

Vergleichende Untersuchungen über die Empfindlichkeit von Plasmodium falciparum gegenüber Chinin und Chinidin in vitro

Birgit Woitsch¹, H. Noedl¹, S. Prajakwong², G. Wiedermann¹,
G. Wernsdorfer³, W. H. Wernsdorfer^{1,3}

Einleitung Chinarinde ist das älteste Therapeutikum, dessen Wirkung gegen Malaria tatsächlich belegt ist. Die vom Cinchonabaum (*Cinchona ledgeriana*) stammende Chinarinde enthält etwa 20 Alkaloide, von welchen vier als Hauptalkaloide gelten, nämlich Chinin, Chinidin, Cinchonin und Cinchonidin. Bis in das 19. Jahrhundert wurde die Chinarinde therapeutisch in ihrer Gesamtheit und fast ausschließlich zur Behandlung fieberhafter, als Malaria angesehener Erkrankungen verwendet. Nachdem es PELLETIER & CAVENDOU im Jahre 1820 gelungen war, die Hauptalkaloide aus der Chinarinde zu isolieren, wurde bald dem Chinin in der Therapie der Malaria der Vorzug gegeben. Allerdings zeigten klinische Studien unter der Aegis der Madras Cinchona Commission schon im Jahre 1866, daß alle vier Hauptalkaloide der Chinarinde bei Malaria deutliche Wirkung entfalten (1). Obwohl weitere Untersuchungen zu Beginn des 20. Jahrhunderts auf eine höhere Wirksamkeit des Chinidins hingewiesen hatten, blieb Chinin weiterhin das Mittel der Wahl zur Behandlung der Malaria (8). Zum einen beträgt der Chininanteil im Alkaloidauszug etwa 85 - 90%, zum anderen wurde Chinidin, mit einem Anteil von etwa 10% im Extrakt, zur Therapie von Arrhythmien benötigt. Ferner zeigt Chinin eine deutlich geringere kardiotoxische Wirkung als Chinidin (3). Außer in heute noch erhältlichen Präparaten mit Gesamtextrakten der Chinarinde erreichten Cinchonin und Cinchonidin keine Bedeutung in der Therapie der Malaria, da die geringen Wirkstoffmengen im Auszug eine separate Formulierung unwirtschaftlich machten.

Chinin (C₂₀H₂₄N₂O₂) ist ein 4-Chinolinmethanol. Die Grundstruktur ist Chinolin, welches in Position 4 über eine CHOH-Gruppe mit einem modifizierten Piperidinring verbunden ist (Abb. 1). Bei allen bisher untersuchten Plasmodienarten wirkt Chinin blutschizontozid. Bei allen nicht zum Subgenus *Plasmodium* (*Laverania*) gehörenden humanpathogenen Malariaerregern wirkt es auch gametozytozid. Während Chinin seinen Platz in der Therapie der schweren und komplizierten *Falciparum*-Malaria auch nach der Einführung synthetischer Malariamittel behaupten konnte, hat es in der Routinebehandlung erst wieder durch die Resistenz von *Plasmodium falciparum* gegenüber Chloroquin und Folathemmern Bedeutung erlangt. Obgleich einzelne Fälle von Chininresistenz bei *P. falciparum* schon 1910 aus Brasilien bekannt waren (5, 6), ist ein breiter Wirkungsverlust von Chinin als Monotherapeutikum erst in den achtziger Jahren in Teilen Südostasiens eingetreten.

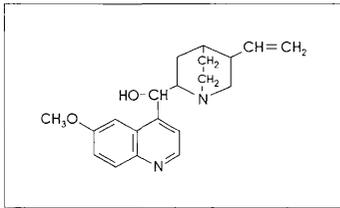


Abbildung 1:
Chinin, Strukturformel.

Kambodscha, Viet Nam, Thailand und Myanmar verzeichnen eine hohe Resistenzquote, dennoch ist R-III Resistenz noch selten und zusätzliche Behandlung mit Tetracyclinen führt in der Regel zur Ausheilung der Infektionen.

Chinidin ist das rechtsdrehende Diastereomer des Chinins (Abb. 1). Sein Wirkungsspektrum bei Plasmodien entspricht jenem des Chinins. In der blutschizontoziden Wirkung ist es dem Chinin überlegen (2). Die wichtigste Indikation für Chinidin in der Therapie der Malaria ist die Behandlung schwerer oder komplizierter *Falciparum*-Malaria in Gegenden, in welchen weder geeignete Artemisinin-derivate noch Chinin zur Verfügung stehen.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Empfindlichkeit von *P. falciparum* gegenüber Chinin und Chinidin in einem Gebiet mit hohem Arzneimitteldruck zu beobachten und die Wirkungsbeziehungen zwischen beiden Medikamenten zu untersuchen.

Material und Methoden

Die Studie wurde zwischen 1994 und 1996 an der Malariaklinik Sektor # 8 in Mae Hong Son, im äußersten Nordwesten Thailands unweit der Grenze mit Myanmar (Burma), durchgeführt. In diesem Gebiet ist *P. falciparum* weitgehend resistent gegen 4-Aminochinoline und Folathemmer, spricht jedoch meist noch gut auf Mefloquin an.

Insgesamt wurden jeweils 58 Isolate von *P. falciparum* mit Erfolg auf ihre in vitro Empfindlichkeit gegenüber Chinin und Chinidin untersucht. Sämtliche Patienten zeigten zum Zeitpunkt der Aufnahme eine mikroskopisch bestätigte Monoinfektion mit *P. falciparum* bei einer Dichte von 1.000 - 80.000 asexuellen Formen im μl Blut. Die meisten Patienten waren zur Zeit der Untersuchung febril, die übrigen berichteten über Fieber während der vergangenen 48 Stunden. Ausgeschlossen wurden Patienten, welche innerhalb der vergangenen 9 Wochen Malariatherapeutika eingenommen hatten.

Die Durchführung der Sensibilitätsprüfungen folgte der WHO Standardmethodik für die Bestimmung der Schizontenreifungshemmung unter Verwendung des Mikrotest Mark II (11). Die Testplatten enthielten neben den medikamentfreien Kontrollen aufsteigende Mengen von Chinin oder Chinidin im Bereich von 4 bis 256 pmol pro Vertiefung, entsprechend 80 bis 5120 nmol/l Blut-Medium-Mischung (BMM).

Jedem Patienten wurde mittels steriler heparinisierter Kapillaren 300 μl Blut aus der Fingerbeere entnommen. Die Blutprobe wurde zu 2,7 ml RPMI 1640 LPLF Medium gegeben und vorsichtig homogenisiert. Gleichzeitig wurde ein dicker Tropfen zur genauen Bestimmung der Parasitaemie angefertigt. Die Vertiefungen der vordosierten Testplatten wurden mit jeweils 50 μl Blut-Medium-Mischung (BMM) beschickt. Nach Schließen der Testplatten wurden diese in einen Kerztopf gebracht und bei 37,5°C für 25 Stunden inkubiert. Nach der Bebrütung wurden aus dem Sediment der verschiedenen Vertiefungen dicke Tropfen angefertigt. Diese wurden nach ausreichender Trocknung bei pH 6,95 nach GIEMSA gefärbt. Bei der mikroskopischen Ablesung wurde die Schizontenzahl pro 200 asexuelle Parasiten bestimmt. Tests galten als erfolgreich, wenn in den Kontrollen wenigstens 20 von 200 asexuellen Parasiten das Schizontenstadium erreicht hatten.

Die Auswertung der Testergebnisse folgte der klassischen Methode von LITCHFIELD & WILCOXON (4) unter logarithmischer Transformation der Arzneimittelkonzentrationen und Probittransformation der Hemmwerte. Im Interesse genauerer Resultate wurde statt der nomographischen Auswertung jedoch ein mathematisches Verfahren gewählt (9). Basierend auf den EC-50 und EC-90 Werten der einzelnen Isolate wurden die Korrelationen zwischen Chinin und Chinidin nach PEARSON & SPEARMAN berechnet.

Tabelle 1:

Effektive Konzentrationen von Chinin und Chinidin, in nmol/l BMM, bei *Plasmodium falciparum* in Mae Hong Son, Thailand, 1994 bis 1996.

Chinin					Chinidin			
Jahr	n	Slope	EC-50	EC-90	n	Slope	EC-50	EC-90
1994	25	2,536	549,9	1824,5	27	2,948	293,4	1181,6
1995	13	3,204	273,4	1225,9	13	2,551	159,5	533,1
1996	20	2,801	417,6	1575,0	18	2,525	179,4	591,8

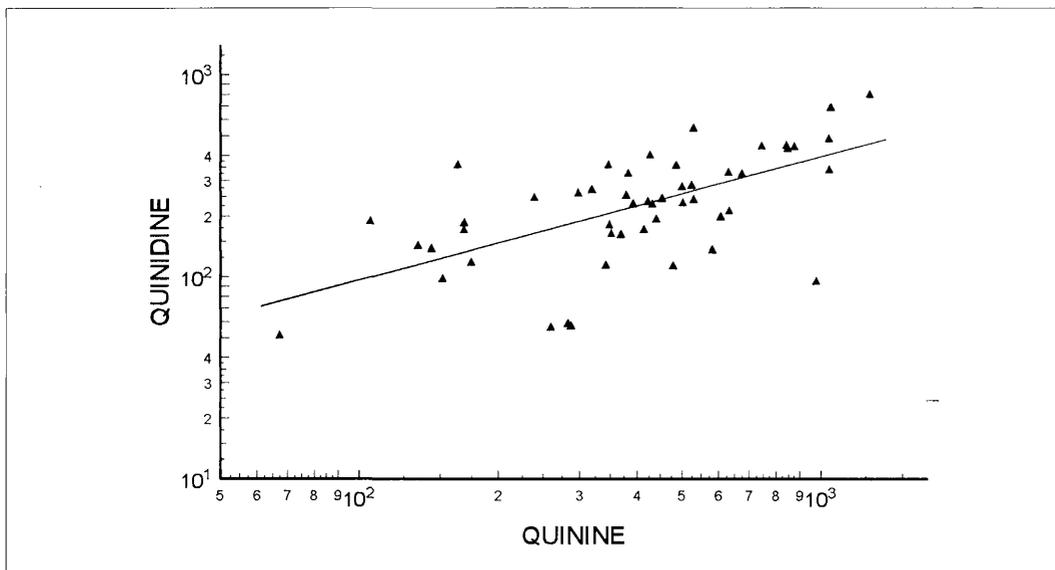


Abbildung 2:

Punktwolkendiagramm der isolatspezifischen EC-50 Werte für Chinin und Chinidin bei *Plasmodium falciparum* in Mae Hong Son, Thailand, 1994-1996.

(n = 50).
EC-Werte in nmol/l BMM.

Chinidin

Im Jahre 1994 wurden 27 *P. falciparum* Isolate auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Chinidin geprüft, 13 im Jahre 1995 und 18 im Jahre 1996. Die χ^2 -Werte der Regressionsgeraden aller Jahre befanden sich innerhalb des Bereichs ausreichender Homogenität. Unter den 58 Isolaten zeigten 24 noch Schizontenreifung bei 1280 nmol/l BMM, also im Grenzbereich der Resistenz. Die EC-50 und EC-90 Werte des Jahres 1994 lagen bei 293 und 1182 nmol/l BMM (Tab. 1). Die EC-99 von 3678 nmol/l BMM ist ein deutlicher Hinweis auf das Vorliegen von Resistenz. Im folgenden Jahr kam es zu einem mäßigen Abfall der EC-50 und einer wesentlich deutlicheren Reduktion der EC-90. Im Jahre 1996 stiegen die Werte wieder geringfügig. Insgesamt ergab sich zwischen 1994 und 1996 eine Verbesserung der Sensibilitätslage, welche sich in einer steileren Regressionsgeraden und vor allem in geringeren EC-90 und EC-99 Werten äußerte.

Diskussion und Schlußfolgerungen

Die longitudinale Entwicklung der Sensibilitätslage von *P. falciparum* gegenüber Chinin und Chinidin im Gebiet von Mae Hong Son ist offenbar der Ausdruck unterschiedlicher Herkunft der Infektionen während der Jahre 1994 - 1996. Während 1994 die Malariapatienten vorwiegend aus dem nahen Myanmar kamen oder sich die Infektionen dort zugezogen hatten, stammten die meisten im Jahre 1995 beobachteten Infektionen aus Thailand, da die Grenze zu Myanmar seit Anfang des Jahres geschlossen war. Im Jahre 1996 war die Grenze wieder geöffnet, jedoch blieb der Grenzverkehr

Ergebnisse

Chinin

Im Jahre 1994 wurden 25 *P. falciparum* Isolate erfolgreich auf ihre Sensibilität gegenüber Chinin untersucht, 13 im Jahre 1995 und 20 im Jahre 1996. Sämtliche Regressionsgeraden (Logprobit) zeigten χ^2 -Werte innerhalb der erlaubten Homogenitätsgrenzen. Fünf der 58 Isolate (9%) zeigten Schizontenreifung bei einer Konzentration von 2560 nmol/l BMM, entsprechend Resistenz zu Chinin. Im Jahre 1994 lagen die mittleren EC-50 und EC-90 Werte bei 550 bzw. 1825 nmol/l BMM (Tab. 1). Die EC-99 von 4850 nmol/l BMM deutet auf das Vorhandensein chininresistenter Isolate hin. Im folgenden Jahr kam es zu einer deutlichen Senkung der EC-50 und einer weniger ausgeprägten Reduktion der EC-90. Im Jahre 1996 stiegen beide Werte wieder an, blieben jedoch unter jenen von 1994. Während dieses Zeitraums zeigte die EC-99 nur geringfügige Schwankungen.

Tabelle 2:

Regressionsparameter für Chinin und Chinidin bei *Plasmodium falciparum* in Mae Hong Son, Thailand, 1994-1996 (nach LITCHFIELD & WILCOXON [4]). EC-50 und EC-90 in nmol/l BMM.

Medikament	n	S	f_s	EC-50	f_{EC-50}	EC-90	f_{EC-90}
Chinin	58	2,773	1,196	424,400	1,239	1579,8	1,372
Chinidin	58	2,799	1,200	218,002	1,241	821,3	1,378

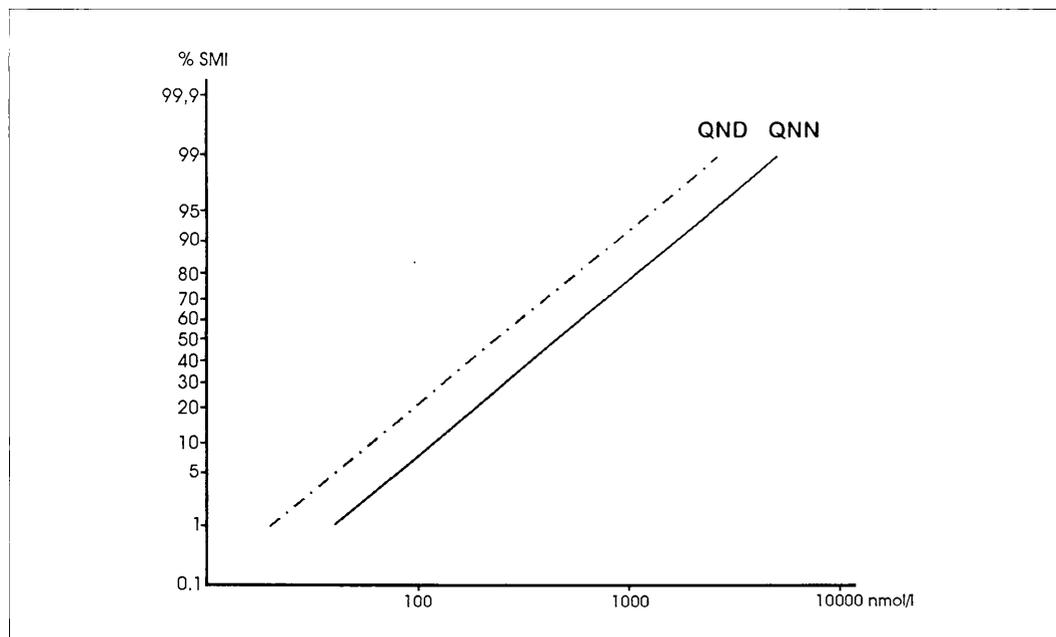


Abbildung 3:

Vergleich der Logprobit Regressionen für Chinin (QNN) und Chinidin (QND) bei *Plasmodium falciparum* in Mae Hong Son, Thailand, 1994-1996.

Wert von 1995 vorzuziehen (273 nmol/l BMM). Über die Zeitspanne von 13 Jahren dürfte die EC-50 demnach auf das 2½-fache gestiegen sein. Hierfür dürfte Arzneimitteldruck durch Chinin kaum verantwortlich sein, da dieses Medikament in Thailand seit 1994 nicht mehr zur Routinebehandlung der Falciparum-Malaria verwendet wird. Vielmehr ist fallende Sensibilität gegenüber Mefloquin, einem dem Chinin chemisch verwandten 4-Chinolinmethanol, ursächlich in Betracht zu ziehen, zumal Wirkungskorrelation zwischen Chinin und Mefloquin nachgewiesen ist.

Die außerordentlich enge chemische Beziehung zwischen Chinin und Chinidin ließ eine ausgeprägte Wirkungskorrelation erwarten. Diese konnte an Hand der EC-50 und EC-90 Werte der 50 parallel gegen Chinin und Chinidin geprüften Isolate untersucht werden. Sie erwies sich als hoch signifikant mit einem Korrelationskoeffizienten (PEARSON) von $r = 0,699$ ($p < 0,0001$) für die EC-50 und $r = 0,479$ ($p < 0,0005$) für die EC-90. Diese enge Beziehung geht auch aus dem Korrelationskoeffizienten nach SPEARMAN hervor. Das Punktwolkendiagramm in Abbildung 2 illustriert die Korrelation zwischen den EC-50 Werten. Kreuzsensibilität bzw. -resistenz zwischen Chinin und Chinidin kann aufgrund dieser Beobachtungen als gesichert gelten.

Die Gegenüberstellung der Regressionsparameter von Chinin und Chinidin (Tab. 2) zeigte bei EC-50 und EC-90 eine erheblich höhere Wirkungsintensität des Chinidins. Für das Steigungsverhältnis (SR) ergibt sich ein Wert von 1,0094. Dieser liegt unter dem des Faktors beider SR Werte ($f_{SR} = 1,2906$). Die Regressionsgeraden für beide Medikamente sind daher parallel (Abb. 3). Für das Wirkungsverhältnis PR ergibt sich ein Wert von 1,9468. Dieser liegt über dem Faktor der EC-50

unter dem 1994 verzeichneten Ausmaß. Die nach Schließung der Grenze beobachtete Reduktion der EC-50 Werte für Chinin und Chinidin deutet auf eine geringere Sensibilität der aus Myanmar stammenden *P. falciparum* Isolate hin, wofür die in Myanmar weit verbreitete Praxis der unkontrollierten Selbstbehandlung verantwortlich sein dürfte. In diesem Zusammenhang wird es interessant sein, (noch nicht erhältliche) Folgedaten für 1997 und 1998 zu vergleichen, da nach relativ starkem Grenzverkehr im Jahre 1997 die Grenze zu Myanmar 1998 wieder geschlossen wurde.

Für die Beurteilung eines langfristigen Trends eignet sich die von SUEBSAENG et al. (7) 1982 in verschiedenen Teilen Thailands erhobene EC-50 für Chinin. Dieser Wert liegt mit 116 nmol/l BMM ($n = 200$) deutlich unter dem 1994 in Mae Hong Son verzeichneten von 550 nmol/l BMM. In Anbetracht der Herkunft der Isolate ist allerdings der Vergleich mit dem

Werte für beide Medikamente ($f_{PR} = 1,3556$). Der Wirkungsunterschied ist daher signifikant. Dies belegt die bereits 1914 von GIEMSA & WERNER (2) beschriebene und in der Folge mehrfach bestätigte (8) ausgeprägtere Wirkung des Chinidins in der Behandlung der Falciparum-Malaria. Chinidin bietet sich daher zur Notfallbehandlung derartiger Infektionen an, wenn andere zur Intensivtherapie geeignete, parenteral anwendbare Medikamente nicht verfügbar sind.

Zusammenfassung Die Empfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* gegenüber Chinin und Chinidin in vitro wurde in den Jahren 1994 - 1996 im Rahmen longitudinaler Studien in Mae Hong Son, Nordwestthailand, untersucht. Die Sensibilitätsbestimmungen wurden mittels Schizontenreifungstest (WHO Standard-Mikrotest Mark II) durchgeführt. Es wurden je 58 frische Parasitenisolate mit Chinin und Chinidin geprüft. Die Chininempfindlichkeit besserte sich zwischen 1994 und 1995 deutlich im Bereich der EC-50, offenbar die Folge der Grenzschießung zum benachbarten Myanmar, woher 1994 zahlreiche Patienten zur Behandlung kamen. Dennoch zeigten die im Grenzbereich der Resistenz befindlichen EC-99 Werte longitudinal nur geringe Veränderungen. Im Vergleich zu Daten von 1982 aus verschiedenen Regionen Thailands zeigte sich insgesamt eine merkliche Abnahme der Chininsensibilität. Zwischen der Wirksamkeit von Chinin und seinem Diastereomer Chinidin besteht eine hoch signifikante positive Wirkungskorrelation. Chinidin entfaltet etwa doppelt so hohe Aktivität als Chinin.

Schlüsselwörter Malaria, *Plasmodium falciparum*, Chinin, Chinidin, Arzneimittelempfindlichkeit, Thailand.

Summary *Comparative in vitro studies on the sensitivity of Plasmodium falciparum to quinine and quinidine*

The in vitro sensitivity of *Plasmodium falciparum* to quinine and quinidine was investigated at Mae Hong Son, northwestern Thailand, in 1994 - 1996. The assays were based on the WHO standard micro-test for the assessment of the inhibition of schizont maturation (Mark II). In total, 58 fresh isolates each were tested with quinine and quinidine. The EC-50 for quinine showed major improvement between 1994 and 1995, obviously the result of the closure of the border to nearby Myanmar from where a substantial number of patients had come in 1994 for treatment. Nevertheless, the EC-99 indicated little change over the years and remained close to the threshold of resistance. Comparing with data reported from various areas of Thailand in 1982, there was a clear reduction of the sensitivity to quinine between 1982 and 1994. The activities of quinine and its diastereomer, quinidine, were found to be significantly correlated. On a molar basis in vitro, quinidine showed about double the efficacy as compared to quinine.

Key words Malaria, *Plasmodium falciparum*, quinine, quinidine, drug sensitivity, Thailand.

Danksagung Die Autoren danken dem Personal des Office for Vector-Borne Disease Control, Chiang Mai, der Unit # 8 Malariaklinik und der Poliklinik des Provinzkrankenhauses in Mae Hong Son für die allzeit gute Zusammenarbeit.

Dem Österreichischen Bundesministerium für Wissenschaft und Verkehr sei für die Mittel gedankt, welche es B.W. und H.N. erlaubten, an dieser Studie teilzunehmen.

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

Literatur

1. BRUCE-CHWATT, L. J. (1988):
History of malaria from prehistory to eradication.
In: Wernsdorfer, W. H., McGregor, I.A. (eds)
Malaria. Principles and practice of malariology, pp 1-60
Churchill Livingstone, Edinburgh.
2. GIEMSA, G., WERNER, H. (1914):
Erfahrungen mit weiteren dem Chinin nahestehenden Alkaloiden und einigen ihrer
Derivate bei Malaria.
Archiv für Schiffs- und Tropenhygiene 18, Beiheft 5.
3. JAMALUDIN, A. et al. (1988):
Single-dose comparative kinetics and bioavailability study of quinine hydrochloride, quinidine sulfate and quinidine
bisulfate sustained-release in healthy male volunteers.
Acta Leidensia 57, 39-46
4. LITCHFIELD, J. T., WILCOXON, F. (1949):
A simplified method of evaluating dose-effect experiments.
J. Pharm. Exp. Ther. 96, 99-113.
5. NEIVA, A. (1910):
Über die Bildung einer chininresistenten Art der Malariaparasiten.
Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 2, 131-140.
6. NOCHT, B., WERNER, H. (1910):
Beobachtungen über relative Chininresistenz bei Malaria aus Brasilien.
Deutsche Med. Wschr. 36, 1557-1560.
7. SUEBSAENG, L., WERNSDORFER, W. H., ROONEY, W. (1986):
Sensitivity to quinine and mefloquine of Plasmodium falciparum in Thailand.
Bull. Wld Hlth Org. 64, 759-765.
8. WERNSDORFER, W. H. (1987):
Quinine in health care in the tropics.
Acta Leidensia 55, 197-208.
9. WERNSDORFER, W. H., WERNSDORFER, M. G. (1995):
The evaluation of in vitro tests for the assessment of drug response in Plasmodium falciparum.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 17, 221-228.
10. WERNSDORFER, W. H. (1997):
Antimalarial drugs.
Health Co-operation Papers 15, 151-198.
11. 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.

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): Woitsch Birgit, Noedl Harald, Prajakwong Somsak, Kollaritsch Herwig, Wernsdorfer Gunther, Wernsdorfer Walther H.

Artikel/Article: [Vergleichende Untersuchungen über die Empfindlichkeit von Plasmodium falciparum gegenüber Chinin und Chinidin in vitro. 183-188](#)