige Bewegung homogenisiert. Hierauf wurden die Vertiefungen der Testplatten mit jeweils 50 μ l der BMM beschickt. Nach Schließen mittels locker sitzendem Deckel (FALCON 3071) wurde die Testplatte in einen vorgewärmten Kerzentopf verbracht, welcher nach Herstellung der CO₂-angereicherten und O₂-reduzierten Atmosphäre für 24 - 26 Stunden bei 37,5°C bebrütet wurde. Nach der Bebrütung wurden dicke Tropfen aus dem Zellsediment der Vertiefungen hergestellt, nach GIEMSA bei pH 6,9 gefärbt, und ausgezählt. Die 8 dicken Tropfen aus einer Testreihe finden, in standardisierter Anordnung, auf einem Objektträger Platz. Bei der Auszählung wurde die Anzahl der Schizonten pro insgesamt 200 asexuelle Parasiten bestimmt. Als Schizont gilt hier jeder asexuelle Parasit mit 3 oder mehr Chromatinkörpern. Der Test gilt als erfolgreich bei mindestens 10% Schizontenreifung in der Kontrolle (10). Die medikamentbedingte relative Hemmung der Schizontenreifung wird auf der Basis der Kontrollwerte errechnet.

Da die Hemmwerte eine log-normale Verteilung aufweisen, wurde die Auswertung der individuellen und gruppierten Sensibilitätstests nach den rechnerischen Grundlagen von LITCHFIELD und WILCOXON (3) mittels EDV-Verfahren (9) durchgeführt. Hierzu wurden die Arzneimittelkonzentrationen logarithmisch und die Hemmwerte in Probite umgewandelt. Zur Prüfung auf Korrelation wurden die mit Pyronaridin und anderen Medikamenten erhaltenen Wertepaare (EC-50 oder EC-90) nach PEARSON analysiert.

Ergebnisse

Die wichtigsten, mit Pyronaridin bei *P. falciparum* in vitro verzeichneten Wirkungsparameter sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Abbildung 2 zeigt die dazugehörige Regressionsgerade. Die an 28 Isolaten gemessene mittlere EC-50 lag bei 14,96 nmol/l BMM, die mittlere EC-90 bei 60,81 nmol/l BMM. Vollständige Hemmung der Schizontenreifung wurde bei einer mittleren Pyronaridinkonzentration von 86,13 nmol/l BMM beobachtet, wobei die Werte vollständiger Hemmung bei den

Tabelle 1:

Wirkungsparameter von Pyronaridin bei *Plasmodium falciparum* in Mae Hong Son, 1996.

| Parameter | Wert |
|--|-------|
| Anzahl Isolate | 28 |
| Mittlere Schizontenreife in Kontrollen (%) | 41,86 |
| EC-50, nmol/l BMM | 14,96 |
| EC-90, nmol/l BMM | 60,81 |
| Mittlerer Endpunkt der Schizontenreife, nmol/l BMM | 86,13 |
| Steigung (EC-84 / EC-50 + EC-50 / EC-16) / 2 | 2,97 |
| Steigungsfaktor f_s | 1,34 |
| Faktor der EC-50 (f_{EC-50}) | 1,39 |

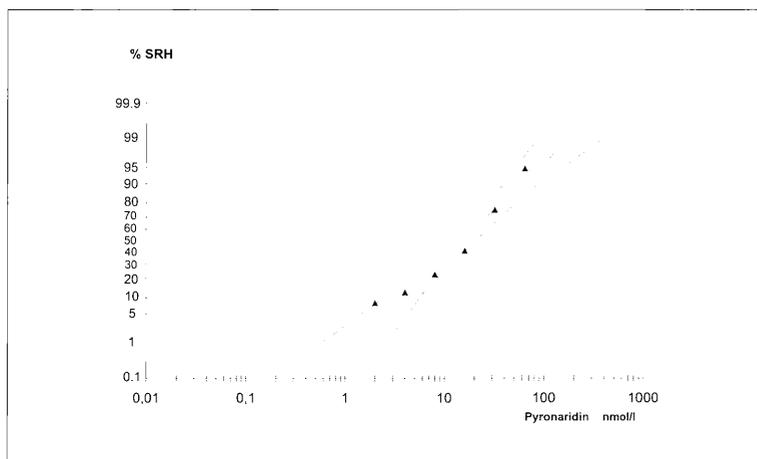


Abbildung 2:

Sensibilität von *Plasmodium falciparum* zu Pyronaridin in Mae Hong Son, Nordwest-Thailand, 1996. Logprobit Regression mit 95% Vertrauensgrenzen. SRH = Hemmung der Schizontenreife.

P. falciparum in Mae Hong Son erheblich empfindlicher (31,9 gegenüber 15,0 nmol/l BMM für die EC-50; 325,9 gegenüber 90,5 nmol/l BMM für die EC-95). Die Untersuchungsgebiete liegen etwa 500 km voneinander entfernt. Die 1995 nahe der Grenze zu Laos in China festgestellten Sensibilitätswerte für Pyronaridin hingegen entsprachen jenen von Mae Hong Son (16,4 gegenüber 15,0 nmol/l BMM für die EC-50; 107,7 gegenüber 90,5 nmol/l BMM für die EC-95). Dies könnte auf regional unterschiedlichen Selektionsdruck zurückzuführen sein.

Die signifikante Korrelation zwischen den Aktivitäten von Pyronaridin und Chloroquin legt es nahe, Pyronaridin zusammen mit den 4-Aminochinolinen als Klasse-I Malariamittel einzustufen. Dem steht jedoch die signifikante, positive Korrelation zwischen Pyronaridin und einem Klasse-II Arylamino-Alkohol gegenüber. Auch mit Atovaquon besteht eine signifikante Wirkungskorrelation ($p < 0,01$ bei EC-50). Es wäre also verfrüht, Pyronaridin der einen oder der anderen Klasse zuzuordnen. Auch die zwar nur mäßige Abweichung von dem bei Klasse I und Klasse II Malariamitteln ausgeprägten linearen log-probit Muster spricht für einen separaten Status von Pyronaridin. Weitere Überprüfung der Konzentrations-Wirkungsregression ergab, in der Tat, die besten Resultate mit einer nicht-linearen log-normalen Angleichung ($A = 3,1469$; $B = -1,5417$; $C = 43,5421$; $r = 0,9996$; $SE = 0,0495$).

Zusammenfassend kann Pyronaridin als wichtiger Kandidat für die weitere pharmazeutische Entwicklung angesehen werden, aber auch als eine Substanz, welche hinsichtlich Wirkungsmechanismus und Pharmakokinetik aus dem von anderen Malariamitteln gewohnten Rahmen fällt.

individuellen Isolaten einen sehr begrenzten Bereich umfassen. Der Wert für relative Heterogenität liegt mit $\chi^2 = 5,47$ zwar noch weit unter der annehmbaren Höchstgrenze (1, 11), ist aber nicht als ideal anzusehen.

Prüfung einer Korrelation zwischen den mit Pyronaridin und Chloroquin bestimmten EC-50 oder EC-90 Werten war bei 23 Isolaten möglich. Bei der EC-50 ergab sich mit $r = 0,4255$ eine mit $p < 0,05$ signifikante positive Korrelation (Abb. 3). Bei der EC-90 war die Korrelation mit $r = 0,6247$ und $p < 0,002$ noch ausgeprägter (Abb. 4).

Diskussion und Schlußfolgerungen

Die mit Pyronaridin 1996 in Mae Hong Son erhaltenen EC-50 und EC-90 Werte sind geringer als die etwa ein Jahrzehnt früher in Thailand gemessenen (6). Diese bezogen sich, im Vergleich zu Mae Hong Son, auf *P. falciparum*-Isolate mit erheblich höherer Resistenz gegenüber Chloroquin. So wurde auch im Dauerkultursystem ein erheblicher, isolatspezifischer Unterschied der Pyronaridinempfindlichkeit in Abhängigkeit von der Chloroquinsensibilität festgestellt (1, 2). Jedoch lag die Proportionalität nahe einem Verhältnis von 1:4 zugunsten von Pyronaridin, so daß dieses Mittel in Anbetracht seiner hohen spezifischen Aktivität dennoch klinisch-parasitologische Wirksamkeit bei Vorliegen mäßiger Chloroquinresistenz erwarten läßt (2).

Im Vergleich zu Beobachtungen in Yunnan nahe der Grenze zu Myanmar aus dem Jahre 1995 (12) zeigte sich

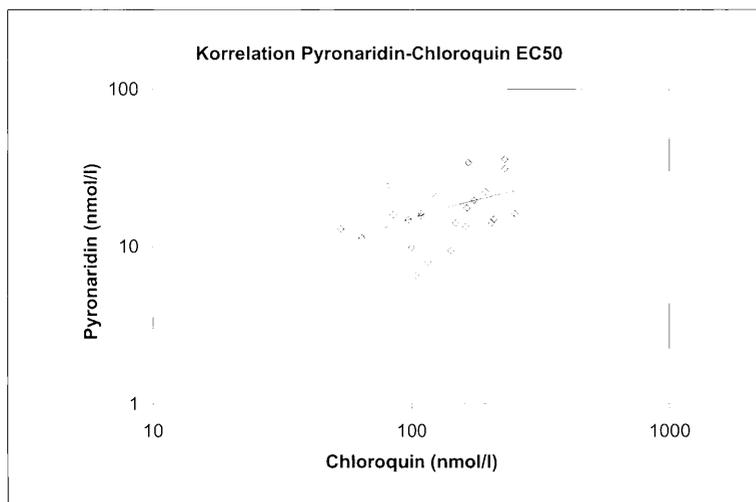


Abbildung 3:
Wirkungskorrelation zwischen den EC-50 Werten für Pyronaridin und Chloroquin.
(n = 23).

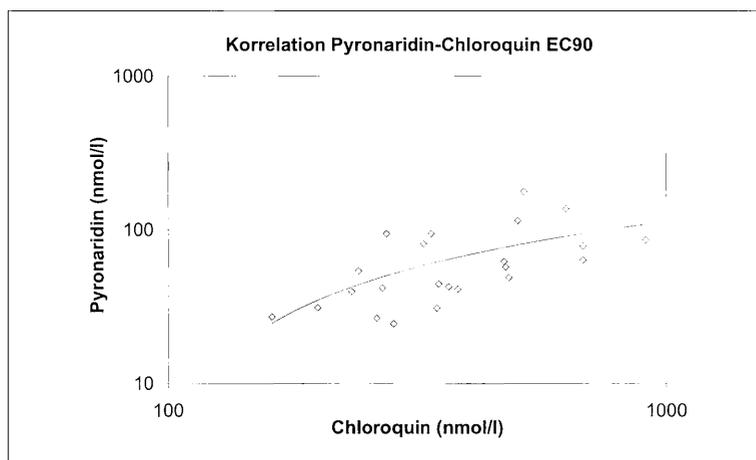


Abbildung 4:
Wirkungskorrelation zwischen den EC-90 Werten für Pyronaridin und Chloroquin.
(n = 23).

Zusammenfassung

Im Jahre 1996 wurden in der Provinz Mae Hong Son, im Nordwesten Thailands, 28 frische Isolate von *P. falciparum* in vitro mittels Schizontenreifungstest (WHO Mark II) auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Pyronaridin, einer Mannich-Base, geprüft. Die mittlere EC-50 lag bei 14,96, die mittlere EC-90 bei 60,81 nmol/l Blut-Medium-Mischung (BMM). Der mittlere Endpunkt der Schizontenreifung lag bei 86,13 nmol/l BMM. Diese Werte lassen mit einer geeigneten oralen Formulierung des Mittels gute Behandlungsergebnisse erwarten. Zwischen Pyronaridin und Chloroquin wurde signifikante Wirkungskorrelation bei der EC-50 ($p < 0,05$) und der EC-90 ($p < 0,002$) beobachtet. Obgleich hieraus eine Zuordnung zu den Klasse-I Medikamenten abgeleitet werden könnte, wäre dies in Anbetracht anderer, von jenen der Klasse I Substanzen abweichender Eigenschaften verfrüht. Pyronaridin kann als wichtiger Kandidat für eine weitere pharmazeutische Entwicklung angesehen werden.

Schlüsselwörter

Malaria, *Plasmodium falciparum*, Pyronaridin, Arzneimittelempfindlichkeit, Resistenz.

Summary

Sensitivity to pyronaridine of Plasmodium falciparum in Thailand

Using a method for assessing the inhibition of schizont maturation (WHO Mark II), 28 fresh isolates of *Plasmodium falciparum* were successfully tested, in vitro, for their sensitivity to pyronaridine, a Mannich base. The studies were performed in 1996 in the Province of Mae Hong Son in the northwestern part of Thailand. The mean EC-50 was 14,96 nmol/l blood-medium-mixture (BMM), the mean EC-90 was 60,81 nmol/l BMM, and the mean cut-off point of schizont maturation 86,13 nmol/l BMM. At this sensitivity level good

clinical-parasitological results could be expected from a suitable oral formulation of the drug. A significant activity correlation was observed between pyronaridine and chloroquine at the EC-50 ($p < 0,05$) and at the EC-90 ($p < 0,002$). Although this could be taken to suggest that pyronaridine belongs to the class I antimalarials, such a classification is premature in view of other characteristics which are different from those of class I drugs. Pyronaridine should be regarded as an important candidate for further pharmaceutical development.

Key words Malaria, *Plasmodium falciparum*, pyronaridine, drug sensitivity, resistance.

Danksagung Die Autoren danken dem Personal des Office of Vector-Borne Disease Control, Chieng Mai, der Unit-8 Malariaklinik und des Ambulatoriums des Provinzkrankenhauses Mae Hong Son für die hervorragende Zusammenarbeit.

Dem Österreichischen Bundesministerium für Wissenschaft und Verkehr sei für die Mittelgedankt, welche Y.-M. T. die Durchführung dieser Studie ermöglichten.

Literatur

1. ALIN, M. H., BJÖRKMAN, A., ASHTON, M. (1990):
In vitro activity of artemisinin, its derivatives, and pyronaridine.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84, 635-637.
2. ELUEZE, E. I., CROFT, S. L., WARHURST, D. C. (1996):
Activity of pyronaridine and mepacrine against twelve strains of Plasmodium falciparum in vitro.
J. Antimicrob. Chemother. 37, 511-518.
3. LITCHFIELD, J. T., WILCOXON, F. (1949):
A simplified method of evaluating dose-effect experiments.
J. Pharm. Exp. Ther. 96, 99-113.
4. LOOAREESUWAN, S., et al. (1996):
Clinical study of pyronaridine for the treatment of acute uncomplicated falciparum malaria in Thailand.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 54, 205-209.
5. NEW DRUG GROUP OF THE FORMER DEPARTMENT OF MALARIA (1980):
Experimental studies on chemotherapeutic effects and toxicities of a new antimalarial drug, 7351.
Acta Pharmaceut. Sin. 25, 630-632.
6. SCHILDBACH, S., WERNSDORFER, W. H., SUEBSAENG, L., ROONEY, W. (1990):
In vitro sensitivity of multiresistant Plasmodium falciparum to new candidate antimalarial drugs in western Thailand.
South East Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth. 21, 29-38
7. WARSAME, M., WERNSDORFER, W. H., PAYNE, D., BJÖRKMAN, A. (1991):
Positive relationship between the response of Plasmodium falciparum to chloroquine and pyronaridine.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 85, 570-571.
8. WERNSDORFER, W. H. (1997):
Antimalarial drugs.
Health Cooperation Papers 15, 151-198.
9. WERNSDORFER, W. H., WERNSDORFER, M. G. (1955):
The evaluation of in vitro tests for the assessment of drug response in Plasmodium falciparum.
Mitt. Österr. Ges. Tropmed. Parasitol 17, 221-228.
10. WORLD HEALTH ORGANIZATION (1990):
In vitro micro-test (Mark II) for the assessment of the response of Plasmodium falciparum to chloroquine, mefloquine, quinine, sulfadoxine / pyrimethamine and amodiaquine.
WHO Document MAP/87.2, Rev. I.
11. WORLD HEALTH ORGANIZATION (1991):
Basic malaria microscopy. Part I.
WHO, Genf
12. YANG, H., et al. (1995):
Sensibilität gegenüber sieben Malariamedikamenten bei Plasmodium falciparum von der China-Laos Grenze [Originalartikel in Chinesisch].
Chung Kuo Chi Sheng Chung Hsueh Yu Chi Sheng Chung Ping Tsa Chih 13, 111-113.

Hinweis Liste der verwendeten Abkürzungen siehe Arbeit ZATLOUKAL et al. (Seite 170).

Korrespondenzadresse Prof. Dr. W. H. Wernsdorfer
Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien
Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria

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: 1998

Band/Volume: [20](#)

Autor(en)/Author(s): Tiedt Yelena-Marietta, Prajakwong Somsak, Wiedermann Gerhard, Kollaritsch Herwig, Wernsdorfer Walther H., Wernsdorfer Gunther

Artikel/Article: [Pyronaridinempfindlichkeit von Plasmodiumfalciparum in Thailand. 177-182](#)