

**Aus dem Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. J. Knobloch**

**Sektion Humanparasitologie
Leiter: Professor Dr. P.G. Kremsner**

**Untersuchung der Kinetik der Wirkung von
Clindamycin gegen *Plasmodium falciparum* in vitro**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Christian Dominik Burkhardt
aus
Konstanz**

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. P. G. Kremsner
2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Dietz

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Epidemiologie, Geschichtliches	4
1.2	Erreger	5
1.3	Klinik	7
1.4	Kontrolle der Erkrankung	9
1.5	Therapie.....	10
1.6	Clindamycin	13
1.6.1	Allgemeines zu Clindamycin	13
1.6.2	Klinische Wirksamkeit von Clindamycin gegen Apicomplexa	14
1.6.3	Wirksamkeit in vitro von Clindamycin gegen Apicomplexa	16
1.7	Fragestellung	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Material	19
2.2	Methoden	19
2.2.1	Kultur	19
2.2.2	Synchronisation	20
2.2.3	Versuche.....	20
2.2.4	Waschvorgang bei Drei-Zyklen-Experimenten.....	22
2.2.5	ELISA.....	23
2.2.6	Auswertung	25
2.2.7	Effektive Konzentrationen	26
3	Ergebnisse	29
3.1	72h-Ergebnisse	29
3.1.1	Clindamycin	29
3.1.2	Chloroquin	30
3.2	144h-Ergebnisse	32
3.2.1	Clindamycin	32
3.2.2	Chloroquin	36
4	Diskussion.....	39
4.1	Einführung.....	39
4.2	Konventionelle Experimente über 72 Stunden	39
4.3	Experimente über drei parasitäre Zyklen	40
4.4	Chloroquin.....	40
4.5	Kritik der Methode	41
4.5.1	Auswaschen des Inhibitors	41
4.5.2	Kritik der Datenaufbereitung und –auswertung	43
4.5.3	<i>Pf</i> HRP2 als Surrogat parasitären Wachstums	43
4.6	Erklärungsmodell	44
4.6.1	Hemmung der Schizogonie.....	44
4.7	Ausblick.....	46
5	Zusammenfassung.....	48
6	Literaturverzeichnis	50
7	Lebenslauf.....	54

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie, Geschichtliches

Malaria ist die bedeutendste parasitäre Infektionskrankheit des Menschen. Schätzungsweise 5% der Weltbevölkerung sind mit humanpathogenen Plasmodien, den Erregern der Malaria, infiziert. Weltweit sterben mehr als eine Million Menschen pro Jahr an der Erkrankung. Sie ist damit die Infektionskrankheit mit der dritthöchsten Mortalität nach AIDS und Tuberkulose. Die Erkrankung ist heute in sämtlichen tropischen Gebieten endemisch, wenn auch in stark unterschiedlichem Ausmaß.

Die bei weitem größte Last tragen Kinder in Afrika südlich der Sahara, einer Region in der sozioökonomische Bedingungen die Kontrolle der Erkrankung stark erschweren. Bis ins 19. Jahrhundert jedoch war Malaria auch in weiten Teilen Europas anzutreffen und die Übertragungsrate in Südeuropa war hoch. Bereits Hippokrates beschrieb im fünften vorchristlichen Jahrhundert wiederkehrende Fieber, die jahreszeitabhängig vermehrt auftraten und Bewohner bestimmter Regionen vermehrt betrafen, bei denen es sich wohl um Malariafieber handelte (15).

Noch die heutige Bezeichnung Malaria (von italienisch: schlechte Luft) reflektiert die lange Zeit vorherrschende miasmatische Deutung der Ätiologie. In der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts setzte sich durch die Pionierarbeit von Koch die Theorie von Mikroorganismen als Erregern von Infektionskrankheiten durch.

So konnte der französische Militärarzt Laveran 1880 erstmals bewegliche Körper im Blut Malariakranker beobachten, der Brite Ross 1897 den parasitären Zyklus mit Anophelesmücke als Haupt- und Mensch als Zwischenwirt aufklären. Sowohl Laveran als auch Ross erhielten den Nobelpreis für ihre Entdeckungen (49).

Im Verlauf des 20. Jahrhunderts wurde die Malaria kontinuierlich weiter erforscht. 1949 schlug Haldane erstmals einen Zusammenhang zwischen Malaria und Sichelzellanämie im Sinne eines protektiven Effekts des

heterozygoten Genotyps vor, die hohe Inzidenz dieser Hämoglobinopathie in malariaendemischen Gebieten erklärend (28).

Trager und Jensen veröffentlichten 1976 die von ihnen entwickelte Methode zur kontinuierlichen Kultur von *Plasmodium falciparum* (46), einer Entwicklung mit weit reichenden Konsequenzen in der Malariaforschung. Erst seit der Möglichkeit der kontinuierlichen Kultur dieses Erregers ist die systematische Erforschung der Blutstadien möglich. Eine der Anwendungen ist die Untersuchung der wirkstoffvermittelten Wachstumsinhibition unter kontrollierten Bedingungen zur vorklinischen Evaluation potentieller Medikamente und auch zur Überwachung der Resistenzlage.

Im Jahr 2002 wurde die Sequenzierung des Genoms des *Plasmodium-falciparum*-Klons 3D7 abgeschlossen (11).

1.2 Erreger

Malaria ist eine durch Protozoen der Gattung *Plasmodium* verursachte Infektionskrankheit. Plasmodien gehören zur Familie der Apicomplexa, zu der noch weitere relevante Erreger zählen (*Toxoplasma*, *Eimeria*). Bekannt sind mehrere hundert Spezies, von denen vier bekannt humanpathogen sind: *Plasmodium falciparum* als Erreger der Malaria tropica, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* als Erreger der Malaria tertiana und *Plasmodium malariae* als Erreger der Malaria quartana.

Die durch *Plasmodium falciparum* verursachte Malaria tropica ist durch ihre hohe Letalität die bei weitem bedeutendste Form der Malaria. Todesfälle bei Infektion mit einer der anderen humanpathogenen Spezies sind sehr selten, wenn dann durch Ruptur der regelmäßig vorhandenen Splenomegalie (49).

Die Übertragung der Erreger erfolgt ausschließlich parenteral, wobei die Übertragung durch Stechmücken mehrerer Spezies der Gattung Anopheles den überragenden Anteil ausmacht. Denkbar sind natürlich aber auch andere bekannte parenterale Übertragungswege mit mittelbarem oder unmittelbarem Blutkontakt, wie Transfusionen oder needle-sharing. Von weiterer klinischer Bedeutung ist die, derzeit noch kontrovers diskutierte, diaplazentare vertikale Übertragung (15).

Im Folgenden bezieht sich dieser Text, wenn nicht ausdrücklich erwähnt, auf die Begebenheiten bei Malaria tropica und ihrem Erreger *Plasmodium falciparum*.

Durch Insektenstich übertragene Sporozoiten gelangen auf dem Blutweg zur Leber und infizieren dort Hepatozyten, in denen sie sich ungeschlechtlich vermehren. Dieser Vorgang nennt sich Leberschizogonie. Diese Teilungsphase dauert im Durchschnitt 5,5 Tage (49). Beim Ausbruch des entstandenen Leberschizonten aus der Wirtszelle werden im Durchschnitt 30.000 Merozoiten freigesetzt, die ihrerseits Erythrozyten befallen. In parasitierten Erythrozyten findet nun ein weiterer asexueller Teilungsprozess statt, die Blutschizogonie. Nach ungefähr 48 Stunden rupturieren Schizont und Erythrozyt und Merozoiten befallen erneut Erythrozyten. Im Falle einer (seltenen) synchronisierten Infektion mit *Plasmodium falciparum* ist dieser Moment klinisch mit Fieberschüben verbunden.

Eine Subpopulation der asexuellen Parasitenformen entwickelt sich nun zu den sexuellen Stadien, den Gametozyten. Bei einer Blutmahlzeit kann eine Anophelesmücke diese Gametozyten aufnehmen. Im Insekt finden die geschlechtliche Vermehrung und die Entwicklung zu infektiösen Sporozoiten statt, womit der parasitäre Zyklus geschlossen ist.

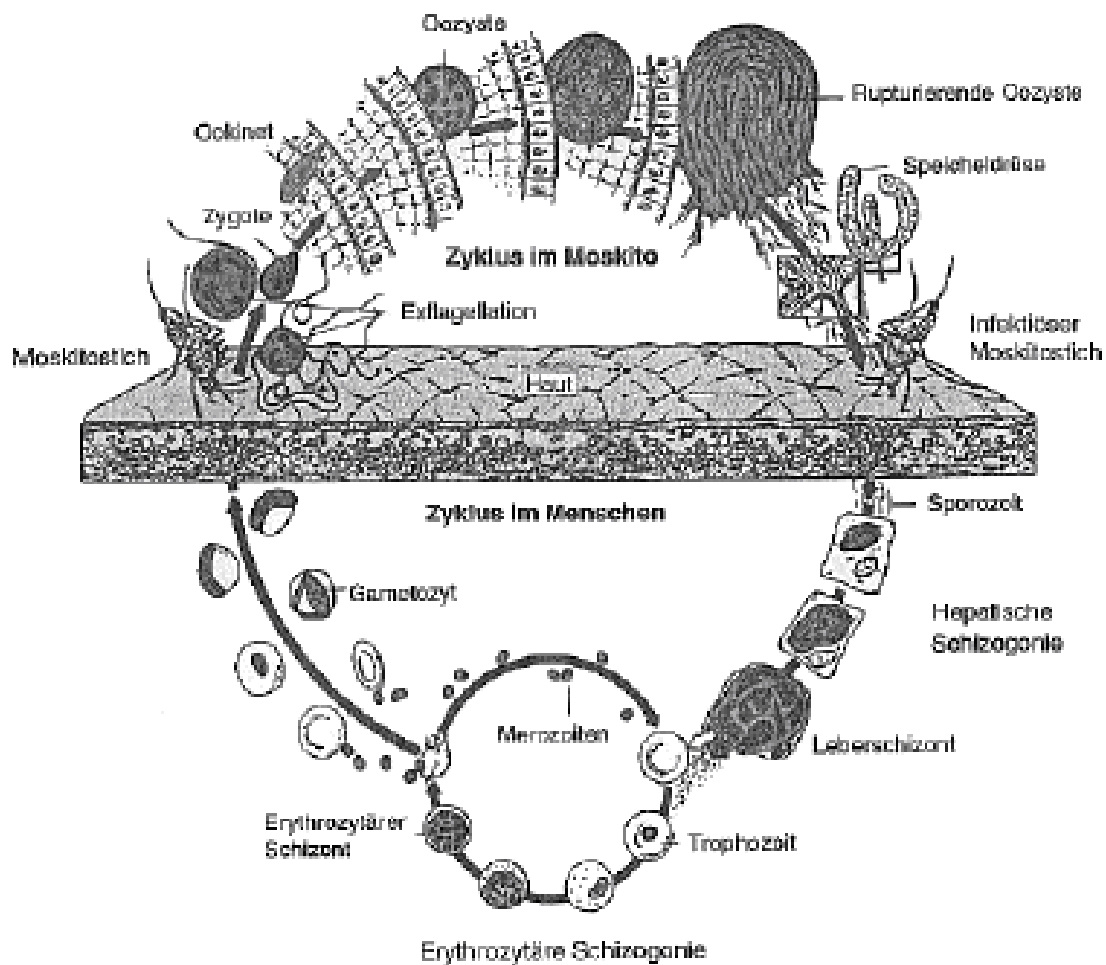


Abb. 1 Zyklus

Der Vektor, die Anophelesmücke, benötigt zur Reproduktion stehendes Süßwasser, was die starke Verbreitung der Erkrankung in Sumpfgebieten erklärt. Der französische Name der Malaria, paludisme, von palud – Sumpf, bezieht sich direkt auf diese Begebenheit. Die Entwicklung des Parasiten im Vektor erfordert Temperaturen über 16°C, die vornehmliche Verbreitung in den Tropen erklärend.

1.3 Klinik

Die Inkubationszeit der Erkrankung schwankt zwischen 7 Tagen und bis zu maximal vier Jahren (15), in der Regel zeigen sich erste Symptome jedoch innerhalb eines Monats nach Infektion. Das Bild der paroxysmalen Fieberschübe mit folgenden symptomfreien Intervallen ist nicht das typische

Bild der Malaria tropica. Die Erkrankung beginnt mit unspezifischen Symptomen wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, abdominalen Schmerzen und Gliederschmerzen.

Es zeigt sich kontinuierliches oder remittierendes Fieber und, teils heftiger, Schüttelfrost.

Das klinische Bild der Malaria wird erheblich beeinflusst vom Immunstatus des betroffenen Individuums. In meso- bis holoendemischen Gebieten, das heißt in Gebieten in denen die asexuelle Parasitenträgerrate 25 % überschreitet, entwickelt sich im Laufe der ersten Lebensjahre eine Teilimmunität, die weder vollständig vor Infektion noch vor Krankheitssymptomen schützt, schwere Verläufe aber sehr unwahrscheinlich macht. Teilimmune Individuen, die hochendemische Gebiete verlassen, verlieren diese schützende Immunität. Ebenso kann der Abfall der Infektionsrate in einem gegebenen Gebiet zum individuellen Verlust der bereits aufgebauten Teilimmunität führen.

Auch können nichtimmune Individuen Teilimmunität aufbauen, indem sie in ein holoendemisches Gebiet übersiedeln, oder indem ihr Lebensraum meso- bis holoendemisch wird. Erwachsene erwerben Immunität schneller als in holoendemischen Gebieten aufwachsende Kinder (49).

Die Malariaanämie kommt zum einen durch Hämolyse, also den Verlust der durch Parasiten rupturierten Erythrozyten zustande. Zum Anderen scheint jedoch auch eine aplastische Komponente von bisher nicht völlig verstandener Pathophysiologie zu ihr beizutragen (49). Erythrozyten, die reifere Parasiten, die Schizonten, in sich tragen, binden an das Endothel kleiner Gefäße. Diese Zytoadhäsion wird von plasmodialen Transmembranproteinen mit extraerythrozytärer Domäne und endothelialen Rezeptoren vermittelt. Eine wichtige Rolle auf parasitärer Seite scheint hier das *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane proteine 1 (*PfEMP1*) zu spielen. Auf endothelialer Seite sind CD36 und Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) beteiligt. Dieser Vorgang nennt sich Sequestration und führt wahrscheinlich zu schwerwiegenden Mikrozirkulationsstörungen. Er ist auch der Grund weshalb bei Patienten, die mit *Plasmodium falciparum* infiziert sind, sich im peripheren Blut nur sehr selten Schizonten nachweisen lassen. Anders verhalten sich hier

die drei anderen humanpathogenen Plasmodien. Die Eigenschaft, infizierte Erythrozyten am Endothel kleiner Gefäße in inneren Organen haften zu lassen, ist ein Virulenzfaktor von *Plasmodium falciparum* (49).

1.4 Kontrolle der Erkrankung

Verschiedene teils unabhängige, teils voneinander abhängige Parameter halten die Prävalenz der Malaria in einem gegebenen Gebiet aufrecht. Das Ineinandergreifen dieser Faktoren zu verstehen war das Ziel intensiver Forschung in der Hoffnung durch gezielte Beeinflussung dieser Parameter die Malaria ausrotten zu können. Im 19. Jahrhundert ist dies in Teilen Europas gelungen. So wurde 1957 ein Programm der WHO zur weltweiten Eradikation der Erkrankung gestartet, das bis 1970 53% der vormals exponierten Population von diesem Risiko befreite (15). Dieses Programm basierte hauptsächlich auf der Anwendung von DDT und anderen Insektiziden. Seither steigt die Prävalenz der Erkrankung wieder stark an, was auf mehrere Faktoren zurückzuführen ist. Resistenzentwicklung der Vektoren gegen Insektizide und der Erreger gegen Medikamente sind hier zu nennen. Wichtiger noch ist vielleicht die sich verschlechternde weltwirtschaftliche Lage in den 1970er Jahren, die zum Rückgang der Unterstützung von wirtschaftlich schwachen Ländern und damit dem Rückgang der Kontrollmaßnahmen in diesen Ländern führte (15).

Gelegentlich sind jedoch auch epidemiologische Erfolge zu verzeichnen. So konnte die Malaria noch in den letzten Jahren auf einigen Inseln vollständig ausgerottet werden (17).

Die Dichte der Anophelesmücken kann auf verschiedene Weisen verringert werden. Der Einsatz von Insektiziden und gezielte Eingriffe zur Verringerung von Süßwasseroberflächen sind zentrale Maßnahmen.

Die schnelle Behandlung erkrankter Individuen senkt die Prävalenz Infizierter und verringert so die Wahrscheinlichkeit der Übertragung von Gametozyten auf den Vektor vor allem in hypoendemischen Gebieten, in denen fast jede Infektion zu klinischen Symptomen führt.

Jede individuelle Maßnahme, die geeignet ist, die Zahl der Stiche zu senken, ist ebenso hilfreich. Hier wären zu nennen das Meiden des Aufenthalts im Freien

zu Tageszeiten erhöhter Aktivität, die Benutzung von insektizidbehandelten Moskitonetzen, die Anwendung von Repellents und weiteren Maßnahmen.

Die prophylaktische Verabreichung von Malariamedikamenten in regelmäßigen Abständen (intermittent preventive treatment) in besonders gefährdeten Populationsgruppen ohne schützender oder temporär verminderter Teilimmunität wie Säuglinge und Schwangere scheint eine Erfolg versprechende Intervention in endemischen Ländern zu sein.

Die Entwicklung eines Impfstoffs wird zwar intensiv betrieben, in absehbarer Zeit ist mit der Einführung eines marktreifen Präparates jedoch nicht zu rechnen (49). Methoden der Vektorkontrolle, der Einsatz von insektizidbehandelten Moskitonetzen und andere Maßnahmen zur Senkung der Transmissionsrate senken wohl die Morbidität und Mortalität, auf unabsehbare Zeit bleibt aber wohl die Verfügbarkeit wirksamer und für die betroffenen Populationen erschwinglicher Therapeutika von entscheidender Bedeutung.

1.5 Therapie

Zur spezifischen Therapie der Malaria steht eine Reihe von Medikamentenklassen zur Verfügung, die entweder einzeln oder in Kombination eingesetzt werden. Die Geschichte der Entwicklung und klinischen Erprobung von Medikamenten mit antiplasmodialer Aktivität ist größtenteils mit der Geschichte von Kriegen verbunden, da sehr häufig die regional betroffenen Gesellschaften ökonomisch und organisatorisch nicht in der Lage waren und leider noch sind, effektive Arzneimittelforschung zu betreiben, sehr wohl aber in tropischen Gebieten Krieg führende Industrienationen. Das Interesse der Militärs an effektiven Therapieoptionen war sehr groß, denn an tropischen Kriegsschauplätzen starben häufig mehr Soldaten an Malaria als durch Kugeln (15).

Die älteste bekannte Droge ist ein Extrakt aus der in China heimischen Pflanze *Artemisia annua*, erstmals erwähnt im vierten nachchristlichen Jahrhundert durch Ge Hong. Ironischerweise wurde der Nutzen dieser Pflanze erst 1971 wieder entdeckt. Heute ist sie Ausgangsstoff für eine der vielversprechendsten neueren Medikamentenklassen, den Artemisininen.

Im 17. Jahrhundert wurde die Rinde des in Peru heimischen Chinabaums als Ausgangsstoff von Chinin von Jesuiten in Europa bekannt gemacht. Chinin in einer intravenös oder intramuskulär zu verabreichenden Formulierung ist heute das Medikament der ersten Wahl bei schwerer Malaria, teils in Kombination mit weiteren Verbindungen, auch wenn es womöglich in absehbarer Zeit von Artemisinin in intravenösen Formulierungen abgelöst wird.

Die strategische Bedeutung wirksamer Medikamente im ersten Weltkrieg führte weltweit zu Anstrengungen, mit dem Ergebnis der ersten synthetischen Wirkstoffe, den 4- und 8-Aminoquinolinen. Zu dieser Gruppe gehören Chloroquin, Amodiaquin und Primaquin.

Am Ende des 2. Weltkriegs wurde in Großbritannien eine weitere Klasse, die Biguanide entdeckt. Zu ihnen zählen Proguanil und Chlorproguanil.

Die in den sechziger Jahren immer mehr Bedeutung erlangende Resistenzentwicklung und der aufkeimende Konflikt in Vietnam führten in den USA zur Entwicklung von Mefloquin und Halofantrin. Mefloquin gilt in Deutschland als Medikament der Wahl bei importierter unkomplizierter Malaria tropica, auch wenn das Nebenwirkungsspektrum mit teils heftigen psychiatrischen Symptomen wenig vorteilhaft ist.

Die seit langer Zeit erste wirklich neue, viel versprechende Verbindung Fosmidomycin wird zurzeit klinisch erprobt (35;50;51).

Einige der in der antibakteriellen Therapie verwendeten Substanzen sind wirksam gegen Infektionen mit eukaryonten Erregern, so auch gegen *Plasmodium falciparum* (14).

Proteinsyntheseinhibitoren wie Tetracycline, Makrolide, Lincosamide, Aminoglykoside, Chloramphenicol und Chinolone zeigen unterschiedliche In-vitro- und In-vivo-Wirksamkeit.

Synergistische Kombinationen von Medikamenten, die in den Folsäuremetabolismus eingreifen, den Sulfonamiden kombiniert mit Diaminopyrimidinen, sind gegen sensitive Parasitenstämme hochwirksam und zur Zeit ist eine solche Kombination, Sulfadoxin-Pyrimethamin (Fansidar®), das Medikament der ersten Wahl bei unkomplizierter Malaria in vielen afrikanischen Ländern.

Die Entstehung, Selektion und Ausbreitung medikamentenresistenter Stämme und so auch die Entwicklung neuer Therapiestrategien sind das dringendste Problem in der Malariaforschung.

Die ersten eindeutigen Nachweise gegen Chinin resistenter Erreger häuften sich in den 1960er Jahren, vor allem in Südostasien, ungefähr drei Jahrhunderte nach Einführung der Chinarinde nach Europa.

Gegen das 1934 entwickelte Chloroquin traten Ende der fünfziger Jahre erstmals Resistenzen auf; heute ist es in weiten Teilen der Welt als Monotherapie fast nutzlos.

Resistenzen gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin traten ebenfalls erstmals in den 1960er Jahren in Südostasien auf, drei Jahrzehnte nach Entdeckung der antibakteriellen Wirksamkeit von Sulfonamiden und ungefähr fünf Jahre nach Einführung dieser Kombination zur Behandlung der Malaria.

In den späten 80er Jahren traten erste Resistenzen gegen Mefloquin, einer während des Vietnamkriegs entwickelten Verbindung auf.

So wird klar, dass bei der Entwicklung und Testung neuer Therapieregime nicht nur Parameter, die das zu behandelnde Individuum betreffen, bedacht werden müssen, sondern auch die voraussichtliche „Überlebenszeit“, das heißt die Zeit bis zur Entwicklung relevanter Resistenzen gegen das Medikament oder die Kombinationstherapie (48).

Die Entwicklung von Resistenzen kann verhindert oder mindestens verzögert werden, indem Wirkstoffe mit verschiedenen molekularen Wirkorten kombiniert werden. Derselbe Gedanke liegt den aktuellen Therapieschemata gegen Tuberkulose, AIDS, Lepra und verschiedenen Neoplasien zugrunde.

Werden zwei Medikamente unterschiedlicher Wirkweise kombiniert, so muss der Parasit, das Virus, das Bakterium oder auch der maligne Klon zwei unterschiedliche Resistenzmechanismen entwickeln. Die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Resistenz eines individuellen Parasiten gegen beide Kombinationspartner ist das Produkt der Einzelwahrscheinlichkeiten der Resistenzentwicklung gegen einen der Kombinationspartner (21).

Etliche Kombinationen werden aktuell angewandt oder sind in der Phase der klinischen Evaluation.

Ein Kriterium bei der Auswahl der Kombinationspartner ist deren Halbwertszeit, da lange Halbwertszeiten eine schnelle Resistenzentwicklung zu fördern scheinen. Ein Medikament mit langer Halbwertszeit ist lange Zeit in subparasitiziden Konzentrationen im Plasma vorhanden. Eine häufige Anwendung eines bestimmten Medikaments mit langer Halbwertszeit in einer umschriebenen Population (so genannter population drug pressure) beschleunigt die Ausbreitung von resistenten Mutanten (48).

1.6 Clindamycin

1.6.1 Allgemeines zu Clindamycin

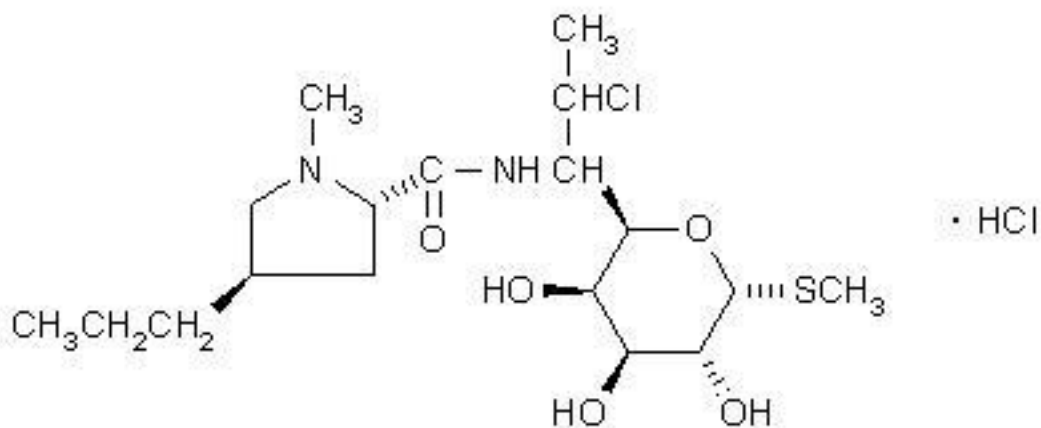


Abb. 2 Clindamycin Strukturformel

Clindamycin gehört mit Lincomycin zur Gruppe der Lincosamide. Es wird halbsynthetisch aus Kulturfiltrat von *Streptomyces lincolnensis* durch Substitution einer Hydroxylgruppe durch ein Chloratom hergestellt. Es wirkt bakteriostatisch und in hohen Dosen bakterizid gegen aerobe grampositive Kokken mit Ausnahme von Enterokokken und gegen einige anaerobe gramnegative Stäbchen (18;29).

Verschiedene Formulierungen des Medikaments erlauben sowohl die intravenöse als auch die perorale Verabreichung. Die orale Bioverfügbarkeit beträgt ungefähr 50%, Konzentrationsgipfel nach oraler Administration werden nach annähernd 45 Minuten erreicht und die Plasmahalbwertszeit in gesunden

Individuen ist 2-3 Stunden. Die Substanz wird renal, vorwiegend jedoch hepatisch, eliminiert (12;29).

Clindamycin bindet an die große (50S) Untereinheit prokaryonter Ribosomen und hemmt so ihre Funktion als Transpeptidase und somit die prokaryontische Proteinsynthese. Die Verbindung interagiert nicht mit der korrespondierenden eukaryonten (60S) Untereinheit (40), was ihren Einsatz als selektiv toxisches Antibiotikum ermöglicht. Umso erstaunlicher ist die Tatsache, dass Clindamycin neben einigen anderen spezifischen Inhibitoren der prokaryonten Replikation, Transkription und Translation auch gegen einige eukaryonte Organismen, darunter so wichtige Krankheitserreger wie *Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii*, wirksam ist.

1.6.2 Klinische Wirksamkeit von Clindamycin gegen Apicomplexa

Die Aktivität von Clindamycin gegen Plasmodien wurde erstmals 1967 von Lewis et al. in *Plasmodium berghei* gezeigt (30), die Wirksamkeit gegen *Plasmodium falciparum* erstmals 1975 beschrieben (5) und seither in etlichen klinischen Studien bestätigt (1;5;7;20;22-25;29;32-34;38;44).

Clindamycin kann erfolgreich als Monotherapie eingesetzt werden. Eine Übersichtsarbeit klinischer Studien zeigte eine mittlere Heilungsrate von 98 % in mehr als 500 behandelten Patienten, sowie ein in der Regel mildes und selbstlimitierendes Nebenwirkungsspektrum, das dem Nebenwirkungsspektrum der Verbindung in der antibakteriellen Therapie entspricht (29).

Gastrointestinale Nebenwirkungen wie Diarrhoe sind häufig und können im speziellen Fall der pseudomembranösen Kolitis lebensbedrohlich werden. Diese Komplikation wird durch eine Überwucherung des Colons durch den toxinbildenden Anaerobier *Clostridium difficile* verursacht und wurde vor allem in Zusammenhang mit der intravenösen Verwendung von Clindamycin im intensivmedizinischen Bereich beschrieben, obwohl sie auch unter anderen Antibiotika beobachtet wird. Spezifische Therapieoptionen sind orales Vancomycin oder Metronidazol. In der Behandlung der Malaria mit Clindamycin wurden zwei Fälle von schwerem Durchfall beschrieben, die wahrscheinlich durch *Clostridium difficile* verursacht wurden (26).

Trotz der zufrieden stellenden Heilungsraten kann Clindamycin als Monotherapie der Malaria wegen seiner verzögerten Wirkung nicht empfohlen werden. In der bereits zitierten Übersichtsarbeit wurden mittlere Zeiten bis zum Unterschreiten der mikroskopischen Parasitennachweisgrenze von vier bis sechs Tagen errechnet, einem vergleichsweise unvorteilhaften Wert verglichen mit zwei bis drei Tagen bei anderen Malariamedikamenten (29). Dieser langsame Wirkungseintritt macht die Monotherapie der Malaria tropica insbesondere in der Behandlung von nichtimmunen Patienten, Schwangeren und Kindern, bei denen eine schnelle Senkung der Parasitämie erforderlich ist, potentiell gefährlich.

Günstiger ausnutzen lassen sich die Eigenschaften von Clindamycin in der Kombinationstherapie, einer - wie bereits beschrieben - viel versprechenden Strategie.

Ein möglicher Kombinationspartner ist das schnell wirkende Chinin (1;22;25;32-34;38;41;47). Der Hauptvorteil der Kombination der beiden Verbindungen liegt in der Verkürzung der zur erfolgreichen Behandlung notwendigen Zeit, einem wichtigen Parameter um die Akzeptanz und damit die Compliance einer Therapie zu verbessern. Chinin allein muss über sieben, Clindamycin allein über fünf Tage verabreicht werden, um ausreichende Heilungsraten zu erzielen; in der Kombination genügen drei Tage (29). Denselben Vorteil hat die Kombination von Chinin mit Doxycyclin oder Tetracyclin, wobei beide Substanzen im Gegensatz zu Clindamycin in Schwangerschaft, Stillzeit und bei Kindern kontraindiziert sind, einem weiteren großen Vorteil von Clindamycin.

Auch Kombinationen von Clindamycin mit Chloroquin (23-25) und Fosmidomycin (2;3), einer neuen, ebenfalls aus der antibakteriellen Therapie stammenden Verbindung, wurden und werden mit unterschiedlichen Ergebnissen untersucht. Die Kombination von Clindamycin mit Chloroquin in Regionen mit hoher Chloroquinresistenz verbessert die Wirksamkeit des Regimes im Gegensatz zur Monotherapie mit Chloroquin beachtlich, aber nicht ausreichend um wirklich empfohlen werden zu können (23;25;29;29).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Clindamycin in der Therapie der Malaria ein viel versprechender Kombinationspartner für schnell wirkende

Medikamente mit vorteilhaften Eigenschaften, sein Einsatz in der Monotherapie jedoch wegen des langsamen Wirkprofils sehr eingeschränkt ist.

1.6.3 Wirksamkeit in vitro von Clindamycin gegen Apicomplexa

Seit der Entdeckung der klinischen Wirksamkeit und des verzögerten parasitiziden Effekts von Clindamycin in vivo als einem Proteinsyntheseinhibitor mit eigentlich selektiver Wirksamkeit gegen Prokaryonten, wurden intensive Anstrengungen unternommen dem Wirkmechanismus näher zu kommen. Geary und Jensen untersuchten 1983 den Effekt verschiedener Antibiotika gegen *Plasmodium falciparum* in vitro (14) und konnten die positiven klinischen Erfahrungen mit Clindamycin bestätigen. Als möglichen Wirkort von Inhibitoren der 50S-Untereinheit von prokaryontischen Ribosomen diskutierten diese Autoren die mitochondriale Proteinsynthese.

Seaberg et al. zeigten einen plateauförmigen Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve und spekulierten bei der Erklärung dieses Effekts mit dem Vorliegen mehrerer unabhängiger Wirkmechanismen: Einem die Erythrozyten schädigenden Effekt, der sich in ihren Versuchen in Konzentrationen über 220µM auch in sichtbarer Hämolyse zeigte, und einem oder mehreren weiteren inhibitorischen Effekten, die bereits bei niedrigeren Konzentrationen zum Tragen kommen. Außerdem beobachteten sie einen gleichsinnigen Zusammenhang zwischen Inkubationszeit mit Clindamycin und Inhibition auf die Lage der Dosis-Wirkungs-Kurve (45).

In einer von Divo et al. veröffentlichten Versuchsreihe zur Untersuchung eines möglichen additiven Einflusses der Sauerstoffkonzentration während der Inkubation auf die Wirksamkeit verschiedener Inhibitoren konnte die Zeitabhängigkeit der Clindamycinwirkung bekräftigt werden. Die Autoren schlugen die unterstellte antimitochondriale Wirkung der Verbindung als Erklärung sowohl für die beobachtete Abhängigkeit der Inhibition von der Sauerstoffkonzentration als auch von der Inkubationszeit mit Clindamycin vor (6).

Eine weitere Veröffentlichung von Geary et al. zeigte die im Gegensatz zu anderen Antimalariamedikamenten langsame und weniger ausgeprägte

intraerythrozytäre Konzentration von Clindamycin als mögliche Erklärung des verzögerten Wirkprofils (13).

In einer anderen Reihe von Veröffentlichungen, die sich mit der in vitro Inhibition durch Clindamycin des mit Plasmodien nah verwandten intrazellulären Organismus *Toxoplasma gondii* befassten, wurden ähnliche Beobachtungen gemacht und mögliche Wirkorte diskutiert. Auch in *Toxoplasma gondii* wurde ein verzögerter Wirkeintritt beobachtet und Mitochondrien als Orte prokaryonter Proteinsynthese als wahrscheinliche Wirkorte diskutiert (40). Weitere Untersuchungen machten das Mitochondrium als Wirkort unwahrscheinlicher, da der Sauerstoffverbrauch von Clindamycin nicht beeinflusst wird, wie beim Organell des oxidativen Stoffwechsels zu erwarten gewesen wäre (39).

Mittlerweile war jedoch in Apicomplexa ein weiteres Genom von 35 Kilobasen entdeckt worden und einem bis dahin unbekanntem Organell, dem Apicoplasten (von Apex und Plastid), zugeordnet worden (19). Der Apicoplast ist ein von vier Membranen umhülltes, plastidähnliches Organell, das wahrscheinlich durch sekundäre Endosymbiose von Apicomplexa erworben wurde. Dieses Organell befindet sich am Apex, einem sich verjüngenden Ende der Parasiten. Ihm wird eine Rolle bei der Invasion der Wirtszellen zugeschrieben.

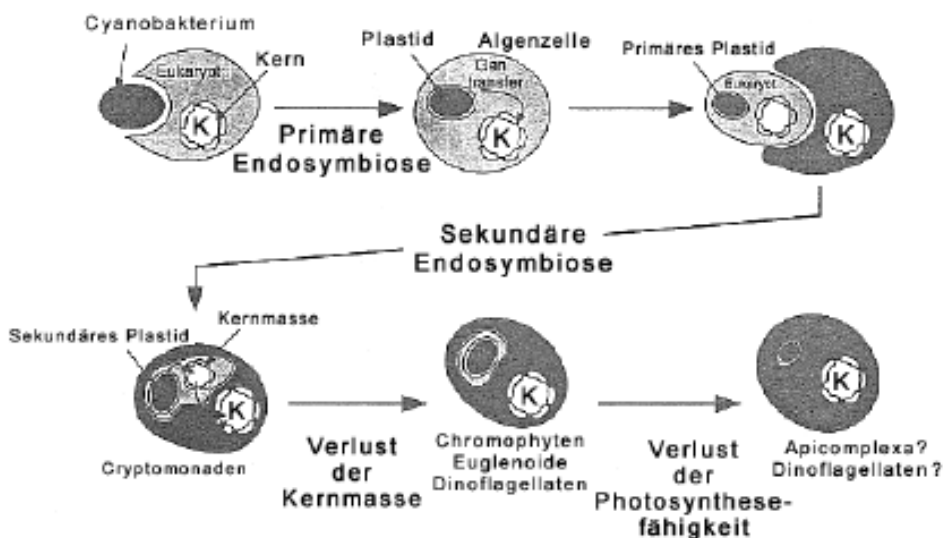


Abb. 3 Sekundäre Endosymbiose

Fichera et al. bestätigten 1995 in *Toxoplasma gondii* das bereits bekannte inkubationszeitabhängige Wirkprofil, zeigten aber zusätzlich eine wirkliche Verzögerung der Wirkung. Nicht die Dauer der Inkubation mit Clindamycin, sondern der Eintritt in den nächsten parasitären Zyklus nach der Behandlung zeigte sich als maßgeblich, den erst in der nächsten Wirtszelle konnte Inhibition gezeigt werden (8).

Für *Toxoplasma gondii* liegt mittlerweile molekularbiologische Evidenz für den Apicoplasten als molekularen Wirkort von Clindamycin vor. Camps et al. konnten eine Mutation der für die rRNA kodierenden, apicoplastären DNA in clindamycinresistenten Parasiten nachweisen (4).

Die von verschiedenen Untersuchern in vitro bestimmten EC_{50} -Werte von Clindamycin gegen *Plasmodium falciparum* liegen je nach Methode und Inkubationszeit zwischen 1 und 100 μ M (14;42;45;51). 0,76 Stunden nach oraler Administration von 600 mg Clindamycin an gesunde Erwachsene wurden Plasmaspitzenkonzentrationen von 11,4 μ M bei einer Halbwertszeit von 2,4 Stunden erreicht (12). Mazur et al. fanden bei den üblichen Dosierungen von 5 mg/kg Körpergewicht alle acht Stunden permanente Plasmaspiegel von mindestens 300 nM und Spitzenspiegel von 3500 nM (31). Jedoch schon mit niedrigeren Dosierungen ist eine kurative Monotherapie möglich (29).

1.7 Fragestellung

Clindamycin zeigt in seiner In-vivo- und In-vitro-Wirksamkeit Auffälligkeiten im zeitlichen Ablauf der Parasitenhemmung bei ungeklärtem Wirkmechanismus. Von mehreren Autoren wurde auf den möglichen Zusammenhang zwischen molekularem Wirkort und spezieller Kinetik der Wirkung hingewiesen. Deshalb soll hier die Kinetik der Wirkung von Clindamycin gegen Wachstum und Vermehrung von *Plasmodium falciparum* in vitro, gemessen als Produktion von *Plasmodium-falciparum*-Histidine-rich-proteine 2 (PFHRP2), in Abhängigkeit von Medikamentenkonzentration und Inkubationsdauer über mehrere parasitäre Zyklen verfolgt werden. Parallele Experimente mit Chloroquin sollen als Referenz für die Validität des experimentellen Aufbaus dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Sämtliche Arbeiten mit Parasitenkulturen oder sterilen Substanzen, die zur Verwendung mit Parasitenkulturen vorgesehen waren, wurden unter dem keimreduzierten laminaren Luftfluss einer Arbeitsbank in einem Labor der Sicherheitsstufe S2 durchgeführt.

Zur kontinuierlichen Kultur wurde RPMI 1640 (Sigma) angereichert mit 0,5 % Albumax (Sigma), 2 % hitzeinaktiviertem Humanserum der Blutgruppe AB, 25 mM HEPES Puffer, 200 µM Hypoxanthin und 2 mM L-Glutamin verwendet. Die so hergestellte Komplettlösung wurde nach Sterilfiltration durch einen Filter mit Poren von 22 µm bei 4 °C maximal eine Woche gelagert, um Kontaminationen zu vermeiden.

Die zur Synchronisation verwendete Lösung wurde durch Einwaage von Sorbitol (Sigma) in doppelt destilliertes Wasser hergestellt. Diese Lösung wurde ebenfalls wie bereits beschrieben steril filtriert, bei 4 °C gelagert und nach längerer Lagerungsdauer direkt vor Anwendung erneut steril filtriert.

Die Medikamentenstammlösungen wurden durch Einwaage von Clindamycin hydrochlorid (Sigma) und Chloroquindiphosphat (Sigma) in doppelt destilliertes Wasser hergestellt. Die so hergestellten Einheiten von 0,5 ml 10 mM Lösung wurden nach Sterilfiltration bei - 80 °C bis zur Anwendung gelagert.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultur

Die kontinuierliche Kultur des verwendeten Isolats S007 wurde nach der von Trager und Jensen entwickelten und 1976 veröffentlichten Methode (46) mit einigen Modifikationen durchgeführt. S007 wurde 1996 von einem Patienten im zentralafrikanischen Gabun isoliert und seither in kontinuierlicher Kultur gehalten oder in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

Eine Suspension parasitierter Erythrozyten wurde mit Kulturmedium und frischen Erythrozyten auf einen Hämatokrit von 5 % verdünnt. Die verwendeten Gewebeskulturflaschen wurden mit einer Mischung von 5 % CO₂, 5 % O₂ und 90

% N₂ begast und bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Alle 24 h wurde der Überstand gegen frisches Kulturmedium ausgewechselt, alle 48 h wurde ein Ausstrich der Kultur angefertigt.

Diese Ausstriche wurden mit Methanol fixiert und nach Giemsa gefärbt. Bei 1000facher Vergrößerung mit Ölimmersion wurde die Parasitendichte als Verhältnis der Zahl parasitierter Erythrozyten pro Gesichtsfeld zu allen Erythrozyten pro Gesichtsfeld bestimmt und morphologisch das Entwicklungsstadium beurteilt. Überstieg die Parasitendichte 3%, so wurde mit frischen Erythrozyten verdünnt.

2.2.2 Synchronisation

Ergab die mikroskopische Beurteilung der Parasiten vorwiegend junge Stadien, die wegen ihrer Morphologie so genannten Ringe, wurde der gesamte Kulturansatz mit Sorbitol 5 % nach der von Lambros und Vanderberg beschriebenen Methode (27) synchronisiert. Dazu wurde die Kultur 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgehoben und verworfen und die so erhaltenen Zellen 10 min mit auf 37 °C erwärmtem Sorbitol 5 % suspendiert. Danach wurde erneut zentrifugiert, der Überstand abgehoben und die Zellen mit 10 ml Kulturmedium gewaschen. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt und wie oben beschrieben die kontinuierliche Kultur fortgesetzt.

Erythrozyten, die mit Trophozoiten oder Schizonten parasitiert sind, haben eine erniedrigte osmotische Resistenz und werden bei der Sorbitolbehandlung lysiert. So führt diese Methode zur Anreicherung von jungen Stadien und damit zur Synchronisation der kontinuierlichen Kultur.

Diese Prozedur wurde einmal pro Woche, mindestens jedoch dreimal vor einem Versuch und direkt vor Beginn jedes Versuchs durchgeführt.

2.2.3 Versuche

Es wurden zum einen 72 h-Experimente und zum anderen Drei-Zyklus-Experimente durchgeführt.

Bei den 72 h-Experimenten wurden Parasiten über 72 h kontinuierlich verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren Clindamycin oder Chloroquin

ausgesetzt. Diese Experimente wurden zur Etablierung der Methodik und zur Findung adäquater Konzentrationen der Inhibitoren durchgeführt.

Bei den Drei-Zyklen-Experimenten über 144 h wurden ebenfalls Parasiten verschiedenen Inhibitorkonzentrationen ausgesetzt. Ein Teil der untersuchten Parasiten wurde jedoch nach 48 h ohne Inhibitor weiter inkubiert, so dass für die folgenden 96 h vom Zeitpunkt 48 h bis zum Zeitpunkt 144 h zwei experimentelle Arme beobachtet wurden: Einer mit kontinuierlicher Exposition zum Inhibitor und einer mit Exposition zum Inhibitor nur über die ersten 48 h. Das Parasitenwachstum wurde zu den Zeitpunkten 0, 48, 96 und 144 h mittels Messung der Produktion von *Pf*HRP2 bestimmt.

Bei allen durchgeführten Versuchen wurden die folgenden Prozeduren auf immer gleiche Weise durchgeführt.

Die Clindamycinstammlösung wurde aufgetaut und mit Kulturmedium auf die benötigten Konzentrationen verdünnt. Jeweils 50 µl pro Testgefäß der entsprechend konzentrierten Lösung wurden im Fall der Drei-Zyklen-Experimente im jeweils gleichen Muster auf 8 Mikrotiterplatten, im Fall der 72h-Experimente auf eine Mikrotiterplatte pipettiert.

Bei den Drei-Zyklen-Experimenten wurden pro Experiment fünf, bei den 72 h-Experimente sieben verschiedene Konzentrationen plus medikamentenfreie Positivkontrollen pipettiert. Pro Platte war jede Konzentration siebenmal wiederholt vorhanden. Die Pipettierpläne befinden sich im Anhang.

Nach mikroskopischer Verifikation der Synchronität und des Vorherrschens junger Ringe wurde die kontinuierliche Kultur erneut synchronisiert und ein weiterer Ausstrich angefertigt, gefärbt und ausgezählt. Anschließend wurde eine Versuchskultur mit 2% Hämatokrit und 0,05% Parasitendichte wie oben beschrieben hergestellt. Je 150 µl der angesetzten Zellsuspension wurden in die Mikrotiterplatten pipettiert. Somit ergab sich ein Gesamtvolumen pro Testgefäß von 200 µl mit einem Hämatokrit von 1,5 %. Vor Inkubationsbeginn wurde der Inhalt mehrerer Testgefäße als Hintergrund entnommen und bei – 20 °C eingefroren und die entleerten Testgefäße mit parasitenfreiem 200 µl Medium gefüllt.

Diese Platten wurden nun in einem gasdichten Gefäß mit der oben beschriebenen Gasmischung begast und bei 37 °C inkubiert.

Die Platten der 72 h-Experimente wurden nach 72 h bei – 20 °C zur späteren Messung eingefroren.

2.2.4 Waschvorgang bei Drei-Zyklen-Experimenten

Abbildung 4 illustriert die verschiedenen Vorgehensweisen zu den Zeitpunkten 48 h, 96 h und 144 h bei den jeweils acht identischen Mikrotiterplatten 1 - 8, mit denen jedes Drei-Zyklen-Experiment begonnen wurde.

Der Waschvorgang ermöglichte es, erstens das Medium auf eine kontrollierte Weise zu erneuern, zweitens die Menge des sekretierten *PfHRP2* indirekt messbar zu machen und drittens den Vergleich zwischen Inkubation mit der jeweils verwendeten Testsubstanz (Clindamycin oder Chloroquin) für lediglich 48 h oder für die gesamten 144 h.

Zum Zeitpunkt 48 h wurde mit den Platten 2 – 7 auf folgende Weise verfahren: Vor jedem Waschgang wurde die gesamte Mikrotiterplatte bei 1500 U/min für 5 min zentrifugiert, um sicherzustellen, dass sich im Überstand keine Zellen mehr befanden. Anschließend wurden unter sterilen Bedingungen 150 µl des Überstands abpipettiert und durch 150 µl frisches Kulturmediums ersetzt. Dieser Vorgang wurde für die Platten 2 – 8 dreimal wiederholt, die Platten 1 und 2 wurden daraufhin eingefroren. Den Platten 6 – 8 wurde nach dem dritten Waschgang frisches Medium mit den jeweiligen Konzentrationen von Clindamycin oder Chloroquin zugefügt, den Platten 3 -5 wurde inhibitorfreies Medium zugefügt. Nun wurden die Platten 3 – 7 für weitere 48 h bis zum Zeitpunkt 96 h unter den beschriebenen Bedingungen inkubiert. Zum Zeitpunkt 96 h wurden die Platten 4, 5, 7 und 8 nach dem eben beschriebenen Muster dreimal gewaschen, wobei den Platten 7 und 8 beim dritten Waschgang frisches Medium mit Clindamycin beziehungsweise Chloroquin und den Platten 4 und 5 inhibitorfreies Medium zugefügt wurde. Nun wurden die Platten 3, 4, 6 und 7 eingefroren, die Platten 5 und acht für weitere 48 h bis zum Zeitpunkt 144 h inkubiert und dann eingefroren. Nach Abschluss eines Experiments lagen nun also acht Mikrotiterplatten mit ursprünglich identischer Verteilung der Konzentration von Clindamycin oder Chloroquin vor. Die Platten 1 und 2

repräsentierten die nach 48 h gebildete Menge an PfHRP2, wobei der Platte 2 jene Menge extraerythrozytären Proteins entnommen war, die bei den Wachvorgängen verloren ging. Die Platten 3, 4, 6 und 7 repräsentierten die nach 96 h gebildete Menge PfHRP2, die Platten 3 und 4 mit Exposition zu Clindamycin oder Chloroquin nur für die ersten 48 h, die Platten 6 und 7 mit durchgehender Exposition. Äquivalent zur Vorgehensweise nach 48 h enthielten die Platten 3 und 6 das den Platten 4 und 7 beim Waschvorgang entzogene PfHRP2. Die Platten 5 und 8 repräsentierten schließlich die Menge PfHRP2, die nach 144 h gebildet war, die Platte 5 mit Exposition zu Clindamycin oder Chloroquin nur für die ersten 48 h, die Platte 8 mit durchgehender Exposition. Im weiter folgenden Text werden die Mikrotiterplatten 3 – 5 Arm A mit Exposition über nur die ersten 48 h, die Platten 6 – 8 Arm B mit durchgehender Exposition, genannt.

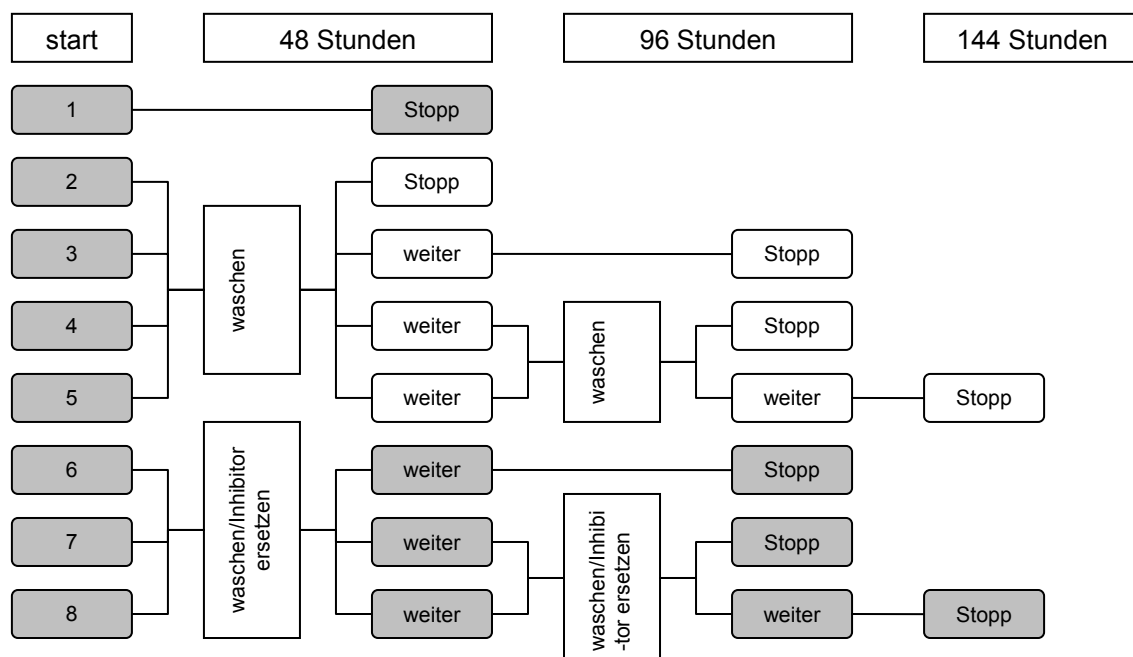


Abb. 4 Flussdiagramm zur Erläuterung der Prozeduren bei den Drei-Zyklen-Experimenten

2.2.5 ELISA

Es werden mehrere Methoden der Quantifizierung von Wachstum und Vermehrung von *Plasmodium falciparum* in Kultur angewendet. Die in diesen

Experimenten verwendete Wachstumsbestimmungsmethode ist relativ neu und basiert auf dem etablierten ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay)-Verfahren, das sich zur Bestimmung von Antigenkonzentrationen eignet, aber die Verfügbarkeit eines geeigneten Immunglobulins voraussetzt.

In diesem Fall waren alle benötigten Bestandteile kommerziell in einem für diagnostische Anwendungen entwickelten System (Malaria Antigen CELISA, Cellabs, Brookvale, New South Wales, Australien) erhältlich.

Nach Abschluss eines Experiments, das heißt wenn jeweils alle verwendeten Platten eingefroren waren, wurden alle Platten und die vor Beginn der Experimente entnommenen Hintergrundkontrollen bei Raumtemperatur aufgetaut und erneut bei - 20 °C eingefroren. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, so dass sämtliche Zellen in der Suspension lysiert waren, um bei der anschließenden Messung sowohl intra- als auch extrazelluläres Protein zu erfassen. Im Falle der drei durchgeführten Experimente über 72 Stunden wurden die je Experiment jeweils sechsfach vorhandenen unabhängigen Testgefäße mit gleicher Inhibitorkonzentration und gleicher Kultursuspension vor der Messung zusammengeführt und gemischt. Somit ergab sich also im Ergebnis der Mittelwert von sechs unabhängigen Unterversuchen. Bei den Versuchen über 144 Stunden wurden die hier ebenfalls vorhandenen sechsfachen gleichartig behandelten Testgefäße auch jeweils einzeln gemessen.

Je 100 µl der lysierten Suspension wurden in die mit dem spezifischen Anti-*Pf*HRP2-Immunglobulin vorbeschichteten Testgefäße der ELISA-Mikrotiterplatte überführt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Menge des von den festgebundenen monoklonalen Antikörpern (IgM, Code: CPF4) erkannten *Pf*HRP2-Proteins ist konzentrationsabhängig. Nach Ablauf der Inkubation wurden alle Testgefäße dreimal mit der mitgelieferten, verdünnten PBS-Tween Pufferlösung gewaschen. Auf diese Weise wurde das von den Antikörpern erkannte *Pf*HRP2 in den Testgefäßen angereichert. 100 µl Lösung mit einem peroxidase-konjugierten anti-*Pf*HRP2 Antikörper (IgG1, Code: CPF6) wurde nun den auf Krepppapier trocken geschlagenen Mikrotiterplatten zugefügt. Nach einer Stunde Inkubation zur Bindung des Antikörperkonjugat

wurde nun erneut dreimal mit PBS-Tween Pufferlösung gewaschen und anschließend die Mikrotiterplatten auf Krepppapier trocken geschlagen. Somit befindet sich nun eine von der Konzentration des Proteins in der lysierten Zellsuspension abhängige Menge der Peroxidase in jedem Testgefäß. Nun wurde noch 50 µl eines Farb-Substrat-Gemischs (Tetramethylbenzidine/H₂O₂) zugefügt, das in einer von der Peroxidase katalysierten Reaktion einen Farbumschlag anzeigt. Bei konstanter Substratmenge, Reaktionszeit und Temperatur ist die molare Menge des umgesetzten Substrats, beziehungsweise die Intensität dieses Farbumschlags nun ausschließlich abhängig von der Konzentration des Enzyms und so auch des zu messenden Proteins in jede Testgefäß. Nach Ende der 15 min wurde der Farbumschlag durch Inhibition des Enzyms mit Salzsäure gestoppt und die Intensität der Färbung photometrisch durch Messung der Absorption bei 450 nm gemessen (LS55 Luminescence Spectrometer, PerkinElmer, MA, USA). Parallel wurde bei jeder Messung eine Verdünnungsreihe aus einer Positivkontrolle, das heißt einer ohne Inhibition gewachsenen Probe, gemessen. Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurde die Konzentration dieser Positivprobe absteigend um jeweils 50 % der Vorhergehenden durch Zugabe von destilliertem Wasser reduziert, so dass parallel unter identischen Bedingungen in jeder Messung eine Eichreihe mit bekannten relativen Konzentrationen von 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %, 1,563 % und 0,781 % der verwendeten Positivkontrolle vorlag.

2.2.6 Auswertung

Nach Abschluss eines Experiments, das heißt nach Beendigung der Kulturzeit, dem Hämolsieren durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen, der Durchführung des ELISA und abschließender photometrischer Bestimmung der Absorption lagen nun die *Pf*HRP2-Konzentrationen repräsentierende Werte der optischen Dichte (OD) vor. Die aus den Verdünnungsreihen erstellten Eichkurven zeigten eine nichtlineare Beziehung zwischen den optischen Dichten und der relativen Konzentration von *Pf*HRP2. Deshalb wurde als erster Schritt der Datenanalyse aus den Eichreihen mit bekannter relativer Konzentration des Proteins ein polynomiales Regressionsmodell für jedes Experiment erstellt (EXCEL für Windows, Microsoft, Seattle, USA). Mit Hilfe der

sich ergebenden Funktion wurden sämtliche Werte der optischen Dichte in Werte der relativen PfHRP2-Konzentration umgerechnet (42).

Bei den Versuchen über mehrere Zyklen parasitärer Entwicklung mit Medienwechsel während der laufenden Versuche ergab sich das Problem, dass PfHRP2 zu einem unbekanntem Teil nach extrazellulär sekretiert wird (37). Um diese Unbekannte erfassen zu können, wurde zu jedem Messzeitpunkt, an dem gleichzeitig ein Medienwechsel erfolgte, jeweils eine identische Mikrotiterplatte ungewaschen eingefroren, so dass aus der Differenz der Ergebnisse dieser beiden Platten auf den ausgewaschenen Anteil Proteins rückgeschlossen werden konnte.

Die Berechnung der PfHRP2-Werte zu den jeweiligen Zeitpunkten erfolgte dann nach den folgenden Formeln 1,2. Die Berechnung erfolgte für jede InhibitorKonzentration für die Arme A und B.

Nach 96 h:

$$[PfHRP\ 2]_{96\ korrigiert} = [PfHRP\ 2]_{96\ ungewasche\ n} + ([PfHRP\ 2]_{48\ ungewasche\ n} - [PfHRP\ 2]_{48\ gewaschen})$$

Formel 1

Nach 144 h:

$$[PfHRP\ 2]_{144\ korrigiert} = [PfHRP\ 2]_{144\ ungewasche\ n} + ([PfHRP\ 2]_{96\ ungewasche\ n} - [PfHRP\ 2]_{96\ gewaschen})$$

Formel 2

2.2.7 Effektive Konzentrationen

Zur Berechnung der effektiven Konzentrationen (EC) wurden bei den Experimenten über 72 h die aus den optischen Dichten errechneten Werte relativer PfHRP2-Konzentration direkt verwendet. Bei den Versuchen über mehrere Zyklen wurden zur Bestimmung der effektiven Konzentrationen den prozentualen Werten zu einem Messzeitpunkt jeweils der Mittelwert der

relativen PfHRP2-Konzentration bei derselben Medikamentenkonzentration des vorhergegangenen Messzeitpunkts abgezogen (Formeln 3, 4), um Aussagen über den zeitlichen Ablauf der inhibitorischen Eigenschaften der untersuchten Verbindungen machen zu können.

$$PfHRP2_{Zyklus} = PfHRP2[\%]144_{KonzA} - \frac{\sum^n PfHRP2[\%]96_{KonzA}}{n}$$

Formel 3

$$PfHRP2_{Zyklus} = PfHRP2[\%]96_{KonzA} - \frac{\sum^n PfHRP2[\%]48_{KonzA}}{n}$$

Formel 4

Aus den so gewonnenen Daten wurden nun mit Hilfe einer im Internet frei zugänglichen Software (<http://malaria.farch.net>) die effektiven Konzentrationen errechnet. Die Software beruht auf einem polynomialen Regressionsmodell und ergibt Resultate, die denen anderer Berechnungsmethoden sehr nahe kommen (36).

Die gewonnenen Daten werden eingangs als effektive Hemmkonzentrationen zu einem gegebenen Zeitpunkt dargestellt. Außerdem erfolgte der Vergleich zwischen den beiden experimentellen Armen in den Versuchen über mehrere Zyklen, dem einen mit kontinuierlicher Exposition zum Inhibitor, dem anderen mit Exposition für nur einen Zyklus, als direkter Vergleich der relativen HRP2-Werte zu einem Zeitpunkt und mit einer gegebenen Inhibitorkonzentration mittels des MANOVA-Verfahrens, beziehungsweise des Wilcoxon Rangsummentests im Falle des Experiment mit Chloroquin über 144 h. Das MANOVA-Verfahren ermöglicht den Vergleich von Daten aus verschiedenen Experimenten, indem es den Einfluss des Experiments und der Zielvariablen, hier der Expositionsdauer, getrennt zu berücksichtigen imstande ist. Als

statistisch signifikant wurden Irrtumswahrscheinlichkeiten $< 0,05$ angenommen. Alle Berechnungen wurden mit der Software STATA für Mac OS X (Stata Corporation, Texas, USA), JMP 5.0 (SAS Institute, North Carolina, USA) und EXCEL für Windows XP (Microsoft, Seattle, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 72h-Ergebnisse

3.1.1 Clindamycin

Bei den zwei durchgeführten Versuchen mit jeweils sechs Proben pro Konzentration führten 137,7 und 151,2 μM zu 50 % Hemmung der Synthese von PflHRP2 (EC_{50}). Im Einzelnen sind die Ergebnisse in Tabelle 1 aufgeführt. Abbildung 2 zeigt die sich aus den zwei Versuchen ergebenden Dosis-Wirkungs-Kurven.

Clindamycin [μM]	HRP2 [% der Positivkontrolle]	
	Experiment 1	Experiment 2
0	100,00	100,00
0,3	89,85	115,07
1	73,55	99,84
3	82,56	106,42
10	70,99	101,14
30	75,16	88,72
100	61,48	71,60
300	9,84	25,76
EC [% Hemmung]	[μM]	
50	137,70	151,24

Tab. 1 Dosis-Wirkungs-Beziehung und Hemmkonzentrationen (EC_{50}) Clindamycin 72 h

Dosis-Wirkung Clindamycin 72h

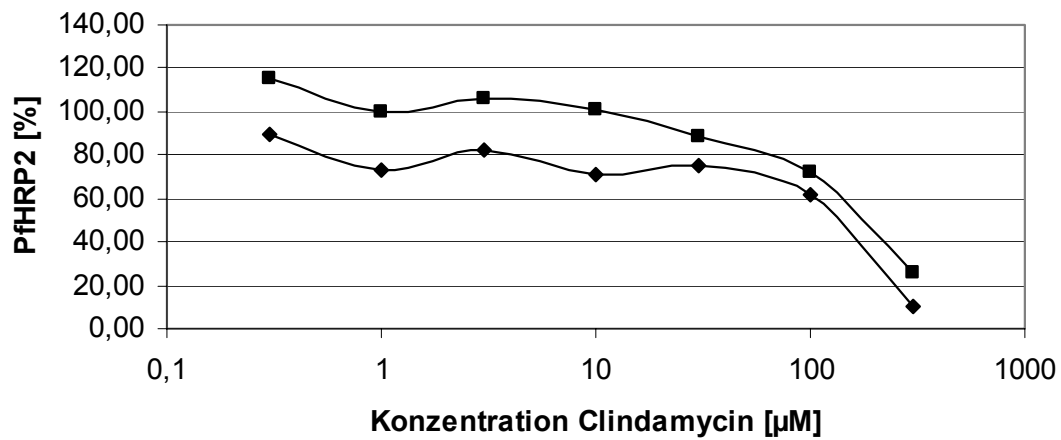


Abb. 5 Dosis-Wirkungs-Kurve Clindamycin 72 h

3.1.2 Chloroquin

Der einzelne Versuch mit durchgehender Exposition mit Chloroquin ergab Hemmkonzentrationen von 8,62 nM für 50 %, 21,89 nM für 90% und 28,51 nM für 99 % Inhibition der Synthese des Proteins (EC_{50} , EC_{90} , EC_{99}). Tabelle 2 und Abbildung 3 zeigen die vollständigen Ergebnisse und die graphische Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung.

Chloroquin [nM]	HRP2 [% der Positivkontrolle] Experiment 1
0	100,00
0,3	102,18
1	96,93
3	110,13
10	39,17
30	2,93
100	1,27
300	1,44
1000	1,88
3000	3,38
EC [% Hemmung]	[nM]
50	8,62
90	21,89
99	28,51

Tab. 2 Dosis-Wirkungs-Beziehung und Hemmkonzentrationen ($EC_{50/90/99}$) Chloroquin 72 h

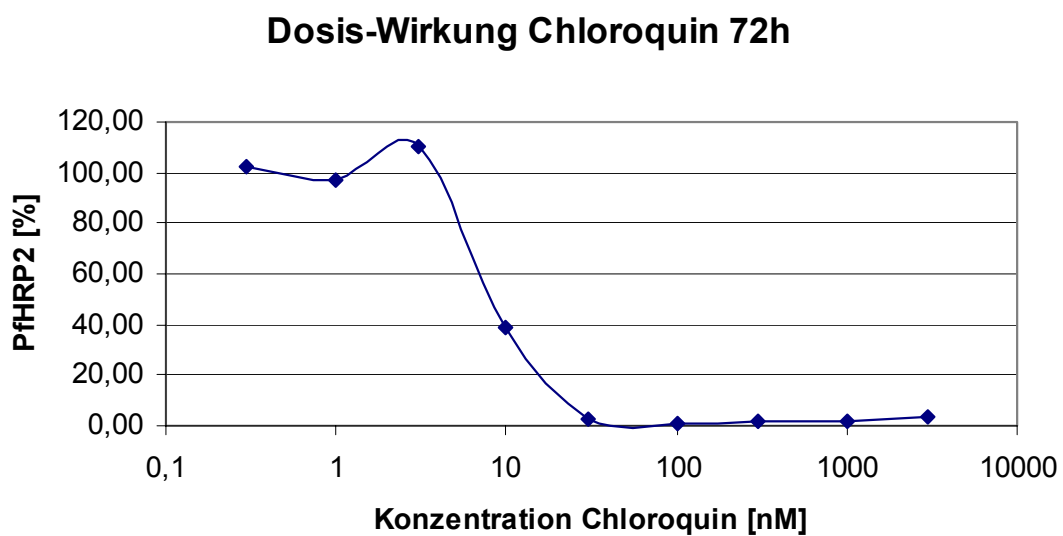


Abb. 6 Dosis-Wirkungs-Kurve Clindamycin 72 h

3.2 144h-Ergebnisse

Nach der Etablierung der Methodik wurden vier Experimente mit Clindamycin und ein Experiment mit Chloroquin über drei parasitäre asexuelle Zyklen über 144 h durchgeführt.

3.2.1 Clindamycin

Die Ergebnisse zeigen eine sehr deutliche Senkung der inhibitorischen Konzentrationen nach 144 h, beziehungsweise nach Abschluss eines dritten parasitären Zyklus auf 5,3 nM bei durchgehender und auf 7,2 nM bei Exposition zu Clindamycin nur über die ersten 48 h. Die Ergebnisse sind im Einzelnen in Tabelle 3 dargestellt.

Expositionsdauer [h]	n	EC50 [nM]				EC90 [nM]			
		Mittel	Min	Max	SA	Mittel	Min	Max	SA
48	6	7,2	3,9	9,2	1,9	21,5	19,3	26,3	2,5
144	6	5,3	3,0	6,8	1,4	15,3	10,9	19,0	3,3

Tab. 3 Hemmkonzentrationen ($EC_{50/90}$) für Clindamycin nach 144 h

Die Unterschiede zwischen der Exposition zum Hemmstoff über nur 48 h und der durchgehende Exposition über die gesamten 144 h beziehungsweise drei parasitäre Zyklen sind klein, zum Teil jedoch statistisch signifikant.

Zum Messzeitpunkt nach 96 h ist bei 100 und 300 nM die *Pf*HRP2-Synthese signifikant größer – wider Erwarten jedoch bei den Parasiten, die durchgehend Kontakt zu den vollen Clindamycinkonzentrationen hatten. Bei 100.000 nM wiederum wächst eher erwartungsgemäß die Kultur mit nur kürzerer Exposition besser.

Nach drei Zyklen beziehungsweise 144 h zeigen sich bei 1, 10, 30, 30000 und 100000 nM signifikante Unterschiede im Sinne von stärkerer *Pf*HRP2-Synthese bei Kulturen, die nur über 48 h exponiert waren.

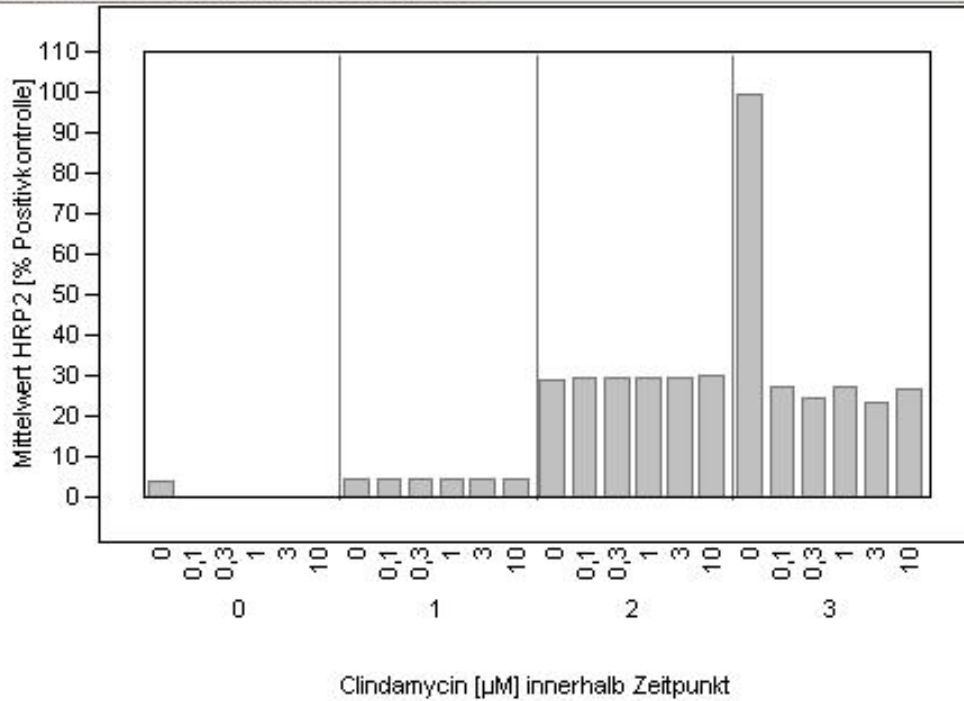
Die hier vorgestellten Ergebnisse der longitudinalen Analyse der gesamten über 144 h erhobenen Daten sind in Tabelle 4 dargestellt. Abbildung 7 zeigt die Entwicklung der mittleren relativen *Pf*HRP2-Konzentration in Prozent der über

drei Zyklen sich entwickelnden medikamentenfreien Positivkontrolle in Abhängigkeit der Konzentration von Clindamycin und dem Messzeitpunkt am Beispiel eines Experiments.

		Mittel	SA	Min	Max						
n											
Negativkontrolle		8	2,3	1,3	1,0	4,3					
Zyklus I											
Clindamycin [nM]		n	Mittel	SA	Min	Max					
0	24		5,4	1,5	1,1	3,7					
1	6		5,0	0,4	4,5	5,5					
3	6		5,4	0,4	4,6	5,8					
10	6		4,8	0,5	4,2	5,6					
30	6		4,5	0,2	4,3	5,0					
100	12		4,8	0,4	3,8	5,3					
300	6		5,0	0,1	4,9	5,2					
1000	18		5,2	1,2	3,6	7,7					
3000	18		5,0	1,2	3,4	7,8					
10000	18		4,6	1,1	3,0	6,4					
30000	12		3,9	1,1	2,5	5,6					
100000	12		4,3	1,2	3,1	6,8					
Zyklus II											
Exposition		durchgehend				nur im ersten Zyklus					
Clindamycin [nM]	n	Mittel	SA	Min	Max	Mittel	SA	Min	Max	p	
0	24	36,5	7,7	27,4	56,2	35,6	11,1	23,5	62,3	0,600	
1	6	33,9	5,9	27,2	42,9	33,7	4,3	28,9	41,7	0,956	
3	6	35,5	2,4	31,8	39,0	31,9	5,3	26,4	39,4	0,162	
10	6	23,4	3,7	18,2	29,4	25,8	2,8	21,5	28,2	0,238	
30	6	21,1	3,0	17,4	25,5	22,1	2,2	20,0	24,8	0,547	
100	12	26,4	5,4	18,0	32,5	24,7	5,5	17,3	30,5	0,010	
300	6	31,9	1,8	30,1	34,1	29,6	0,7	28,5	30,6	0,018	
1000	18	37,8	7,1	29,7	54,7	38,7	14,0	25,5	63,5	0,652	
3000	18	37,5	7,5	29,7	51,4	39,3	14,4	25,7	63,7	0,342	
10000	18	39,3	9,1	30,4	56,1	40,4	14,6	28,5	65,9	0,579	
30000	12	44,2	8,3	33,5	58,2	49,6	18,4	29,5	78,4	0,143	
100000	12	41,5	7,1	29,9	50,0	48,4	15,3	30,1	69,4	0,011	
Zyklus III											
0	24	100,0	33,3	33,3	155,2	100,0	32,2	36,8	144,7	1,000	
1	6	90,5	9,5	79,3	102,7	108,1	16,6	88,4	130,8	0,048	
3	6	81,2	12,8	66,5	103,2	95,5	15,2	65,7	106,9	0,109	
10	6	35,2	2,4	32,6	38,8	51,3	6,5	44,9	63,4	0,000	
30	6	21,8	0,7	20,9	22,6	24,8	1,3	23,7	27,2	0,001	
100	12	23,0	3,1	20,3	31,2	23,9	4,9	19,3	36,7	0,469	
300	6	24,5	2,4	22,0	28,4	24,8	1,8	23,4	28,0	0,785	
1000	18	34,7	9,7	21,6	51,6	37,3	14,4	25,3	59,7	0,098	
3000	18	35,4	10,1	21,7	51,5	36,3	16,0	22,1	63,1	0,591	
10000	18	36,8	11,0	18,1	57,3	39,2	16,1	23,1	64,4	0,174	
30000	12	41,6	7,7	32,4	54,4	48,7	17,0	29,5	67,3	0,007	
100000	12	36,8	8,6	25,6	48,6	46,7	15,7	26,6	66,4	0,000	

Tab. 4 Ergebnisse der longitudinalen Analyse der vier über 144 h durchgeführten Experimente mit Clindamycin (Ergebnisse als % PfHRP2 der ungehemmten Kontrolle nach 144 h. Irrtumswahrscheinlichkeiten: MANOVA).

144.3, Exposition nur erster Zyklus



144.3, durchgehende Exposition

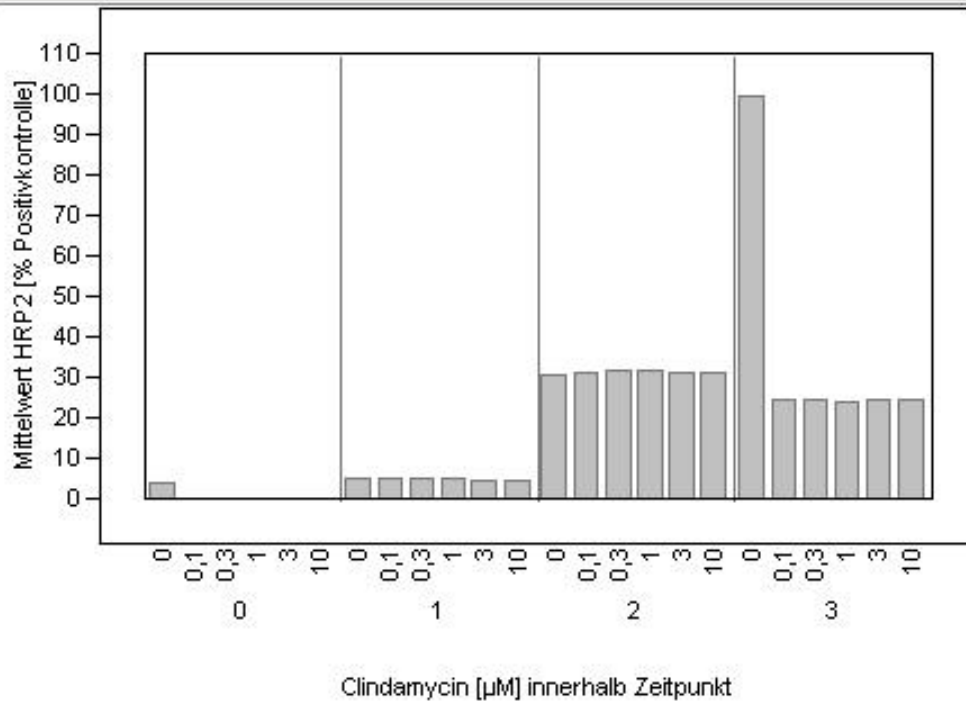


Abb. 7 Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung am Beispiel von Experiment 144.3 (Ergebnisse als % PfHRP2 der ungehemmten Kontrolle nach 144 h).

3.2.2 Chloroquin

Die Analyse der in dem einen über 144 h durchgeführten Experiment erhobenen Daten mit Chloroquin ergab nach 96 h mittlere EC_{50} von 4,1 und 19,9 nM bei Exposition über 48 h und 144 h. Nach 144 h ergaben sich 12,8 und 8,8 nM, ebenfalls nach Exposition über 48 h und 144 h. Tabelle 5 zeigt die vollständigen Ergebnisse.

Exposition [h]		EC50 [nM]				EC90 [nM]				
	n	Mittel	Min	Max	SA	Mittel	Min	Max	SA	
Zyklus II										
	48	3	2,9	1,7	5,2	2,0	18,9	7,7	28,2	10,4
	144	4	16,5	12,7	19,3	2,8	27,4	26,9	28,0	0,5
Zyklus III										
	48	6	10,5	6,4	12,5	2,3	25,0	21,5	28,4	2,4
	144	5	7,7	4,2	9,3	2,0	21,4	17,0	25,6	3,3

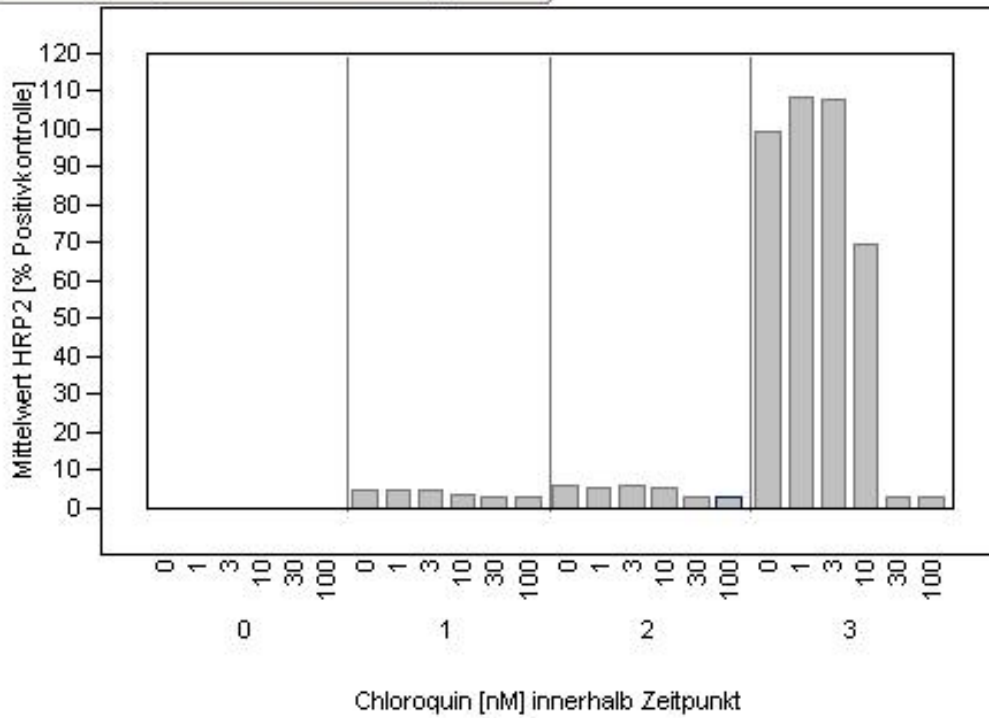
Tab. 5 Hemmkonzentrationen ($EC_{50/90}$) für Chloroquin nach 96 und 144 h

Der Vergleich der beiden experimentellen Arme in der longitudinalen Analyse ergab signifikante Unterschiede zwischen den experimentellen Armen in den Konzentrationen 10, 30 und 100 nM, sowohl nach zwei, als auch nach drei Zyklen.

		n	Mittel	SA	Min	Max					
Negativkontrolle		2	0,24	0,01	0,23	0,24					
Zyklus I											
Chloroquin [nM]		n	Mittel	SA	Min	Max					
	0	6	5,04	0,59	4,41	6,02					
	1	6	4,93	0,60	4,06	5,88					
	3	6	5,06	0,46	4,29	5,56					
	10	6	4,02	0,29	3,60	4,37					
	30	6	3,04	0,06	2,98	3,15					
	100	6	2,97	0,08	2,84	3,04					
Zyklus II											
Exposition		durchgehend				nur im ersten Zyklus					
Chloroquin [nM]		n	Mittel	SA	Min	Max	Mittel	SA	Min	Max	p
	0	6	6,67	0,58	5,97	7,70	6,64	0,82	5,35	7,72	1,000
	1	6	6,21	0,43	5,77	6,71	5,99	0,68	5,50	7,35	0,262
	3	6	6,24	0,43	5,57	6,76	6,19	0,52	5,64	6,91	0,873
	10	6	5,33	0,26	4,97	5,62	5,99	0,50	5,56	6,91	0,025
	30	6	2,97	0,06	2,91	3,08	3,15	0,11	3,04	3,33	0,010
	100	6	2,94	0,06	2,85	2,99	3,13	0,05	3,07	3,21	0,004
Zyklus III											
Chloroquin [nM]		n	Mittel	SA	Min	Max	Mittel	SA	Min	Max	p
	0	6	100,00	25,20	70,51	137,53	100,00	22,82	79,23	140,49	0,873
	1	6	103,46	19,24	81,15	131,28	108,77	14,70	92,12	133,49	0,522
	3	6	94,06	16,46	76,15	120,17	107,99	26,88	86,67	160,49	0,199
	10	6	48,25	11,01	35,58	65,55	70,18	10,83	53,35	85,31	0,010
	30	6	2,86	0,02	2,83	2,89	3,13	0,09	3,04	3,25	0,004
	100	6	2,88	0,03	2,85	2,93	3,06	0,06	2,99	3,17	0,004

Tab. 6 Ergebnisse der longitudinalen Analyse des über 144 h durchgeführten Experiments mit Chloroquin (Ergebnisse als % PfHRP2 der ungehemmten Kontrolle nach 144 h. Irrtumswahrscheinlichkeiten: Wilcoxon Rangsummentest).

144.clq, Exposition nur erster Zyklus



144.clq, durchgehende Exposition

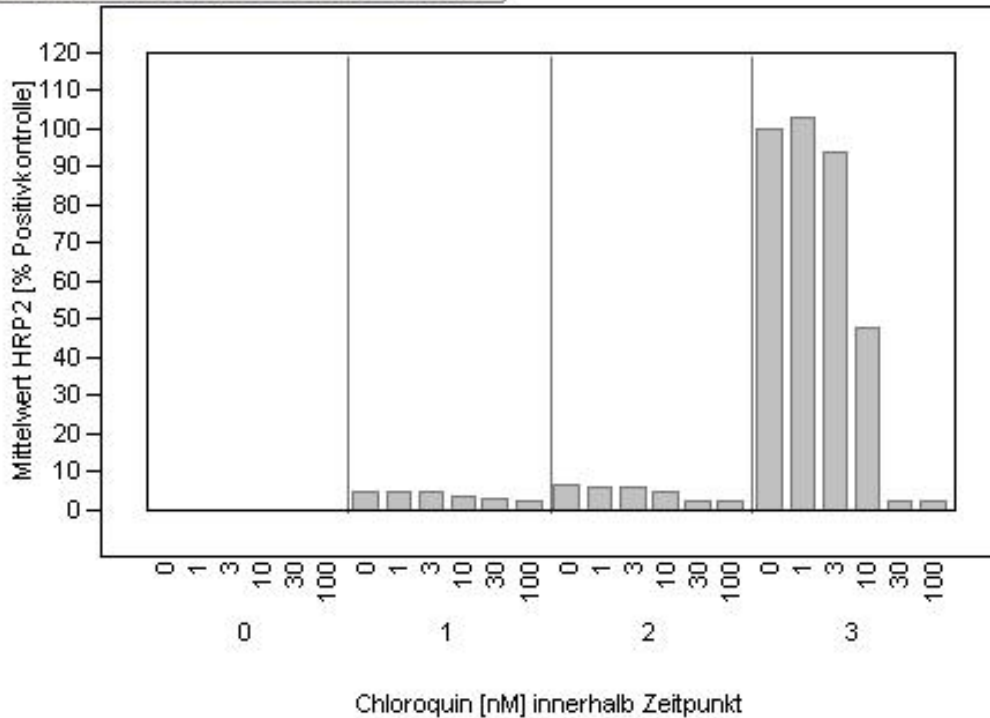


Abb. 8 Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung (Ergebnisse als % PfHRP2 der ungehemmten Kontrolle nach 144 h).

4 Diskussion

4.1 Einführung

Die vorgestellten Ergebnisse bieten einige Antworten auf die in der Einleitung aufgeworfenen Fragen. Hier sollen also zuerst die Bedeutung der im Ergebnisteil vorgestellten Resultate diskutiert werden. Daraufhin werden Schwächen der Methodik angesprochen. Zuletzt soll ein die Ergebnisse erklärendes Modell vorgestellt und erläutert werden mit einem Ausblick auf experimentelle Möglichkeiten zur Klärung der weiterhin bestehenden und neu entstandenen Fragen.

4.2 Konventionelle Experimente über 72 Stunden

Die zuerst durchgeführten, konventionellen Experimente über 72h zeigten ähnlich hohe EC_{50} -Werte von im Mittel $144,5 \mu\text{M}$ wie von anderen Autoren beschrieben (42). In vivo werden mit den üblichen Dosierungen von 5 mg/kg Körpergewicht alle acht Stunden Plasmaspiegel zwischen 300 nM und 3500 nM erreicht (31). In einer anderen pharmakokinetischen Studie in vivo wurden 0,76 Stunden nach oraler Administration von 600 mg Clindamycin an gesunde Erwachsene Plasmaspitzenkonzentrationen von $11,4 \mu\text{M}$ bei einer Halbwertszeit von 2,4 Stunden erreicht (12). Diese Spitzenspiegel sind also zwölf bis vierzigfach niedriger als die hier in vitro über 72 h gefundenen EC_{50} -Werte. Nichtsdestotrotz sind diese Plasmaspiegel ausreichend um klinisch bei Anwendung über fünf Tage als Monotherapie eine vollständige Eradikation der Parasiten zu erreichen. Der in vivo beobachtete, langsame Wirkungseintritt mit einer mittleren Parasiteneliminationszeit von 3 bis 4 Tagen (entsprechend einem Wirkungseintritt nach 2 Replikationszyklen) und einer klinischen Heilungszeit, gemessen als mittlere Zeit bis zur Entfieberung, von drei bis fünf Tagen, legte also eine Verlängerung des Versuchszeitraums nahe (29). Auch der in anderen Veröffentlichungen gezeigte, merkwürdige zeitliche Verlauf (45) der Parasitenelimination durch Clindamycin und der noch ungeklärte molekulare Wirkort von Clindamycin als Antiprotozoikum machten die genauere Untersuchung der Kinetik interessant.

4.3 Experimente über drei parasitäre Zyklen

Die Verlängerung des Versuchsaufbaus enthüllte eine interessante Eigenschaft von Clindamycin. Konzentrationen, die nach bis zu 96 Stunden Inkubation nur eine geringe Wirkung auf die HRP2-Synthese hatten, führten nach 144 Stunden zu einem vollständigen Erliegen der Synthese dieses Proteins, gemessen als Synthese des Proteins vom Zeitpunkt 96 Stunden bis zum Zeitpunkt 144 Stunden. So ergab sich nach 144 Stunden eine mittlere EC_{50} von 5,26 nM, während nach 48 und 96 Stunden Konzentrationen bis zu 100.000 nM eine Hemmung von lediglich unter 50 % bewirkten. Der mit der gleichen Methodik beim gleichen Laborstamm gemessene mittlere EC_{50} von 144,5 μ M bei kontinuierlicher Exposition über 72 Stunden ist also mehr als 27.000-fach höher. Eine ähnliche Beobachtung machten bereits Divo et al. (6) in einer In-vitro-Studie, bei der zur Quantifizierung des Wachstums die Aufnahme von [3 H]-Hypoxanthin als Substrat der Synthese von Nukleinsäuren benutzt wurde. Bei dieser Methode wird die Menge des aufgenommenen, tritiummarkierten Hypoxanthins mit einem Szintillationszähler bestimmt. Diese Gruppe beobachtete einen Abfall der Inhibitionskonzentrationen um den Faktor 10^4 bis 10^6 bei Verlängerung der Exposition der Parasiten um 48 Stunden.

Erstaunlicherweise war dieser verzögerte Effekt sogar dann zu beobachten, wenn Clindamycin bereits nach 48 Stunden ausgewaschen und nicht wieder ersetzt wurde. Der hier bestimmte mittlere EC_{50} nach 144 h betrug 7,24 nM, ebenfalls um vier Zehnerpotenzen niedriger als im Versuchsaufbau über 72 Stunden.

4.4 Chloroquin

Als Referenz wurde der gleiche Versuchsaufbau über 144 und 72 Stunden mit Chloroquin als Inhibitor durchgeführt. Hier bestätigte sich das spezielle Wirkprofil von Clindamycin, als Chloroquin mit verlängerter Inkubationszeit wohl eine Wirkungsverstärkung erfährt, sich die inhibitorische Potenz aber nicht in solchen Dimensionen ändert wie das bei Clindamycin zu beobachten war. Der nach 72 Stunden sich ergebende EC_{50} betrug bei Chloroquin 8,62 nM, bei durchgehender Exposition über 144 Stunden 7,7 nM. Im Versuch über 144

Stunden zeigte sich zum Messzeitpunkt nach 96 Stunden ein EC_{50} von 16,5 nM, nach 48 Stunden konnte mit der hier eingesetzten maximalen Konzentration von 100 nM eine Hemmung von nur ungefähr 43 % erreicht werden. Insgesamt war also auch hier eine positive Korrelation zwischen inhibitorischer Wirkung und Versuchsdauer zu erkennen. Dieser positive Zusammenhang war aber im Gegensatz zu Clindamycin ungleich weniger ausgeprägt.

Auch die interessante Beobachtung dass der verzögerte Effekt von Clindamycin auch bei Exposition für nur 48 h fast gleich ausgeprägt ist, zeigte sich bei Chloroquin in nur deutlich geringerem Maße. Durchgehend mit Chloroquin behandelte Kulturen entwickelten sich bei Hemmstoffkonzentrationen, die eine deutliche Wachstumshemmung verursachten signifikant schlechter als jene, die nur während der ersten 48 Stunden mit der Ausgangskonzentration in Kontakt waren.

4.5 Kritik der Methode

4.5.1 Auswaschen des Inhibitors

Bei den Versuchen über 144 Stunden wurde zu den Zeitpunkten 48 und 96 Stunden das Medium mehrfach ausgewaschen. Dies wurde durchgeführt um zum einen den Kulturen wieder neue Substrate zur Verfügung zu stellen und somit deren Wachstumsbedingungen wieder möglichst dem Ausgangszustand anzupassen. Zum Zweiten ermöglichte diese aufwändige Methode die indirekte Bestimmung des sekretierten Anteils *Pf*HRP2, um einen möglichen Einfluss der verwendeten Inhibitoren auf das Verhältnis von intra- zu extraerythrozytärem Antigen vernachlässigbar zu machen. Zum Dritten konnte so der Vergleich zwischen Exposition zum Inhibitor über nur 48 Stunden und die vollen 144 Stunden durchgeführt werden. Bei jedem Waschvorgang wurde durch Entnahme von 75 % des Gesamtvolumens von 200 μ l die theoretische Gesamtkonzentration um den Faktor 0,25 gesenkt. Somit ergab sich eine Reduktion der Konzentration nach drei Waschvorgängen um den Faktor $0,25^3$ auf 1,56 % der Ausgangskonzentration. Bei den Waschvorgängen konnte jedoch nur der extrazelluläre Überstand erreicht werden. Wahrscheinlich

vorhandene Konzentrationsunterschiede in verschiedenen Kompartimenten könnten so also nicht erreicht werden. Angenommen die mittlere intraerythrozytäre Konzentration sei nach 48 Stunden Konzentrationsausgleich höher als die extraerythrozytäre, so würde die resultierende Gesamtkonzentration nach drei Waschvorgängen höher als die errechneten 1,56 % der Ausgangskonzentration liegen. Im entgegengesetzten Fall ergäbe sich eine niedrigere als die errechnete Konzentration.

Im ersten Fall resultierte nun also in den Kulturen, die dreimal mit inhibitorfreiem Medium gewaschen wurden eine durchschnittliche Konzentration von $1,56 \% + X$, mit X als einem unbekanntem Anteil aus der intraerythrozytären erhöhten Konzentration. In den Kulturen, die kontinuierlich dem Inhibitor ausgesetzt sein sollten, denen also im dritten Waschgang Medium mit der die rechnerische Zielkonzentration ergebenden Konzentration zugesetzt wurde, ergäbe sich eine Konzentration von $1,56 \% + X + Y$, mit X wie im ersten Fall und Y dem durch die Zugabe inhibitorhaltigen Mediums erhöhenden Anteils.

Auch muss bedacht werden, dass während des Waschvorgangs die extraerythrozytäre Konzentration in drei Stufen vermindert wird und zwischen den Waschgängen Konzentrationsausgleich stattfinden kann. Dieser Konzentrationsausgleich nähert die tatsächlichen Konzentrationen den errechneten Konzentrationen an, bei deren Berechnung Kompartimentierung und resultierende Konzentrationsunterschiede nicht in Betracht gezogen wurden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Clindamycin vergleichsweise gering intraerythrozytär akkumuliert. Untersuchungen mit tritiummarkierten Medikamenten zeigten Verhältnisse von intra- und extraerythrozytären Konzentrationen von 5,5 nach 120 min. Bei Chloroquin ergeben sich Verhältnisse von bis zu 20.000 (13). Könnte dieser enorme Unterschied zwischen Clindamycin und Chloroquin nicht auch die hier beobachteten Effekte erklären?

Eine Auswirkung der stark unterschiedlichen intrazellulären Akkumulation der beiden untersuchten Substanzen auf die Kinetik der Wirksamkeit der beiden Verbindungen kann nicht ausgeschlossen werden, würde aber, wie im

Folgenden beschrieben, keinen Einfluss auf die Interpretation der vorliegenden Daten haben. Bei den höheren intraerythrozytären Konzentrationen bei Chloroquin ist der Waschvorgang wie oben Anhand einer Modellrechnung erläutert deutlich weniger effektiv als bei Clindamycin. So wären die wirklichen Konzentrationen nach dem ersten, mehr noch nach dem zweiten Waschvorgang höher als angenommen. Das würde zu falsch niedriger Bestimmung der Hemmkonzentrationen führen. Tatsächlich sinken aber die Hemmkonzentrationen bei dem weniger akkumulierenden Medikament deutlich stärker.

4.5.2 Kritik der Datenaufbereitung und –auswertung

Um Daten über das Ausmaß der Inhibition innerhalb der beobachteten Zyklen zu erhalten, wurden die Werte der relativen HRP2-Konzentration nach Formel 4 umgerechnet. Dieses Modell ist eine Vereinfachung, weil es einen linearen Anstieg der *Pf*HRP2-Konzentration unterstellt, der unabhängig ist von der zum jeweiligen Zyklusbeginn bestehenden *Pf*HRP2-Konzentration und Parasitämie. Aus diesem Grund wurden die gewonnenen EC_{50} auch nicht zum statistischen Vergleich des Einflusses von verschiedenen Inkubationsdauern auf die *Pf*HRP2 Produktion nach 144 h herangezogen. Diese halbmaximalen Hemmungswerte illustrieren aber sehr gut die bei Clindamycin um Zehnerpotenzen abfallenden und bei Chloroquin in den gleichen Dimensionen verbleibenden ECs.

4.5.3 *Pf*HRP2 als Surrogat parasitären Wachstums

Jede Methode der Quantifizierung parasitären Wachstums ist mit Nach- und Vorteilen behaftet.

Die Methode der Schizontenreifung, bei der nach 24 Stunden Inkubation mit dem zu untersuchenden Hemmstoff das Verhältnis von reifen Schizonten zur Parasitengesamtzahl gebildet wird, ist mit einfachen Mitteln durchführbar, sehr arbeitsintensiv und führt bei einem reifungsverlangsamenden, aber nicht endgültig verhindernden Effekt des Inhibitors zu falsch niedrigen effektiven Konzentrationen. Für die in dieser Studie notwendige, longitudinale Evaluation ist diese Methode ungeeignet.

Eine alternative Methode wäre die direkte Bestimmung der Parasitämie gewesen. Sie ist über verschieden lange Zeiträume durchführbar und durch Verwendung der Durchflusszytometrie statt der konventionellen Lichtmikroskopie auch automatisierbar und weniger subjektiv, obwohl tendenziell weniger sensitiv.

Mit der szintigraphischen Bestimmung der Aufnahme verschiedener, radioaktiv markierter Substrate lassen auf interessante Weise verschiedene metabolische Prozesse als Korrelat der inhibitorvermittelten Wachstumshemmung heranziehen. Etabliert sind [³H]-Isoleucin als Substrat der Translation und [³H]-Hypoxanthin als Substrat der Nukleinsäuresynthese. Ein großer Nachteil jedoch ist die Notwendigkeit des Einsatzes radioaktiv markierter Substanzen.

Die hier schließlich verwendete Methode der quantitativen Bestimmung von *Pf*HRP2 mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA-Testkits ist mit relativ einfachen Mitteln durchführbar. Die Methode korreliert hervorragend mit der Schizontenreifungsbestimmung und der [³H]-Hypoxanthin-Aufnahme bei der Evaluation von Mefloquin, Chinin, Chloroquin und Artesunat (36). Auch bei der Bestimmung der Wirksamkeit von Clindamycin wurde die Methode bereits mit guten Ergebnissen angewendet (42). Da *Pf*HRP2 ein im Nukleus kodiertes Protein ist, sind keine spezifischen Verzerrungen durch einen wahrscheinlichen Hemmer der apicoplastären oder eventuell auch mitochondrialen Proteinsynthese zu erwarten.

4.6 Erklärungsmodell

4.6.1 Hemmung der Schizogonie

Clindamycin als Lincosamid ist gemeinsam mit Makroliden, Chloramphenicol, Azithromycin und Spiramycin ein Inhibitor prokaryonter Ribosomen. All diese Inhibitoren prokaryonter Proteinsynthese zeigen in vitro und/oder in vivo Wirksamkeit gegen Apicomplexa, einer Gattung eukaryonter Protozoen. All diese strukturell unterschiedlichen Antibiotika zeigen in ihrer Wirkung gegen Apicomplexa einen distinkten, verzögerten Wirkeintritt, den „delayed death phenotype“, einen gemeinsamen molekularen Wirkort nahe legend (8-10;43).

Camps et al. konnten einen gegen Clindamycin resistenten Mutanten von *Toxoplasma gondii* isolieren und eine eventuell ursächliche Punktmutation der ribosomalen RNA nachweisen. Außerdem waren sie in der Lage, elektronenmikroskopische Aufnahmen von mit Clindamycin behandelten Parasiten in ihrer Wirtszelle, in diesem Fall humanen Vorhautfibroblasten, anzufertigen. Diese Aufnahmen zeigen bis zu drei Generationen ultrastrukturell weitgehend normal aussehende Tochterzellen in ihren Mutterzellen. Die Tochterzellen scheinen ihre Fähigkeit der Endodyogenie verloren zu haben. Das heißt, sie sind nicht mehr in der Lage, die Mutterzelle zu verlassen, somit die Wirtszelle zu lysieren und neue Wirtszellen zu befallen. Sollte dies ein Effekt der Hemmung der apicoplastären Proteinsynthese durch Clindamycin sein, so wäre das eine mögliche Erklärung für die spezielle Kinetik der Inhibition von Apicomplexa durch Clindamycin und andere prokaryonte Proteinsyntheseinhibitoren (4).

Eine andere Veröffentlichung unterstützt die Verbindung von apicoplastärer Funktion und verzögertem Zelltod. He et al. interferierten auf nicht-pharmakologische Weise *Toxoplasma gondii* mit der normalen Funktion des Apicoplasten und beobachteten ebenfalls den Effekt des „delayed death phenotypes“ (16).

Übertragen auf *Plasmodium falciparum* würde sich damit folgendes Erklärungsmodell der in vitro beobachteten Phänomene ergeben:

Beim Beginn eines Versuchs sind die synchronisierten Parasiten intraerythrozytär im frühen Ringstadium. Während der Entwicklung zum reifen Schizonten in den ersten 48 Stunden des Versuchs wird die Proteinsynthese durch Hemmung der Translation an apicoplastären Ribosomen vermindert und somit die Funktionalität der Apicoplasten der Tochterzellen gehemmt. Die Mutterzelle jedoch besitzt noch die Fähigkeit die Wirtszelle zu lysieren und somit den Tochterzellen, den Merozoiten, den Befall neuer Erythrozyten zu ermöglichen.

In dieser neuen Wirtszelle entwickeln sich mit oder ohne Einfluss von Clindamycin ungestört erneut Tochterzellen in ihrer Mutterzelle, dem Schizonten. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist auch die zytoplasmatische Proteinsynthese ungestört. Das heißt, trotz Einfluss eines potenten Inhibitors ist die HRP2-Synthese bis 96 Stunden nach Beginn des Experiments ungestört.

Zeitgleich zeigt sich aber die Wirkung durch gestörte apicoplastäre Funktion: Eine erneute Schizogonie ist nicht möglich. Die Tochterzellen verbleiben in der Mutterzelle und der Wirtszelle. Es werden keine neuen Erythrozyten befallen und durch Mangel an Substraten, Anhäufung von toxischen Metaboliten oder Platz oder einer Kombination der genannten Effekte im Erythrozyten kommt es zu einer starken Inhibition der zytoplasmatischen Proteinsynthese.

Inhibitorische Effekte, die schon früher bei höheren Konzentrationen sichtbar werden, sind zum einen durch nur unvollkommene Synchronität der parasitären Entwicklung, zum anderen durch einen anderen Wirkmechanismus von Clindamycin verursacht.

In einer 1984 veröffentlichten Studie zeigte sich ein plateauförmiger Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve. Dieses Phänomen wurde mit den in hohen Konzentrationen sichtbaren Schäden an den Wirtszellen, den Erythrozyten, erklärt (45). Somit wären die frühen Effekte von Clindamycin Zeichen einer nicht-selektiven Toxizität.

4.7 Ausblick

Bei *Toxoplasma gondii* ist der Nachweis einer Punktmutation im Bereich der apicoplastären DNS bei clindamycinresistenten Mutanten gelungen. Dieser Bereich kodiert für die Transpeptidationsregion ribosomaler RNS.

Die Selektion vergleichbarer, clindamycinresistenter Mutanten von *Plasmodium falciparum* wäre ein Schritt, den molekularen Wirkmechanismus von Hemmern der prokaryonten Proteinsynthese bei diesem Apicomplexa Parasiten aufzuklären. Untersuchungen der ultrastrukturellen Morphologie mit Clindamycin behandelte Plasmodien könnten Hinweise auf die Rolle von Proteinprodukten des Apicoplasten, speziell in der Erythrozytenevasion, geben. Eventuell könnten Clindamycin-resistente Allele der großen ribosomalen RNA

Untereinheit für die gezielte Manipulation von Apikoplastenfunktionen mit Hilfe von Allelaustausch Experimenten benutzt werden.

5 Zusammenfassung

Das Antibiotikum Clindamycin als selektiver Inhibitor der prokaryonten Proteinsynthese zeigt eine seit langem bekannte, aber wenig charakterisierte hemmende Wirkung gegen eukaryonte Apicomplexa, zu denen die Protozoen *Toxoplasma gondii*, dem Erreger der Toxoplasmose und *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria tropica, gehören. In der Literatur zur In-vitro-Wirksamkeit von Clindamycin gegen Apicomplexa zeigen sich zum einen in mehreren Veröffentlichungen extrem hohe EC_{50} , zum anderen eine merkwürdig verzögerte Kinetik der Wachstumshemmung.

Die vorliegende Arbeit untersucht den zeitlichen Verlauf der Wirksamkeit von Clindamycin gegen *Plasmodium falciparum* in vitro. Es wird die Frage untersucht, ob der langsame Wirkungseintritt nach zwei Generationen durch einen Akkumulationseffekt nach kontinuierlicher Einwirkung mit Clindamycin (time of exposure-dependent effect), oder durch ein verspätetes Einsetzen der Wirkung (delayed effect) hervorgerufen wird.

Es wurden Experimente in vitro über mehrere parasitäre Zyklen von *Plasmodium falciparum* (144 h) und unterschiedlich langer Exposition (48 h versus 144 h) zu einem weiten Konzentrationsbereich von Clindamycin (1 bis 1×10^5 nM) durchgeführt. Das Wachstum beziehungsweise die Vermehrung wurde zu den Zeitpunkten 0, 48, 96 und 144 h mittels eines etablierten ELISA mit monoklonalen Antikörpern gegen das parasitäre Protein PfHRP2 quantifiziert.

Bis zur maximal eingesetzten Konzentration von 100.000 nM Clindamycin zeigte sich nach 48 und 96 h keine 50%ige Hemmung der PfHRP2-Synthese. Nach 144 h ergaben sich jedoch mittlere EC_{50} von 5,25 nM bei durchgehender Exposition und 7,24 nM bei Exposition zum Hemmstoff nur über die ersten 48 h des Versuchs. Der Vergleich zwischen den beiden experimentellen Armen einmal mit durchgehender, einmal mit nur 48-stündiger Exposition zeigt erstaunlich geringe Unterschiede. Das durchgeführte Kontrollexperiment mit

Chloroquin bestätigte das eigenartige Wirkprofil vom Clindamycin. Chloroquin zeigte schon nach 48 h eine deutliche antiproliferative Wirkung, die errechneten EC_{50} zeigten wohl auch einen positiven Zusammenhang der Wirksamkeit mit dem zeitlichen Abstand nach Expositionsbeginn, nicht jedoch in den bei Clindamycin zu beobachtenden Dimensionen und die Unterschiede zwischen den zwei unterschiedlichen Expositionsdauern war bei deutlicher Hemmung signifikant.

Diese Ergebnisse sind mit einem Modell der Hemmung der Synthese von apicoplastären Proteinen mit einer konsekutiven Hemmung der folgenden Schizogonie, wie bereits bei *Toxoplasma gondii* vermutet wurde, vereinbar.

6 Literaturverzeichnis

1. Adehossi E, Parola P, Foucault C, Delmont J, Brouqui P, Badiaga S et al. Three-day quinine-clindamycin treatment of uncomplicated falciparum malaria imported from the tropics. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2003;47(3):1173.
2. Borrmann S, Adegnika AA, Matsiegui PB, Issifou S, Schindler A, Mawili-Mboumba DP et al. Fosmidomycin-clindamycin for Plasmodium falciparum Infections in African children. *J.Infect.Dis.* 2004;189(5):901-8.
3. Borrmann S, Issifou S, Esser G, Adegnika AA, Ramharter M, Matsiegui PB et al. Fosmidomycin-clindamycin for the treatment of Plasmodium falciparum malaria. *J.Infect.Dis.* 2004;190(9):1534-40.
4. Camps M, Arrizabalaga G, Boothroyd J. An rRNA mutation identifies the apicoplast as the target for clindamycin in Toxoplasma gondii. *Mol.Microbiol.* 2002;43(5):1309-18.
5. Clyde DF, Gilman RH, McCarthy VC. Antimalarial effects of clindamycin in man. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1975;24(2):369-70.
6. Divo AA, Geary TG, Jensen JB. Oxygen- and time-dependent effects of antibiotics and selected mitochondrial inhibitors on Plasmodium falciparum in culture. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1985;27(1):21-7.
7. el Wakeel ES, Homeida MM, Ali HM, Geary TG, Jensen JB. Clindamycin for the treatment of falciparum malaria in Sudan. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1985;34(6):1065-8.
8. Fichera ME, Bhopale MK, Roos DS. In vitro assays elucidate peculiar kinetics of clindamycin action against Toxoplasma gondii. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1995;39(7):1530-7.
9. Fichera ME, Roos DS. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* 1997;390(6658):407-9.
10. Fichera ME, Roos DS. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* 1997;390(6658):407-9.
11. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW et al. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature* 2002;419(6906):498-511.
12. Gatti G, Flaherty J, Bupp J, White J, Borin M, Gambertoglio J. Comparative study of bioavailabilities and pharmacokinetics of clindamycin in healthy volunteers and patients with AIDS. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1993;37(5):1137-43.
13. Geary TG, Divo AA, Jensen JB. Uptake of antibiotics by Plasmodium falciparum in culture. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1988;38(3):466-9.
14. Geary TG, Jensen JB. Effects of antibiotics on Plasmodium falciparum in vitro. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1983;32(2):221-5.
15. Gilles, H. M. and Warrell, D. A. Bruce-Chwatt's Essential Malariology. (3rd Edition). 1993.
16. He CY, Shaw MK, Pletcher CH, Striepen B, Tilney LG, Roos DS. A plastid segregation defect in the protozoan parasite Toxoplasma gondii. *EMBO J.* 2001;20(3):330-9.

17. Kaneko A, Taleo G, Kalkoa M, Yamar S, Kobayakawa T, Bjorkman A. Malaria eradication on islands. *Lancet* 2000;356(9241):1560-4.
18. Karow, T. and Lang, R. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 533-576. 2001.
19. Kohler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJ et al. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* 1997;275(5305):1485-9.
20. Kremsner PG. Clindamycin in malaria treatment. *J.Antimicrob.Chemother.* 1990;25(1):9-14.
21. Kremsner PG, Krishna S. Antimalarial cocktails--tropical flavours of the month. *Lancet* 2002;360(9350):1998-9.
22. Kremsner PG, Radloff P, Metzger W, Wildling E, Mordmuller B, Philipps J et al. Quinine plus clindamycin improves chemotherapy of severe malaria in children. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1995;39(7):1603-5.
23. Kremsner PG, Wildling E, Jenne L, Graninger W, Bienzle U. Comparison of micronized halofantrine with chloroquine-antibiotic combinations for treating *Plasmodium falciparum* malaria in adults from Gabon. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1994;50(6):790-5.
24. Kremsner PG, Winkler S, Brandts C, Graninger W, Bienzle U. Curing of chloroquine-resistant malaria with clindamycin. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1993;49(5):650-4.
25. Kremsner PG, Winkler S, Brandts C, Neifer S, Bienzle U, Graninger W. Clindamycin in combination with chloroquine or quinine is an effective therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children from Gabon. *J.Infect.Dis.* 1994;169(2):467-70.
26. Kremsner PG, Zotter GM, Feldmeier H, Graninger W, Rocha RM, Wiedermann G. A comparative trial of three regimens for treating uncomplicated *falciparum* malaria in Acre, Brazil. *J.Infect.Dis.* 1988;158(6):1368-71.
27. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J.Parasitol.* 1979;65(3):418-20.
28. Lederberg J. J. B. S. Haldane (1949) on Infectious Disease and Evolution. *Genetics* 1999;153(1):1-3.
29. Lell B, Kremsner PG. Clindamycin as an antimalarial drug: review of clinical trials. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2002;46(8):2315-20.
30. Lewis C. Antiplasmodial activity of halogenated lincomycin analogues in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Antimicrobial.Agents Chemother.* 1967;7:537-42.
31. Mazur D, Schug BS, Evers G, Larsimont V, Fieger-Buschges H, Gimbel W et al. Bioavailability and selected pharmacokinetic parameters of clindamycin hydrochloride after administration of a new 600 mg tablet formulation. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.* 1999;37(8):386-92.
32. McGready R, Cho T, Samuel, Villegas L, Brockman A, van Vugt M et al. Randomized comparison of quinine-clindamycin versus artesunate in the treatment of *falciparum* malaria in pregnancy. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 2001;95(6):651-6.
33. Metzger W, Mordmuller B, Graninger W, Bienzle U, Kremsner PG. High efficacy of short-term quinine-antibiotic combinations for treating adult

- malaria patients in an area in which malaria is hyperendemic. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1995;39(1):245-6.
34. Miller LH, Glew RH, Wyler DJ, Howard WA, Collins WE, Contacos PG et al. Evaluation of clindamycin in combination with quinine against multidrug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1974;23(4):565-9.
 35. Missinou MA, Borrmann S, Schindler A, Issifou S, Adegnikaa AA, Matsiegui PB et al. Fosmidomycin for malaria. *Lancet* 2002;360(9349):1941-2.
 36. Noedl H, Wernsdorfer WH, Miller RS, Wongsrichanalai C. Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2002;46(6):1658-64.
 37. Noedl H, Wongsrichanalai C, Miller RS, Myint KS, Looareesuwan S, Sukthana Y et al. *Plasmodium falciparum*: effect of anti-malarial drugs on the production and secretion characteristics of histidine-rich protein II. *Exp.Parasitol.* 2002;102(3-4):157-63.
 38. Parola P, Ranque S, Badiaga S, Niang M, Blin O, Charbit JJ et al. Controlled trial of 3-day quinine-clindamycin treatment versus 7-day quinine treatment for adult travelers with uncomplicated *falciparum* malaria imported from the tropics. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2001;45(3):932-5.
 39. Pfefferkorn ER, Borotz SE. Comparison of mutants of *Toxoplasma gondii* selected for resistance to azithromycin, spiramycin, or clindamycin. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1994;38(1):31-7.
 40. Pfefferkorn ER, Nothnagel RF, Borotz SE. Parasitocidal effect of clindamycin on *Toxoplasma gondii* grown in cultured cells and selection of a drug-resistant mutant. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1992;36(5):1091-6.
 41. Pukrittayakamee S, Chantira A, Vanijanonta S, Clemens R, Looareesuwan S, White NJ. Therapeutic responses to quinine and clindamycin in multidrug-resistant *falciparum* malaria. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2000;44(9):2395-8.
 42. Ramharter M, Noedl H, Winkler H, Graninger W, Wernsdorfer WH, Kreamsner PG et al. In vitro activity and interaction of clindamycin combined with dihydroartemisinin against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2003;47(11):3494-9.
 43. Roos DS, Crawford MJ, Donald RG, Fraunholz M, Harb OS, He CY et al. Mining the *Plasmodium* genome database to define organellar function: what does the apicoplast do? *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 2002;357(1417):35-46.
 44. Salazar NP, Sanieel MC, Estoque MH, Talao FA, Bustos DG, Palogan LP et al. Oral clindamycin in the treatment of acute uncomplicated *falciparum* malaria. *Southeast Asian J.Trop.Med.Public Health* 1990;21(3):397-403.
 45. Seaberg LS, Parquette AR, Gluzman IY, Phillips GW, Jr., Brodasky TF, Krogstad DJ. Clindamycin activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *J.Infect.Dis.* 1984;150(6):904-11.

46. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976;193(4254):673-5.
47. Vaillant M, Millet P, Luty A, Tshopamba P, Lekoulou F, Mayombo J et al. Therapeutic efficacy of clindamycin in combination with quinine for treating uncomplicated malaria in a village dispensary in Gabon. *Trop.Med.Int.Health* 1997;2(9):917-9.
48. White NJ. Antimalarial drug resistance: the pace quickens. *J.Antimicrob.Chemother.* 1992;30(5):571-85.
49. White, N. J. Malaria. Gordon, C. C. and Alimuddin, Z. *Manson's Tropical Diseases.* (21st Edition), 1205-1295. 2003.
50. Wiesner J, Borrmann S, Jomaa H. Fosmidomycin for the treatment of malaria. *Parasitol.Res.* 2003;90 Suppl 2:S71-S76.
51. Wiesner J, Henschker D, Hutchinson DB, Beck E, Jomaa H. In vitro and in vivo synergy of fosmidomycin, a novel antimalarial drug, with clindamycin. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2002;46(9):2889-94.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name Christian Dominik Burkhardt
geboren am 21.09.1973 in Konstanz
Nationalität deutsch

Schulbildung:

1980-1993 Grundschule und Gymnasium in Konstanz

Zivildienst:

1993-1995 Zivildienst beim Mobilien Sozialen Dienst der
Arbeiterwohlfahrt Konstanz

Berufsausbildung:

1995-1998 Ausbildung zum Krankenpfleger am Klinikum Konstanz

Studium:

1998-1999 Studium der Musik, Hochschule für Musik, Groningen,
Niederlande
4/1999 Studium der Humanmedizin, Universität Tübingen
03/2001 Physikum (Note 1)
03/2002 1. Staatsexamen (Note 2)
09/2004 2. Staatsexamen (Note 1,66)
18.11.2005 3. Staatsexamen (Note 1), Ärztliche Prüfung - Gesamtnote
sehr gut (1,49)
11/2005 Approbation als Arzt

Famulatur:

08/2001 Famulatur am Ospidal d'Engiadina Bassa, Scuol, Schweiz
08-09/2002 Famulatur am Hôpital Bethesda, Agou-Nyogbo, Togo

Praktisches Jahr:

10/2004-02/2005 Chirurgie am Klinikum am Steinenberg, Reutlingen
02-04/2005 Innere Medizin am Klinikum am Steinenberg, Reutlingen
04-06/2005 Innere Medizin an der Bristol Royal Infirmary, Bristol,
Großbritannien

- 06-08/2005 Anästhesie am Hôpital Universitaire de Genève, Genf,
Schweiz
- Promotion:**
seit 03/2003 Experimentelle Arbeit zur Pharmakotherapie der Malaria
tropica am Tropenmedizinischen Institut, Abteilung
Humanparasitologeder Universität Tübingen
- 07-10/2003 Forschungsaufenthalt am Laboratoire de Recherche am
Hôpital Albert Schweitzer, Lambaréné, Gabun
- Tätigkeiten:**
05-08/1998 Krankenpfleger, Unfallchirurgie, Klinikum Konstanz
1999-2001 studienbegleitend Krankenpfleger, Hämatologie,
Medizinische Klinik der Universität Tübingen
seit 12/2005 Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesie und
Intensivmedizin des Robert-Bosch-Krankenhauses, Stuttgart