

**Untersuchungen über den Einfluss von Chloroquin und
Desethylchloroquin auf die verschiedenen Entwicklungsstadien
der Malariaerreger *Plasmodium yoelii nigeriensis* und
Plasmodium falciparum (Coccidia: Plasmodiidae)**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Jonathan Chul-Hwan Kang

aus Seoul, Südkorea

Bonn Juni 2002

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Professor Dr. W. A. Maier
2. Referent: Professor Dr. K. P. Sauer

Tag der Promotion: 16.12.2002

1 Einleitung	6
1.1 Malaria und <i>Plasmodium</i>	6
1.2 Probleme bei der Malariabekämpfung	9
1.3 Chloroquin	10
1.4 Zielsetzung der Versuche	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Versuche mit <i>Plasmodium yoelii nigeriensis</i>	13
2.1.1 Mückenzucht	13
2.1.2 Mäuse-Haltung	14
2.1.2.1 Betäubung der Mäuse	14
2.1.2.2 Tierversuchsgenehmigung	14
2.1.3 <i>Plasmodium yoelii nigeriensis</i>	15
2.1.3.1 Infektion der Mäuse mit <i>Plasmodium yoelii nigeriensis</i>	15
2.1.3.2 Kryokonservierung (nach Trager & Jensen 1980)	16
2.1.4 Infektion der Mücken mit <i>Plasmodium yoelii nigeriensis</i>	17
2.1.5 Applikation von Chloroquin und Monodesethylchloroquin	17
2.1.5.1 Injektion von Chloroquin in die infizierten Mäuse (Versuchsreihe 1)	17
2.1.5.2 Applikation von Chloroquin in Glukoselösung (Versuchsreihe 2)	18
2.1.5.3 Applikation von Chloroquin über gesunde Mäuse (Versuchsreihe 3)	18
2.1.5.4 Applikation von Chloroquin und Monodesethylchloroquin über eine Membranfütterungsanlage (Versuchsreihe 4)	20
2.1.5 Auswertung des Infektionsverlaufs in den Mücken	21
2.1.5.1 Oozystenanzahl	21
2.1.5.2 Sporozitenanzahl	22
2.1.5.3 Statistische Auswertung	22
2.2 Versuche mit <i>Plasmodium falciparum</i>	22
2.2.1 in vitro-Kultur von <i>Plasmodium falciparum</i>	23
2.2.1.1 Bestandteile des Kulturmediums	23
2.2.1.2 Kontinuierliche Kultur von <i>Plasmodium falciparum</i>	24
2.2.1.3 Kryokonservierung	25

2.2.2 Bestimmung der Chloroquin- und Monodesethylchloroquinempfindlich-keit der asexuellen Stadien	25
2.2.2.1 Medikamenten-Stammlösungen	25
2.2.2.2 Bestimmung der ED ₅₀ -Werte.....	26
2.2.2.3 Kombinationsversuche mit Chloroquin und Monodesethylchloroquin.....	27
2.2.2.4 Bestimmung der Parasitämie	27
3 Ergebnisse.....	28
3.1 Versuche mit <i>Plasmodium yoelii nigeriensis</i>	28
3.1.1 Fotografische Darstellungen	28
3.1.2 Applikation von Chloroquin in infiziertem Blut (Versuchsreihe 1).....	30
3.1.3 Applikation von Chloroquin im Zuckerwasser (Versuchsreihe 2).....	35
3.1.4 Applikation von Chloroquin in nicht infiziertem Blut (Versuchsreihe 3).....	38
3.1.5 Applikation von Chloroquin und Monodesethylchloroquin in menschlichem Blut (Versuchsreihe 4)	47
3.2 Versuche mit <i>Plasmodium falciparum</i>	51
3.2.1 ED ₅₀ von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin	51
3.2.2 Applikation von Chloroquin und Monodesethylchloroquin in Kombinationen.....	52
4 Diskussion.....	55
4.1 Einfluss der Behandlung infizierter Mäuse mit subtherapeutischen Medikamentendosen auf die Infektiosität der Parasiten für die Mücken (zur Versuchsreihe 1).....	55
4.2 Einfluss nachträglicher Aufnahme von unverstoffwechseltem Medikament auf den Infektionsverlauf in der Mücke (zur Versuchsreihe 2).....	56
4.3 Einfluss nachträglicher Aufnahme des verstoffwechselten Medikamentes auf den Infektionsverlauf in der Mücke (zur Versuchsreihe 3).....	58
4.4 Einfluss unterschiedlicher Konzentrationskombinationen von Medikament und dessen Metaboliten auf den Infektionsverlauf der Malariaerreger (zur Versuchsreihe 4 und Untersuchungen mit <i>Plasmodium falciparum</i>).....	60
4.5 Ausblick.....	61
5 Zusammenfassung	63
6 Literaturverzeichnis	65

7 Anhang.....	71
7.1 Originaldaten der vorliegenden Arbeit.....	71
7.2 Untersuchungen zur Wirkung von Halofantrin, Mefloquin bzw. Chinin auf Gamogonie und Sporogonie.....	115
7.2.1 Applikation von Halofantrin in infiziertem Blut.....	115
7.2.1.1 Behandlung der infizierten Mäuse 6 Stunden vor Infektion der Mücken	115
7.2.1.2 Behandlung der infizierten Mäuse 18 Stunden vor Infektion der Mücken	115
7.2.2 Applikation von verstoffwechseltem Halofantrin in nicht infiziertem Blut.....	116
7.2.2.1 Behandlung gesunder Mäuse mit Halofantrin 6 Stunden vor der zweiten Blutmahlzeit	116
7.2.2.2 Behandlung gesunder Mäuse mit Halofantrin 24 Stunden vor der zweiten Blutmahlzeit	116
7.2.3 Applikation von Mefloquin in infiziertem Blut.....	117
7.2.3.1 Behandlung der infizierten Mäuse 2 Stunden vor Infektion der Mücken	117
7.2.3.2 Behandlung der infizierten Mäuse 24 Stunden vor Infektion der Mücken	117
7.2.4 Applikation von verstoffwechseltem Mefloquin in nicht infiziertem Blut	117
7.2.4.1 Behandlung gesunder Mäuse mit Mefloquin 2 Stunden vor der zweiten Blutmahlzeit	118
7.2.4.2 Behandlung gesunder Mäuse mit Mefloquin 24 Stunden vor der zweiten Blutmahlzeit	118
7.2.5 Applikation von Chinin in infiziertem Blut.....	118
7.2.5.1 Behandlung der infizierten Mäuse 2 Stunden vor Infektion der Mücken	119
7.2.5.2 Behandlung der infizierten Mäuse 24 Stunden vor Infektion der Mücken	119
7.2.6 Applikation von verstoffwechseltem Chinin in nicht infiziertem Blut	119
7.2.6.1 Behandlung gesunder Mäuse mit Halofantrin 2 Stunden vor der zweiten Blutmahlzeit	119
7.2.6.2 Behandlung gesunder Mäuse mit Halofantrin 24 Stunden vor der zweiten Blutmahlzeit	120
Danksagung.....	121

1 Einleitung

1.1 Malaria und *Plasmodium*

Malaria ist eine Krankheit, die durch parasitische Protozoen (Gattung *Plasmodium*, Stamm: Apicomplexa) im Blut des Vertebratenwirtes hervorgerufen wird und durch Stechmücken (Gattung *Anopheles*) übertragen wird. Die Erreger befallen nicht nur Menschen, sondern auch Säuger, Vögel, Reptilien oder Amphibien, wobei sie streng wirtsspezifisch sind.

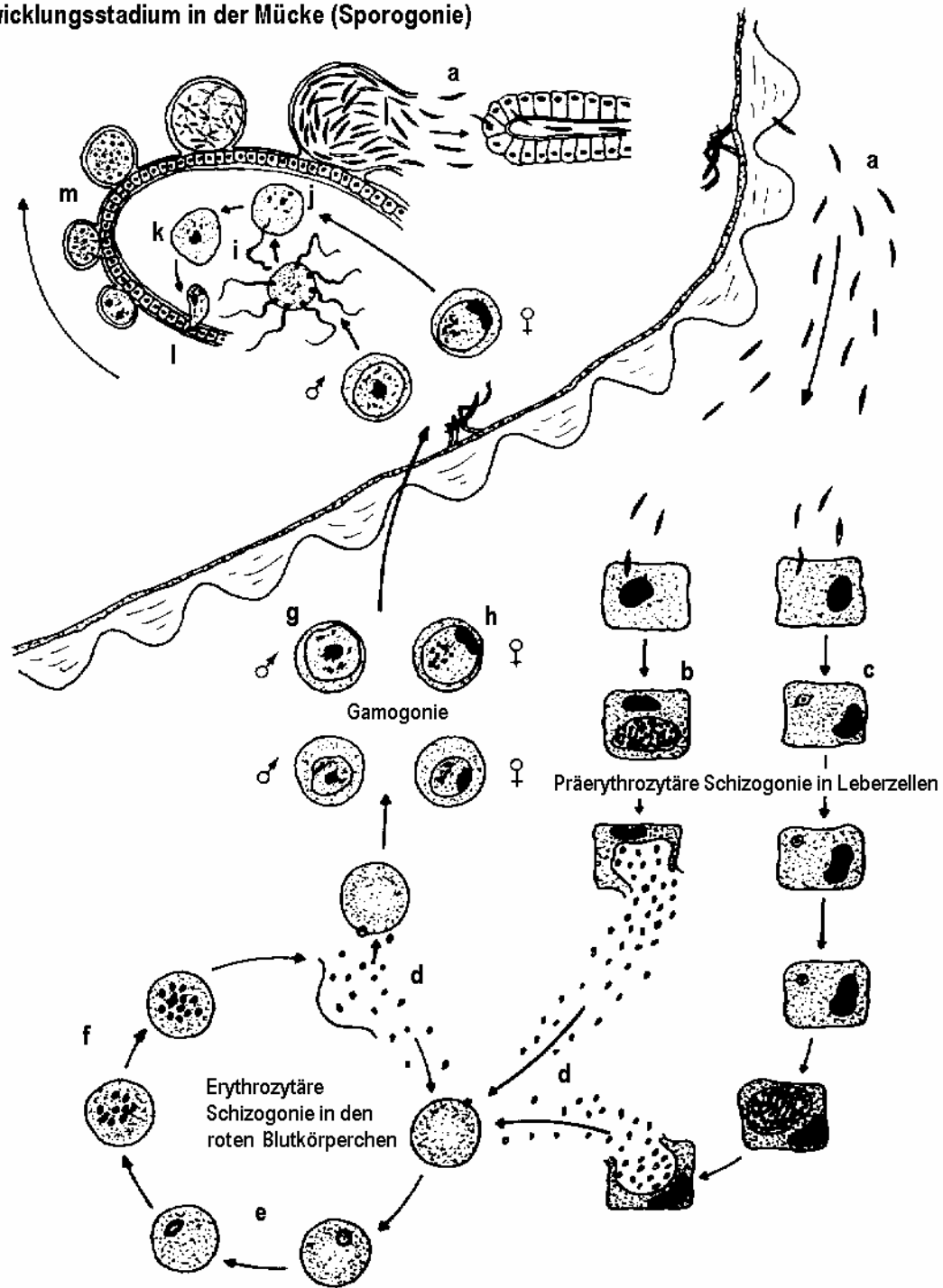
Die folgenden vier Arten von *Plasmodium* sind für den Menschen medizinisch bedeutend und nach den Abständen der Fieberschübe wie folgt zu gruppieren :

Art	Name	erythrozytärer Schizogoniezyklus	Fieber-Tage
<i>P. vivax</i> <i>P. ovale</i>	Malaria tertiana	48 h	1 Fieber-Tag und 1 fieberfreier Tag
<i>P. malariae</i>	Malaria quartana	72 h	1 Fieber-Tag und 2 fieberfreie Tage
<i>P. falciparum</i>	Malaria tropica	48 h	ständiges, unregelmäßiges, hohes Fieber

In **Abb. 1** ist der Entwicklungszyklus von *Plasmodium* sp. dargestellt: Durch den Stich einer infizierten weiblichen Mücke werden **Sporozoiten (a)** auf den Wirbeltierwirt übertragen. Die Sporozoiten dringen über die Blutbahn in Leberzellen ein und wachsen dort intrazellulär zu **Gewebesporozoiten** heran **(b)**. Dieser Vorgang wird als „**präerythrozytäre Schizogonie**“ bezeichnet. Bei *Plasmodium vivax* und *P. ovale* überleben in Leberzellen einige eingedrungene Sporozoiten bzw. produzierte Merozoiten der ersten Generation als sog. Dormozoiten bzw. **Hypnozoiten (c)**, vermehren sich erst nach Monaten oder Jahren und führen so zu neuen Malaria-Anfällen (Rezidive). In den Schizonten bilden sich zahlreiche **Merozoiten (d)**. Beim Platzen der Leberzellen gelangen diese in den Blutstrom und befallen Erythrozyten (**Trophozoiten, e**). In den Erythrozyten wachsen die Merozoiten zu **Schizonten (f)** heran, die wieder 8 bis 16 Merozoiten ausbilden. Danach zerfallen die befallenen Erythrozyten. Dabei werden u.a. Reste des abgebauten Hämoglobins, das sogenannte „Malariapigment“, frei, wodurch die Fieberanfälle verursacht werden.

Einige Merozoiten differenzieren sich zu männlichen bzw. weiblichen Gamonten, die jeweils **Mikro-** bzw. **Makrogametozyten (g, h)** oder Mikro- bzw. Makrogamonten (Synonym) heißen und für die Mücke die infektiösen Stadien darstellen. Nach der Blutaufnahme der Mücke entwickeln sich die Mikrogametozyten zu **Mikrogameten (i)** und die Makrogametozyten zu **Makrogameten (j)**. Sie verschmelzen und bilden die **Zygote (k)**. Aus der ovoiden Zygote entsteht ein längliches Stadium, der **Ookinete (l)**, der durch die peritrophische Membran hindurch in die Epithelzellen des Mückendarmes eindringt. Nach der Passage siedelt sich der Ookinete als **Oozyste (m)** zwischen Darmwand und Basallamina an. Der Kern zerfällt in mehrere Tochterkerne und zahlreiche Sporozoiten in einer dünnen, von den Wirtszellen abgeschiedenen Schicht. Die reifen **Sporozoiten (a)** verlassen die Oozysten aktiv, gelangen über die Hämolymphe in die Speicheldrüse und können beim nächsten Stich der Mücke abgegeben werden.

Entwicklungsstadium in der Mücke (Sporogonie)



Entwicklungsstadien im Vertebratenwirt (Schizogonie / Gamogonie)

Abb. 1: Entwicklungszyklus von *Plasmodium* sp. (aus PETERS, 1987, geändert)
 a: Sporoziten, b: Gewebeschizonten, c: Hypnozoiten, d: Merozoiten,
 e: Trophozoiten, f: Schizonten, g: Mikrogametozyt, h: Makrogametozyt,
 i: Mikrogamet, j: Makrogamet, k: Zygote, l: Ookinet, m: Oozysten

1.2 Probleme bei der Malariabekämpfung

Nach der Entdeckung des Chloroquins gelang sowohl die prophylaktische als auch die kurative Behandlung der Malaria in den meisten Fällen. In den letzten Jahren sind jedoch resistente Erreger in fast allen Malariagebieten der Erde entstanden. Insbesondere haben sich chloroquin-resistente Stämme von *Plasmodium falciparum* in Asien, Süd- und Mittelamerika, West- und Ostafrika ausgebreitet (RIECKMANN et al., 1989. BJÖRKMAN et al., 1990. GARVAVELLI et al., 1992. KOZARSKY et al., 1994. **Abb. 2**).

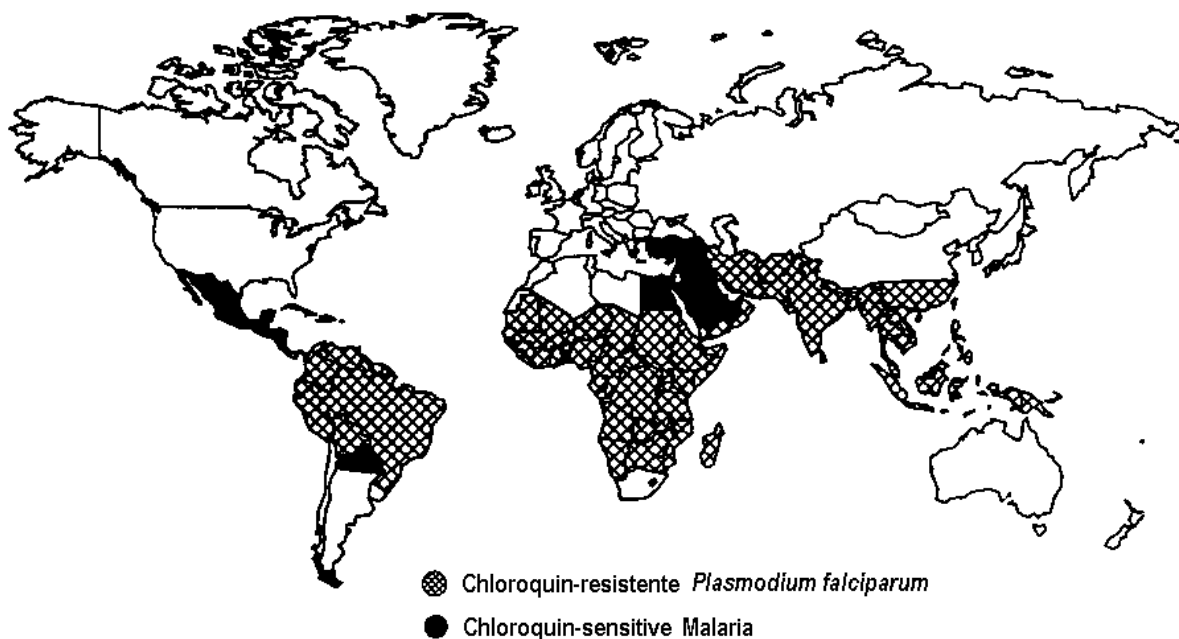


Abb. 2: Verbreitung der Malaria und Chloroquin-resistenter *Plasmodium falciparum*, 1994 (aus KOZARSKY et al., 1994)

Zur Zeit gibt es weltweit jährlich 1,5 bis 2,7 Millionen Todesfälle hauptsächlich unter Kindern im Alter unter 5 Jahren und schwangeren Frauen im Sub-Sahara-Afrika (PHILLIPS, 2001). In einigen Gebieten dieses Kontinentes scheint Chloroquin kaum mehr Wirksamkeit zu haben (NUWAHA, 2001).

Es ist fraglich, ob man Chloroquin zur Prophylaxe weiter benutzen sollte, da es Hinweise gibt, dass dieses Medikament sogar zur Steigerung der Infektiosität der Erreger beitragen kann: Bereits 1969 wiesen RAMKARAN UND PETERS nach, dass die Infektiosität des chloroquin-resistenten Mäusemalariaerregers *Plasmodium berghei* durch Chloroquin-Aufnahme der Mücken (*Anopheles stephensi*) gesteigert wurde (RAMKARAN et al., 1969). Später fanden COLEMAN und seine Kollegen, dass die Aufnahme von medikamenthaltigem

Blut durch die Mücken im Falle von Mefloquin und Artemisinin bei geringer Dosis zu einer beschleunigten Entwicklung der Sporozoiten von *P. berghei* führte (COLEMAN et al., 1988). Bei ähnlichen Versuchen mit Chloroquin bei *Anopheles stephensi* fanden DO ROSARIO und seine Kollegen zwar keine Veränderung der Infektiosität von *Plasmodium falciparum* und *P. berghei* bei *Anopheles stephensi* und *A. freeborni*; als aber *A. freeborni* Mücken am 10. und 12. Tag nach Infektion mit *P. berghei* zusätzlich Chloroquin erhielten, zeigte sich eine hohe Invasionsrate der Erreger in die Speicheldrüsen (um 60 und 70%, DO ROSARIO et al., 1988). Eine erhöhte Infektiosität fanden auch ICHIMORI und seine Kollegen bei *Plasmodium yoelii nigeriensis* bei Chloroquin-behandelten *Anopheles stephensi* (ICHIMORI et al., 1990).

Je nach Autor waren die in den Versuchen eingesetzten Methoden jedoch sehr unterschiedlich. So war z.B. der zeitliche Abstand der Gabe des Medikamentes nach der Infektion, die Dosierung des Medikamentes etc. verschieden, so dass die Ergebnisse nicht direkt miteinander zu vergleichen sind. Es ist dringend notwendig, solche Versuche in einem bestimmten Schema systematisch durchzuführen, um das Problem der Resistenzentwicklung der Malariaerreger besser beurteilen zu können. Die Chemoprophylaxe mit Medikamenten müsste radikal geändert werden, wenn sich bestätigen sollte, dass die Resistenzentwicklung und –ausbreitung durch den Einsatz eines Medikamentes gefördert würde.

1.3 Chloroquin

Chloroquin wurde erstmalig 1939 in Deutschland beschrieben und ab 1941 in größerem Umfang in den USA hergestellt (Andersag et al., 1939, HARTKE et al., 1991, **Abb. 3**). Chloroquin mit Handelsnamen Resochin® gehört zur Gruppe der 4-Aminoquinoline, deren Angriffspunkte auf die Stadien der Parasiten beschränkt sind, die aktiv in Abbau des Hämoglobins beteiligt sind. Chloroquin hemmt die Reifung der erythrozytären Formen der Parasiten und damit die mit dem Fieberanfall verbundene Freisetzung der Merozoiten. Das Wirkungsspektrum umfasst alle Formen der Malariaerreger des Menschen (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae*). Gegen Gewebeschnizonten, Hypnozoiten sowie Gametozyten von *P. falciparum* ist Chloroquin dagegen unwirksam (HARTKE et al., 1991, BUTCHER, 1997).

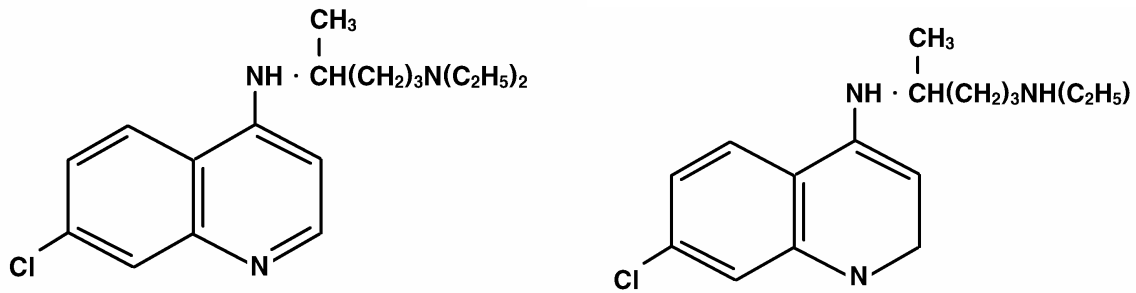


Abb. 3: Strukturformel von **Chloroquin** (7-chloro-4-[4'-(diethylamino)-1'-methylbutyl] aminoquinolin, links) und **Monodesethylchloroquin** (7-chloro-4-[4'-(ethylamino)-1'-methylbutyl] aminoquinolin, rechts) (nach ANSARI, 1994)

Der Mechanismus der Chloroquin-Wirkung gegen Plasmodien besteht in der Hemmung der Hämpolymerase nach Anreicherung des Wirkstoffs in Erythrozyten mit Parasitenbefall. Da Plasmodien einen starken Hämoglobinabbau zur Gewinnung essentieller Aminosäuren induzieren, sind sie auf die Entgiftung toxischer Häm-Metaboliten angewiesen. Diese erfolgt durch Polymerisation des freien Häm (Ferriprotoporphyrin IX, FPIX) zu Hämozoin. Eine Anreicherung toxischer Häm-Abbauprodukte durch Chloroquin bedingt die blutschizontozide Wirkung (HARTKE et al., 1991, O'NEILL et al., 1998).

Der Hauptmetabolit des Chloroquins ist Monodesethylchloroquin, dessen hemmende Wirkung gegen Chloroquin-sensitive *Plasmodium falciparum*-Stämme stark wie Chloroquin aber gegen Chloroquin-resistente *P. falciparum* viel geringer ist (VERDIER et al., 1984, FU et al., 1986, TRAORE, 1997, **Abb. 3**). Hierbei stellt sich eine Frage, ob und inwiefern Monodesethylchloroquin an der Inhibition bzw. Stimulation der Infektiosität der Malariaerreger beteiligt ist. ADEROUNMU (1984) wies nach, dass eine 4:1 Konzentrationskombination von Chloroquin und Monodesethylchloroquin mehr hemmende Wirkung auf die Schizogonie der chloroquin-resistenten *P. falciparum* hatte als Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin allein. Unterschiedliche Ergebnisse liegen vor, wenn Chloroquin den mit *Plasmodium* infizierten Mücken appliziert wurde. Hierdurch wurde die Infektiosität der Parasiten erhöht (WILKINSON et al., 1976, PETERS et al., 1970, ICHIMORI et al., 1990), verringert (JEFFREY, 1958, HOGH et al., 1995) oder es gab keine Änderung der Infektiosität (GERBERG, 1971, CHUTMONGKONKUL et al., 1992a,b). Da Chloroquin hierbei je nach der Untersuchung verstoffwechselt von den Mücken aufgenommen wurde, ist zu bedenken, dass Monodesethylchloroquin bzw. weitere Metaboliten des Chloroquin, z.B. Bisdesethylchloroquin, eine Rolle spielen könnten.

1.4 Zielsetzung der Versuche

Mit der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob und gegebenenfalls wie Chloroquin und Monodesethylchloroquin Gamogonie und Sporogonie von *Plasmodium yoelii nigeriensis* (Nagermalaria Parasiten) und *Plasmodium falciparum* beeinflussen, und zwar mit folgenden vier Fragestellungen:

- a. Welchen Einfluss hat die Behandlung infizierter Mäuse mit subtherapeutischen Medikamentendosen auf die Infektiosität der Parasiten. Hierdurch sollte erklärt werden, ob das Medikament, das zur Chemotherapie eingenommen wurde, die Entwicklung der Malariaerreger in den Mücken beeinflusst.
- b. Wie beeinflusst die nachträgliche Aufnahme von unverstoffwechseltem Medikament den Infektionsverlauf in der Mücke.
- c. Welchen Einfluss hat die nachträgliche Aufnahme des verstoffwechselten Medikamentes auf den Infektionsverlauf in der Mücke. Dadurch sollte ermittelt werden, wie das Medikament, das zur Prophylaxe eingenommen wurde, die Entwicklung der Malariaerreger in den schon infizierten Mücken beeinflusst.
- d. Wie beeinflussen unterschiedliche Konzentrationskombinationen von Chloroquin und Monodesethylchloroquin den Infektionsverlauf der Malariaerreger. Durch diese Versuche sollte erklärt werden, ob eventuell die inhibierende, stimulierende bzw. fehlende Wirkung des Chloroquins auf die Malariaparasiten im Zusammenhang mit dem Konzentrationsverhältnis von Chloroquin und dessen Metabolit Monodesethylchloroquin im Blut steht.

Zusammenfassend sollte überprüft und diskutiert werden, ob sich eine Steigerung der Mückeninfektion durch den Einsatz von Chloroquin ergibt und ob Chloroquin zur Prophylaxe weiter verwendet werden sollte.

Da diese Versuche Teil eines Projektes am Institut für Medizinische Parasitologie Bonn sind, mit dem der Einfluss anderer wichtigen Malariamedikamente (Halofantrin, Mefloquin) auf die Malariaparasiten überprüft wird, sollten die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Ergebnissen der Untersuchungen mit diesen anderen Medikamenten verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuche mit *Plasmodium yoelii nigeriensis*

2.1.1 Mückenzucht

Verwendet wurden Mücken einer *Anopheles stephensi* – Kolonie, die seit 1985 im Institut für Medizinische Parasitologie der Universität Bonn gezüchtet wird. Die derzeit existierende Kolonie geht auf Laborstämme aus London, Basel und Zürich zurück.

Die Mücken wurden bei 26°C, 80% relativer Luftfeuchtigkeit und einem regelmäßigem Hell-Dunkel-Wechsel von 16 Stunden Kunstlicht und 8 Stunden Dunkelheit gehalten.

Für die Aufzucht der Larven wurden die abgelegten Eier in Makrolonschalen (20 x 15 x 15 cm, Fa. Ebeco) in Leitungswasser bei einem Wasserstand von 1 cm gelegt, wobei die inneren Wände der Makrolonschalen mit einem Band Filterpapier ausgelegt wurden, um ein Austrocknen der Eier zu verhindern. In den folgenden Tagen wurden die Larven in größere Makrolonschalen (42 x 26 x 15 cm) mit einem Wasserstand von 5 cm aufgeteilt, so daß jede Schale mit etwa 400 Larven besetzt wurde. 1-2mal pro Tag wurde soviel Futter (Tetra Standard Mix, Fa. Tetra, zermörsert) auf die Wasseroberfläche aufgebracht, dass es sich durch die Oberflächenspannung des Wassers gut verteilte. Täglich wurden die vorhandenen Puppenstadien in wassergefüllte Schalen in die Einflugkäfige (40x40x40 cm) überführt. Als Nahrungsquelle für die Adultmücken diente eine alle zwei Tage frisch angesetzte 10%ige Glukoselösung in Erlenmeyerkölbchen, die über Filterpapierröllchen den Mücken angeboten wurde. Außerdem enthielt jeder Käfig eine Schale mit autoklaviertem Leitungswasser.

Zur Gelegeproduktion wurde einmal wöchentlich eine Blutfütterung durchgeführt. Zur Stimulation der Saugaktivität der Mücken wurde 24 Stunden zuvor das Zuckerwasser aus den Käfigen entfernt. NMRI-Mäuse wurden wie unter 2.2 beschrieben betäubt und auf die Mückenkäfige gelegt, so dass die Mücken durch die Gaze Blut saugen konnten.

2.1.2 Mäuse-Haltung

Als Wirbeltierwirte für *Plasmodium yoelii nigeriensis* und als Fütterungsmäuse für die *Anopheles stephensi*-Gelegeproduktion dienten weiße Labormäuse. Es handelte sich um insitutseigene Nachzuchten des NMRI-Stammes (Hannover bzw. Charles River GmbH, Sulzfeld). Die Tiere wurden in Makrolonschalen bei Zimmertemperatur und Tageslicht gehalten. Sie wurden mit Altromin Standard-Diät und Wasser ad libitum gefüttert. Das Gewicht zum Zeitpunkt der Versuche betrug 20-40 g.

2.1.2.1 Betäubung der Mäuse

Zur Betäubung der Mäuse für die Fütterung und Infektion der Mücken wurde eine Ketamin-Xylazin-Betäubung durchgeführt. Hierzu wurde zunächst Atropinsulfat (0,2 mg/kg Körpergewicht, KG, Fa. Braun, mit 0,9% NaCl verdünnt) subcutan appliziert und nach einer Wartezeit von 15-30 Minuten wurden Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg KG, von Ketanest® Fa. Parke-Davis) und Xylazinhydrochlorid (16 mg/kg KG, von Rompun® Fa. Bayer) zusammen injiziert. Die Schlafzeit der Mäuse betrug ca. 30 Minuten.

2.1.2.2 Tierversuchsgenehmigung

Die Versuche an Mäusen wurden nach § 8 des Tierversuchsgesetzes nach Antrag von der Bezirksregierung Köln (Aktenzeichen: 23.203.2 BN 15, 19/93) genehmigt. Das gesamte Vorhaben trug den Titel: „Untersuchungen über den Einfluss ausgewählter Malariamedikamente auf die verschiedenen Entwicklungsstadien der Gamogonie und Sporogonie von *Plasmodium yoelii nigeriensis* und *Plasmodium berghei*“ (Kurzbezeichnung: Malariavektor / Malariamedikamente).

2.1.3 *Plasmodium yoelii nigeriensis*

Plasmodium yoelii nigeriensis wurde 1968 in Buschratten (*Thamnomys rutilans*) aus Nigeria entdeckt und von KILICK-KENDRIK (1973) genauer beschrieben. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm handelt es sich um den Klon N₆₇, der 1983 von Dr. D. Walliker (Institute of Animal Genetics, Edinburgh) zur Verfügung gestellt wurde. Seit dem wurde er durch mechanische Passage oder zyklisch durch *Anopheles stephensi* übertragen oder in Mäuseblut kryokonserviert aufbewahrt. Nach etwa sechs mechanischen Passagen erfolgte eine zyklische Passage, um die Fähigkeit von *Plasmodium yoelii nigeriensis* zur geschlechtlichen Vermehrung aufrecht zu erhalten.

2.1.3.1 Infektion der Mäuse mit *Plasmodium yoelii nigeriensis*

Die für die Versuche verwendeten Mäuse wurden entweder von kryokonserviertem parasitiertem Blut (0,3 ml pro Maus, 1:1 verdünnt mit physiologischer NaCl-Lösung) oder frischem Blut einer mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infizierten Maus injiziert. Zur besseren Standardisierbarkeit der Infektion wurden für die Versuche lediglich über „Blutpassagen“ infizierte Mäuse verwendet. Von einer aufgetauten Probe wurden außerdem nicht mehr als fünf Mäusepassagen durchgeführt, um eine gleichbleibende hohe Produktion und Infektiosität der Gametozyten zu gewährleisten. 5 Tage nach der Infektion wurde eine Maus (Parasitämie ca. 15-20%) dekapitiert und das Blut in einem Becherglas aufgefangen, das 0,3 ml Liquemin® und 1,5 ml NaCl-Lösung (0,9%) als Antikoagulans enthielt.

Die Parasitendichte wurde wie folgt bestimmt:

10 µl der Blut-Liquemin®-Mischung wurden 1:100 mit phys. NaCl-Lösung verdünnt. In einer Thoma-Zählkammer wurde die Zellzahl dieser Suspension nach der Formel ermittelt:

$$Z = \frac{X \times 10^6}{Y \times 4}$$

Z : Zellzahl / ml Suspension

X: Zellzahl in den B-Feldern

Y: Anzahl der gezählten B-Felder

Unter Einbeziehung der vorher ausgezählten Parasitämie (PÄ) und des Verdünnungsfaktors der Suspension wurde dann die Parasitendichte der Blut-Liquemin®-Mischung errechnet:

$$P = \frac{X \times 10^6 \times 100 \times PE}{Y \times 4 \times GE}$$

P: Parasitenzahl / ml

PE: parasitierte Erythrozyten

GE: gesamt ausgezählte Erythrozyten

$$P\ddot{A} = \frac{PE}{GE} \times 100 (\%)$$

PÄ: Parasitämie

Mit phys. NaCl-Lösung wurde die Blut-Liquemin®-Mischung auf 1×10^6 Parasiten pro Inokulumvolumen (0,3 ml) eingestellt und intraperitoneal (i.p.) injiziert. Der Infektionsverlauf der Mäuse wurde täglich anhand Giemsa-gefärbter Schwanzblut-Ausstriche kontrolliert.

2.1.3.2 Kryokonservierung (nach TRAGER & JENSEN 1980)

Infiziertes Mäuseblut wurde wie unter 2.3.1 beschrieben gewonnen und mit physiologischer NaCl-Lösung auf 4×10^7 parasitierte Erythrozyten pro 0,25 ml eingestellt. Diese Suspension wurde mit dem gleichen Volumen Einfrierlösung versetzt. Jeweils 0,25 ml wurden in Kryoröhrchen portioniert und in flüssiges N₂ (-170°C) eingebracht.

Herstellung der Glycerin-Sorbitol-Einfrierlösung:

0,9 g NaCl

4,2 g Sorbitol

mit aqua dest. auf 100 ml auffüllen

mit 38,9 ml Glycerin vermischen

2.1.4 Infektion der Mücken mit *Plasmodium yoelii nigeriensis*

Für die Versuche wurden ca. 1500 Puppen von *Anopheles stephensi* in Wassergläsern in einen großen Einflugkäfig (40x40x40 cm) eingestellt und wie in [2.1] beschrieben behandelt. Am dritten Tag nach der Infektion der Mäuse mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* wurden saugwillige weibliche Mücken in mehrere kleinere Käfige (20x20x20 cm) aufgeteilt und konnten 20 Minuten an den Mäusen saugen. Die Mücken, die nicht voll gesaugt hatten, wurden mit Exhaustor entnommen und verworfen. 24 Stunden vor dem Blutmahl wurde das Zuckerwasserglas weggestellt, um die Saugaktivität der Mücken zu erhöhen. Die Mücken waren 6 bis 8 Tage vor dem Blutmahl geschlüpft.

2.1.5 Applikation von Chloroquin und Monodesethylchloroquin

Chloroquin wurde als Chloroquin-Diphosphat bei der Fa. Sigma gekauft; Monodesethylchloroquin wurde von der Fa. Rhône-Poulenc Rorer GmbH, Köln freundlicherweise kostenlos zur Verfügung gestellt. Diese Chemikalien wurden über vier unterschiedliche Wege in die Mücken appliziert:

2.1.5.1 Injektion von Chloroquin in die infizierten Mäuse (Versuchsreihe 1)

Den Mäusen, die wie unter [2.3.1] beschrieben mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren, wurde Chloroquin mit unterschiedlichem Zeitabstand bis zum Blutmahl (6 h, 30 h bzw. 54 h) intraperitoneal appliziert. Die Dosierungen betragen 1, 10 bzw. 50 mg Chloroquin-Base pro kg Körpergewicht der Maus. Dazu wurde eine Stammlösung aus 100 mg Chloroquin-diphosphat in 10 ml aqua dest hergestellt und mit physiologischer

Kochsalzlösung so verdünnt, daß ein Inokulum von 0,3 ml entsprechend dem Gewicht der Mäuse die gewünschte Menge Chloroquin enthielt. Kontrollmäuse erhielten eine Injektion von 0,3 ml physiologischer Kochsalzlösung. Am dritten Tag nach der Infektion der Mäuse konnten die Mücken wie unter [2.4] beschrieben an diesen Mäusen saugen.

2.1.5.2 Applikation von Chloroquin in Glukoselösung (Versuchsreihe 2)

Chloroquinhaltige Glukoselösung wurde in den Konzentrationen von 15, 150 und 750 µg/ml hergestellt. Dazu wurde eine Stammlösung von Chloroquin in aqua dest hergestellt, die über mehrere Wochen bei 4°C aufbewahrt wurde. Aus dieser Stammlösung wurde mit frisch angesetzter 10%iger Glukoselösung die gewünschte Konzentration eingestellt und den Mücken angeboten. Die Mücken der Kontrollgruppe erhielten nur 10%ige Glukoselösung.

2.1.5.3 Applikation von Chloroquin über gesunde Mäuse (Versuchsreihe 3)

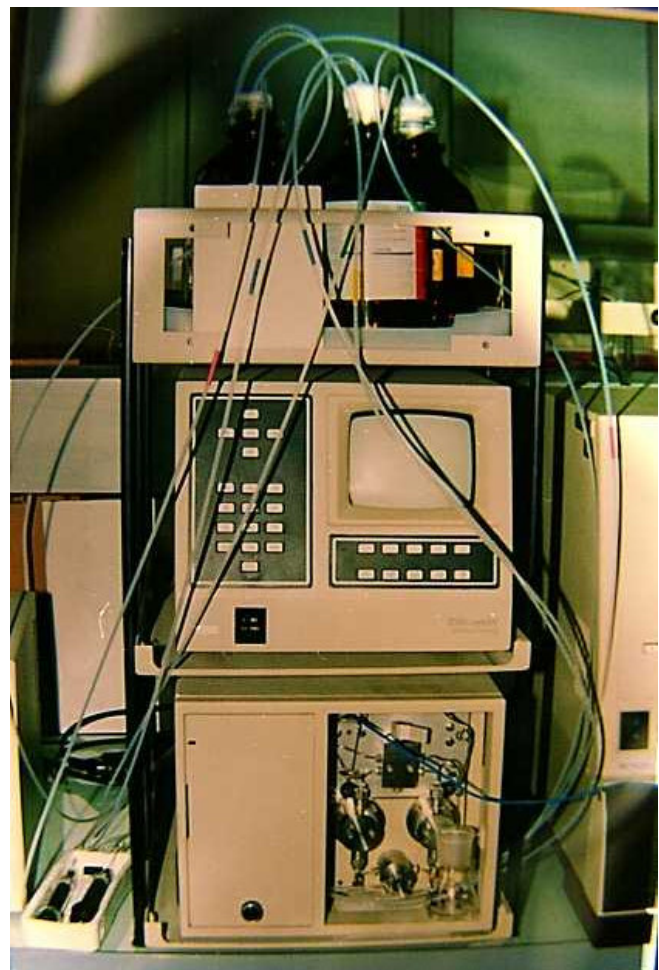
Die Mücken, die durch ein infektiöses Blutmahl mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren, erhielten Chloroquin durch ein zweites Blutmahl. Dies erfolgte an gesunden Mäusen, denen Chloroquin 0,5 h, 2 h, 6 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h zuvor intraperitoneal appliziert worden war. Die Chloroquin-Inokula wurden wie unter [2.5.1] beschrieben vorbereitet. Die Dosierungen betragen ebenfalls 1, 10 bzw. 50 mg/kg Körpergewicht. Unmittelbar nach der Fütterung wurden diese Mäuse dekapitiert; deren Blut wurde entweder je 250 µl in flüssigem Stickstoff aufbewahrt oder je 50 µl auf Filterpapier getrocknet und später zur Bestimmung der Konzentrationen von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin mit HPLC analysiert.

Die HPLC-Analyse wurde freundlicherweise durch Dr. J. F. Chaulet und Herrn Cyril Mounier im Hôpital d'Instruction des Armées Desgenettes, Lyon, Frankreich, durchgeführt (nach CHAULET et al., 1993, CROES et al., 1994). Zur Extraktion der Medikamente aus den Blutproben wurden NaOH und Diethylether bei eingefrorenen Blutproben bzw. HCl und Dichloromethan bei Blutproben auf Filterpapier verwendet (Abb. 4). Zur Mobilphase diente eine Mischlösung aus Acetonitril und Methanol/Ammoniak (Abb. 5).



Abb. 4: Chloroquin-Extrakt in Dichlormethan (im unteren durchsichtigen Bereich) und Filterpapier mit Blutzellen (im oberen dunklen Bereich).

Abb. 5: Das HPLC-Analysegerät bestand aus einer Waters 600 E multi-solvent delivery Pumpe (Fa. Millipore, USA), einem Waters 715 Ultrawisp Injektor (Fa. Millipore, USA), einer 5 μm silica intersil Säule und einem Waters 470 Scanning Fluorescence Detektor (Fa. Millipore, USA).



2.1.5.4 Applikation von Chloroquin und Monodesethylchloroquin über eine Membranfütterungsanlage (Versuchsreihe 4)

Mit Hilfe einer Membranfütterungsanlage erhielten die infizierten Mücken ein zweites Blutmahl, das aus Kombination von Chloroquin und Monodesethylchloroquin bestand (Abb. 6 und 7). Dazu wurden eine Stammlösung aus 100 mg Monodesethylchloroquin in 10 ml 50% Methanol hergestellt und eine Stammlösung aus 100 mg Chloroquin in 10 ml aqua dest.. Aus diesen beiden Stammlösungen wurden drei Kombinationen der beiden Chemikalien in Humanblut hergestellt, nämlich Chloroquin : Monodesethylchloroquin = 10:0, 5:5 bzw. 0:10 (Base in Gewicht). Das hierfür benutzte Humanblut wurde zuvor von dem Autor frisch entnommen, in eine Glasflasche überführt und durch zwölfminütiges Schütteln mit Glaskugeln defibriniert. Die Dosierungen der beiden Chemikalien betrug gepoolt 1,5; 7,5 bzw. 15 µg/ml Totalblut. Während der zwanzigminütigen Fütterung wurde die Temperatur des Blutes bei 38°C konstant gehalten. Zur Stimulierung der Saugaktivität wurde durch einen Schlauch vorsichtig um die Gefäße mit dem Blut in die Käfige hineingehaucht.



Abb. 6: Die Membranfütterungsanlage bestand aus einer Warmwasserpumpe, mehreren Fütterungskammerchen und an die Pumpe angeschlossenen Schläuchen. Die Fütterungskammerchen waren jeweils an ihrer Unterseite mit einer Paraffinmembran überzogen. Die Wasserpumpe hielt das fließende Wasser auf 38°C, damit das in eine Schicht zwischen unterer Kammerfläche und der Membran eingespritzte Blut auch warm bleiben konnte.



Abb. 7: Die Mücken in jedem Käfig konnten durch die Netze und die Membran das Blut saugen. Mücken, die nicht vollgesogen waren, wurden mit einem Exhaustor beseitigt.

2.1.5 Auswertung des Infektionsverlaufs in den Mücken

2.1.5.1 Oozystenzahl

Am 7. Tag nach der Infektion der Mücken mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* wurden die Mücken mit einem Exhaustor aus den Käfigen gefangen und mit Äther betäubt oder im Eis deaktiviert. Die Präparation erfolgte in einem Tropfen 0,9%iger NaCl-Lösung : Der Thorax wurde mit einer Pinzette fixiert, während die beiden letzten Abdominalsegmente mitsamt dem Verdauungstrakt mit einer zweiten Pinzette langsam abgezogen wurden. Der Mitteldarm wurde mit einer Nadel von den anderen Körperteilen der Mücke abgeschnitten und mit einem Deckglas bedeckt, dann wurde mit Fließpapier vorsichtig soviel Flüssigkeit abgezogen, daß der Darm gut ausgebreitet lag. Mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskopes wurde die Anzahl der Oozysten pro Mitteldarm bestimmt.

2.1.5.2 Sporozoitenzahl

Am 14. Tag nach der Fütterung erfolgte die quantitative Untersuchung der Speicheldrüseninfektion anhand der Bestimmung der Sporozoitenzahlen in Thoraxhomogenaten. Die Mücken wurden mit Äther betäubt, und auf einem Objektträger wurden Kopf, Flügel, Beine und Abdomen entfernt. Die gewonnenen Thoraces (ca. 20 Stück pro Versuchsansatz) wurden in einer Eppendorfreagenzgefäß in 0,9%iger NaCl-Lösung zermörsert. Die groben Bestandteile des Homogenats wurden bei 1500 Umdrehung/Minute 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 13000 Umdrehung/Minute 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die Sedimente wurden mit 50 µl 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendiert. Mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer im Phasenkontrast wurde die Zahl der Sporozoiten bestimmt. Die Berechnung der durchschnittlichen Sporozoitenzahl pro infizierter Mücke erfolgte unter Berücksichtigung der Infektionsrate (prozentualer Anteil der infizierten Mücken).

2.1.5.3 Statistische Auswertung

Aufgrund der starken Schwankungen der Oozysten Zahlen pro Mitteldarm der Mücke erfolgte die statistische Absicherung mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Testes (LAMPRECHT, 1992): Die Oozysten Zahlen wurden in einer Rangreihenfolge angeordnet, und mit diesen Rangfolgewerten wurde die Infektionsintensität der Mitteldärme (Anzahl der Oozysten pro Mitteldarm) auf signifikante Abweichungen überprüft. Die Stärke der Speicheldrüseninfektion mit Sporozoiten konnte nicht statistisch ausgewertet werden, da pro Versuchsansatz nur ein Thoraxhomogenat angefertigt worden war.

2.2 Versuche mit *Plasmodium falciparum*

Die Versuche wurden mit dem *Plasmodium falciparum*-Stamm NF₅₄ durchgeführt. Dieser Stamm wurde 1979 am Institut für Medizinische Parasitologie der Universität Nimwegen von einem an Flughafen-Malaria erkrankten Patienten isoliert („Amsterdam airport strain“). Stabilate dieses Stammes wurden dem Institut für Medizinische Parasitologie in Bonn mehrfach zur Verfügung gestellt.

2.2.1 in vitro-Kultur von *Plasmodium falciparum*

Die in vitro-Kultur von *Plasmodium falciparum* erfolgte im Prinzip nach der Methode von TRAGER & JENSEN (1976), wurde jedoch in einigen Punkten modifiziert. Alle Lösungen, die in der Kultur Verwendung fanden, wurden sterilfiltriert (0,22 µm Einwegfilter, Fa. Milipore und Fa. Schleicher & Schuell). Antibiotika wurden nicht eingesetzt. Sämtliche Arbeit wurden an einer auf 37°C aufgeheizten sterilen Werkbank (Fa. Biochrom) durchgeführt. Alle Medien und Gerätschaften wurden vor der Verwendung bei der Kultivierung auf 37°C erwärmt.

2.2.1.1 Bestandteile des Kulturmediums

Die Kultivierung wurde in RPMI 1640-Medium durchgeführt, das mit 25 mM HEPES-Puffer und 50 mg/l Hypoxanthin versetzt wurde. Zu dieser RPMI-Stammlösung wurden kurz vor der Verwendung 10% Humanserum und 0,275% NaHCO₃ zugegeben und als Komplettmedium (KM) verwendet.

RPMI-Stammlösung

10,41 g RPMI 1640-Trockenpulver (Fa. Sigma)

5,95 g HEPES-Buffer (Fa. Roth)

50 mg Hypoxanthin (Fa. Sigma)

ad 1000 ml Aq. demil.

pH = 7,0 (mit NaOH bzw. HCl eingestellt)

Die RPMI-Stammlösung wurde bei +4°C höchstens bis zu zwei Wochen aufbewahrt.

Humanserum

Das verwendete Humanserum wurde freundlicherweise vom Institut für Experimentelle Hämatologie und Bluttransfusionswesen der Universitätskliniken Bonn zur Verfügung gestellt. Das Humanserum wurde ohne Verwendung von Antikoagulantien gewonnen. Hierzu wurde frisch entnommenes Spenderblut (A⁺) bei Zimmertemperatur zur Koagulation stehengelassen, und das Serum wurde abzentrifugiert und bei -20°C tiefgefroren. Die Zentrifugation erfolgte bereits eine Stunde nach der Blutentnahme, um eine möglichst

schnelle Kühlung zu sichern und die durch Wärme begünstigte Entstehung toxischer Substanzen im Serum zu verhindern. Das Serum von mindestens zehn Spendern wurde gepoolt, in Aliquots von je 50 ml bei -20°C gelagert und erst unmittelbar vor der Verwendung aufgetaut. Eine Inaktivierung des Serums erfolgte nicht.

Erythrozyten

Zur Erythrozytengewinnung wurde Spenderblut der Blutgruppe A bzw. O im Institut für Medizinische Parasitologie in Bonn ohne Antikoagulantien entnommen und sofort steril in eine Glasflasche überführt und durch zwölfminütiges Schütteln mit Glaskugeln defibriniert. Das Blut wurde abzentrifugiert (2000 U/min, 4 min), der Überstand verworfen, zweimal in RPMI-Stammlösung resuspendiert und jeweils wieder abzentrifugiert. Anschließend wurden die abzentrifugierten Erythrozyten 3:1 mit Humanserum versetzt, bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert und nicht länger als eine Woche benutzt.

2.2.1.2 Kontinuierliche Kultur von *Plasmodium falciparum*

Die kontinuierliche Kultur der erythrozytären Stadien erfolgte in Kunststoff-Petrischalen (35x10 mm bzw. 60x15 mm, Fa. Nunc) bei einem Hämatokrit von 7 %, dies entspricht 0,375 ml Erythrozyten plus 5 ml Kompletmedium. Das Medium wurde alle 24 Stunden gewechselt, indem das alte Medium über den sedimentierten Erythrozyten abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt wurde. Wenn die Parasitämie einer Schale 5 % erreichte, wurde die kontinuierliche Kultur entweder auf die Hälfte verdünnt oder auf zwei Schalen aufgeteilt, so daß die Parasitämie auf 0,5 % eingestellt wurde. Die Kulturen wurden in Inkubationskammern (Fa. Billus-Rothenberg) mit einem Gasgemisch aus 5% CO_2 , 3% O_2 und 92% N_2 ca. zwei Minuten lang begast und anschließend im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Temperaturschwankungen und Aufenthaltsdauer der Kulturen an der Raumluft wurden möglichst minimal gehalten.

2.2.1.3 Kryokonservierung

Sobald ausreichend Kulturmateriale vorhanden war, wurde ein Teil der Kulturen eingefroren, um die Parasiten in kryokonserviertem Zustand lange aufbewahren und später wieder auftauen und benutzen zu können. Diese Kryokonservierung erfolgte nach DIGGS et al. (1977) mit einigen Modifikationen:

Eine Kultur in mehreren Schalen mit einer Parasitämie von etwa 5% (überwiegend Ringstadien) wurde in Zentrifugeröhrchen umgefüllt, zentrifugiert (2000 Umdrehung/min, 4 min) und der Überstand wurde verworfen. Jeweils 0,2 ml des Pellets wurde in 1,8 ml-Kryoröhrchen (Fa. Nunc) portioniert und das gleiche Volumen kalter 30%iger Glycerinlösung in 0,01 M PBS (Kryolösung) wurde zugegeben. Die Proben wurden zuerst 30 min lang bei -4°C abgestellt und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Um von kryokonserviertem Material eine Kultur anzulegen, wurde eine Probe bei 37°C im Wasserbad schnell aufgetaut und sofort für einige Minuten lang auf Eis gelegt, dann in ein Zentrifugeröhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen kalter 3,5%iger NaCl-Lösung suspendiert. Die Erythrozyten wurden abzentrifugiert (2000 Umdrehung/min, 4 min), mit 20 ml Komplet-Medium resuspendiert und in eine 20 ml-Schale überführt. Anschließend wurde 0,4 ml frische Erythrozyten dazugegeben. In den ersten zwei Tagen erfolgte kein Mediumwechsel.

2.2.2 Bestimmung der Chloroquin- und Monodesethylchloroquinempfindlichkeit der asexuellen Stadien

2.2.2.1 Medikamenten-Stammlösungen

Zur Bestimmung der Medikamentempfindlichkeit der asexuellen Stadien von *Plasmodium falciparum* wurden von den verwendeten Wirkstoffen Stammlösungen hergestellt. Diese wurden in Glasgefäßen bei +4°C über mehrere Monate lang aufbewahrt.

Chloroquin-Stammlösung:

100 mg Chloroquin-Diphosphat (Fa. Sigma)
in 10 ml H₂O

Monodesethylchloroquin-Stammlösung:

100 mg Monodesethylchloroquin (Fa. Rhône-Poulenc Rorer)
in 10 ml 50%iger Methanollösung

Für jeden Versuch wurde aus diesen Stammlösungen jeweils eine Stocklösung hergestellt, indem die Chloroquin- bzw. Monodesethylchloroquin-Stammlösung mit RPMI-Stammlösung auf 1/500 verdünnt und sterilfiltriert wurde. Je nach Versuchsansatz wurden diese Stocklösungen wiederum mit RPMI-Stammlösungen auf 1/10 bis 1/10000 verdünnt, um nach Komplettierung mit Humanserum und NaHCO_3 die gewünschten finalen Konzentrationen erreichen zu können.

2.2.2.2 Bestimmung der ED_{50} -Werte

Hierzu wurden asexuelle Stadien über einen Zeitraum von 96 Stunden verschiedenen Chloroquin- bzw. Monodesethylchloroquin-Konzentrationen ausgesetzt. Die Kultivierung erfolgte in 3 x 4-Loch-Platten (Fa. Costar). Jede Vertiefung erhielt 2 ml Komplettmedium mit der jeweiligen Medikamentenkonzentrationen und wurde mit 0,2 ml infizierten Erythrozyten beimpft. Die Ausgangsparasitämie betrug 0,3% und der finale Hämatokrit-Wert 10%. Alle 24 Stunden wurde das Medium gewechselt, Blutausrichungen wurden dabei angefertigt und die Parasitenzahlen wurden bestimmt. Die eingesetzten Chloroquin- bzw. Monodesethylchloroquin-Konzentrationen betragen 1, 10 bzw. 100 ng/ml. Die Kontrollgruppen wurden mit medikamentenfreiem Komplettmedium angesetzt. Die Kontrollgruppen für Monodesethylchloroquin-Versuchsgruppen erhielten dieselbe Menge Methanol wie sie nach der Verdünnungsreihe in den Versuchsgruppen noch verblieben (von 0,0005 bis 0,000005% v/v). Die Stocklösungen, Serum und NaHCO_3 wurden kurz vor dem Mediumwechsel zur Verwendung zusammengesetzt. Alle Versuche wurden mit drei Parallelansätzen durchgeführt. Die ED_{50} -Werte („effective dose“; Wirkstoffkonzentration, bei der eine 50%ige Hemmung des Parasitenwachstums erreicht wird) wurden nach dem Probit-Verfahren ermittelt.

2.2.2.3 Kombinationsversuche mit Chloroquin und Monodesethylchloroquin

Aufgrund der unter 2.2.2.2 ermittelten ED₅₀-Werte wurden eine Reihe von Kombinationsversuche durchgeführt, wobei Chloroquin und Monodesethylchloroquin in verschiedenen Verhältnissen im Kompletmedium kombiniert wurden und so auf die asexuellen Stadien gesetzt wurden. Hierzu wurden jeweils eine Stocklösung von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin mit einer Wirkstoffkonzentration hergestellt, die dem jeweiligen ED₅₀-Wert entsprach. Die beiden Stocklösungen wurden dann 10:0, 8:2, 5:5, 2:8 bzw. 0:10 (w:w, Base; „w“ steht für Gewicht) zusammengesetzt und zur Behandlung der Kultur verwendet. Die Bedingungen der Kultivierung, z.B. Kulturplatten, Parallelansätze, Ausgangsparasitämie, Hämatokrit, Mediumwechsel sowie Blutausstriche, waren wie unter 2.2.2.2 beschrieben. Die Kontrollgruppen erhielten medikamentenfreies Kompletmedium.

2.2.2.4 Bestimmung der Parasitämie

Die Parasitämie, nämlich der prozentuale Anteil der durch asexuelle Stadien parasitierten Erythrozyten an der Gesamtzahl der ausgezählten Erythrozyten, wurde durch Auswertung von Ausstrichen bestimmt. Die Ausstriche wurden kurz mit 100%igem Methanol fixiert und dann 12 Minuten mit Giemsa-Lösung (1 Teil Giemsa-Stammlösung auf 19 Teile Phosphatpuffer mit pH 7,2) gefärbt. Die Präparate wurden im Lichtmikroskop (Hellfeld) bei 1000facher Vergrößerung ausgewertet. Die Parasitämie wurde durch Auszählen von mindestens 1000 Erythrozyten ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Versuche mit *Plasmodium yoelii nigeriensis*

3.1.1 Fotografische Darstellungen

In den folgenden Bildern sind verschiedene Entwicklungsstadien von *Plasmodium yoelii nigeriensis* dargestellt: Schizogonie (**Abb. 8**) und Gamogonie (**Abb. 9**) im Mäuseblut sowie Sporogonie in der Mücke (**Abb. 10**).

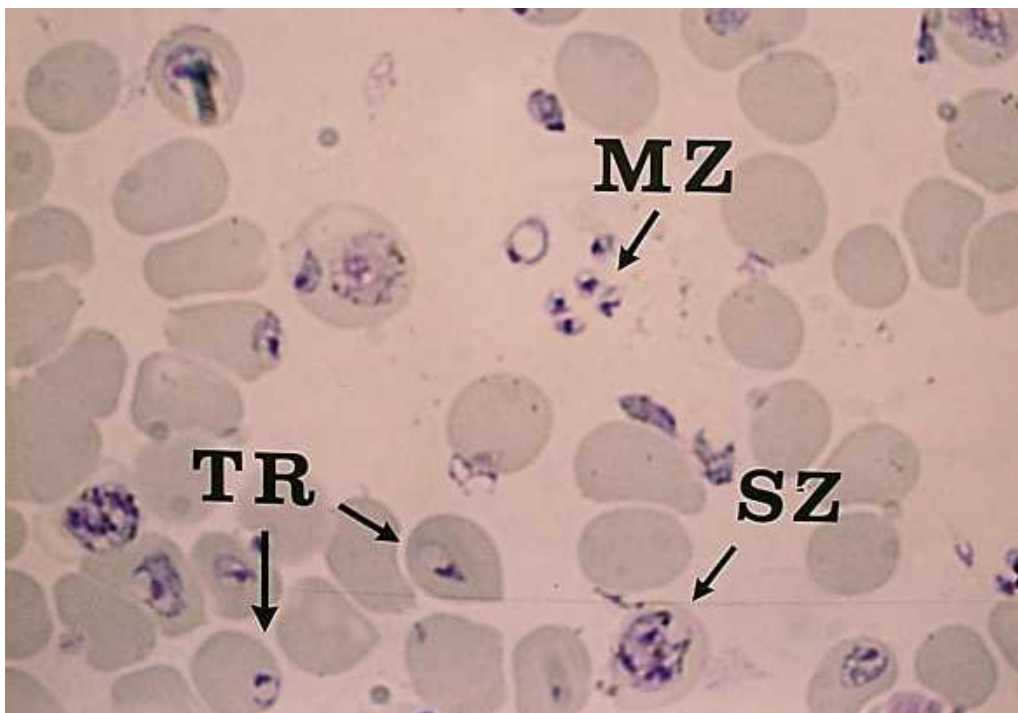


Abb. 8: *Plasmodium yoelii nigeriensis* im Blutausstrich einer infizierten Maus, in die drei Tage zuvor 1×10^6 parasitierte Erythrozyten injiziert worden waren. Trophozoiten (TR), Merozoiten (MZ) sowie Schizonten (SZ) waren zu erkennen (1000fach, Hellfeld, Lichtmikroskop).

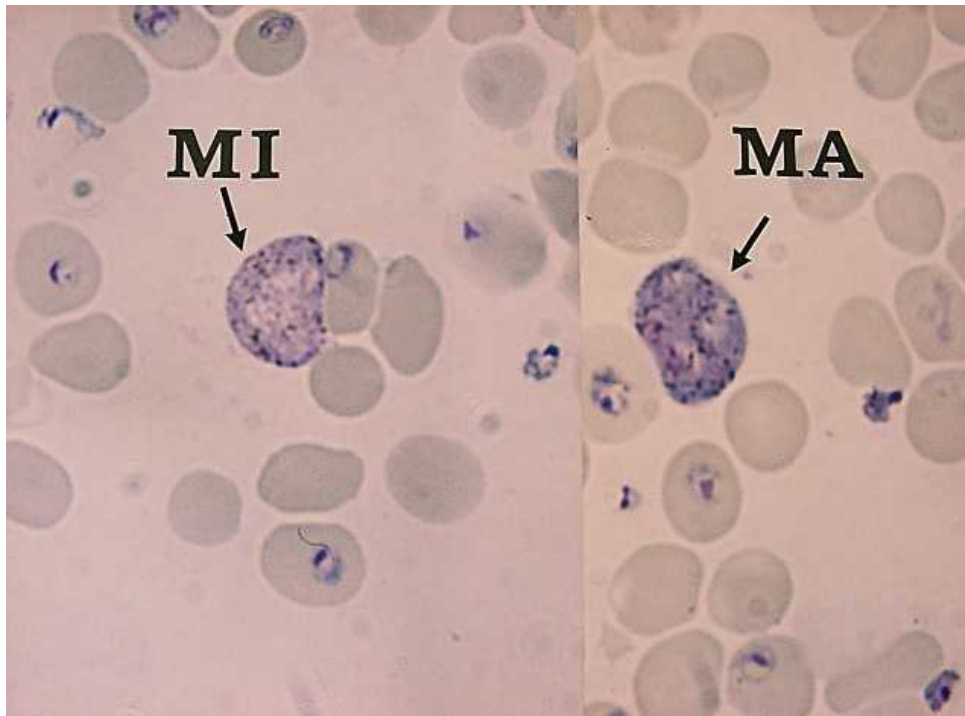


Abb. 9: Männlicher Gametozyt (Mikrogametozyt, MI) und weiblicher Gametozyt (Makrogametozyt, MA) von *Plasmodium yoelii nigeriensis* im Blutausschlag drei Tage nach der Infektion (1000fach, Hellfeld, Lichtmikroskop).

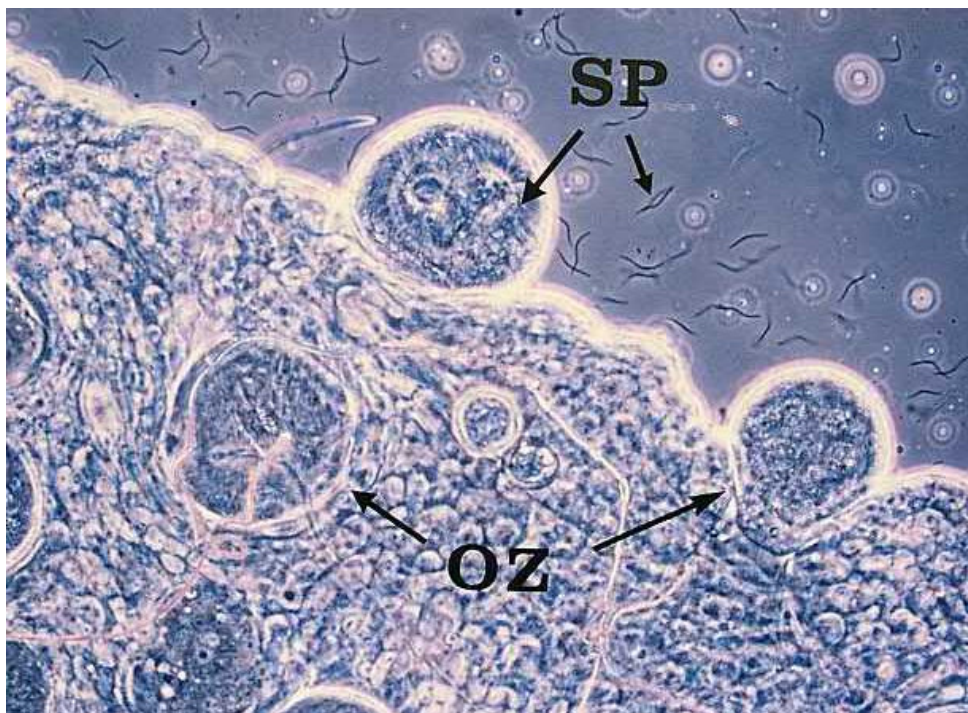


Abb. 10: Oozysten (OZ) von *Plasmodium yoelii nigeriensis* im Mitteldarm einer Mücke sieben Tage nach der Infektion und darin bzw. freiliegende Sporozoiten (SP) (250fach, Phasenkontrast).

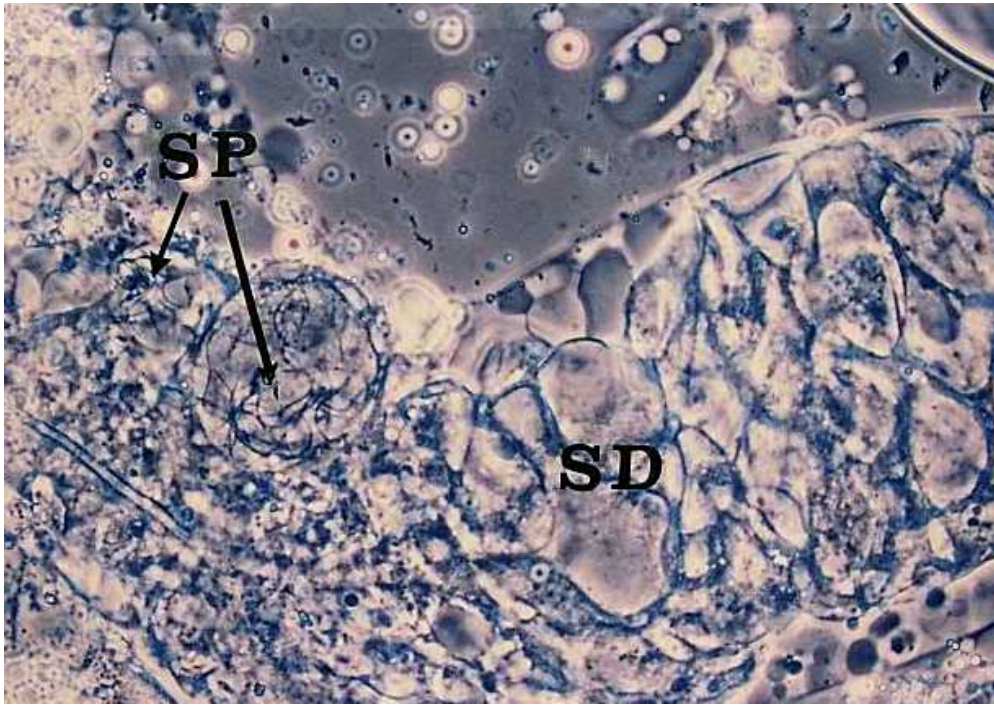


Abb. 11: Sporozoiten (SP) von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Speicheldrüsen (SD) einer Mücke 17 Tage nach der Infektion (250fach, Phasenkontrast).

3.1.2 Applikation von Chloroquin in infiziertem Blut (Versuchsreihe 1)

In dieser Versuchsreihe (VR) wurden die Mäuse mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert, mit unterschiedlichem Zeitabstand bis zum Blutmahl (6 h, 30 h bzw. 54 h) mit Chloroquin (CQ) behandelt und am dritten Tag nach der Infektion den Mücken zu einem infektiösen Blutmahl angeboten. Am 7. Tag nach dem Blutmahl erfolgte die Mitteldarmpräparation zur Auswertung der Oozysten.

Im Versuch mit einer Dosis von **1 mg/kg** erwies sich eine signifikante Verringerung der Oozystenzahlen bei 30 h ($16 \pm 3,4$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($110 \pm 23,4$) (**Tabelle 1** und **Abb. 12**). Obwohl die Parasitämie der Maus zum Zeitpunkt des Blutmahls bei 6 h bzw. 54 h niedriger (0,8 % bzw. 2,8 % jeweils) als die bei der Kontrollgruppe (4,2 %) war, wichen die Oozystenzahlen von der Kontrolle nicht stark ab ($96 \pm 14,1$ bzw. $133,5 \pm 20,5$ gegenüber $110,5 \pm 23,4$). Deshalb ist der hemmende Effekt des Chloroquins bei 30 h allein mit der Parasitämie der Maus (1,3 %) schwer zu erklären. Der Korrelationskoeffizient der Oozystenzahlen und Parasitämien von den vier Gruppen betrug auch nur 0,53.

Wahrscheinlich müsste die Chloroquin-Gabe zu diesem Zeitpunkt (30 Stunden vor dem infektiösen Blutmahl bzw. 42 Stunden nach der Infektion der Maus) günstig gewirkt haben, nämlich auf die Schizogonie und Gamogonie der Parasiten in der Maus bzw. auf die Sporogonie der Parasiten in der Mücke (vgl. **Abb. 1**).

Im Versuch mit einer Dosis von **10 mg/kg** waren die Oozystenzahlen bei 6 h, 30 h sowie 54 h signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (**Tabelle 2** und **Abb. 13**). Die Oozystenzahlen bei 30 h ($6 \pm 1,3$) schienen niedriger zu sein als bei 6 h ($46 \pm 9,4$) bzw. 54 h ($21 \pm 7,4$), welches zur Überlegung führte, ob die Chloroquin-Gabe in diesem Zeitpunkt ebenso günstiger gewirkt hätte als die Chloroquin-Applikationen zu anderen Zeitpunkten, jedoch diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

Im Versuch mit einer Dosis von **50 mg/kg** zeigten die Oozystenzahlen ebenso signifikante Unterschiede bei 6 h, 30 h und 54 h gegenüber der Kontrolle (**Tabelle 3** und **Abb. 14**). Wahrscheinlich war die Dosis von 50 mg/kg hoch genug, um zu sehr niedrigen Parasitämien der Mäuse (0,1% bis 0,7 % im Vergleich zu 2,4 %) zu führen und eindeutig geringe Oozystenzahlen bei den Mücken ($0 \pm 0,1$ bis $2 \pm 1,1$ gegenüber $115 \pm 35,1$) zu verursachen. Besonders war die Maus bei der Versuchsgruppe von 6 h durch die Chloroquin-Behandlung mit dieser relativ hohen Dosis zu dem Zeitpunkt des Blutmahls so gut wie „geheilt“ (Parasitämie = 0,1 %), so dass die Infektionsrate der voll gesogenen Mücken auch sehr niedrig war (22,2 %). Im Vergleich dazu konnten die Parasiten bei den Versuchsgruppen von 30 h und 54 h wahrscheinlich nach der Chloroquin-Behandlung bis zum Blutmahl mehr Zeit haben, sich zu erholen und für die Mücken infektiöser zu sein, so dass die Infektionsrate der Mücken nicht gravierend abnahm (75,0 % bzw. 88,2 % gegenüber 88,9 % bei der Kontrolle).

Tabelle 1: Anzahl der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an infizierten Mäusen. Die Mäuse wurden drei Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert (jeweils 1×10^6 infizierte Erythrozyten, i.p.) und mit unterschiedlichem Zeitabstand bis zum Blutmahl mit Chloroquin behandelt (i.p.). Die Dosis betrug **1 mg/kg** Körpergewicht der Maus.

Zeit zwischen CQ-Behandlung und Blutmahl	6 h	30 h	54 h	Kontrolle
Oozystenzahl (Median) ± Standardfehler	96 ± 14,1	16 ± 3,4	133,5 ± 20,5	110,5 ± 23,4
Anzahl der Mücken	11	14	16	18
Infektionsrate (%)	81,8	100,0	93,8	88,9
Mortalität der Mücken (%)	28,9	42,0	39,2	44,6
Parasitämie / Gamätositämie der Maus zum Zeitpunkt des Blutmahls (%)	0,8 / 0,029	1,3 / 0,004	2,8 / 0,052	4,2 / 0,043
Mann-Whitney U-Test (einseitig)	n.s.	p < 0,001	n.s.	-

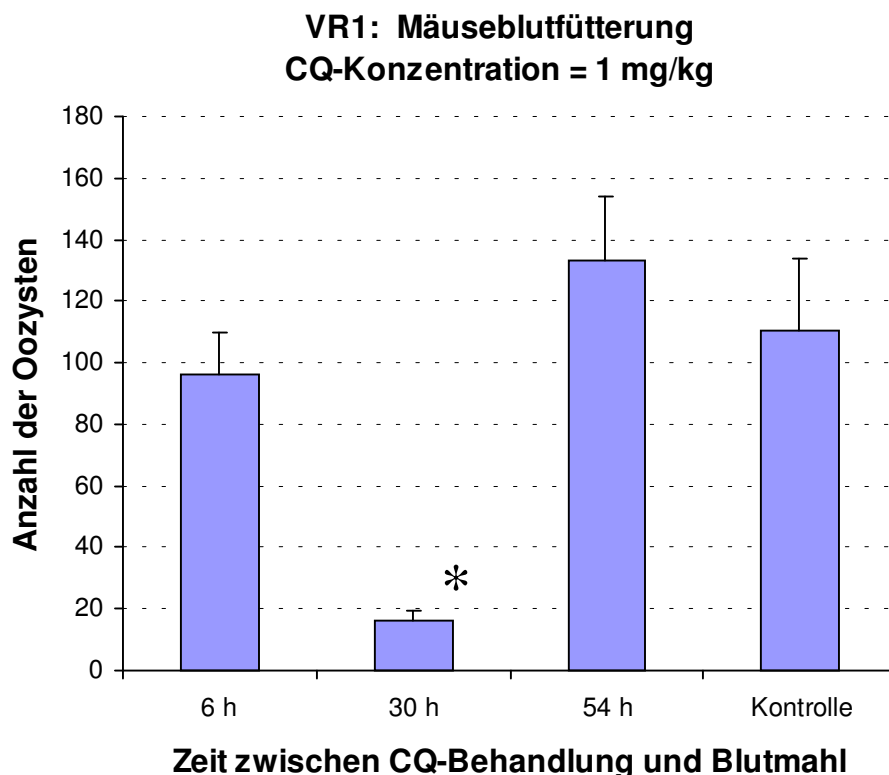


Abb. 12: Mittlere Anzahl (Median + Standardfehler) der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach der Infektion durch Blutmahl an Chloroquin-behandelten Mäusen, die drei Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Die Chloroquin-Behandlung erfolgte 6 h, 30 h bzw. 54 h vor dem Blutmahl (i.p.). Die Dosis betrug 1 mg/kg Körpergewicht der Maus.

* signifikant gegenüber Kontrolle (Mann-Whitney U-Test, einseitig)

Tabelle 2: Anzahl der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an infizierten Mäusen. Die Mäuse wurden drei Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert (jeweils 1×10^6 infizierte Erythrozyten, i.p.) und mit unterschiedlichem Zeitabstand bis zum Blutmahl mit Chloroquin behandelt (i.p.). Die Dosis betrug **10 mg/kg** Körpergewicht der Maus.

Zeit zwischen CQ-Behandlung und Blutmahl	6 h	30 h	54 h	Kontrolle
Oozystenzahl (Median) ± Standardfehler	46 ± 9,4	6 ± 1,3	21 ± 7,4	209 ± 29,7
Anzahl der Mücken	17	18	19	14
Infektionsrate (%)	94,1	94,4	89,5	85,7
Mortalität der Mücken (%)	51,8	51,9	50,0	54,4
Parasitämie / Gamätositämie der Maus zum Zeitpunkt des Blutmahls (%)	3,8 / 0,067	2,2 / 0,048	1,6 / 0,031	4,7 / 0,167
Mann-Whitney U-Test (einseitig)	p < 0,003	p < 0,001	p < 0,001	-

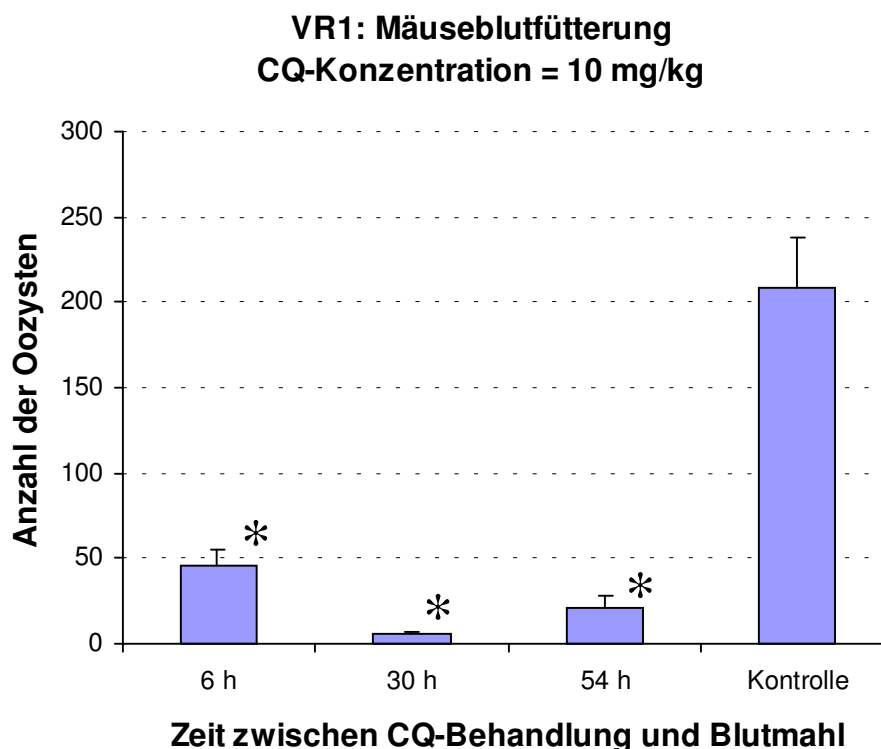


Abb. 13: Mittlere Anzahl (Median + Standardfehler) der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach der Infektion durch Blutmahl an Chloroquin-behandelten Mäusen, die drei Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Die Chloroquin-Behandlung erfolgte 6 h, 30 h bzw. 54 h vor dem Blutmahl (i.p.). Die Dosis betrug 10 mg/kg Körpergewicht der Maus.

* signifikant gegenüber Kontrolle (Mann-Whitney U-Test, einseitig)

Tabelle 3: Anzahl der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an infizierten Mäusen. Die Mäuse wurden drei Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert (jeweils 1×10^6 infizierte Erythrozyten, i.p.) und mit unterschiedlichem Zeitabstand bis zum Blutmahl mit Chloroquin behandelt (i.p.). Die Dosis betrug **50 mg/kg** Körpergewicht der Maus.

Zeit zwischen CQ-Behandlung und Blutmahl	6 h	30 h	54 h	Kontrolle
Oozystenzahl (Median) ± Standardfehler	0 ± 0,1	1,5 ± 0,3	2 ± 1,1	115 ± 35,1
Anzahl der Mücken	9	16	17	9
Infektionsrate (%)	22,2	75,0	88,2	88,9
Mortalität der Mücken (%)	67,4	55,6	56,9	85,3
Parasitämie / Gamätositämie der Maus zum Zeitpunkt des Blutmahls (%)	0,1 / 0,0	1,1 / 0,0	0,7 / 0,0	2,4 / 0,048
Mann-Whitney U-Test (einseitig)	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	-

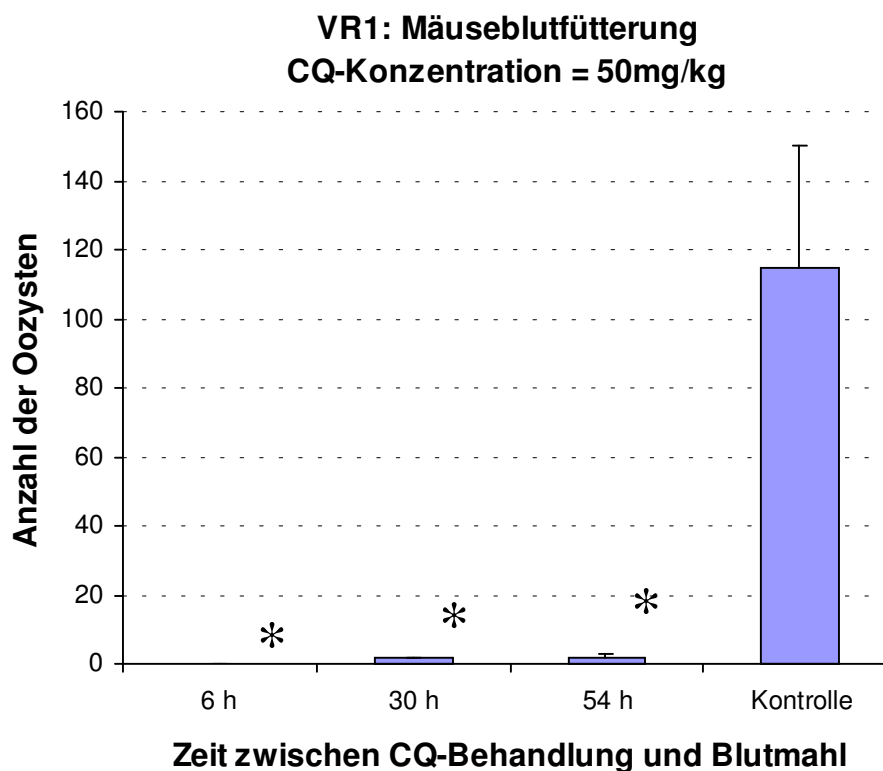


Abb. 14: Mittlere Anzahl (Median + Standardfehler) der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach der Infektion durch Blutmahl an Chloroquin-behandelten Mäusen, die drei Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Die Chloroquin-Behandlung erfolgte 6 h, 30 h bzw. 54 h vor dem Blutmahl (i.p.). Die Dosis betrug 50 mg/kg Körpergewicht der Maus.

* signifikant gegenüber Kontrolle (Mann-Whitney U-Test, einseitig)

3.1.3 Applikation von Chloroquin im Zuckerwasser (Versuchsreihe 2)

Hierzu wurde eine Maus mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert (1×10^6 infizierte Erythrozyten) und drei Tage danach den Mücken zur Blutfütterung angeboten. Die vollgesogenen Mücken wurden mit Hilfe eines Exhausters vorsichtig auf vier Gruppen aufgeteilt. Die Mücken von drei Gruppen erhielten 0,9 % Glukoselösung mit Chloroquin in einer Konzentration von 15, 150 bzw. 750 $\mu\text{g/ml}$. Die Kontrollgruppe erhielt nur 0,9 % Glukoselösung. Die Oozystenzahlen wurden am 7. Tag nach der Blutfütterung ausgewertet.

Im ersten Versuch zeigte sich eine signifikante Verringerung der Oozystenzahl bei einer Chloroquin-Konzentration von 750 $\mu\text{g/ml}$ ($131 \pm 17,1$) gegenüber der Kontrollgruppe ($229,5 \pm 11,9$) (**Tabelle 4, Abb. 15**; $p < 0,003$). Da Chloroquin nicht verstoffwechselt in der Glukoselösung blieb und so den infizierten Mücken verabreicht wurde, könnte diese Verringerung eine signifikante sporontozide Wirkung von nicht verstoffwechseltem Chloroquin in dieser Konzentration auf die Sporogonie von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in *Anopheles stephensi* bedeuten. Eine hohe Mortalität der Mücken bei 750 $\mu\text{g/ml}$ (75,0 %) im Vergleich zu den anderen Gruppen führte zu der Überlegung, ob es sich um eine Toxizität dieser relativ hohen Konzentration des Chloroquins handelt. Bei einem Wiederholungsversuch mit einem größeren Mückenansatz war jedoch eine solch hohe Mortalität bei 750 $\mu\text{g/ml}$ nicht zu sehen (**Tabelle 5**).

In dem Wiederholungsversuch war die Verringerung der Oozystenzahlen bei 150 $\mu\text{g/ml}$ ($216 \pm 22,0$) und 750 $\mu\text{g/ml}$ ($162 \pm 22,3$) gegenüber der Kontrolle ($268 \pm 22,5$) signifikant (**Tabelle 5, Abb. 16**; $p < 0,025$ bzw. $0,05$ jeweils). Nach diesen Ergebnissen scheint ein nicht verstoffwechseltes Chloroquin in einer Konzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 750 $\mu\text{g/ml}$ eine signifikante sporontozide Wirkung auf *Plasmodium yoelii nigeriensis* in *Anopheles stephensi* zu haben.

Tabelle 4. Anzahl der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an einer Maus, die drei Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert wurde (1×10^6 infizierte Erythrozyten, i.p.). Chloroquin-Applikation erfolgte durch Chloroquin haltige Glukoselösung, die die Mücken beliebig saugen durften. Die Chloroquin-Konzentration betrug 15 µg/ml, 150 µg/ml bzw. 750 µg/ml Glukoselösung (Base).

Chloroquin-Konzentration	15 µg/ml	150 µg/ml	750 µg/ml	Kontrolle
Oozystenzahl (Median) ± Standardfehler	203,5 ± 11,9	204 ± 14,2	131 ± 17,1	229,5 ± 11,9
Anzahl der Mücken	16	13	9	10
Infektionsrate (%)	100	100	100	100
Mortalität der Mücken (%)	50,0	51,8	75,0	31,3
Parasitämie der Maus zum Zeitpunkt des Blutmahls (%)	7,3			
Mann-Whitney U-Test (einseitig)	n.s.	n.s.	p < 0,003	-

VR2a: Glukoselösung

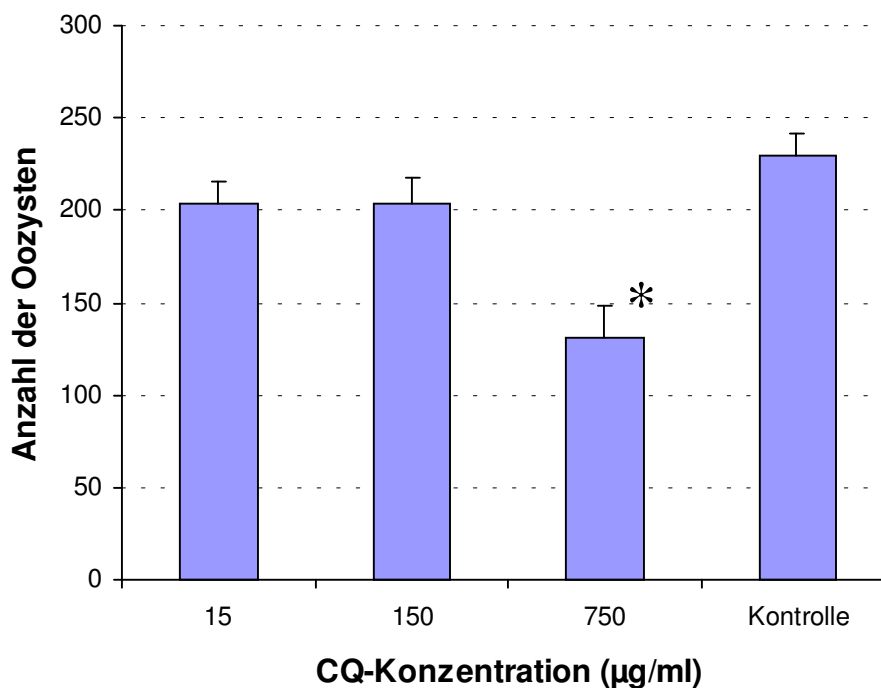


Abb. 15: Mittlere Anzahl (Median + Standardfehler) der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an einer Maus, die drei Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert wurde (1×10^6 infizierte Erythrozyten, i.p.). Chloroquin-Applikation erfolgte durch Chloroquin haltige Glukoselösung, die die Mücken beliebig saugen durften. Die Chloroquin-Konzentration betrug 15 µg/ml, 150 µg/ml bzw. 750 µg/ml Glukose-Lösung (Base).

Tabelle 5. Anzahl der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an einer Maus, die drei Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert wurde (1×10^6 infizierte Erythrozyten, i.p.). Chloroquin-Applikation erfolgte durch Chloroquin haltige Glukoselösung, die die Mücken beliebig saugen durften. Die Chloroquin-Konzentration betrug 15 µg/ml, 150 µg/ml bzw. 750 µg/ml Glukose-Lösung (Base). Wiederholungsversuch.

Chloroquin-Konzentration	15 µg/ml	150 µg/ml	750 µg/ml	Kontrolle
Oozystenzahl (Median) ± Standardfehler	215 ± 19,8	216 ± 22,0	162 ± 22,3	268 ± 22,5
Anzahl der Mücken	25	25	25	25
Infektionsrate (%)	100,0	100,0	100,0	96,0
Mortalität der Mücken (%)	40,0	51,4	49,6	59,0
Parasitämie der Maus zum Zeitpunkt des Blutmahls (%)	8,2			
Mann-Whitney U-Test (einseitig)	n.s.	p < 0,025	p < 0,05	-

VR2b: Glukoselösung

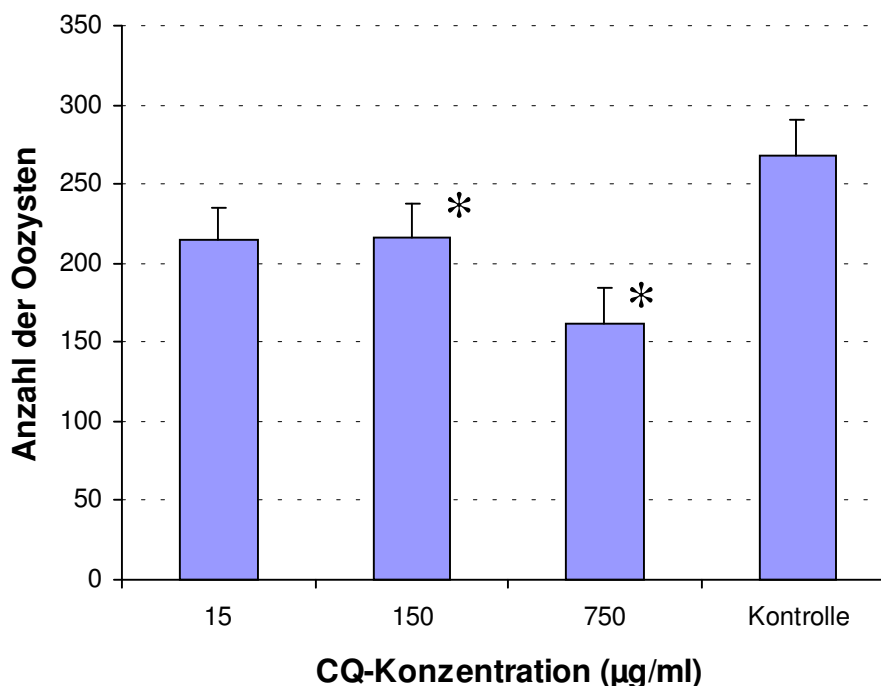


Abb. 16: Mittlere Anzahl (Median + Standardfehler) der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an einer Maus, die drei Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert wurde (1×10^6 infizierte Erythrozyten, i.p.). Chloroquin-Applikation erfolgte durch Chloroquin haltige Glukoselösung, die die Mücken beliebig saugen durften. Die Chloroquin-Konzentration betrug 15 µg/ml, 150 µg/ml bzw. 750 µg/ml Glukose-Lösung (Base). Wiederholungsversuch.

3.1.4 Applikation von Chloroquin in nicht infiziertem Blut (Versuchsreihe 3)

Je nach Versuch wurden 1 bis 4 Mäuse mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert (je 1×10^6 infizierte Erythrozyten) und drei Tage danach zur Infektion der Mücken verwendet. Am dritten Tag nach diesem Blutmahl, an dem die meisten Mücken ihre Eier abgelegt hatten, wurden die Mücken mit Hilfe eines Exhaustors auf 4 bis 5 Gruppen aufgeteilt, und anschließend erfolgte ein zweites Blutmahl (2.BM). Hierzu dienten 4 bzw. 5 Mäuse, die 0,5 h, 2 h, 6 h (**Experiment I**) bzw. 6 h, 24 h, 48 h, 72 h (**Experiment II**) zuvor mit Chloroquin behandelt worden waren. Die hierbei verwendeten Dosierungen betrug 1, 10 bzw. 50 mg/kg Körpergewicht der Maus. Unmittelbar nach dem zweiten Blutmahl wurden die Mäuse dekapitiert, die Blutproben wurden eingefroren und später mit HPLC (High Performance Liquid Chromatography) analysiert, um Chloroquin- und Monodesethylchloroquin-Konzentrationen im Blut zu bestimmen.

Experiment I:

Bei der Dosis von **1 mg/kg** schienen die Oozystenanzahlen bei 6 h ($180 \pm 22,0$) höher als in der Kontrolle ($122 \pm 17,1$) zu sein, jedoch war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant (**Tabelle 6** und **Abb. 17**). Mit zunehmender Zeit (0,5 h \diamond 2 h \diamond 6 h) nahm die Konzentration von Chloroquin im Blut der gesunden Mäuse zum Zeitpunkt des zweiten Blutmahls stetig ab ($175,7 \diamond 87,8 \diamond 40,9$ ng/ml), während sich die Monodesethylchloroquin-Konzentration langsam erhöhte ($43,5 \diamond 76,2 \diamond 67,3$ ng/ml). Dies zeigt, dass Chloroquin nach der Injektion (i.p.) im Mäuseblut stark abgebaut wurde, so dass sich dessen Metabolit, Monodesethylchloroquin, bereits 30 Minuten nach der Injektion nachweisen ließ und die Blutkonzentration etwa 1/5 von Chloroquin betrug. Nach 2 Stunden war das Verhältnis der Blutkonzentrationen von Chloroquin und Monodesethylchloroquin ungefähr 1:1 ($87,8$ ng/ml : $76,2$ ng/ml). Nach 6 Stunden konnte auch bei Monodesethylchloroquin ein Abbau zu weiteren Metaboliten bzw. eine Ausscheidung festgestellt werden. Zwischen Blutkonzentrationen von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin und den Oozystenanzahlen der jeweiligen Versuchsgruppe war jedoch kein Zusammenhang aufzuweisen.

Bei einer Dosis von **10 mg/kg** ergab sich kein signifikanter Unterschied der Oozystenanzahlen zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrolle (**Tabelle 7** und **Abb. 18**). Der Verlauf der

Konzentrationen von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin im Blut war ähnlich wie bei 1 mg/kg. Zwischen den Konzentrationen von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin im Blut und den Oozystenzahlen war ebenso kein erklärbarer Zusammenhang zu finden.

Eine signifikante Verringerung zeigte sich jedoch bei einer Dosierung von **50 mg/kg**, wobei Chloroquin 2 h vor dem zweiten Blutmahl appliziert worden war (**Tabelle 8, Abb. 19**, $p < 0,015$). Dies weist darauf hin, dass Chloroquin und Monodesethylchloroquin mit diesen Konzentrationen im Blut (4,99 µg/ml und 2,41 µg/ml jeweils) zusammen eine signifikant hemmende Wirkung auf die Sporogonie von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in *Anopheles stephensi* haben könnten. Bei 0,5 h und 6 h scheinen die Oozystenzahlen höher als in der Kontrolle zu sein, als ob Chloroquin und Monodesethylchloroquin in diesen Konzentrationen zusammen eine stimulierende Wirkung auf die Sporogonie haben würden; diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

Tabelle 6: Anzahl der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an 4 Mäusen im Pool, die 3 Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein zweites Blutmahl an gesunden Mäusen, denen zuvor zu verschiedenen Zeiten (0,5 h, 2 h bzw. 6 h) Chloroquin injiziert worden war. Die Dosis betrug **1 mg/kg** Körpergewicht der gesunden Mäuse.

Zeit zwischen CQ-Behandlung und 2. Blutmahl	0,5 h	2 h	6 h	Kontrolle
Oozysten (Median) ± Standardfehler	105 ± 20,6	98 ± 18,6	180 ± 22,0	122 ± 17,1
Anzahl der Mücken	45	43	46	55
Infektionsrate (%)	88,9	90,7	93,5	94,5
Mortalität der Mücken (%)	43,0	53,3	50,0	42,7
Parasitämie der Maus (%)	8,2 = (6,4 + 9,2 + 7,6 + 9,5) / 4			
Mann-Whitney U-Test (einseitig)	n.s.	n.s.	n.s.	-
CQ-Konzentration (ng/ml) *	175,7	87,8	40,9	-
MDCQ-Konzentration (ng/ml) *	43,5	76,2	67,3	-

* Die Konzentration von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin im Blut der gesunden Mäuse zum Zeitpunkt des 2. Blutmahls wurde mit HPLC bestimmt.

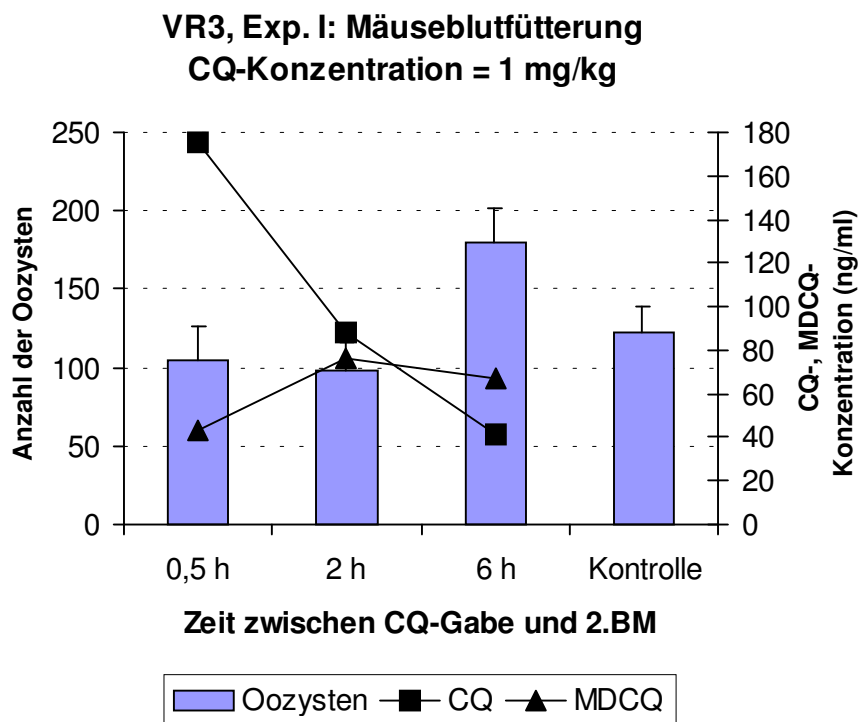


Abb. 17: Mittlere Anzahl (Median + Standardfehler) der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an 4 Mäusen im Pool, die 3 Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein zweites Blutmahl an gesunden Mäusen, denen zuvor zu verschiedenen Zeiten (0,5 h, 2 h bzw. 6 h) Chloroquin injiziert worden war (i.p.). Die Dosis betrug 1 mg/kg Körpergewicht der gesunden Mäuse. Die Konzentration von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin im Blut der gesunden Mäuse zum Zeitpunkt des 2. Blutmahls wurde mit HPLC bestimmt.

Tabelle 7: Anzahl der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an 4 Mäusen im Pool, die 3 Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein zweites Blutmahl an gesunden Mäusen, denen vorher zu verschiedenen Zeiten (0,5 h, 2 h bzw. 6 h) Chloroquin injiziert worden war. Die Dosis betrug **10 mg/kg** Körpergewicht der gesunden Mäuse.

Zeit zwischen CQ-Behandlung und 2. Blutmahl	0,5 h	2 h	6 h	Kontrolle
Oozysten (Median) ± Standardfehler	49 ± 11,6	25 ± 7,2	23 ± 7,1	35 ± 11,1
Anzahl der Mücken	75	88	87	72
Infektionsrate (%)	98,7	94,3	94,3	93,1
Mortalität der Mücken (%)	21,9	16,2	13,9	27,3
Parasitämie der Maus (%)	2,9 = (3,2 + 2,6 + 2,4 + 3,5) / 4			
Mann-Whitney U-Test (einseitig)	n.s.	n.s.	n.s.	-
CQ-Konzentration (ng/ml) *	1598	1069	696	-
MDCQ-Konzentration (ng/ml) *	503	994	865	-

* Die Konzentration von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin im Blut der gesunden Mäuse zum Zeitpunkt des 2. Blutmahls wurde mit HPLC bestimmt.

**VR3, Exp. I: Mäuseblutfütterung
CQ-Konzentration = 10 mg/kg**

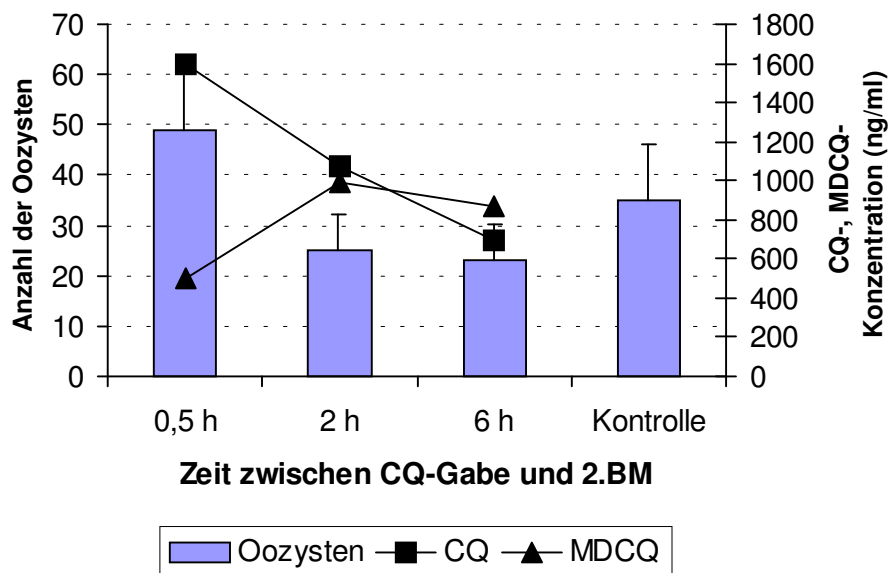


Abb. 18: Mittlere Anzahl (Median + Standardfehler) der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach der Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an 4 Mäuse gepoolt, die 3 Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein zweites Blutmahl an gesunden Mäusen, denen vorher zu verschiedenen Zeiten (0,5 h, 2 h bzw. 6 h) Chloroquin injiziert worden war (i.p.). Die Dosis betrug 10 mg/kg Körpergewicht der gesunden Mäuse. Die Konzentration von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin im Blut der gesunden Mäuse zum Zeitpunkt des 2. Blutmahls wurde mit HPLC bestimmt.

Tabelle 8: Anzahl der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an 4 Mäusen im Pool, die 3 Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein zweites Blutmahl an gesunden Mäusen, denen vorher zu verschiedenen Zeiten (0,5 h, 2 h bzw. 6 h) Chloroquin injiziert worden war. Die Dosis betrug **50 mg/kg** Körpergewicht der gesunden Mäuse.

Zeit zwischen CQ-Behandlung und 2. Blutmahl	0,5 h	2 h	6 h	Kontrolle
Oozysten (Median) ± Standardfehler	107,5 ± 17,1	23 ± 15,8	121,5 ± 17,9	61 ± 15,7
Anzahl der Mücken	50	45	46	47
Infektionsrate (%)	92,0	91,1	100,0	100,0
Mortalität der Mücken (%)	28,6	31,8	29,2	19,0
Parasitämie der Maus (%)	3,4 = (3,5 + 4,1 + 2,9 + 3,2) / 4			
Mann-Whitney U-Test (einseitig)	n.s.	p < 0,015	n.s.	-
CQ-Konzentration (µg/ml) *	4,89	4,99	2,17	-
MDCQ-Konzentration (µg/ml) *	1,25	2,41	2,91	-

* Die Konzentration von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin im Blut der gesunden Mäuse zum Zeitpunkt des 2. Blutmahls wurde mit HPLC bestimmt.

**VR3, Exp. I: Mäuseblutfütterung
CQ-Konzentration = 50 mg/kg**

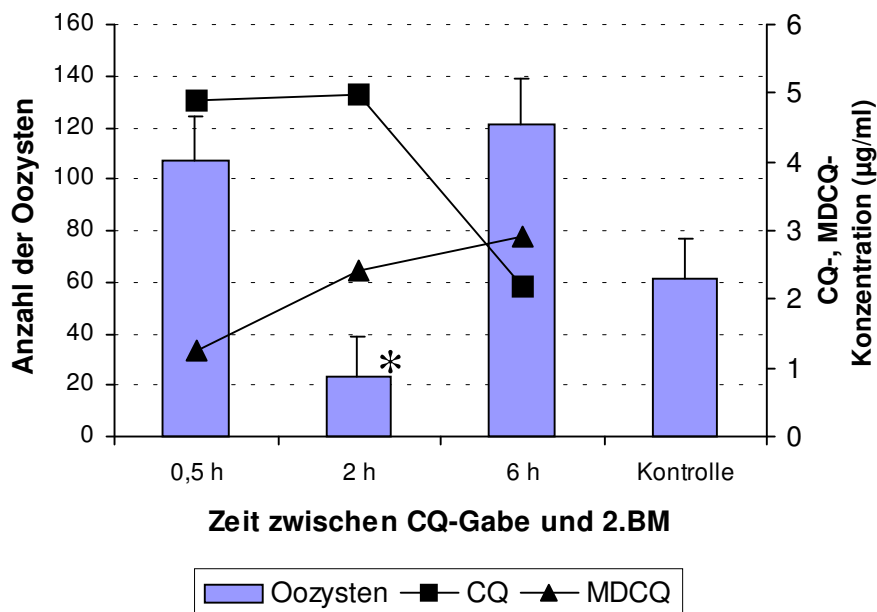


Abb. 19: Mittlere Anzahl (Median + Standardfehler) der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an 4 Mäusen im Pool, die 3 Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein zweites Blutmahl an gesunden Mäusen, denen vorher zu verschiedenen Zeiten (0,5 h, 2 h bzw. 6 h) Chloroquin injiziert worden war (i.p.). Die Dosis betrug 50 mg/kg Körpergewicht der gesunden Mäuse. Die Konzentration von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin im Blut der gesunden Mäuse zum Zeitpunkt des 2. Blutmahls wurde mit HPLC bestimmt.

* signifikant gegenüber der Kontrolle (p < 0,015)

Experiment II

Bei einer Dosis von **1 mg/kg** zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Oozystenanzahl ($64 \pm 15,0$) gegenüber der Kontrolle ($20 \pm 14,3$), wobei Chloroquin 48 h vor dem zweiten Blutmahl appliziert worden war (**Tabelle 9, Abb. 20**; $p < 0,05$). Dies bedeutet, dass Chloroquin und Monodesethylchloroquin in diesen Konzentrationen (0,8 ng/ml und 5,3 ng/ml jeweils) zusammen eine signifikant stimulierende Wirkung auf die Sporogonie von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in *Anopheles stephensi* haben könnten. Die Oozystenanzahl bei 24 h bzw. 72 h war auch höher als in der Kontrolle, jedoch war sie statistisch nicht signifikant.

Bei einer Dosis von **10 mg/kg** war die Oozystenanzahl bei 24 h ($50 \pm 12,3$) bzw. 48 h ($36 \pm 17,7$) signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Kontrolle ($155,5 \pm 31,3$) (**Tabelle 10, Abb. 21**; $p < 0,003$ bzw. $p < 0,018$). Dies deutet darauf hin, dass Chloroquin und Monodesethylchloroquin in diesen Konzentrationen (10,1 ng/ml und 72,3 ng/ml bzw. 3,7 ng/ml und 24,0 ng/ml jeweils) zusammen eine signifikant hemmende Wirkung auf die Sporogonie von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in *Anopheles stephensi* haben könnten. Die Oozystenanzahl bei 6 h bzw. 72 h war auch niedriger als in der Kontrolle, jedoch war sie statistisch nicht signifikant.

Bei einer Dosis von **50 mg/kg** zeigte sich gegensätzlich zur Erwartung kein signifikanter Unterschied der Oozystenanzahlen zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe (**Tabelle 11, Abb. 22**).

Tabelle 9: Anzahl der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an 2 Mäusen im Pool, die 3 Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein zweites Blutmahl an gesunden Mäusen, denen vorher zu verschiedenen Zeiten (6 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h) Chloroquin injiziert worden war. Die Dosis betrug 1 mg/kg Körpergewicht der gesunden Mäuse.

Zeit zwischen CQ-Behandlung und 2.Blutmahl	6 h	24 h	48 h	72 h	Kontrolle
Oozysten (Median) ± Standardfehler	25 ± 11,9	50 ± 14,4	64 ± 15,0	43 ± 18,0	20 ± 14,3
Anzahl der Mücken	20	18	25	27	16
Infektionsrate (%)	90,0	94,4	100,0	100,0	100,0
Mortalität der Mücken (%)	48,7	50,0	35,9	46,0	51,5
Parasitämie der Maus (%)	2,1 = (2,3 + 1,9) / 2				
Mann-Whitney U-Test (einseitig)	n.s.	n.s.	p < 0,05	n.s.	-
CQ-Konzentration (ng/ml) *	23,9	6,0	0,8	0,8	-
MDCQ-Konzentration (ng/ml) *	38,3	18,4	5,3	10,3	-

* Die Konzentration von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin im Blut der gesunden Mäuse zum Zeitpunkt des 2. Blutmahls wurde mit HPLC bestimmt.

**VR3, Exp. II: Mäuseblutfütterung
CQ-Konzentration = 1 mg/kg**

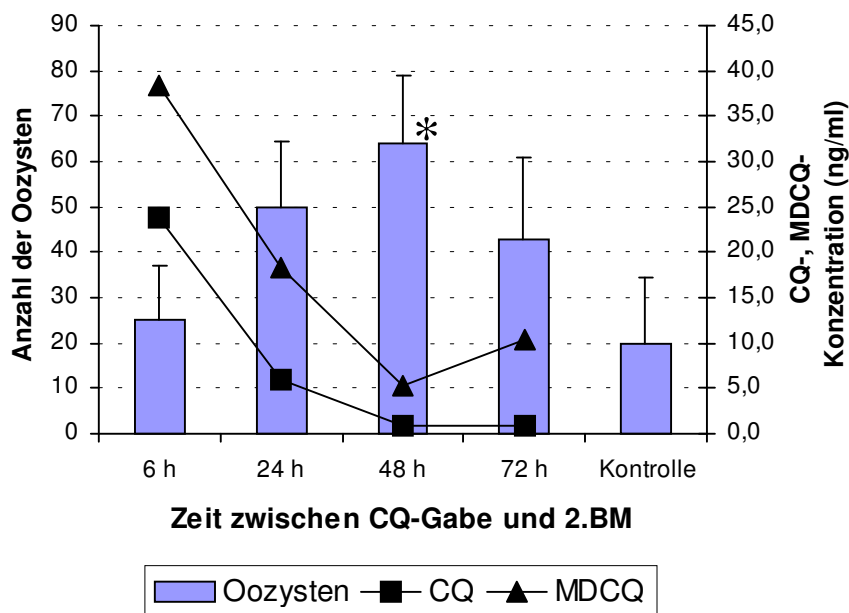


Abb. 20: Mittlere Anzahl (Median + Standardfehler) der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an 2 Mäusen im Pool, die 3 Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein zweites Blutmahl an gesunden Mäusen, denen vorher zu verschiedenen Zeiten (6 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h) Chloroquin injiziert worden war (i.p.). Die Dosis betrug 1 mg/kg Körpergewicht der gesunden Mäuse. Die Konzentration von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin im Blut der gesunden Mäuse zum Zeitpunkt des 2. Blutmahls wurde mit HPLC bestimmt.
* signifikant gegenüber der Kontrolle (p < 0,05)

Tabelle 10: Anzahl der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an einer Maus, die 3 Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden war. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein zweites Blutmahl an gesunden Mäusen, denen vorher zu verschiedenen Zeiten (6 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h) Chloroquin injiziert worden war. Die Dosis betrug **10 mg/kg** Körpergewicht der gesunden Mäuse.

Zeit zwischen CQ-Behandlung und 2. Blutmahl	6 h	24 h	48 h	72 h	Kontrolle
Oozysten (Median) ± Standardfehler	82 ± 18,2	50 ± 12,3	36 ± 17,7	108,5 ± 17,6	155,5 ± 31,3
Anzahl der Mücken	20	28	28	28	22
Infektionsrate (%)	100,0	96,4	100,0	100,0	100,0
Mortalität der Mücken (%)	33,3	20,0	26,3	17,6	18,5
Parasitämie der Maus (%)	1,7				
Mann-Whitney U-Test (einseitig)	n.s.	p < 0,003	p < 0,018	n.s.	-
CQ-Konzentration (ng/ml) *	234,1	10,1	3,7	1,2	-
MDCQ-Konzentration (ng/ml) *	653,0	72,3	24,0	14,2	-

* Die Konzentration von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin im Blut der gesunden Mäuse zum Zeitpunkt des 2. Blutmahls wurde mit HPLC bestimmt.

**VR3, Exp. II: Mäuseblutfütterung
CQ-Konzentration = 10 mg/kg**

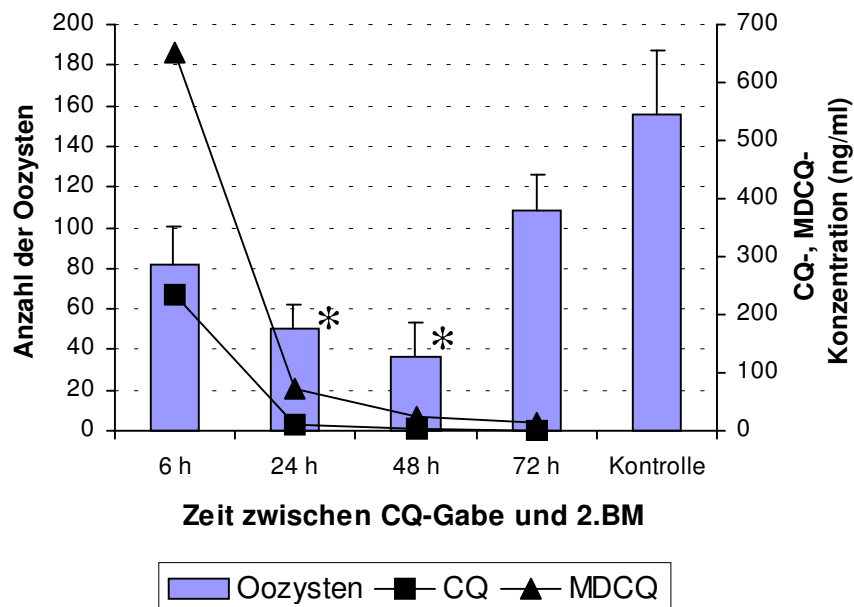


Abb. 21: Mittlere Anzahl (Median + Standardfehler) der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an einer Maus, die 3 Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden war. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein zweites Blutmahl an gesunden Mäusen, denen vorher zu verschiedenen Zeiten (6 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h) Chloroquin injiziert worden war (i.p.). Die Dosis betrug 10 mg/kg Körpergewicht der gesunden Mäuse. Die Konzentration von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin im Blut der gesunden Mäuse zum Zeitpunkt des 2. Blutmahls wurde mit HPLC bestimmt.

* signifikant gegenüber der Kontrolle (p < 0,003 bzw. 0,018)

Tabelle 11: Anzahl der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an 2 Mäusen im Pool, die 3 Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein zweites Blutmahl an gesunden Mäusen, denen vorher zu verschiedenen Zeiten (6 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h) Chloroquin injiziert worden war. Die Dosis betrug **50 mg/kg** Körpergewicht der gesunden Mäuse.

Zeit zwischen CQ-Behandlung und 2.Blutmahl	6 h	24 h	48 h	72 h	Kontrolle
Oozysten (Median) ± Standardfehler	127 ± 16,9	148 ± 12,9	103 ± 15,9	120 ± 17,1	117 ± 16,3
Anzahl der Mücken	30	29	25	27	23
Infektionsrate (%)	96,7	96,6	96,0	100,0	95,7
Mortalität der Mücken (%)	47,4	47,3	53,7	42,6	54,9
Parasitämie der Maus (%)	4,4 = (3,8 + 5,0) / 2				
Mann-Whitney U-Test (einseitig)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-
CQ-Konzentration (ng/ml) *	536,57	48,89	9	8,8	-
MDCQ-Konzentration (ng/ml) *	1673,36	390,2	68,23	28,73	-

* Die Konzentration von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin im Blut der gesunden Mäuse zum Zeitpunkt des 2. Blutmahls wurde mit HPLC bestimmt.

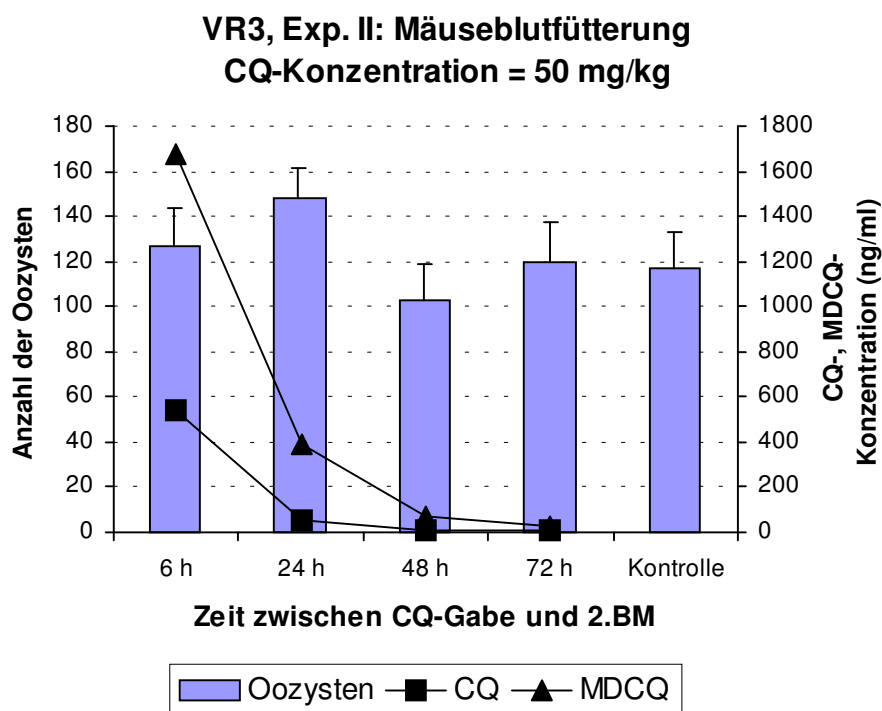


Abb. 22: Mittlere Anzahl (Median + Standardfehler) der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an 2 Mäusen im Pool, die 3 Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein zweites Blutmahl an gesunden Mäusen, denen vorher zu verschiedenen Zeiten (6 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h) Chloroquin injiziert worden war (i.p.). Die Dosis betrug 50 mg/kg Körpergewicht der gesunden Mäuse. Die Konzentration von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin im Blut der gesunden Mäuse zum Zeitpunkt des 2. Blutmahls wurde mit HPLC bestimmt.

3.1.5 Applikation von Chloroquin und Monodesethylchloroquin in menschlichem Blut (Versuchsreihe 4)

Mit Hilfe einer Membranfütterungsanlage erhielten die infizierten Mücken ein zweites Blutmahl, das aus Kombination von Chloroquin und Monodesethylchloroquin bestand (10:0, 5:5 bzw. 0:10 Base w:w). Die Dosierungen der beiden Chemikalien betragen zusammen 1,5; 7,5 bzw. 15 µg/ml Totalblut.

Bei einer Dosis von **1,5 µg/ml** war kein signifikanter Unterschied der Oozystenanzahlen zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe zu sehen (**Tabelle 12, Abb. 23**). Bei einer Dosis von **7,5 µg/ml** waren die Oozystenanzahlen bei 5:5 signifikant niedriger ($119 \pm 13,1$) als in der Kontrolle ($169 \pm 11,2$) (**Tabelle 13, Abb. 24**, $p < 0,05$). Bei einer Dosis von **15 µg/ml** waren die Oozystenanzahlen bei 5:5 ebenso signifikant niedriger ($102 \pm 13,8$) als in der Kontrolle ($159 \pm 16,4$) (**Tabelle 14, Abb. 25**, $p < 0,03$). Als Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin allein appliziert wurde (d.h. 10:0 bzw. 0:10), erwiesen die Oozystenanzahlen bei allen drei Dosierungen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen und Kontrollgruppen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Chloroquin und Monodesethylchloroquin in diesen Konzentrationen in menschlichem Blut (Gesamtkonzentration: 7,5 bzw. 15 µg/ml) eine synergetisch inhibierende Wirkung auf die Sporogonie von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in *Anopheles stephensi* haben, wenn Chloroquin und Monodesethylchloroquin etwa 1:1 (Base, w:w) im Blut vorhanden sind. Außerdem zeigen diese Ergebnisse, dass Chloroquin oder Monodesethylchloroquin allein weder hemmende noch stimulierende Wirkung haben.

Tabelle 12: Anzahl der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an 5 Mäusen im Pool, die 3 Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein 2. Blutmahl über eine Membranfütterungsanlage (s. Abb. 6-7), wobei Chloroquin und Monodesethylchloroquin 10:0, 5:5 bzw. 0:10 (w:w) in menschliches Blut zugesetzt wurden. Die Dosis der beiden Chemikalien betrug zusammen **1,5 µg/ml Blut**.

CQ : MDCQ (w:w)	10:0	5:5	0:10	Kontrolle
Oozysten (Median) ± Standardfehler	140 ± 23,9	114 ± 21,2	117,5 ± 17,5	142 ± 23,4
Anzahl der Mücken	27	45	60	43
Infektionsrate (%)	100,0	100,0	95,0	97,7
Mortalität der Mücken (%)	38,6	26,2	23,1	29,5
Parasitämie der Maus (%)	3,4 = (2,1 + 5,0 + 2,0 + 4,9 + 3,2) / 5			
Mann-Whitney U-Test (einseitig)	n.s.	n.s.	n.s.	-

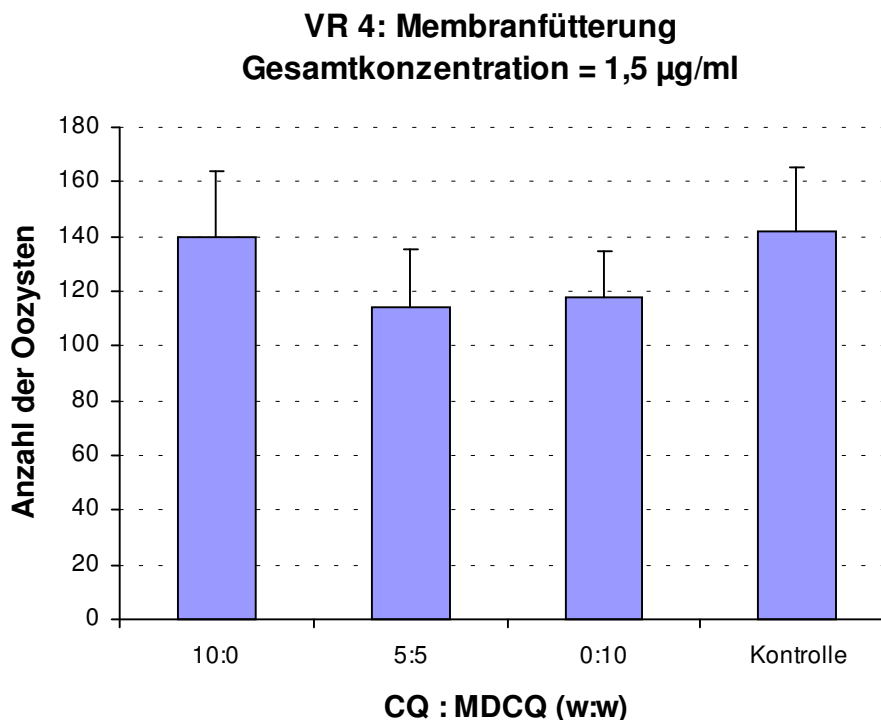


Abb. 23: Mittlere Anzahl (Median + Standardfehler) der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an 5 Mäusen im Pool, die 3 Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein 2. Blutmahl über eine Membranfütterungsanlage (s. Abb. 6-7), wobei Chloroquin und Monodesethylchloroquin 10:0, 5:5 bzw. 0:10 (w:w) in menschliches Blut zugesetzt wurden. Die Dosis der beiden Chemikalien betrug zusammen 1,5 µg/ml Blut.

Tabelle 13: Anzahl der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an 4 Mäusen im Pool, die 3 Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein 2. Blutmahl über eine Membranfütterungsanlage (s. Abb. 6-7), wobei Chloroquin und Monodesethylchloroquin 10:0, 5:5 bzw. 0:10 (w:w) in menschliches Blut zugesetzt wurden. Die Dosis der beiden Chemikalien betrug zusammen **7,5 µg/ml Blut**.

CQ : MDCQ (w:w)	10:0	5:5	0:10	Kontrolle
Oozysten (Median) ± Standardfehler	169 ± 15,3	119 ± 13,1	157 ± 15,4	169 ± 11,2
Anzahl der Mücken	76	61	80	66
Infektionsrate (%)	100,0	100,0	95,0	100,0
Mortalität der Mücken (%)	11,5	12,6	17,5	12,1
Parasitämie der Maus (%)	1,5 = (1,5 + 1,9 + 1,1 + 1,6) / 4			
Mann-Whitney U-Test (einseitig)	n.s.	p < 0,05	n.s.	-

VR 4: Membranfütterung
Gesamtkonzentration = 7,5 µg/ml

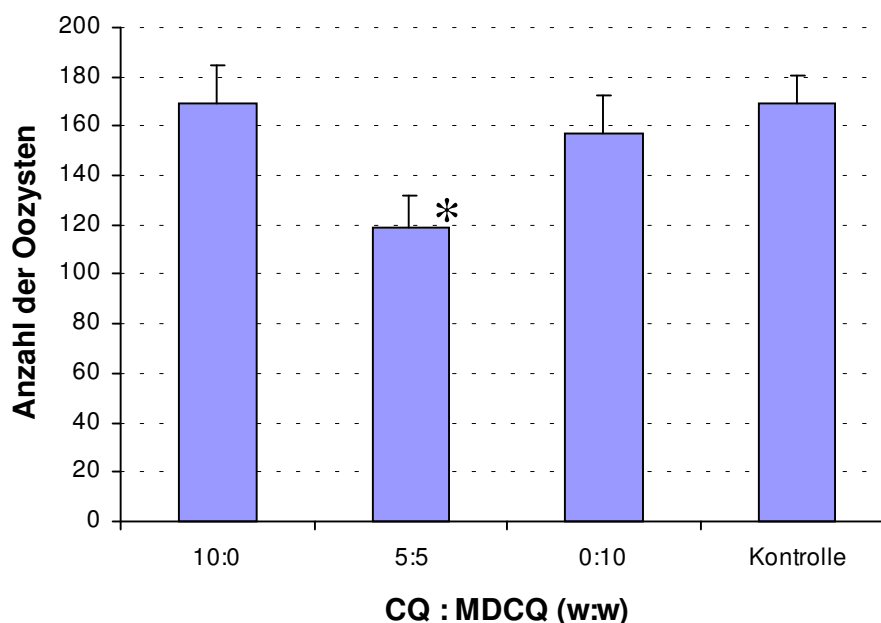


Abb. 24: Mittlere Anzahl (Median + Standardfehler) der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an 4 Mäusen im Pool, die 3 Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein 2. Blutmahl über eine Membranfütterungsanlage (s. Abb. 6-7), wobei Chloroquin und Monodesethylchloroquin 10:0, 5:5 bzw. 0:10 (w:w) in menschliches Blut zugesetzt wurden. Die Dosis der beiden Chemikalien betrug zusammen 7,5 µg/ml Blut.

* signifikant gegenüber der Kontrolle (p<0,05)

Tabelle 14: Anzahl der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an 6 Mäusen im Pool, die 3 Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein 2. Blutmahl über eine Membranfütterungsanlage (s. Abb. 6-7), wobei Chloroquin und Monodesethylchloroquin 10:0, 5:5 bzw. 0:10 (w:w) in menschliches Blut zugesetzt wurden. Die Dosis der beiden Chemikalien betrug zusammen **15 µg/ml Blut**.

CQ : MDCQ (w:w)	10:0	5:5	0:10	Kontrolle
Oozysten (Median) ± Standardfehler	155 ± 16,5	102 ± 13,8	139 ± 22,9	159 ± 16,4
Anzahl der Mücken	41	33	23	35
Infektionsrate (%)	95,1	90,9	95,7	97,1
Mortalität der Mücken (%)	14,0	18,5	27,9	19,2
Parasitämie der Maus (%)	2,6 = (3,0 + 2,8 + 2,7 + 2,5 + 2,2 + 2,5) / 6			
Mann-Whitney U-Test (einseitig)	n.s.	p < 0,03	n.s.	-

VR 4: Membranfütterung
Gesamtkonzentration = 15 µg/ml

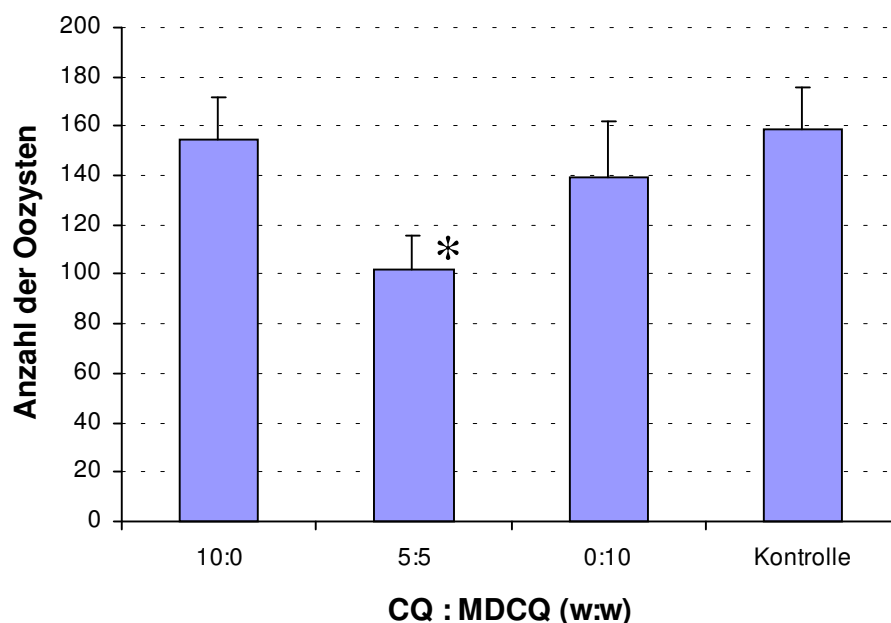


Abb. 25: Mittlere Anzahl (Median + Standardfehler) der Oozysten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* am 7. Tag nach Infektion. Die Infektion erfolgte durch ein Blutmahl an 6 Mäusen im Pool, die 3 Tage zuvor mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infiziert worden waren. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein 2. Blutmahl über eine Membranfütterungsanlage (s. Abb. 6-7), wobei Chloroquin und Monodesethylchloroquin 10:0, 5:5 bzw. 0:10 (w:w) in menschliches Blut zugesetzt wurden. Die Dosis der beiden Chemikalien betrug zusammen 15 µg/ml Blut.

* signifikant gegenüber der Kontrolle (p<0,03)

3.2 Versuche mit *Plasmodium falciparum*

3.2.1 ED₅₀ von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin

Um ED₅₀-Werte von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin für *Plasmodium falciparum* zu bestimmen, wurden asexuelle Stadien über einen Zeitraum von 96 Stunden verschiedenen Konzentrationen der beiden Chemikalien ausgesetzt (1, 10 bzw. 100 ng/ml Base jeweils). Da die Werte von dem 3. Tag (d.h. nach 72 Stunden) zur Bestimmung der ED₅₀-Werte am günstigsten waren, wurden sie zur Umrechnung genommen. Nach einem Probit-Verfahren beliefen sich die ED₅₀-Werte von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin jeweils auf 2,52 ng/ml bzw. 2,20 ng/ml (**Tabelle 15**).

Tabelle 15: Parasitämie von *Plasmodium falciparum* 72 h nach Applikation von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin für die Ermittlung der ED₅₀-Werte dieser beiden Chemikalien nach Probit-Verfahren. Die Ausgangsparasitämie betrug 0,3% bei einem Hämatokrit von 10%. Das Medium wurde alle 24 Stunden gewechselt.

Dosis (ng/ml)	Chloroquin			Monodesethylchloroquin			Kontrolle
	1	10	100	1	10	100	
Probit-Verfahren	1	10	100	1	10	100	-
Parasitämie (%) von drei Parallelansätzen	1,07	0,13	0,02	1,36	0,28	0,02	1,68
	1,28	0,23	0,02	1,12	0,19	0,02	1,64
	1,36	0,17	0,02	1,01	0,21	0,03	1,76
Mittelwert der Parasitämie (%)	1,24	0,18	0,02	1,16	0,23	0,02	1,69
% Inhibition	26,63	89,35	98,82	31,36	86,39	98,82	-
Regressionsformel	y = 15,676Ln(x) + 35,503 R ² = 0,8465			y = 14,648Ln(x) + 38,462 R ² = 0,8826			-
ED₅₀	2,52 ng/ml			2,20 ng/ml			-

3.2.2 Applikation von Chloroquin und Monodesethyl chloroquin in Kombinationen

Aufgrund der oben ermittelten ED₅₀-Werte von Chloroquin und Monodesethylchloroquin wurden viertägige Suppressionsversuche durchgeführt. Hierzu wurden Chloroquin und Monodesethylchloroquin in Verhältnissen von 10:0, 8:2, 5:5, 2:8 bzw. 0:10 (w:w, Base) angesetzt und zur Behandlung der Kultur verwendet.

Während die Parasitämie bei der Kontrollgruppe von 0,90 % (nach 24 h) auf 3,96 % (nach 96 h) stets anstieg, verliefen die Parasitämien bei den Versuchsgruppen unterschiedlich (**Tabelle 16, Abb. 26**). Bei einer Versuchsgruppe von 8:2 (CQ:MDCQ) zeigte sich eine signifikant höhere Parasitämie nach 72 h ($4,09 \pm 0,16$ %) als in der Kontrollgruppe ($2,99 \pm 0,13$) (Paired samples T-Test, $p < 0,025$, einseitig). Dies weist darauf hin, dass Chloroquin und Monodesethylchloroquin in einem Verhältnis von 4:1 (w:w, Base) eine signifikant stimulierende Wirkung auf Schizogonie von *Plasmodium falciparum* in vitro haben.

Dagegen war die Parasitämie bei der Versuchsgruppe mit einem Chloroquin/Monodesethylchloroquin-Verhältnis von 5:5 nach 72 h signifikant niedriger ($1,97 \pm 0,27$) als in der Kontrollgruppe ($2,99 \pm 0,13$, $p < 0,01$). Dies bedeutet, dass Chloroquin und Monodesethylchloroquin in einem Verhältnis von 1:1 (w:w, Base) eine signifikant inhibierende Wirkung auf die Schizogonie von *Plasmodium falciparum* in vitro haben. Nach 96 h war die Parasitämie bei der Versuchsgruppe von 8:2 (CQ:MDCQ) signifikant niedriger ($1,92 \pm 0,31$) als in der Kontrollgruppe ($3,96 \pm 0,34$, $p < 0,0005$). Es ist jedoch nicht klar, ob es sich dabei um eine hemmende Wirkung von den beiden Chemikalien handelt, oder eine Toxizität von dem Überwachsen, da die Parasitämie dieser Versuchsgruppe bis 72 h hochstieg (höher als in der Kontrollgruppe) und danach drastisch abfiel (niedriger als alle anderen Gruppen). Die Parasitämien der anderen Versuchsgruppen (10:0, 2:8, 0:10) verliefen aufsteigend, waren allerdings nach 72 h niedriger als in der Kontrollgruppe. Jedoch waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant.

Tabelle 16: Parasitämie von *Plasmodium falciparum* nach Applikation von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin in Verhältnissen von 10:0, 8:2, 5:5, 2:8 bzw. 0:10 (w:w, Base). Die Ausgangsparasitämie betrug 0,3% bei einem Hämatokrit von 10%. Das Medium wurde alle 24 Stunden gewechselt. Die Dosis betrug 2,52 ng/ml bei Chloroquin bzw. 2,20 ng/ml bei Monodesethylchloroquin. (Mittelwert \pm Standardfehler)

Dosis	Chloroquin : Monodesethylchloroquin (w:w)					
	10:0	8:2	5:5	2:8	0:10	Kontrolle
24 h	0,68 \pm 0,07	0,72 \pm 0,09	0,69 \pm 0,03	0,76 \pm 0,13	0,86 \pm 0,06	0,90 \pm 0,09
48 h	1,60 \pm 0,18	1,87 \pm 0,13	1,86 \pm 0,03	2,63 \pm 0,14	1,76 \pm 0,04	1,52 \pm 0,12
72 h	2,49 \pm 0,73	4,09 \pm 0,16* (p<0,025)	1,97 \pm 0,27* (p<0,01)	3,02 \pm 0,71	2,20 \pm 0,36	2,99 \pm 0,13
96 h	2,56 \pm 0,40	1,92 \pm 0,31* (p<0,0005)	2,68 \pm 0,31	2,56 \pm 0,27	2,62 \pm 0,37	3,96 \pm 0,34

* signifikant gegenüber der Kontrolle (Paired samples T-Test, einseitig)

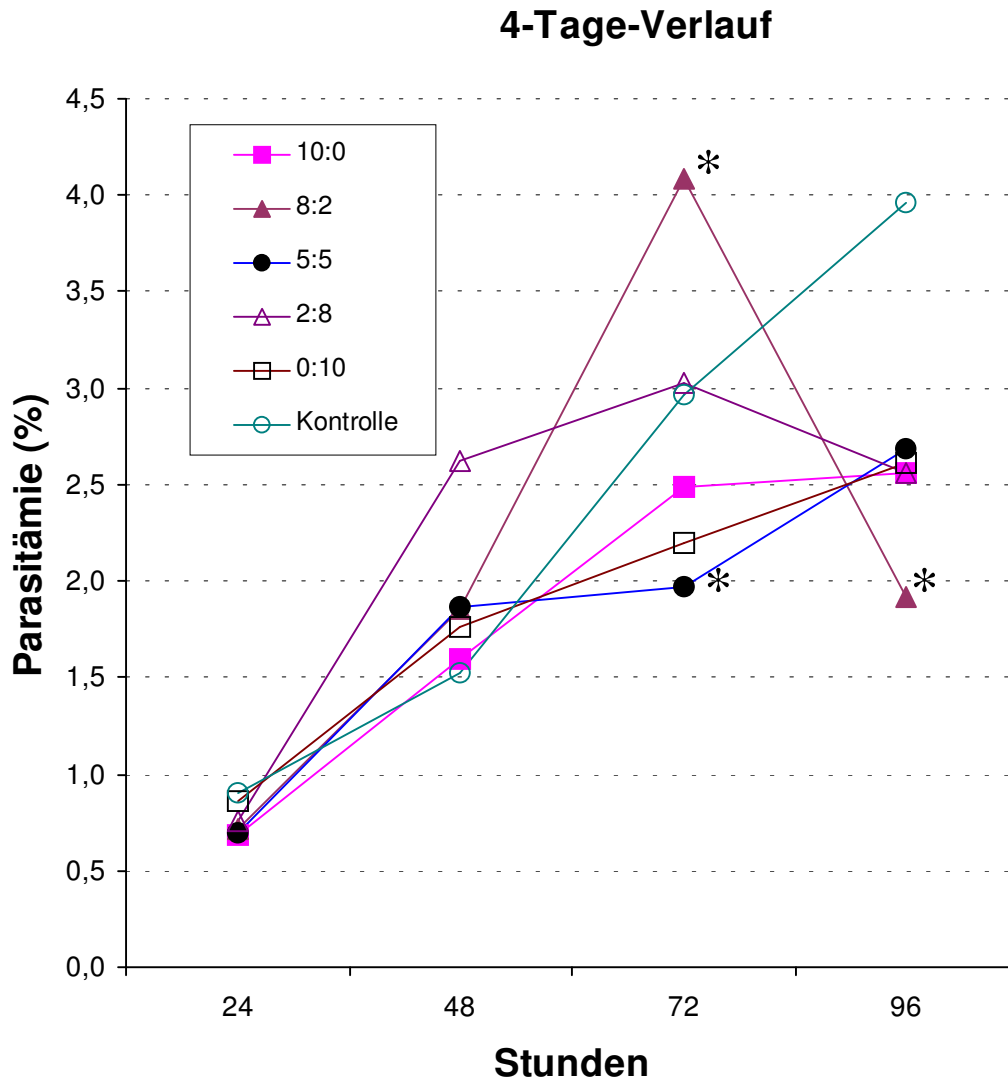


Abb. 26: 4-Tage-Verlauf der Parasitämien von *Plasmodium falciparum* nach Applikation von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin in Verhältnissen von 10:0, 8:2, 5:5, 2:8 bzw. 0:10 (w:w, Base). Die Ausgangsparasitämie betrug 0,3% bei einem Hämatokrit von 10%. Das Medium wurde alle 24 Stunden gewechselt. Die Dosis betrug 2,52 ng/ml bei Chloroquin bzw. 2,20 ng/ml bei Monodesethylchloroquin.
* signifikant gegenüber der Kontrolle (Paired samples T-Test, einseitig)

4 Diskussion

Die Versuche bauten teilweise auf Ergebnissen von Steffen Krug (vgl. Anhang 7.2) auf, in denen aber nie eine stimulierende Wirkung der Medikamente nachgewiesen werden konnte.

4.1 Einfluss der Behandlung infizierter Mäuse mit subtherapeutischen Medikamentendosen auf die Infektiosität der Parasiten für die Mücken (zur Versuchsreihe 1)

Der Versuchsaufbau entspricht etwa der Situation, in der ein Malariapatient nach der Behandlung mit einem Medikament von einer noch nicht infizierten Mücke gestochen wird. Dies sollte zur Auseinandersetzung dienen, ob und gegebenenfalls wie das Medikament, das zur Chemotherapie eingenommen wurde, die Entwicklung der Malariaerreger in den Mücken beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* und *Anopheles stephensi* zeigte sich eine signifikante Verringerung der Oozystenzahlen bei Chloroquin-Dosen von 10 mg/kg bzw. 50 mg/kg, wobei Chloroquin 6 h, 30 h bzw. 54 h vor der infektiösen Blutmahlzeit in die infizierten Mäuse injiziert worden war (**Abb. 13** und **14**). Diese Verringerungen der Oozystenzahlen sind zum großen Teil auf die bekannte schizontozide Wirkung des Chloroquins zurückzuführen und auf eine eventuell vorhandene gametozytozide Wirkung.

Interessant ist das Ergebnis bei 1 mg/kg. Es ergab sich bei 30 h eine signifikante Verringerung der Oozystenzahlen, während sich bei 6 h bzw. 54 h kein Unterschied der Oozystenzahlen gegenüber der Kontrollgruppe erweisen ließ (**Abb. 12**). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Chloroquin-Gabe zu diesem Zeitpunkt, d.h. 30 h vor dem infektiösen Blutmahl der Mücken bzw. 42 h nach der Infektion der Maus die Entwicklung der jungen Gametozyten in der Maus gehindert hat.

PETERS & ROBINSON (1987) untersuchten die gametozytozide Wirkung des Chloroquins auf *Plasmodium yoelii nigeriensis* bei *Anopheles stephensi*, indem sie die Mäuse mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* infizierten, drei Tage danach mit Chloroquin behandelten (s.c. bzw. i.p.) und 1 h später den Mücken zum Blutmahl anboten. Dabei zeigte Chloroquin keine gametozytozide Aktivität in allen verwendeten Dosen (1, 3, 10, 30 sowie 60 mg/kg). Diese fehlende

gametozytozide Wirkung könnte aber darin begründet sein, dass Chloroquin erst 1 h vor dem Blutmahl, d.h. etwa 71 h nach der Infektion der Mäuse mit *Plasmodium yoelii nigeriensis*, appliziert wurde, zu welchem Zeitpunkt Gametozyten bereits reif geworden waren.

In der vorliegenden Untersuchung wurde Chloroquin 30 h vor dem Blutmahl, d.h. 42 h nach der Infektion der Mäuse mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* appliziert, als die Gametozyten noch jung waren. 54 h vor dem Blutmahl, d.h. 18 h nach der Infektion der Mäuse waren noch kaum Gametozyten vorhanden; 6 h vor dem Blutmahl, d.h. 64 h nach der Infektion der Mäuse waren die Gametozyten schon reif. Man kann zusammenfassen, dass Chloroquin in einer Dosis von 1 mg/kg eine inhibierende Wirkung auf junge Gametozyten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* hat.

Bei RAMKARAN & PETERS (1969) zeigte sich eine stimulierende Wirkung des Chloroquins auf Gametozyten einer Chloroquin-resistenten Linie von *Plasmodium berghei* NK₆₅, wobei die infizierten Mäuse am 3. d.p.i. mit Chloroquin behandelt (1 bzw. 10 mg/kg, s.c.) und 12 h danach den Mücken zum Blutmahl angeboten wurden. Bei der Gametozytämie vor und nach der Chloroquin-Behandlung gab es auch keine signifikante Änderung. Bei den Untersuchungen von ICHIMORI et al. (1990) war ebenso eine stimulierende Wirkung des Chloroquins auf Sporogonie von *Plasmodium yoelii nigeriensis* nachzuweisen, als Chloroquin in einer Dosis von 1 mg/kg 12 h vor dem infektiösen Blutmahl in die infizierten Mäuse appliziert wurde.

In der vorliegenden Arbeit mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* ergab sich keine stimulierende Wirkung des Chloroquins auf die Gametozyten, sondern eher eine inhibierende Wirkung, wobei Gametozytenzahlen um etwa 107,5 % gegenüber der Kontrolle verringert worden waren. Jedoch sind hier die Zeitabstände zwischen Chloroquin-Applikation und Blutmahl anders gewählt als bei den obigen Autoren.

4.2 Einfluss nachträglicher Aufnahme von unverstoffwechseltem Medikament auf den Infektionsverlauf in der Mücke (zur Versuchsreihe 2)

Die Art der Applikation von Chloroquin im Zuckerwasser entspricht nicht der natürlichen Situation. Denn Chloroquin bleibt im Zuckerwasser unverstoffwechselt, während Chloroquin im Blut je nach Aufenthaltsdauer mehr oder weniger verstoffwechselt wird. Außerdem

werden zuckerhaltige Lösungen in den Darmdivertikeln zwischengespeichert und nach und nach in den Mitteldarm übernommen, während Blut direkt in den Mitteldarm aufgenommen wird. Seit dem ersten Versuch dieser Art durch TERZIAN (1947) mit *Plasmodium gallinaceum* wurden jedoch viele Untersuchungen in dieser Form durchgeführt worden, um schnell und kostengünstig die Wirkung der Medikamente gegen *Plasmodium* zu testen (GERBERG, 1971).

In der vorliegenden Arbeit inhibierte Chloroquin in einer Dosis von 150 bzw. 750 µg/ml Zuckerwasser (0,015 bzw. 0.075 %) die Sporogonie von *Plasmodium yoelii nigeriensis* signifikant (**Tabelle 15** und **16**). Bei Untersuchungen mit *Plasmodium falciparum* von GERBERG (1971) zeigte Chloroquin in einer Dosis von 0,1 % in Zuckerwasser eine signifikante sporontozide Wirkung.

Diese Dosen für sporontozide Wirkung bei *Plasmodium yoelii nigeriensis* bzw. *Plasmodium falciparum* sind im Vergleich zu anderen Medikamenten, die durch GERBERG (1971) mitgetestet wurden, relativ hoch: Pyrimethamin zeigte bereits bei 0,0001 % im Zuckerwasser eine signifikante sporontozide Wirkung auf *Plasmodium falciparum*, Cycloguanil bei 0,001 % und Proguanil bei 0,01 %. Primaquin zeigte wie Chloroquin bei 0,1 % eine signifikante sporontozide Wirkung und Chinin gar keine Wirkung auf Sporogonie von *Plasmodium falciparum*.

Bei den Untersuchungen von TERZIAN (1968) mit *Plasmodium vivax* zeigte Chloroquin in einer Dosis von 100 µg/ml Zuckerwasser keine sporontozide Wirkung, Mepacrin, Chinin in gleicher Dosis sowie Primaquin in einer Dosis von 500 µg/ml ebenso keine signifikante Wirkung auf Sporogonie von *Plasmodium vivax*. Cycloguanil mit einer Dosis von 10 µg/ml, Pyrimethamin 20 µg/ml sowie Proguanil 50 µg/ml zeigten dagegen signifikante sporontozide Wirkung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die oben genannten Daten deuten an, dass Chloroquin nur in einer relativ hohen Dosis eine sporontozide Wirkung auf Plasmodien hat, wenn es unverstoffwechselt den Mücken appliziert wird.

4.3 Einfluss nachträglicher Aufnahme des verstoffwechselten Medikamentes auf den Infektionsverlauf in der Mücke (zur Versuchsreihe 3)

Dieser Versuch entspricht der Situation, in der ein Malariapatient nach Prophylaxe mit Chloroquin von einer infizierten Mücke gestochen wird, so dass das verstoffwechselte Medikament in den Mitteldarm der Mücke gelangt und dort auf die Sporogonie der Parasiten wirken kann.

Bei den ersten drei Versuchen, in denen Chloroquin 0,5 h, 2 h bzw. 6 h lang in den gesunden Mäusen verstoffwechselt werden konnte, ergab sich kein signifikanter Unterschied der Oozystenzahlen. Auch kein Zusammenhang zwischen Chloroquin- bzw. Monodesethylchloroquin-Konzentration und den Oozystenzahlen war zu finden. Allein bei einer Dosis von 50 mg/kg zeigte sich eine signifikante sporontozide Wirkung, wobei Chloroquin 2 h lang in der Maus verstoffwechselt wurde.

In der zweiten Versuchsreihe, in der Chloroquin 6 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h lang in den gesunden Mäusen verstoffwechselt werden konnte, ergab sich dagegen sowohl stimulierende als auch inhibierende Wirkung:

(1) Als Chloroquin in einer geringen Menge von 1 mg/kg appliziert worden war und durch 48stündige Metabolisierung in einem Verhältnis von 0,8 : 5,3 (Chloroquin : Monodesethylchloroquin, ng/ml) im Blut vorhanden war, resultierte dies in einer stimulierenden Wirkung auf Sporogonie von *Plasmodium yoelii nigeriensis*.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine unkontrollierte Selbsttherapie bzw. Prophylaxe mit Chloroquin gegen *Plasmodium falciparum* zu einer unerwünschten Stimulierung der Infektiosität der Parasiten führen kann, was wiederum zur Entwicklung der Chloroquin-resistenten Stämme dienen würde.

(2) Als Chloroquin in einer Dosis von 10 mg/kg appliziert worden war, 24 h bzw. 48 h lang metabolisiert wurde und in einem Konzentrationsverhältnis von 10,1 : 72,3 bzw. 3,7 : 24,0 (Chloroquin : Monodesethylchloroquin, ng/ml) im Blut vorhanden war, führte dies zu einer inhibierenden Wirkung auf die Sporogonie von *Plasmodium yoelii nigeriensis*.

Diese Ergebnisse sind insofern bedeutsam, als Chloroquin in einer bestimmten Menge und in einem bestimmten Konzentrationsverhältnis mit seinem Metaboliten doch eine sporontozide Wirkung besitzt, was der Rolle des Chloroquins für die mögliche Unterbrechung der Übertragung der Malariaparasiten durch die Mücken eine neue Bedeutung gibt.

(3) Als Chloroquin in einer relativ hohen Dosis von 50 mg/kg appliziert wurde, konnte es unabhängig von der Dauer der Metabolisierung bzw. von den Konzentrationsverhältnissen mit Monodesethylchloroquin interessanterweise keinen Einfluss auf die Sporogonie von *Plasmodium yoelii nigeriensis* ausüben.

Hierzu ist kaum eine zufriedenstellende Erklärung zu finden, wie eine Chloroquin-Applikation in einer höheren Dosis (50 mg/kg) keine Wirkung haben kann, während eine Chloroquin-Applikation in einer niedrigeren Dosis (10 mg/kg) eine inhibierende Wirkung hat. Untersuchungen mit anderen Malariamedikamenten, z.B. Halofantrin, Mefloquin, durch andere Autoren im Institut für Medizinische Parasitologie Bonn ergaben ebenso fehlende Wirkungen bei höheren Dosen (KRUG et al., 1995; **Anhang 7.2**).

Eine mögliche Erklärung dazu wäre, dass der hierzu verwendete Stamm, *Plasmodium yoelii nigeriensis* N₆₇, aus einer genetisch gemischten Population mit Chloroquin-resistenten und Chloroquin-sensitiven Parasiten besteht (ICHIMORI et al., 1990), die deshalb je nach Umständen vielfältig reagieren können. Eine gemischte Population wurde auch bei *Plasmodium falciparum* beschrieben (WILLET et al., 1991): Ein natürliches Isolat von einem Patienten aus Equador wurde in die Kultur eingesetzt und mit verschiedenen Medikamenten behandelt. Es ergaben sich zwei unterschiedliche IC₅₀-Werte für jedes Medikament, beispielsweise für Chloroquin 1,47 ng/ml und 51,6 ng/ml, für Monodesethylchloroquin 1,01 ng/ml und 115,95 ng/ml bzw. für Pyremethamin 1,47 ng/ml und 247,45 ng/ml. Dies zeigt, dass das Isolat aus zwei Parasitenpopulationen besteht, die in der Empfindlichkeit gegenüber den Medikamenten signifikant unterschiedlich sein können.

4.4 Einfluss unterschiedlicher Konzentrationskombinationen von Medikament und dessen Metaboliten auf den Infektionsverlauf der Malariaerreger (zur Versuchsreihe 4 und Untersuchungen mit *Plasmodium falciparum*)

Um zu ermitteln, ob eventuell inhibierende, stimulierende bzw. fehlende Wirkung eines Malariamedikamentes im Zusammenhang mit dem Konzentrationsverhältnis des Medikamentes mit dessen Metaboliten im Blut steht, wurden in der vorliegenden Arbeit einige Untersuchungen mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* bzw. *Plasmodium falciparum* durchgeführt.

Bei einer Konzentrationskombination von 5:5 (Chloroquin : Monodesethylchloroquin, w:w) ergab sich eine signifikante sporontozide Wirkung auf *Plasmodium yoelii nigeriensis*, wobei infizierte *Anopheles stephensi*-Mücken über eine Membranfütterungsanlage diese kombinierten Medikamente in einer Gesamtmenge von 7,5 µg/ml bzw. 15 µg/ml aufnahmen. Das heißt, die inhibierende Wirkung auf die Sporogonie von *Plasmodium yoelii nigeriensis* war bei Chloroquin und Monodesethylchloroquin in der Kombination von etwa 1:1 signifikant stärker als in der Applikation der einzelnen Medikamente. Anders ausgedrückt, zeigten Chloroquin und Monodesethylchloroquin einen synergetischen Effekt. Bei Monoapplikation von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin fehlte die sporontozide Wirkung bei diesen Konzentrationen.

Bei *Plasmodium falciparum* erwies eine Konzentrationskombination von 5:5 (Chloroquin : Monodesethylchloroquin, w:w) ebenso eine signifikante schizontozide Wirkung, wobei Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin jeweils aufgrund seines vorher ermittelten ED₅₀-Wertes (2,52 ng/ml bzw. 2,20 ng/ml) berechnet und täglich eingesetzt wurde und 72 h lang auf die Kultur wirken konnte. Eine Kombination von 8:2 (Chloroquin : Monodesethylchloroquin, w:w) hingegen zeigte eine stimulierende Wirkung auf die Schizogonie von *Plasmodium falciparum*.

Es ist bekannt, dass die schizontozide Wirkung des Monodesethylchloroquins bei Chloroquin sensitiven Stämmen der Malariaparasiten fast derjenigen von Chloroquin entspricht, aber bei Chloroquin resistenten Stämmen mehr als dreifach geringer als Chloroquin ist (ADEROUNMU, 1984; AJAY et al., 1987). Eine Konzentrationskombination von 4:1 (Chloroquin : Monodesethylchloroquin, w:w) bei den Versuchen von ADEROUNMU (1984) erwies eine vergleichbare schizontozidale Wirkung wie Monodesethylchloroquin in der Monoapplikation

bzw. stärkere Wirkung als Chloroquin in der Monoapplikation bei einem Chloroquin-sensitiven *Plasmodium falciparum*-Stamm; bei einem Chloroquin-resistenten Stamm eine stärkere Wirkung als allein bei Monodesethylchloroquin bzw. Chloroquin. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht überein. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Stamm *Plasmodium falciparum* N₅₄ ist als Chloroquin empfindlich bekannt und die verwendete 4:1 Kombination erbrachte eine genau umgekehrte, stimulierende Wirkung im Vergleich zu den Ergebnissen von ADEROUNMU (1984).

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und von den Untersuchungen vieler anderer Autoren weisen darauf hin, dass bei der Malariabekämpfung viele Faktoren zu berücksichtigen sind, unter anderem:

(1) Durch Chemotherapie mit Chloroquin können Schizonten im Blut beseitigt werden. Reife Gametozyten bleiben jedoch 15 bis 26 Tage im Blut infektiös, da Chloroquin hauptsächlich auf Schizonten und junge Gametozyten wirkt. So fungiert ein „geheilte“ Patient als potentieller Gametozyten-Spender für die Mücken (JEFFERY, 1958; KLEIN et al., 1991). Zusätzlich zur Chloroquin-Chemotherapy sollte ein für *Plasmodium falciparum* gametozytozides Medikament, wie z.B. Primaquin, eingesetzt werden, um infektiöse Gametozyten rechtzeitig beseitigen zu können (STRICKLAND, 1986).

(2) Prophylaktische Anwendung des Chloroquin könnte zur Beseitigung Chloroquin-empfindlicher Stämme der Malariaparasiten und somit zum selektiven Wachstum Chloroquin-resistenter Malariaparasiten führen. Denn Chloroquin und dessen Metaboliten bleiben über einen längeren Zeitraum im Blut. Beispielsweise betrug die Halbwertszeit von Chloroquin 30-60 Tage nach einer einmaligen Einnahme von 150, 300 oder 600 mg/kg, bei Monodesethylchloroquin 9-20 Tage (FRISK-HOLMBERG et al., 1984). So können Chloroquin und Monodesethylchloroquin von infizierten Mücken aufgenommen werden und inhibierend bzw. stimulierend auf die Malariaparasiten wirken.

(3) Bei der Entwicklung eines Malariamedikamentes sollte eine „Mücken-Studie“ durchgeführt werden, um eine mögliche unerwünschte Förderung der Vektorkapazität zu

vermeiden. Untersuchungen über schizontozide bzw. gametozytozide Wirkungen allein reichen nicht aus (DO ROSARIO et al., 1988).

(4) Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bedürfen noch der Vervollständigung: Bei den Versuchen mit Membranfütterung (Versuchsreihe 4) könnte man noch detaillierte Konzentrationskombinationen von Chloroquin und Monodesethylchloroquin nehmen, z.B. 10:0, 8:2, 5:5, 2:8, 0:10, um genauer zu erfahren, wie die Kombinationen der beiden Medikamenten auf die Sporogonie der Parasiten in den Mücken wirken. Dazu müsste man noch geringere Dosen als die in dieser Arbeit verwendete geringste Konzentration von 1,5 µg/ml verwenden, um zu erfahren, ob eine geringere Konzentration in einer bestimmten Konzentrationskombination eventuell zu einer Stimulierung führen würde. Bei den Versuchen mit *Plasmodium falciparum* könnte man nicht nur die Wirkung auf Schizogonie, sondern auch auf Gamogonie und Sporogonie mit solchen Chloroquin-Monodesethylchloroquin-Kombinationen untersuchen.

5 Zusammenfassung

RAMKARAN & PETERS (1969) hatten nachgewiesen, dass die Infektiosität Chloroquin resistenter Mäusemalariaerreger (*Plasmodium berghei*) durch Chloroquinaufnahme der Überträger *Anopheles stephensi* gesteigert wurde. Spätere Studien erbrachten aber nur fragmentarische und teilweise widersprüchliche Ergebnisse.

Es sollte daher nochmals an einem anderen Nagermalariaerreger systematisch untersucht werden, welchen Einfluss Chloroquin auf die Entwicklung von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in *Anopheles stephensi* hat. Infizierten Mücken wurde Chloroquin in unterschiedlichen Dosen auf vier verschiedene Arten appliziert: 1. Zusammen mit der infektiösen Blutmahlzeit, 2. als nicht verstoffwechseltes Medikament mit Zuckerwasser nach der Infektion, 3. als verstoffwechseltes Medikament über eine gesunde Maus, 4. als eine Mischung von Chloroquin und dessen Metaboliten, Monodesethylchloroquin, über eine Membranfütterungsanlage. Der Einfluss des Medikamentes auf die Sporogonie wurde anhand der Anzahl der Oozysten im Mitteldarm der Mücken am 7. Tag nach der Infektion ermittelt.

Bei dem Experiment (1) ergaben sich signifikant niedrigere Oozystenzahlen, als Chloroquin 6 h, 30 h bzw. 54 h vor dem Blutmahl in einer Dosis von 10 mg/kg bzw. 50 mg/kg in die infizierten Mäuse appliziert worden war. Bei einer Dosis von 1 mg/kg waren die Oozystenzahlen signifikant niedrig, als Chloroquin 30 h vor dem Blutmahl appliziert worden war. Diese Ergebnisse deuten die bekannte schizontozidale Wirkung des Chloroquins und eine mögliche inhibierende Wirkung auf junge Gametozyten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* an.

Im Experiment (2) ergab sich eine signifikante Verringerung der Oozystenzahl bei einer Dosis von 150 µg/ml bzw. 750 µg/ml. Dies zeigt, dass unverstoffwechseltes Chloroquin in diesen Dosen eine signifikante sporontozide Wirkung auf *Plasmodium yoelii nigeriensis* besitzt.

Im Experiment (3) ergaben sich signifikant niedrigere Oozystenzahlen bei einer Dosis von 10 mg/kg, als Chloroquin 24 h oder 48 h vor dem Blutmahl in die gesunden Mäuse injiziert worden war, bzw. bei einer Dosis von 50 mg/kg, als Chloroquin 2 h vor dem Blutmahl injiziert worden war. Bei einer Dosis von 1 mg/kg zeigte sich dagegen eine signifikante Erhöhung der Oozystenzahl, als Chloroquin 48 h vor dem Blutmahl appliziert worden war.

Diese Ergebnisse deuten an, dass verstoffwechseltes Chloroquin je nach Menge im Blut und Konzentrationsverhältnis mit seinem Metaboliten eine signifikant hemmende bzw. stimulierende Wirkung auf die Sporogonie von *Plasmodium yoelii nigeriensis* hat.

Bei dem Experiment (4) zeigte sich eine signifikante Verringerung der Oozystenanzahl bei einer Gesamtdosis von 7,5 µg/ml bzw. 15 µg/ml, wobei Chloroquin und Monodesethylchloroquin in einem Konzentrationsverhältnis von 1:1 in die Mücke appliziert worden waren. Dies deutet eine signifikant synergetisch inhibierende Wirkung von Chloroquin und Monodesethylchloroquin auf die Sporogonie von *Plasmodium yoelii nigeriensis* an.

Um die Wirkungsweise von Chloroquin und Monodesethylchloroquin bei *Plasmodium falciparum* zu erfahren, wurden Chloroquin und Monodesethylchloroquin in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen (10:0, 8:2, 5:5, 2:8, 0:10 w:w) in die Kultur von *Plasmodium falciparum* eingesetzt. Nach 72 h ergab sich eine signifikante Verringerung der Parasitämie bei einem Konzentrationsverhältnis von 1:1 (Chloroquin : Monodesethylchloroquin) und eine signifikante Erhöhung der Parasitämie bei 4:1 (Chloroquin : Monodesethylchloroquin). Diese Ergebnisse deuten an, dass Chloroquin und Monodesethylchloroquin je nach Konzentrationsverhältnis im Blut eine inhibierende bzw. stimulierende Wirkung auf die Schizogonie von *Plasmodium falciparum* besitzen.

Bei der Prophylaxe bzw. Chemotherapie mit Chloroquin sollte man eine stimulierende Wirkung von Chloroquin und Monodesethylchloroquin für die Malariaparasiten mitrechnen. Eine prophylaktische Anwendung des Chloroquins sollte vermieden werden.

6 Literaturverzeichnis

- Aderounmu, A. F., (1984): *In vitro* assessment of the antimalarial activity of chloroquine and its major metabolites. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 78(6), 581-585
- Andersag, H., Breitner, S. & Jung, H. (1939): Ger. Pat. 638:692
- Ansari, A. M. & Craig, J. C. (1995): A convenient, short synthesis of desethylchloroquine [7-chloro-4-(4'-ethylamino-1'-methylbutylamino)quinoline]. *Synthesis*, 147-149
- Ajay, F. O., Salako, L. A. & Kuye, J. O. (1987): Antimalarial activity of bisdesethylchloroquine against *P. falciparum* and *P. berghei berghei*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 81(4), 445-447
- Björkman, A. & Phillips-Howard, P. A. (1990): The epidemiology of drug-resistant malaria. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84, 177-180
- Butcher, G. A. (1997): Antimalarial drugs and the mosquito transmission of *Plasmodium*. *International Journal for Parasitology*, 27(9), 975-987
- Chalet, J.-F., Robet, Y., Prevosto, J.-M. & Soares, O. (1993): Simultaneous determination of chloroquine and Chinin in human biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 613, 303-310
- Chutmongkonkul, M., Maier, W. A. & Seitz, H. M. (1992a): *Plasmodium falciparum*: effect of chloroquine, halofantrine and pyrimethamine on the infectivity of gametocytes for *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 86 (2), 103-110
- Chutmongkonkul, M, Maier W. A. & Seitz, H. M. (1992b): A new model for testing gametocytocidal effects of some antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* in vitro. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 86(3), 207-215

- Coleman, R. E., Vaughan, J. A., Hayes, D. O., Hollingdale, M. R. & Do Rosario, V. E. (1988): Effect of Mefloquine and Artemisinin on the sporogonic cycle of *Plasmodium berghei* ANKA in *Anopheles stephensi* Mosquitoes. *Acta Leidensia*, 57, 6-74
- Croes, K. McCarthy, P. T. & Flanagan, R. J. (1994): Simple and rapid HPLC of Chinin, hydroxychloroquine, chloroquine and desethylchloroquine in serum, whole blood, and filter paper-absorbed dry blood. *Journal of Analytical Toxicology*, 18, 255-260
- Diggs, C. L., Aikawa, M. & Haynes, J. D. (1977): Ultrastructure and viability of cryopreserved *Plasmodium falciparum*. *Bulletin of World Health Organisation*, 55(2-3), 299-304
- Do Rosario, V. E., Vaughan, J. A., Murphy, M. Harrod, V. & Coleman, R. (1988): Effect of Chloroquine on the sporogonic cycle of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* in Anopheline mosquitoes. *Acta Leidensia* 57 (1), 53-60
- Frisk-Holmberg, M., Bergqvist, Y. & Domeij-Nyberg, B. (1984): The single dose kinetics of chloroquine and its major metabolite desethylchloroquine in healthy subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 26, 521-530
- Fu, S., Björkman, A., Wåhlin, Brigitta, Ofori-Adjei, D., Ericsson, Ö. & Sjöqvist, F. (1986): In vitro activity of chloroquine, the two enantiomers of chloroquine, desethylchloroquine and pyronaridine against *Plasmodium falciparum*, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 22, 93-96
- Garvavelli, P. L. & Corti, E. (1992): Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*: the first case in Brazil. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86, 128
- Gerberg, E.J. (1971): Evaluation of antimalarial compounds in mosquito test systems. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 65, 358-363
- Gustafsson, L. L., Rombo, L., Alvan, G., Björkman, A., Lind, M. & Walker, O. (1983): On the question of dose-dependent chloroquine elimination of a single oral dose. *Clinical Pharmacology and Therapy*, 34 (3), 383-385

- Hartke, K., Hartke, H., Mutschler, E., Rücker, G & Wichtl, M. (1993): DAB10-Kommentar, Wissenschaftliche Erläuterungen zum Deutschen Arzneibuch, 10. Ausgabe 1991, Band II/1, Monographien A-D, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Govi-Verlag GmbH Frankfurt, 1993
- Hogh, B., Thompson, R., Hetzel, C., Fleck, S.L., Kruse, N.A.A., Jones, I., Dgedge, M., Barreto, J. & Sinden, R.E. (1995): Specific and non-specific response to *Plasmodium falciparum* blood-stage parasites and observations on the gametocytaemia in schoolchildren living in a malaria-endemic area of Mozambique. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52, 51-59
- Ichimori, K., Curtis, C. F. & Targett, G.A.T. (1990): The effect of chloroquine on the infectivity of chloroquine-sensitive and -resistant populations of *Plasmodium yoelii nigeriensis* to mosquitoes. *Parasitology*, 100, 377-381
- Jeffrey, G.M. (1958): Infectivity to mosquitoes of *Plasmodium vivax* following treatment with chloroquine and other antimalarials. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 7, 207-210
- Killick-Kendrick, R. (1973): Parasitic protozoa of the blood of rodents I: The life-cycle and zoogeography of *Plasmodium berghei nigeriensis* subsp. nov. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 67(3), 261-277
- Killick-Kendrick, R. & Peters, W. (1978): *Rodent malaria*. S. 56. London: Academic Press.
- Klein, T. A., Tada, M. S., Lima, J. B. P. & Katsuragawa, T. H. (1991): Infection of *Anopheles darlingi* fed on patients infected with *Plasmodium vivax* before and during treatment with chloroquine in Costa Marques, Rondonia, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 45(4), 471-478
- Kozarsky, P. E. & Lobel, H. O. (1994): Antimalarial agents: Are we running out of options? *Current Opinion in Infectious Diseases*, 7, 701-707

- Krug, S., Inyama, J.S., Maier, W.A. & Seitz, H.-M. (1995): Untersuchungen über den Einfluss von Halofantrin und Mefloquin auf die Gamogonie und Sporogonie der Nagermalaria *Plasmodium yoelii nigeriensis* Killick-Kendrick (Coccidia: Plasmodiidae) in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). Mitteilungen der deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie, 10, 649-652
- Lamprecht, J. (1992): Biologische Forschung: Von der Planung bis zur Publikation, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg 1992
- Nuwaha F. (2001): The challenge of chloroquine-resistant malaria in sub-Saharan Africa. Health Policy Plan, 16(1), 1-12
- O'Neill, P. M., Bray, P. G., Hawkey, S. R. Ward, S. A. & Park, B. K. (1998): 4-Aminoquinolines – Past, present, and future: A chemical perspective, Pharmacology and Therapy, 77(1), 29-58
- Peters, W. (1987): Chemotherapy and drug resistance in Malaria, 2nd Edition, Vol. 1, Academic Press, London 1987
- Peters, W., Bafort, J., Ramkaran, A.E., Portus J.H. & Robinson, B.L. (1970): The chemotherapy of rodent malaria, XI. Cyclically transmitted, chloroquine resistant variants of the Keyberg 173 strain of *Plasmodium berghei*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 64, 41-51
- Peters, W & Robinson, B.L. (1987): The activity of primaquine and its possible metabolites against rodent malaria.” In: W.H. Wernsdorfer and P.I. Trigg (eds) Primaquine: pharmacokinetics, metabolism, toxicity and activity. John Wiley and Sons, New York, pp.93-101
- Phillips, R. S. (2001): Current status of malaria and potential for control. Clinical Microbiology (Review), 14(1), 208-26
- Ramkaran, A. E. & Peters, W. (1969): Infectivity of chloroquine resistant *Plasmodium berghei* to *Anopheles stephensi* enhanced by chloroquine. Nature 223, 635-636

- Rieckmann, K. H., Davis, D. R. & Hutton, D. C. (1989): *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? *Lancet*, 2(8673), 1183-4
- Strickland, G. T., Fox, E., Sarwar, M., Khaliq, A. A. & MacDonald, M. (1986): Effects of chloroquine, amodiaquine and pyrimethamine-sulfadoxine on *Plasmodium falciparum* gametocytemia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35(2), 259-262
- Terzian, L. A. (1947): A method for screening antimalarial compounds in the mosquito host. *Science*, 106, 449
- Terzian, L. A., Stahler, N. & Dawkins, A. T. Jr. (1968): The sporogonous cycle of *Plasmodium vivax* in *Anopheles* mosquitoes as a system for evaluating the prophylactic and curative capabilities of potential antimalarial compounds. *Experimental Parasitology*, 23, 56-66
- Trager, W. & Jensen, J. B. (1980): Cultivation of erythrocytic and extraerythrocytic stages of *Plasmodium*. In: *Malaria*, Vol. 2, Academic Press, London 1980, 271-319
- Trager, W. & Jensen, J. B. (1976): Human malaria parasites in continuous culture, *Science* 193, 673-675
- Traore, B., Lazaro, E. & Gay, F. (1997): A bioassay for evaluating antimalarial activity and for measuring concentration in plasma. *Tropical Medicine and International Health*, 2(10), 929-933
- Verdier, F., Le Bras, J., Clavier, F. & Hatin, I. (1984): Blood levels and in vitro activity of desethylchloroquine against *Plasmodium falciparum*, *The Lancet*, May 26, 1187
- Wilkinson, R.N., Neoypatimanond, S. & Gould, D.J. (1976): Infectivity of *falciparum* malaria patients for anopheline mosquitoes before and after chloroquine treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 70, 306-307

Willet, G. P., Milhous, W. K., Gerena, L. & Oduola, A. M. J. (1991): Mixed population dynamics in human malaria parasite cultures. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85, 33-34

7 Anhang

7.1 Originaldaten der vorliegenden Arbeit

Tabelle 17: Oozystenanzahlen von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* 7 Tage nach der infektiösen Blutmahlzeit an den Mäusen, die mit Chloroquin in einer Dosis von **1 mg/kg** zum unterschiedlichen Zeitpunkt behandelt worden waren (6 h, 30 h bzw. 54 h vor dem Blutmahl. Daten zu Tabelle 1).

6 h	30 h	54 h	Kontrolle
0	1	0	0
0	1	19	0
16	2	37	23
80	3	71	28
89	3	74	30
96	11	114	45
102	16	125	55
105	16	127	83
109	19	140	95
112	23	147	126
122	24	183	163
	27	208	171
	28	221	188
	43	227	205
		246	215
		257	238
			285
			306

Tabelle 18: Oozystenzahlen von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* 7 Tage nach der infektiösen Blutmahlzeit an den Mäusen, die mit Chloroquin in einer Dosis von **10 mg/kg** zum unterschiedlichen Zeitpunkt behandelt worden waren (6 h, 30 h bzw. 54 h vor dem Blutmahl. Daten zu Tabelle 2).

6 h	30 h	54 h	Kontrolle
0	0	0	0
2	1	0	0
2	1	3	34
4	2	4	95
6	3	8	97
12	3	13	201
15	4	14	203
16	5	16	214
46	6	19	214
63	6	21	265
65	6	23	270
67	7	29	289
69	7	30	302
78	8	59	304
93	10	65	
97	15	75	
113	18	81	
	19	82	
		99	

Tabelle 19: Oozystenzahlen von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* 7 Tage nach der infektiösen Blutmahlzeit an den Mäusen, die mit Chloroquin in einer Dosis von **50 mg/kg** zum unterschiedlichen Zeitpunkt behandelt worden waren (6 h, 30 h bzw. 54 h vor dem Blutmahl. Daten zu Tabelle 3).

6 h	30 h	54 h	Kontrolle
0	0	0	0
0	0	0	8
0	0	1	61
0	0	1	85
0	1	1	115
0	1	1	210
0	1	1	213
1	1	1	228
1	2	2	295
	2	3	
	2	3	
	2	6	
	2	6	
	3	7	
	3	10	
	5	12	
		14	

Tabelle 20: Oozystenanzahlen von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* 7 Tage nach der infektiösen. Chloroquin-Applikation erfolgte durch Chloroquin haltige Glukoselösung, die die Mücken beliebig saugen durften. Die Chloroquin-Konzentration betrug 15 µg/ml, 150 µg/ml bzw. 750 µg/ml Glukoselösung (Base). (Daten zu Tabelle 4)

15 µg/ml	150 µg/ml	750 µg/ml	Kontrolle
97	121	94	169
102	160	117	195
119	185	118	195
171	188	129	216
172	191	131	224
176	194	158	235
194	204	220	246
199	225	221	257
208	247	223	262
216	254		295
219	259		
220	293		
229	294		
233			
237			
246			

Tabelle 21: Oozystenzahlen von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* 7 Tage nach der infektiösen. Chloroquin-Applikation erfolgte durch Chloroquin haltige Glukoselösung, die die Mücken beliebig saugen durften. Die Chloroquin-Konzentration betrug 15 µg/ml, 150 µg/ml bzw. 750 µg/ml Glukoselösung (Base). (Wiederholungsversuch, Daten zu Tabelle 5)

15 µg/ml	150 µg/ml	750 µg/ml	Kontrolle
16	1	15	0
43	5	33	14
62	16	58	67
84	31	59	68
87	49	74	106
97	103	78	110
151	104	98	212
189	109	130	246
202	117	134	248
202	127	137	260
202	144	141	265
205	186	161	268
215	216	162	268
221	224	184	269
234	249	188	270
281	252	201	281
283	252	220	311
287	261	227	323
287	262	244	326
289	279	287	334
292	282	329	338
298	285	358	340
329	303	364	345
352	325	365	352
357	371	382	389

Tabelle 22: Oozystenzahlen von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* 7 Tage nach der infektiösen. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein zweites Blutmahl an gesunden Mäusen, denen zuvor zu verschiedenen Zeiten (0,5 h, 2 h bzw. 6 h) Chloroquin injiziert worden war. Die Dosis betrug **1 mg/kg**. (Daten zu Tabelle 6)

0,5 h	2 h	6 h	Kontrolle
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	3	3
0	2	4	4
1	4	9	6
7	6	17	17
8	9	24	21
9	12	35	22
12	16	36	23
18	19	43	27
19	21	56	30
24	33	62	32
51	44	63	33
51	48	73	41
54	48	84	51
57	62	84	55
79	64	113	64
89	66	118	68
94	71	120	72
101	91	128	75
101	98	147	79
105	101	178	81
108	106	182	96
113	125	185	101
122	136	195	108

(Fortsetzung)

0,5 h	2 h	6 h	Kontrolle
125	145	207	110
127	158	209	122
133	169	210	139
151	170	264	146
161	175	266	147
174	182	270	152
204	217	292	152
207	218	295	156
220	223	299	156
255	248	304	156
282	296	320	227
287	309	321	235
307	334	325	245
315	341	327	255
319	375	332	259
329	381	370	261
360	412	405	262
366		413	264
662		452	280
		638	287
			290
			299
			315
			322
			325
			333
			341
			408
			538

Tabelle 23: Oozystenzahlen von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* 7 Tage nach der infektiösen. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein zweites Blutmahl an gesunden Mäusen, denen zuvor zu verschiedenen Zeiten (0,5 h, 2 h bzw. 6 h) Chloroquin injiziert worden war. Die Dosis betrug **10 mg/kg**. (Daten zu Tabelle 7)

0,5 h	2 h	6 h	Kontrolle
0	0	0	0
1	0	0	0
2	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
5	1	1	1
5	2	1	2
5	2	1	3
6	2	2	4
7	3	2	4
7	3	3	5
8	3	3	5
9	4	3	5
9	5	4	6
9	5	5	6
10	5	6	8
11	5	6	8
12	6	7	9
15	6	7	9
15	7	8	10
17	7	8	10
23	8	8	10
26	8	9	13
27	8	9	15
27	9	9	15
29	9	9	16
30	9	10	17
32	10	10	17
33	10	10	19
35	10	11	21
35	11	11	21
36	11	12	24
36	11	13	27
39	11	13	28
42	12	13	29
44	12	14	34
49	12	14	36
49	14	15	37
53	15	15	41
54	19	19	44
56	21	20	45

(Fortsetzung)

0,5 h	2 h	6 h	Kontrolle
58	22	22	49
60	23	22	66
62	24	23	70
62	26	25	72
74	26	25	75
75	27	30	78
78	27	32	78
79	27	33	79
83	29	33	81
86	31	33	82
101	31	37	91
107	35	38	101
107	36	38	106
119	40	39	117
124	41	42	136
125	41	48	143
134	44	49	146
139	49	50	146
145	49	64	150
159	58	75	155
160	59	76	181
166	60	77	219
186	61	77	225
194	66	81	248
195	68	82	255
218	80	84	274
219	80	93	279
221	89	93	289
248	90	96	299
278	92	110	304
279	102	117	386
293	102	119	
390	105	121	
542	109	125	
	119	139	
	137	140	
	139	141	
	145	145	
	149	167	
	159	171	
	159	202	
	174	204	
	181	211	
	194	229	
	229	230	
	318	298	
	331		

Tabelle 24: Oozystenzahlen von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* 7 Tage nach der infektiösen. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein zweites Blutmahl an gesunden Mäusen, denen zuvor zu verschiedenen Zeiten (0,5 h, 2 h bzw. 6 h) Chloroquin injiziert worden war. Die Dosis betrug **50 mg/kg**. (Daten zu Tabelle 8)

0,5 h	2 h	6 h	Kontrolle
0	0	1	3
0	0	2	3
0	0	4	5
0	0	5	6
5	2	7	6
7	2	10	11
10	3	11	12
12	3	12	13
18	3	12	14
20	3	12	14
22	5	13	16
27	5	14	17
33	6	20	18
34	8	23	20
43	10	38	22
48	10	55	22
51	11	74	25
52	12	85	31
54	13	96	36
64	19	99	37
67	19	112	41
83	21	114	58
92	23	121	58
99	25	122	61
103	30	129	65

(Fortsetzung)

0,5 h	2 h	6 h	Kontrolle
112	37	130	74
127	38	133	75
132	56	140	83
134	58	142	90
134	60	144	118
151	68	152	133
158	80	158	134
166	89	175	135
172	96	189	138
176	103	198	152
181	132	218	157
187	149	247	160
191	158	272	176
204	201	280	182
207	205	288	214
214	275	298	222
260	290	298	232
308	328	335	247
321	367	342	287
337	389	387	364
361		489	395
368			402
386			
397			
401			

Tabelle 25: Oozystenzahlen von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* 7 Tage nach der infektiösen. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein zweites Blutmahl an gesunden Mäusen, denen zuvor zu verschiedenen Zeiten (6 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h) Chloroquin injiziert worden war. Die Dosis betrug **1 mg/kg**. (Daten zu Tabelle 9)

6 h	24 h	48 h	72 h	Kontrolle
0	0	1	1	1
0	6	4	1	1
4	7	5	4	5
4	11	7	5	9
6	19	9	8	9
7	30	31	12	10
7	34	31	16	12
10	41	32	17	13
11	42	32	17	27
16	58	36	19	42
34	84	53	22	43
35	128	63	31	63
36	131	64	35	101
51	139	69	43	126
68	145	81	46	132
72	146	82	63	186
125	148	103	65	
133	175	105	67	
142		127	77	
163		138	102	
		145	112	
		182	123	
		189	139	
		244	161	
		267	294	
			308	
			317	

Tabelle 26: Oozystenzahlen von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* 7 Tage nach der infektiösen. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein zweites Blutmahl an gesunden Mäusen, denen zuvor zu verschiedenen Zeiten (6 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h) Chloroquin injiziert worden war. Die Dosis betrug **10 mg/kg**. (Daten zu Tabelle 10)

6 h	24 h	48 h	72 h	Kontrolle
1	0	2	3	2
14	1	3	6	7
31	1	3	9	8
32	1	6	13	20
40	5	8	15	24
48	7	10	22	28
52	7	11	30	56
58	12	12	34	65
59	12	22	58	112
66	29	26	61	119
98	33	32	64	137
101	34	34	68	174
160	47	34	77	175
161	48	35	99	190
161	52	37	118	256
184	58	40	129	267
186	76	54	132	311
217	78	71	134	344
233	79	102	172	381
274	96	106	177	385
	99	119	195	404
	104	124	213	425
	118	157	233	
	119	161	235	
	156	205	245	
	173	216	247	
	174	279	279	
	255	368	288	

Tabelle 27: Oozystenzahlen von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* 7 Tage nach der infektiösen. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein zweites Blutmahl an gesunden Mäusen, denen zuvor zu verschiedenen Zeiten (6 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h) Chloroquin injiziert worden war. Die Dosis betrug **50 mg/kg**. (Daten zu Tabelle 11)

6 h	24 h	48 h	72 h	Kontrolle
0	0	0	9	0
1	22	4	41	1
7	24	20	51	17
36	26	31	56	37
50	34	55	58	53
56	58	76	60	68
59	81	89	61	81
63	95	90	79	96
69	97	92	89	101
83	99	97	113	106
89	115	101	116	115
106	123	102	118	117
109	130	103	118	122
110	142	106	120	122
121	148	119	151	123
133	155	122	162	124
141	156	162	174	153
167	160	162	183	175
190	166	196	192	191
209	168	211	214	215
209	170	211	218	243
210	172	224	225	247
212	178	236	242	289
220	185	263	282	
221	204	281	287	
224	209		304	
252	213		326	
274	224			
311	284			
330				

Tabelle 27: Oozystenzahlen von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* 7 Tage nach der infektiösen. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein 2. Blutmahl über eine Membranfütterungsanlage, wobei Chloroquin und Monodesethylchloroquin 10:0, 5:5 bzw. 0:10 (w:w) in menschliches Blut zugesetzt und den Mücken angeboten wurden. Die Dosis der beiden Chemikalien betrug zusammen **1,5 µg/ml** Blut. (Daten zu Tabelle 12)

10:0	5:5	0:10	Kontrolle
2	12	0	0
16	14	0	18
43	21	0	22
43	33	1	25
54	33	4	25
63	39	12	30
97	39	12	31
105	45	14	36
110	46	17	40
123	47	21	43
129	62	21	45
129	78	29	47
140	80	31	56
140	88	35	57
158	89	37	69
176	92	45	95
177	101	45	119
181	101	49	129
248	102	55	136
248	109	57	140
254	110	58	141
333	111	60	142
341	114	60	155

(Fortsetzung)

10:0	5:5	0:10	Kontrolle
380	124	65	175
391	129	67	177
397	131	68	183
404	133	76	185
	136	85	186
	141	106	223
	146	115	225
	153	120	225
	171	123	236
	193	126	255
	252	135	258
	266	144	281
	289	167	294
	301	172	299
	336	174	310
	348	179	381
	353	192	399
	368	204	497
	373	204	549
	392	216	685
	499	239	
	656	260	
		269	
		272	
		273	
		284	
		305	
		309	
		335	
		341	
		345	
		347	
		347	
		396	
		415	
		491	
		492	

Tabelle 28: Oozystenzahlen von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* 7 Tage nach der infektiösen. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein 2. Blutmahl über eine Membranfütterungsanlage, wobei Chloroquin und Monodesethylchloroquin 10:0, 5:5 bzw. 0:10 (w:w) in menschliches Blut zugesetzt und den Mücken angeboten wurden. Die Dosis der beiden Chemikalien betrug zusammen **7,5 µg/ml** Blut. (Daten zu Tabelle 13)

10:0	5:5	0:10	Kontrolle
3	22	0	18
3	23	0	20
7	28	0	21
12	28	0	23
15	31	1	32
19	31	2	35
24	36	3	37
30	36	5	40
37	39	5	53
44	40	6	55
46	42	10	58
48	43	25	58
51	46	34	67
54	50	48	71
54	72	50	73
56	73	52	75
62	80	52	78
64	83	53	79
72	84	55	91
79	87	55	104
80	89	57	109
82	91	58	124
83	92	60	125
90	93	62	126
94	98	77	127
97	101	85	139
103	103	85	140
105	109	91	140
121	110	97	156
122	118	99	156
123	119	101	160
128	120	110	164
132	121	112	168
133	125	120	170
133	126	129	170

(Fortsetzung)

10:0	5:5	0:10	Kontrolle
146	130	129	172
155	131	137	175
165	133	138	183
173	142	151	184
174	147	155	185
177	159	159	189
178	163	162	192
178	180	169	193
187	181	172	195
195	182	188	208
196	189	188	210
207	196	194	214
209	199	197	216
215	213	199	219
216	217	206	221
218	230	219	227
232	233	220	230
241	239	220	232
249	293	235	240
251	295	240	241
252	302	243	243
257	327	254	257
267	353	256	261
270	397	256	272
273	415	257	302
278	430	257	304
291		266	305
299		280	308
301		286	345
325		287	368
348		290	372
349		309	
358		316	
370		323	
390		341	
402		349	
432		349	
438		351	
520		402	
528		416	
536		421	
		433	
		456	
		538	
		572	

Tabelle 29: Oozystenzahlen von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in den Mitteldärmen von *Anopheles stephensi* 7 Tage nach der infektiösen. Chloroquin-Applikation erfolgte durch ein 2. Blutmahl über eine Membranfütterungsanlage, wobei Chloroquin und Monodesethylchloroquin 10:0, 5:5 bzw. 0:10 (w:w) in menschliches Blut zugesetzt und den Mücken angeboten wurden. Die Dosis der beiden Chemikalien betrug zusammen **15 µg/ml** Blut. (Daten zu Tabelle 14)

10:0	5:5	0:10	Kontrolle
0	0	0	0
0	0	3	2
24	0	17	3
28	28	22	10
36	36	55	37
39	38	71	40
42	43	85	40
48	44	94	75
93	45	108	79
94	66	119	91
97	66	136	103
98	67	139	117
99	76	145	119
105	77	157	126
114	89	159	135
119	97	189	137
119	102	205	143
126	113	225	159
134	123	242	164
139	128	244	165
155	144	267	175
160	156	287	175
167	157	468	182
172	159		189
174	162		220
192	170		223
193	171		225
199	192		226
199	198		270
211	199		279
215	228		280
220	245		296
235	340		298
242			304
247			344
325			
325			
338			
362			
380			
404			

Tabelle 30: Parasitämie von *Plasmodium falciparum* nach Applikation von Chloroquin bzw. Monodesethylchloroquin in Verhältnissen von 10:0, 8:2, 5:5, 2:8 bzw. 0:10 (w:w, Base). Die Dosis betrug 2,52 ng/ml bei Chloroquin bzw. 2,20 ng/ml bei Monodesethylchloroquin (Daten zu Tabelle 16)

CQ : MDCQ						
	10:0	8:2	5:5	2:8	0:10	Kontrolle
nach 24 h						
Ansatz 1	0,80	0,81	0,64	0,57	0,75	0,73
Ansatz 2	0,57	0,54	0,69	0,70	0,94	0,97
Ansatz 3	0,67	0,80	0,75	1,01	0,89	1,00
Mittelwert (%)	0,68	0,72	0,69	0,76	0,86	0,90
Standardfehler	0,07	0,09	0,03	0,13	0,06	0,09
nach 48 h						
Ansatz 1	1,42	2,11	1,86	2,67	1,77	1,33
Ansatz 2	1,42	1,82	1,87	2,36	1,82	1,73
Ansatz 3	1,95	1,69	1,86	2,85	1,69	1,50
Mittelwert (%)	1,60	1,87	1,86	2,63	1,76	1,52
Standardfehler	0,18	0,13	0,03	0,14	0,04	0,12
nach 72 h						
Ansatz 1	1,06	4,02	2,42	1,73	1,84	3,22
Ansatz 2	3,40	3,86	2,01	3,16	1,84	2,96
Ansatz 3	3,02	4,39	1,49	4,18	2,91	2,78
Mittelwert (%)	2,49	4,09	1,97	3,02	2,20	2,99
Standardfehler	0,73	0,16	0,27	0,71	0,36	0,13
nach 96 h						
Ansatz 1	3,13	1,38	2,55	3,05	3,25	3,41
Ansatz 2	2,77	2,45	2,23	2,14	2,62	4,59
Ansatz 3	1,79	1,93	3,27	2,48	1,98	3,87
Mittelwert (%)	2,56	1,92	2,68	2,56	2,62	3,96
Standardfehler	0,40	0,31	0,31	0,27	0,37	0,34

Tabelle 31: Anzahl der Oozysten in den Mitteldarmen von *Anopheles stephensi* nach Infektion mit *Plasmodium berghei*, **sechs Stunden** nach Behandlung der Infektionsmäuse mit **Halofantrin**.

Halofantrin-Dosis	Kontrolle	15 mg/kg	22,5 mg/kg	30 mg/kg
Oozystenanzahl (Median) ± Standardfehler	20 ± 0,6	10 ± 0,7	16 ± 0,5	19 ± 0,5
Anzahl der Mücken	45	45	45	45
Infektionsrate (%)	100,0	100,0	100,0	100,0
Mortalität der Mücken (%)	11,1	13,3	17,8	15,6
Mann-Whitney U-Test (zweiseitig)	-	p < 0,000	p < 0,000	n.s.

**VR1: Halofantrin-Behandlung
6 h vor dem Blutmahl**

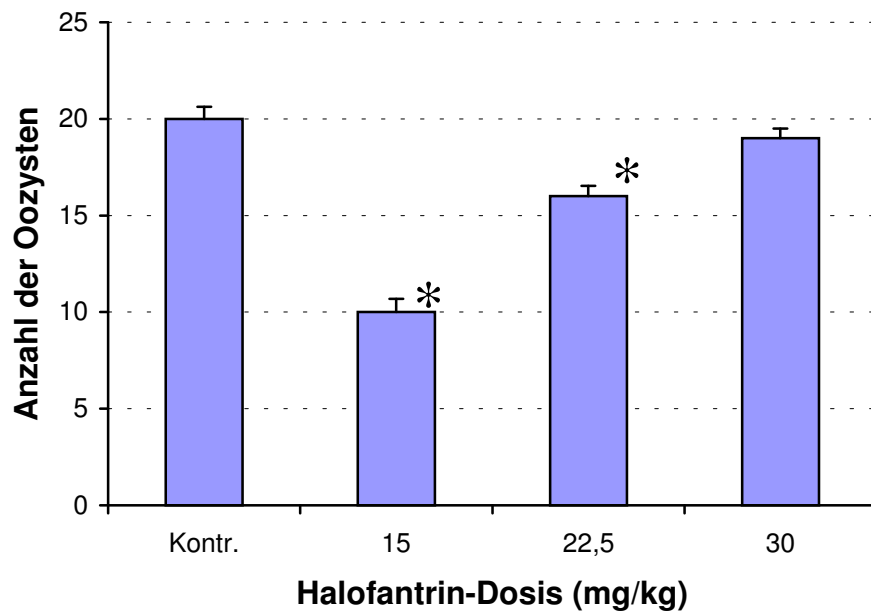


Abb. 27: Zahl der Oozysten (Median + Standardfehler) nach Behandlung der Mäuse mit Halofantrin sechs Stunden vor der Infektion der Mücken.

* signifikant gegenüber Kontrolle (Mann-Whitney U-Test, zweiseitig)

Tabelle 32: Anzahl der Oozysten in den Mitteldarmen von *Anopheles stephensi* nach Infektion mit *Plasmodium berghei*, sechs Stunden nach Behandlung der Infektionsmäuse mit Halofantrin.
(Daten zu Tabelle 31)

Kontrolle	15 mg/kg	22,5 mg/kg	30 mg/kg
12	3	9	10
12	3	10	10
12	3	10	11
13	4	11	12
15	5	11	13
15	5	11	13
16	6	11	13
16	7	11	15
16	7	11	15
17	7	13	17
17	8	13	17
17	8	13	18
17	8	13	18
17	8	13	18
17	8	14	18
17	8	14	18
18	9	15	19
19	9	15	19
19	9	15	19
19	9	15	19
20	9	15	19
20	10	15	19
20	10	16	19
20	10	16	19
21	10	16	19
21	10	17	19
21	10	17	19
21	10	17	20
22	10	17	20
22	11	17	20
22	11	18	20
22	11	18	20
23	12	18	20
23	12	19	20
23	12	19	20
23	13	19	20
24	13	19	20
24	13	19	21
24	14	20	21
25	15	20	21
26	18	20	21
26	19	20	22
27	20	21	22
28	20	21	22
28	24	23	26

Tabelle 33: Anzahl der Oozysten in den Mitteldarmen von *Anopheles stephensi* nach Infektion mit *Plasmodium berghei*, **18 h** nach Behandlung der Infektionsmäuse mit **Halofantrin**.

Halofantrin-Dosis	Kontrolle	15 mg/kg	22,5 mg/kg	30 mg/kg
Oozystenanzahl (Median) ± Standardfehler	19 ± 0,5	0 ± 0,3	0 ± 0,2	0 ± 0,6
Anzahl der Mücken	50	50	50	50
Infektionsrate (%)	100,0	20,0	12,0	12,0
Mortalität der Mücken (%)	28,0	4,0	16,0	20,0
Mann-Whitney U-Test (zweiseitig)	-	p < 0,000	p < 0,000	p < 0,000

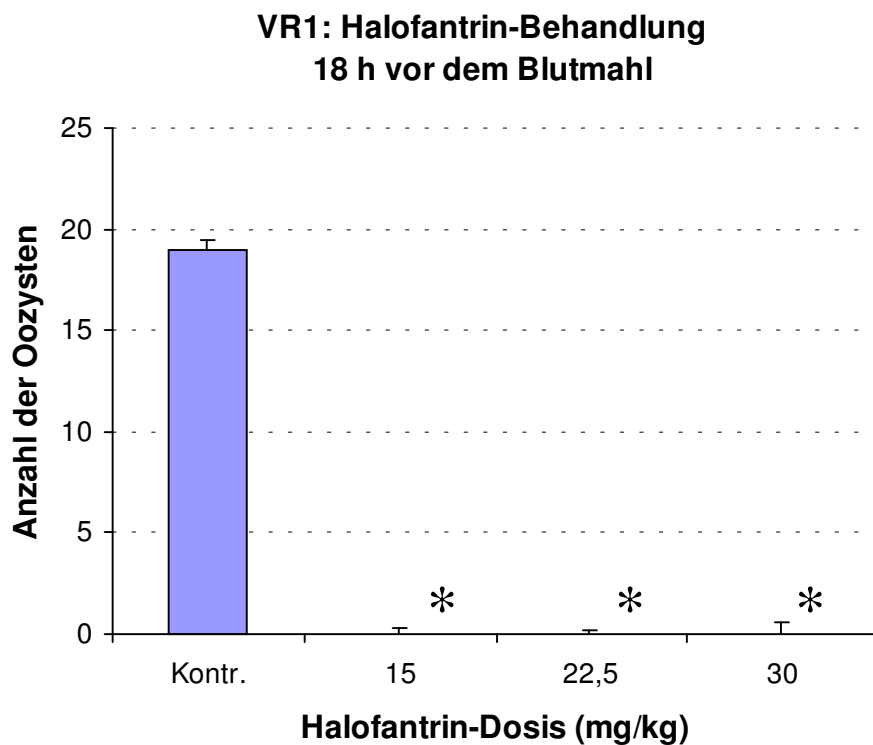


Abb. 28: Zahl der Oozysten (Median + Standardfehler) nach Behandlung der Mäuse mit Halofantrin 18 h vor der Infektion der Mücken.

* signifikant gegenüber Kontrolle (Mann-Whitney U-Test, zweiseitig)

Tabelle 34: Anzahl der Oozysten in den Mitteldarmen von *Anopheles stephensi* nach Infektion mit *Plasmodium berghei*, 18 h nach Behandlung der Infektionsmäuse mit Halofantrin. (Daten zu Tabelle 33)

Kontrolle	15 mg/kg	22,5 mg/kg	30 mg/kg
12	0	0	0
12	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
15	0	0	0
15	0	0	0
15	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
16	0	0	0
16	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
17	0	0	0
17	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
18	0	0	0
18	0	0	0
18	0	0	0
18	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
19	0	0	0
19	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0
20	0	0	0
20	0	0	0
20	0	0	0
20	0	0	0
20	0	0	0
20	0	0	0
21	0	0	0
21	0	0	0
21	0	0	0
21	0	0	0
21	0	0	0
22	0	0	0
22	0	0	0
23	1	0	0
23	2	0	0
23	3	0	0
23	3	0	0
23	5	1	1
23	7	2	1
23	7	2	2
25	8	3	3
25	8	3	5
25	9	5	7

Tabelle 35: Oozystenzahlen von *Plasmodium berghei* nach Aufnahme von verstoffwechseltem Halofantrin in einer zweiten Blutmahlzeit sechs Tage nach der Infektion. Verweildauer von **Halofantrin** im Blut betrug **6 h**.

Halofantrin-Dosis	Kontrolle	15 mg/kg	22,5 mg/kg	30 mg/kg
Oozystenzahl (Median) ± Standardfehler	19 ± 0,4	22 ± 0,5	21 ± 0,5	21 ± 0,5
Anzahl der Mücken	49	50	49	49
Infektionsrate (%)	100,0	100,0	100,0	100,0
Mortalität der Mücken (%)	8,2	6,0	6,1	8,2
Mann-Whitney U-Test (zweiseitig)	-	p < 0,017	p < 0,016	n.s.

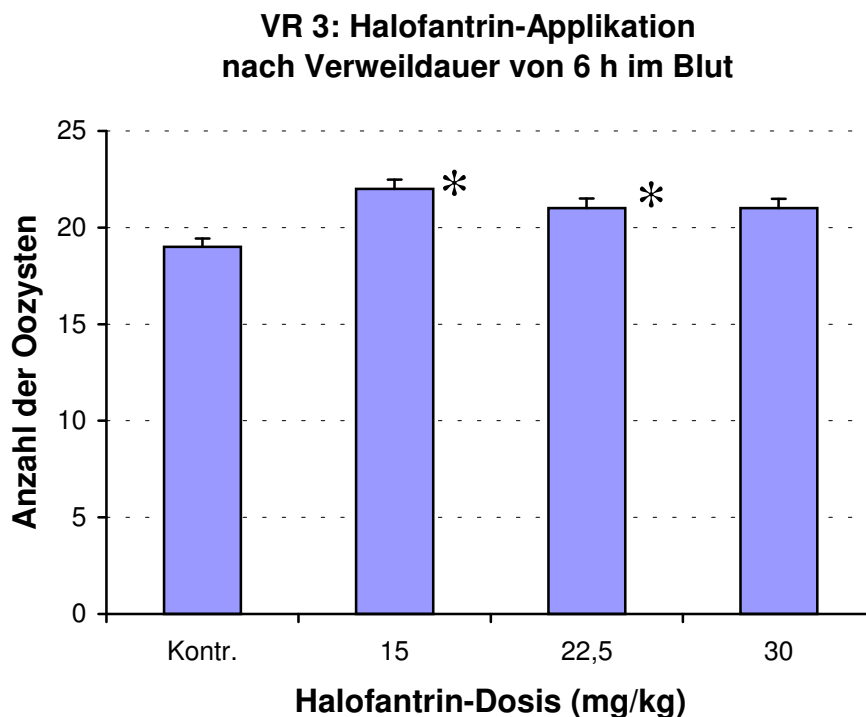


Abb. 29: Oozystenzahlen von *Plasmodium berghei* in *Anopheles stephensi* nach Applikation von Halofantrin nach Verweildauer von 6 h im Blut.
* signifikant gegenüber Kontrolle (Mann-Whitney U-Test, zweiseitig)

Tabelle 36: Oozystenzahlen von *Plasmodium berghei* nach Aufnahme von verstoffwechseltem Halofantrin in einer zweiten Blutmahlzeit sechs Tage nach der Infektion. Verweildauer von Halofantrin im Blut betrug 6 h. (Daten zu Tabelle 35)

Kontrolle	15 mg/kg	22,5 mg/kg	30 mg/kg
10	11	10	10
15	15	10	11
17	15	17	11
17	17	17	15
17	17	18	17
18	18	18	17
18	18	18	18
18	19	19	18
18	19	19	19
19	19	19	19
19	19	20	19
19	19	20	19
19	19	20	20
19	20	20	20
19	20	20	20
19	20	20	20
19	20	20	20
19	20	20	20
19	21	20	20
19	21	21	20
19	21	21	21
19	21	21	21
19	22	21	21
19	22	21	21
20	22	21	21
20	22	21	21
20	22	22	21
20	22	22	21
20	23	22	21
20	23	22	22
20	23	23	22
21	23	23	22
21	23	23	22
21	23	23	22
21	24	23	22
21	24	24	23
22	24	24	23
23	24	24	23
23	24	24	23
24	25	24	24
24	25	25	24
24	25	25	24
24	25	25	24
25	26	25	25
25	26	25	25
25	26	28	25
26	27	28	25
27	27	29	27
	28		

Tabelle 37: Oozystenzahlen von *Plasmodium berghei* nach Aufnahme von verstoffwechseltem Halofantrin in einer zweiten Blutmahlzeit sechs Tage nach der Infektion. Verweildauer von **Halofantrin** im Blut betrug **24 h**.

Halofantrin-Dosis	Kontrolle	15 mg/kg	22,5 mg/kg	30 mg/kg
Oozystenzahl (Median) ± Standardfehler	18 ± 0,5	19 ± 0,5	17 ± 0,5	18 ± 0,4
Anzahl der Mücken	39	41	39	41
Infektionsrate (%)	100,0	100,0	100,0	100,0
Mortalität der Mücken (%)	12,8	17,1	15,4	12,2
Mann-Whitney U-Test (zweiseitig)	-	n.s.	n.s.	n.s.

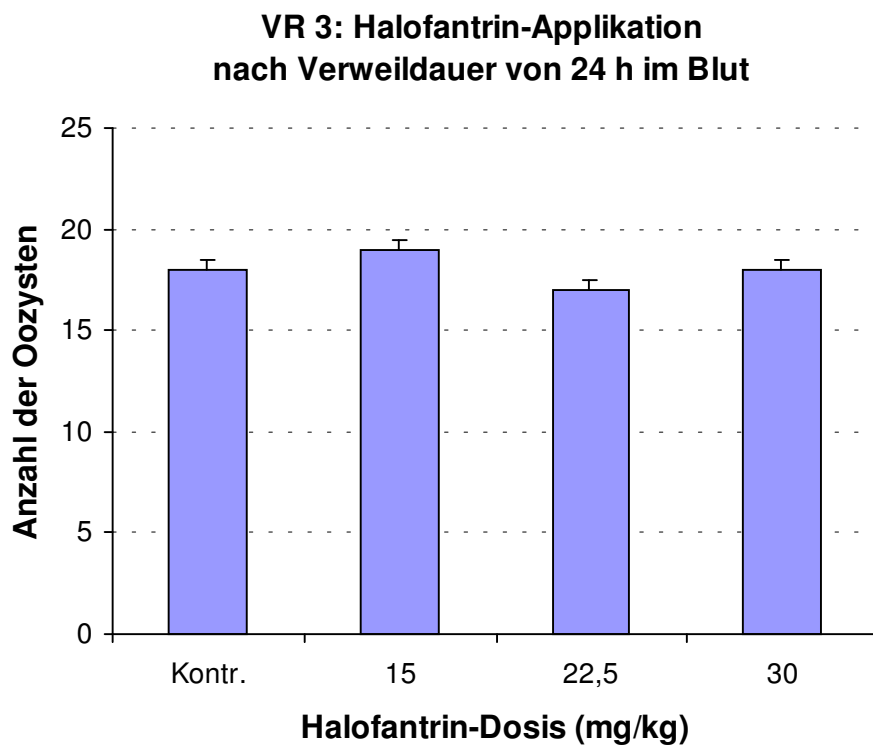


Abb. 30: Oozystenzahlen von *Plasmodium berghei* in *Anopheles stephensi* nach Applikation von Halofantrin nach Verweildauer von 24 h im Blut.
* signifikant gegenüber Kontrolle (Mann-Whitney U-Test, zweiseitig)

Tabelle 38: Oozystenzahlen von *Plasmodium berghei* nach Aufnahme von verstoffwechseltem Halofantrin in einer zweiten Blutmahlzeit sechs Tage nach der Infektion. Verweildauer von Halofantrin im Blut betrug 24 h. (Daten zu Tabelle 37)

Kontrolle	15 mg/kg	22,5 mg/kg	30 mg/kg
11	11	14	12
15	14	14	15
15	14	15	15
15	16	15	15
15	17	16	15
15	17	16	15
15	17	16	16
16	17	16	16
16	17	17	16
17	17	17	17
17	17	17	17
17	17	17	17
17	17	17	17
17	17	17	17
17	18	17	17
17	18	17	17
17	18	17	17
18	19	17	17
18	19	17	18
18	19	17	18
18	19	17	18
18	19	18	18
18	19	19	19
20	19	19	19
20	19	19	19
20	19	19	19
20	19	19	19
20	20	19	20
20	20	19	20
20	20	20	20
20	21	20	20
20	22	22	20
20	22	23	20
23	23	23	21
23	23	23	21
23	23	23	23
23	23	23	23
23	23	23	23
23	23	25	23
24	23	26	23
	23		23
	24		23

Tabelle 39: Anzahl der Oozysten in den Mitteldarmen von *Anopheles stephensi* nach Infektion mit *Plasmodium berghei*, **zwei Stunden** nach Behandlung der Infektionsmäuse mit **Mefloquin**.

Mefloquin-Dosis	Kontrolle	5,5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Oozystenanzahl (Median) ± Standardfehler	21 ± 0,8	21 ± 0,8	20 ± 0,7	21 ± 0,5
Anzahl der Mücken	46	46	46	46
Infektionsrate (%)	100,0	100,0	100,0	100,0
Mortalität der Mücken (%)	8,7	6,5	4,3	8,7
Mann-Whitney U-Test (zweiseitig)	-	n.s.	n.s.	n.s.

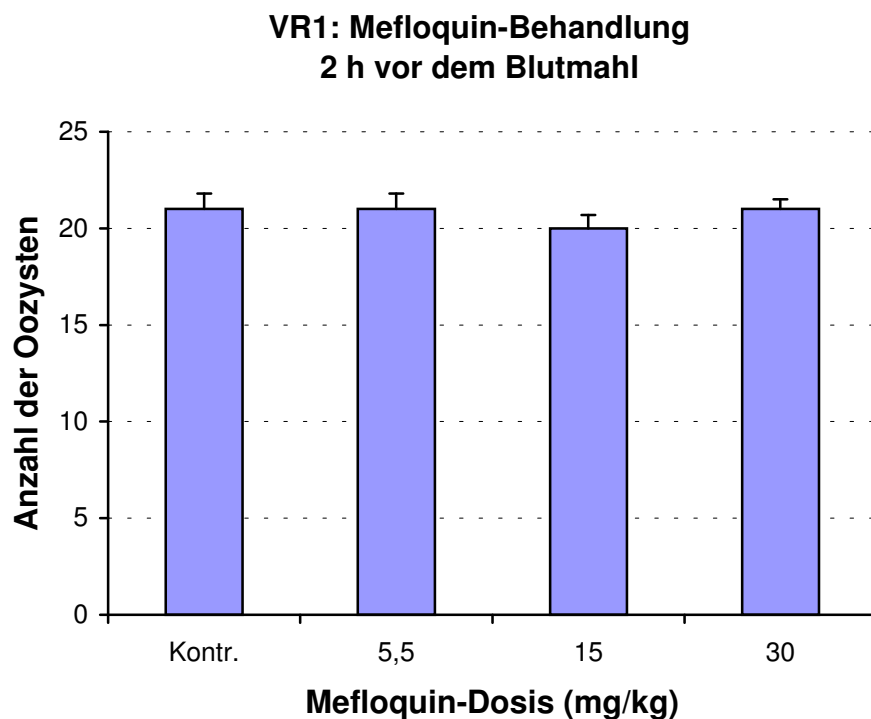


Abb. 31: Zahl der Oozysten (Median + Standardfehler) nach Behandlung der Mäuse mit Mefloquin zwei Stunden vor der Infektion der Mücken.

Tabelle 40: Anzahl der Oozysten in den Mitteldarmen von *Anopheles stephensi* nach Infektion mit *Plasmodium berghei*, zwei Stunden nach Behandlung der Infektionsmäuse mit Mefloquin. (Daten zu Tabelle 39)

Kontrolle	5,5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
10	10	10	14
11	10	11	14
11	11	13	15
15	14	14	18
15	15	14	19
15	15	14	19
17	15	15	19
17	15	15	19
18	17	16	19
19	17	17	19
19	17	17	19
19	18	17	19
19	19	17	19
19	19	18	20
19	19	18	20
19	19	18	20
20	20	19	20
20	20	19	20
20	20	19	20
20	20	19	20
20	20	19	21
20	21	19	21
21	21	20	21
21	21	20	21
22	22	20	22
22	23	20	22
22	23	20	23
22	25	20	23
23	25	20	23
24	25	21	23
25	25	21	23
25	25	21	23
25	25	23	24
25	25	23	24
27	26	23	25
27	26	23	25
28	28	23	25
28	28	25	25
28	28	25	27
28	28	25	27
28	29	25	27
28	30	28	27
29	30	29	27
30	33	30	28
40	33	33	28

Tabelle 41: Anzahl der Oozysten in den Mitteldarmen von *Anopheles stephensi* nach Infektion mit *Plasmodium berghei*, **24 Stunden** nach Behandlung der Infektionsmäuse mit **Mefloquin**.

Mefloquin-Dosis	Kontrolle	5,5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Oozystenanzahl (Median) ± Standardfehler	18 ± 0,7	0 ± 0,9	0 ± 0,3	0 ± 0,4
Anzahl der Mücken	47	48	49	48
Infektionsrate (%)	100,0	29,2	12,2	12,5
Mortalität der Mücken (%)	19,1	18,8	16,3	10,4
Mann-Whitney U-Test (zweiseitig)	-	p < 0,000	p < 0,000	p < 0,000

**VR1: Mefloquin-Behandlung
24 h vor dem Blutmahl**

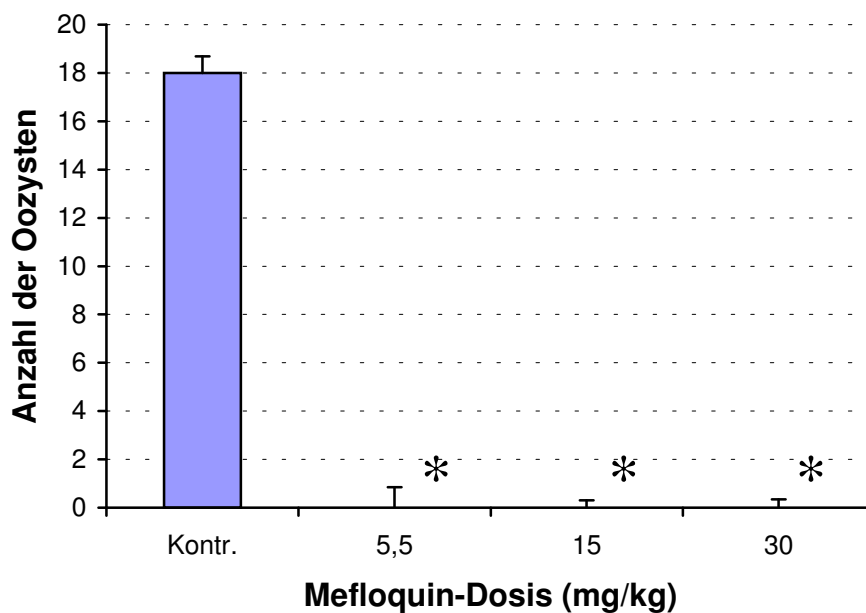


Abb. 32: Zahl der Oozysten (Median + Standardfehler) nach Behandlung der Mäuse mit Mefloquin 24 Stunden vor der Infektion der Mücken.

* signifikant gegenüber Kontrolle (Mann-Whitney U-Test, zweiseitig)

Tabelle 42: Anzahl der Oozysten in den Mitteldarmen von *Anopheles stephensi* nach Infektion mit *Plasmodium berghei*, 24 Stunden nach Behandlung der Infektionsmäuse mit Mefloquin. (Daten zu Tabelle 41)

Kontrolle	5,5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
10	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
14	0	0	0
14	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
15	0	0	0
15	0	0	0
15	0	0	0
15	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
17	0	0	0
17	0	0	0
17	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
18	0	0	0
18	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
19	0	0	0
19	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0
20	0	0	0
20	0	0	0
21	0	0	0
22	1	0	0
22	4	0	0
22	4	0	0
22	5	0	0
22	5	0	0
23	10	0	0
23	11	0	0
24	11	0	0
24	12	0	1
26	13	1	1
26	17	3	2
30	18	5	9
32	19	8	10
	20	8	11
		9	

Tabelle 43: Oozystenzahlen von *Plasmodium berghei* nach Aufnahme von verstoffwechseltem **Mefloquin** in einer zweiten Blutmahlzeit sechs Tage nach der Infektion. Verweildauer von Mefloquin im Blut betrug **2 h**.

Mefloquin-Dosis	Kontrolle	5,5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Oozystenzahl (Median) ± Standardfehler	25 ± 0,8	26 ± 0,7	26 ± 0,8	25 ± 0,9
Anzahl der Mücken	52	52	49	49
Infektionsrate (%)	100,0	100,0	98,0	100,0
Mortalität der Mücken (%)	9,6	7,7	6,1	10,2
Mann-Whitney U-Test (zweiseitig)	-	n.s.	n.s.	n.s.

**VR 3: Mefloquin-Applikation
nach Verweildauer von 2 h im Blut**

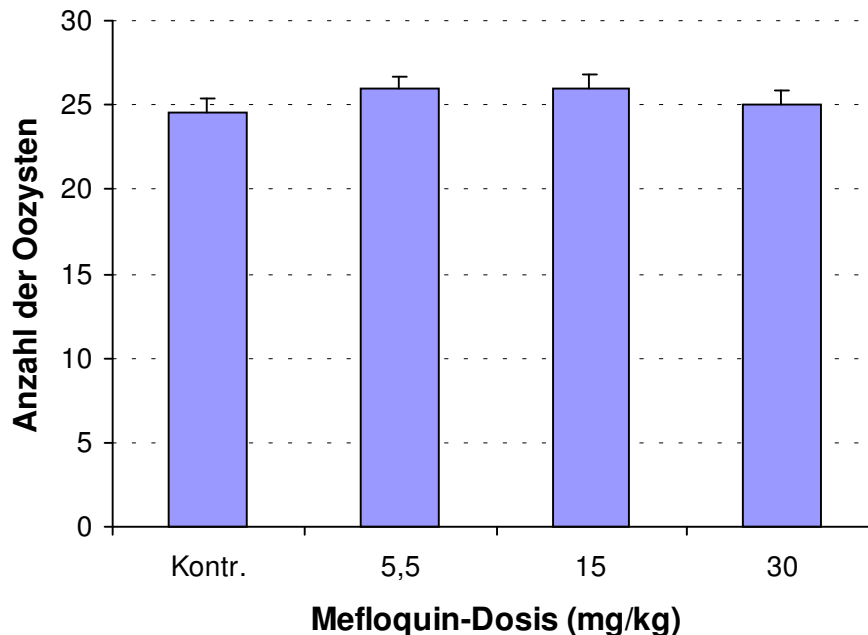


Abb. 33: Oozystenzahlen von *Plasmodium berghei* in *Anopheles stephensi* nach Applikation von Mefloquin nach Verweildauer von 2 h im Blut.

Tabelle 44: Oozystenzahlen von *Plasmodium berghei* nach Aufnahme von verstoffwechseltem Mefloquin in einer zweiten Blutmahlzeit sechs Tage nach der Infektion. Verweildauer von Mefloquin im Blut betrug 2 h. (Daten zu Tabelle 43)

Kontrolle	5,5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
11	16	0	7
15	19	16	11
16	20	17	11
17	20	19	11
19	20	19	15
19	20	20	15
19	20	20	17
19	21	20	19
19	21	20	19
19	21	20	19
20	21	20	19
20	21	20	19
20	22	21	20
20	23	22	20
20	23	23	20
21	23	23	20
21	23	23	21
21	24	25	21
22	25	25	22
22	25	25	23
23	25	25	23
23	25	25	24
23	25	25	25
23	25	26	25
23	25	26	25
24	26	26	25
25	26	27	25
25	26	27	26
25	26	27	27
25	27	27	27
25	27	27	27
25	27	27	27
26	27	28	27
26	27	28	27
26	27	28	27
27	27	28	28
27	28	28	28
27	28	28	28
27	28	28	28
27	29	29	29
27	30	29	29
28	30	30	29
28	30	30	29
28	30	31	30
29	30	32	30
30	31	33	31
30	31	33	31
30	33	35	33
32	37	37	33
33	39		
44	40		
44	41		

Tabelle 45: Oozystenzahlen von *Plasmodium berghei* nach Aufnahme von verstoffwechseltem **Mefloquin** in einer zweiten Blutmahlzeit sechs Tage nach der Infektion. Verweildauer von Mefloquin im Blut betrug **24 h**.

Mefloquin-Dosis	Kontrolle	5,5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Oozystenzahl (Median) ± Standardfehler	23 ± 0,7	23 ± 0,7	25 ± 0,8	21 ± 0,8
Anzahl der Mücken	50	50	50	50
Infektionsrate (%)	100,0	100,0	100,0	100,0
Mortalität der Mücken (%)	6,0	4,0	8,0	8,0
Mann-Whitney U-Test (zweiseitig)	-	n.s.	n.s.	n.s.

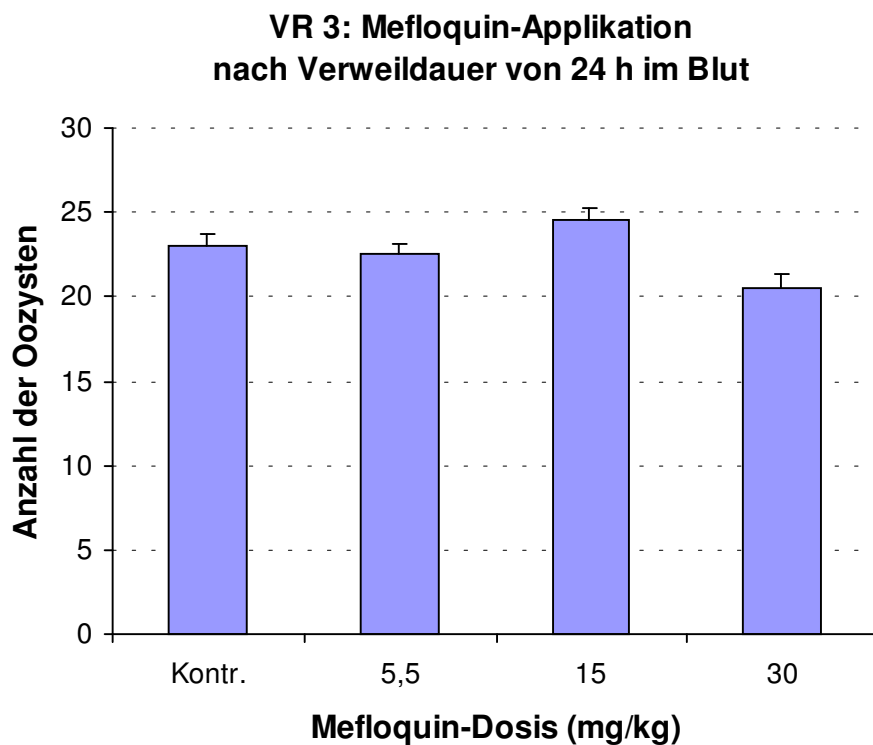


Abb. 34: Oozystenzahlen von *Plasmodium berghei* in *Anopheles stephensi* nach Applikation von Mefloquin nach Verweildauer von 24 h im Blut.

Tabelle 46: Oozystenzahlen von *Plasmodium berghei* nach Aufnahme von verstoffwechseltem Mefloquin in einer zweiten Blutmahlzeit sechs Tage nach der Infektion. Verweildauer von Mefloquin im Blut betrug 24 h. (Daten zu Tabelle 45)

Kontrolle	5,5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
14	11	10	6
14	12	10	10
15	13	10	11
17	15	11	11
17	15	13	12
17	18	14	15
18	19	18	15
18	19	19	15
19	19	19	17
19	19	19	17
19	19	20	17
19	20	20	18
20	20	20	18
20	20	20	19
20	20	21	19
20	20	22	19
21	20	22	19
21	20	23	19
21	20	23	20
22	20	23	20
22	21	23	20
22	21	23	20
23	21	23	20
23	22	24	20
23	22	24	20
23	23	25	21
23	23	25	21
23	23	25	22
24	23	25	22
25	25	25	23
25	25	25	23
25	25	25	23
25	25	25	23
25	25	26	24
25	25	26	24
26	25	26	25
26	25	27	25
27	25	27	25
27	25	27	25
27	26	27	25
27	26	28	26
27	27	29	26
27	27	29	27
28	27	29	27
29	28	29	27
30	28	30	28
30	30	30	29
30	30	30	30
32	30	32	33
39	33	33	35

Tabelle 47: Anzahl der Oozysten in den Mitteldarmen von *Anopheles stephensi* nach Infektion mit *Plasmodium berghei*, **zwei Stunden** nach Behandlung der Infektionsmäuse mit **Chinin**.

Chinin-Dosis	Kontrolle	50 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg
Oozystenanzahl (Median) ± Standardfehler	25 ± 0,5	21 ± 0,8	1 ± 3,2	0 ± 0,1
Anzahl der Mücken	50	50	49	49
Infektionsrate (%)	100,0	100,0	53,1	18,4
Mortalität der Mücken (%)	46,0	42,0	51,0	53,1
Mann-Whitney U-Test (zweiseitig)	-	p < 0,000	p < 0,000	p < 0,000

**VR1: Chinin-Behandlung
2 h vor dem Blutmahl**

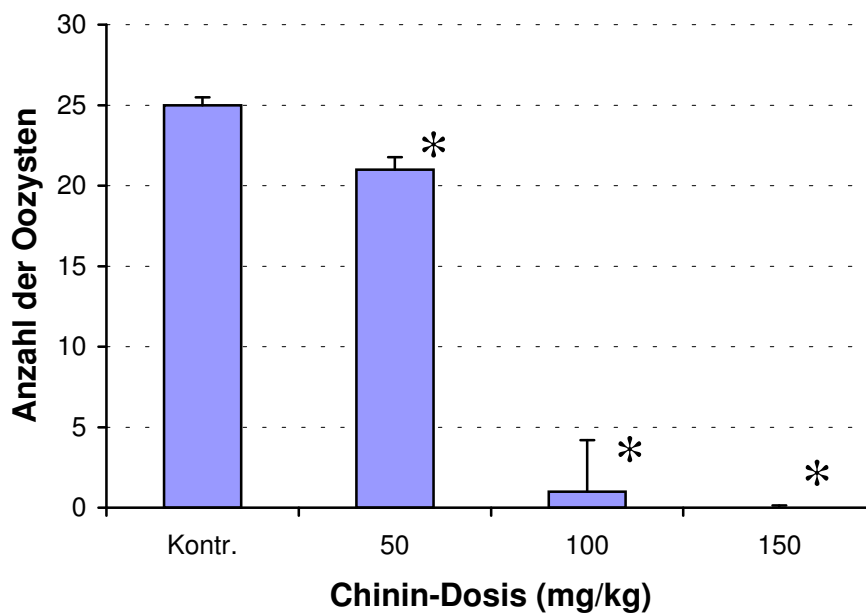


Abb. 35: Zahl der Oozysten (Median + Standardfehler) nach Behandlung der Mäuse mit Chinin zwei Stunden vor der Infektion der Mücken.

* signifikant gegenüber Kontrolle (Mann-Whitney U-Test, zweiseitig)

Tabelle 48: Anzahl der Oozysten in den Mitteldarmen von *Anopheles stephensi* nach Infektion mit *Plasmodium berghei*, zwei Stunden nach Behandlung der Infektionsmäuse mit Chinin. (Daten zu Tabelle 47)

Kontrolle	50 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg
18	10	0	0
19	11	0	0
19	11	0	0
19	13	0	0
20	13	0	0
20	13	0	0
20	13	0	0
21	15	0	0
22	15	0	0
22	15	0	0
22	15	0	0
23	17	0	0
23	17	0	0
23	18	0	0
23	18	0	0
23	19	0	0
23	19	0	0
23	19	0	0
23	19	0	0
23	19	0	0
23	19	0	0
24	19	0	0
24	19	0	0
24	19	0	0
24	20	1	0
25	20	1	0
25	22	1	0
25	22	3	0
25	22	3	0
25	22	3	0
25	23	3	0
25	23	3	0
25	23	3	0
25	23	3	0
25	23	3	0
25	23	3	0
26	23	3	0
26	23	5	0
27	23	5	0
27	23	5	0
27	25	5	0
27	25	5	0
27	25	7	1
28	25	7	1
28	27	10	1
30	27	10	1
30	27	10	2
30	30	13	3
30	30	15	3
30	30	19	3
31	30	158	4
33	32		

Tabelle 49: Anzahl der Oozysten in den Mitteldarmen von *Anopheles stephensi* nach Infektion mit *Plasmodium berghei*, **24 Stunden** nach Behandlung der Infektionsmäuse mit **Chinin**.

Chinin-Dosis	Kontrolle	50 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg
Oozystenanzahl (Median) ± Standardfehler	20 ± 0,8	0 ± 0,5	0 ± 0,3	0 ± 0,2
Anzahl der Mücken	50	49	47	46
Infektionsrate (%)	100,0	34,7	29,8	28,3
Mortalität der Mücken (%)	40,0	38,8	38,3	45,7
Mann-Whitney U-Test (zweiseitig)	-	p < 0,000	p < 0,000	p < 0,000

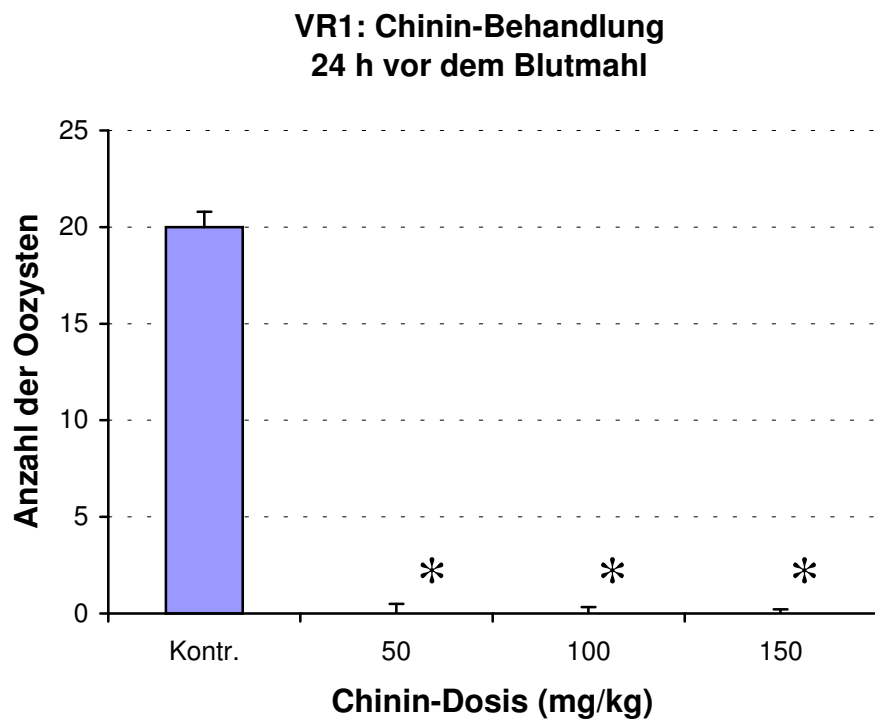


Abb. 36: Zahl der Oozysten (Median + Standardfehler) nach Behandlung der Mäuse mit Chinin 24 Stunden vor der Infektion der Mücken.

* signifikant gegenüber Kontrolle (Mann-Whitney U-Test, zweiseitig)

Tabelle 50: Anzahl der Oozysten in den Mitteldarmen von *Anopheles stephensi* nach Infektion mit *Plasmodium berghei*, 24 Stunden nach Behandlung der Infektionsmäuse mit Chinin. (Daten zu Tabelle 49)

Kontrolle	50 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg
2	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
11	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
13	0	0	0
15	0	0	0
17	0	0	0
17	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
19	0	0	0
19	0	0	0
19	0	0	0
19	0	0	0
19	0	0	0
19	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0
20	0	0	0
20	0	0	0
20	0	0	0
20	0	0	0
21	0	0	0
21	0	0	0
21	0	0	0
22	0	0	0
22	0	0	0
22	1	0	0
22	1	1	1
22	3	1	1
23	3	3	1
23	5	3	1
23	5	3	1
23	5	3	2
23	5	3	2
25	5	4	3
25	7	5	3
25	7	5	3
25	7	5	3
25	7	7	5
27	9	7	7
27	9	9	
27	11		
28	13		
29			

Tabelle 51: Oozystenzahlen von *Plasmodium berghei* nach Aufnahme von verstoffwechseltem Chinin in einer zweiten Blutmahlzeit sechs Tage nach der Infektion. Verweildauer von **Chinin** im Blut betrug **2 h**.

Chinin-Dosis	Kontrolle	50 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg
Oozystenzahl (Median) ± Standardfehler	23 ± 0,6	21 ± 0,6	21 ± 0,6	21 ± 0,6
Anzahl der Mücken	45	45	44	45
Infektionsrate (%)	100,0	100,0	100,0	100,0
Mortalität der Mücken (%)	11,1	8,9	11,4	8,9
Mann-Whitney U-Test (zweiseitig)	-	n.s.	n.s.	n.s.

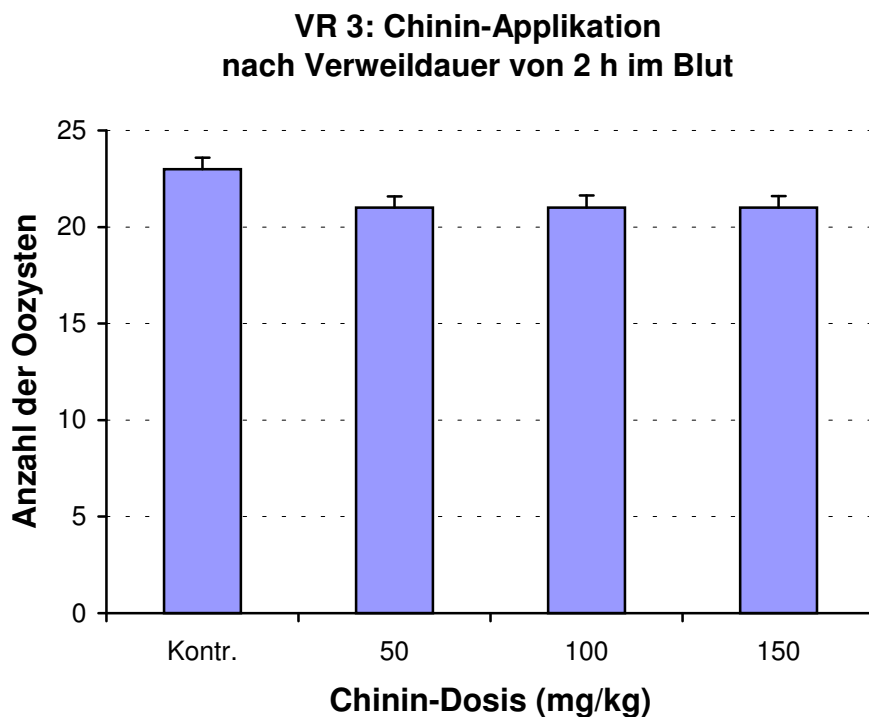


Abb. 37: Oozystenzahlen von *Plasmodium berghei* in *Anopheles stephensi* nach Applikation von Chinin nach Verweildauer von 2 h im Blut.

Tabelle 52: Oozystenzahlen von *Plasmodium berghei* nach Aufnahme von verstoffwechseltem Chinin in einer zweiten Blutmahlzeit sechs Tage nach der Infektion. Verweildauer von Chinin im Blut betrug 2 h. (Daten zu Tabelle 51)

Kontrolle	50 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg
11	15	11	11
15	15	11	15
17	17	15	15
19	17	15	17
19	17	16	17
19	17	17	17
19	17	17	17
19	18	18	18
20	18	19	19
20	19	19	19
20	20	19	19
21	20	19	19
21	20	19	19
21	20	19	20
21	20	20	20
21	20	20	20
22	20	20	20
22	20	20	20
22	20	20	20
22	20	20	20
22	21	20	20
23	21	21	20
23	21	21	21
23	22	21	21
23	22	21	21
23	22	22	21
24	22	22	21
24	23	22	21
25	23	23	22
25	24	23	22
25	24	23	23
25	24	23	23
25	24	24	23
25	24	24	23
26	25	25	24
27	25	25	24
27	25	25	25
27	26	26	25
27	27	27	25
28	27	27	27
28	28	28	27
28	29	28	28
30	29	29	30
30	30	30	30
30	30		31

Tabelle 53: Oozystenzahlen von *Plasmodium berghei* nach Aufnahme von verstoffwechseltem Chinin in einer zweiten Blutmahlzeit sechs Tage nach der Infektion. Verweildauer von **Chinin** im Blut betrug **24 h**.

Chinin-Dosis	Kontrolle	50 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg
Oozystenzahl (Median) ± Standardfehler	20 ± 5,7	22 ± 3,8	20 ± 0,7	20 ± 0,8
Anzahl der Mücken	45	47	45	46
Infektionsrate (%)	100,0	100,0	100,0	100,0
Mortalität der Mücken (%)	13,3	19,1	11,1	13,0
Mann-Whitney U-Test (zweiseitig)	-	n.s.	n.s.	n.s.

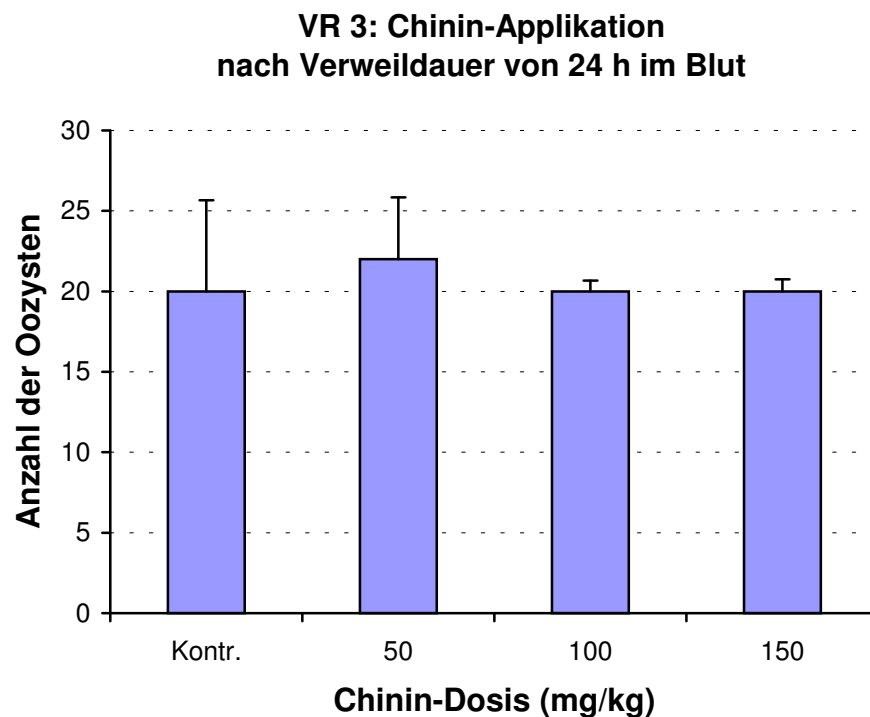


Abb. 38: Oozystenzahlen von *Plasmodium berghei* in *Anopheles stephensi* nach Applikation von Chinin nach Verweildauer von 24 h im Blut.

Tabelle 54: Oozystenzahlen von *Plasmodium berghei* nach Aufnahme von verstoffwechseltem Chinin in einer zweiten Blutmahlzeit sechs Tage nach der Infektion. Verweildauer von Chinin im Blut betrug 24 h. (Daten zu Tabelle 53)

Kontrolle	50 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg
11	7	5	1
12	8	9	9
13	10	15	11
13	10	17	11
13	11	17	13
15	11	18	13
17	17	18	15
17	19	18	17
17	19	19	17
17	19	19	17
18	19	19	17
19	19	19	17
19	20	19	18
19	20	20	18
19	20	20	19
19	20	20	19
20	20	20	19
20	20	20	20
20	20	20	20
20	20	20	20
20	20	20	20
20	21	20	20
20	21	20	20
20	22	20	20
20	22	21	20
20	23	22	21
21	23	22	21
21	23	23	21
21	23	23	21
22	23	23	21
22	23	23	22
23	23	23	22
23	23	23	22
23	24	23	22
24	24	25	23
25	25	25	23
25	25	25	23
25	25	25	23
25	25	25	24
26	25	27	24
27	25	27	25
27	26	27	26
28	28	27	26
30	28	28	26
274	29	28	28
	29		29
	198		

7.2 Untersuchungen zur Wirkung von Halofantrin, Mefloquin bzw. Chinin auf Gamogonie und Sporogonie

7.2.1 Applikation von Halofantrin in infiziertem Blut

In dieser Versuchsreihe wurden mit *Plasmodium berghei* infizierte Mäuse in unterschiedlichen Abständen vor der Blutmahlzeit der Mücken mit unterschiedlichen Dosen (15 mg, 22,5 mg bzw. 30 mg Base pro Körpergewicht der Maus) Halofantrin behandelt, so dass das Medikament unterschiedlich lange auf die Parasiten, *Plasmodium berghei*, im Blut einwirken konnte.

7.2.1.1 Behandlung der infizierten Mäuse 6 Stunden vor Infektion der Mücken

In diesem Versuch wurden die Mäuse zwei Tage nach Infektion mit *Plasmodium berghei* mit Halofantrin behandelt und 6 Stunden danach zur Infektion der Mücken verwendet. Hier scheint der Fall vorzuliegen, dass eine geringe Dosis Halofantrin einen hemmenden Effekt auf die Entwicklungsstadien von *Plasmodium berghei* in den Mücken hat, der mit steigender Dosis abnimmt. Der hemmende Effekt der geringeren Konzentrationen und die daraus resultierenden Reduktionen der Oozystenanzahl sind signifikant unterschiedlich zu der Kontrolle (Tabelle 31, Abb. 27).

7.2.1.2 Behandlung der infizierten Mäuse 18 Stunden vor Infektion der Mücken

In diesem Versuch wurden die Mäuse zwei Tage nach Infektion mit *Plasmodium berghei* mit Halofantrin behandelt und 18 Stunden danach zur Infektion der Mücken verwendet. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche und signifikante Verringerung der Oozystenanzahlen und Infektionsraten durch die Behandlung der Mäuse mit den unterschiedlichen Dosen von Halofantrin. Die Verringerung ist in allen Gruppen gegenüber der Kontrolle signifikant (Tabelle 33, Abb. 28).

7.2.2 Applikation von verstoffwechseltem Halofantrin in nicht infiziertem Blut

In dieser Versuchsreihe wurden die infizierten Mücken mit Halofantrin behandelt, indem sie ein Blutmahl an den gesunden Mäusen erhielten, denen zuvor Halofantrin mit unterschiedlichen Zeitabständen in unterschiedlichen Dosen injiziert worden war. Bei diesem Versuch sollte der Einfluss von verstoffwechseltem Medikament auf die Sporogoniestadien von *Plasmodium berghei* in der Mücke untersucht werden.

7.2.2.1 Behandlung gesunder Mäuse mit Halofantrin 6 Stunden vor der zweiten Blutmahlzeit

Den Mücken wurde am 7. Tag nach Infektion mit *Plasmodium berghei* eine zweite Blutmahlzeit angeboten. Zu diesem Zweck wurden gesunde Mäuse 6 Stunden vor dieser Fütterung mit unterschiedlichen Dosen (15 mg, 22,5 mg und 30 mg Base pro Körpergewicht der Maus) Halofantrin behandelt. Zur Fütterung der Kontrollmücken erhielt eine Maus eine Injektion von 7,5 µl Ethanol in 0,3 ml physiologischer Kochsalzlösung.

Die Erhöhung der durchschnittlichen Oozystenanzahlen pro infizierte Mücke für die Dosis von 15 mg bzw. 22,5 mg pro Körpergewicht ist zwar statistisch signifikant, aber die Unterschiede der Werte zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe waren nicht groß genug, eine Aussage daraus zu machen (Tabelle 35, Abb. 29).

7.2.2.2 Behandlung gesunder Mäuse mit Halofantrin 24 Stunden vor der zweiten Blutmahlzeit

In einem anderen Versuch, wobei gesunde Mäuse 24 Stunden vor der zweiten Blutmahlzeit zur Behandlung infizierter Mücken mit Halofantrin appliziert worden waren, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Oozystenanzahlen zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe (Tabelle 37, Abb. 30).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Halofantrin schizontozidale und/oder gametozide Wirkung auf *Plasmodium berghei* hat, allerdings bei einer geringeren Dosis stärkere Wirkung, wenn das Medikament 6 Stunden lang im infizierten Blut einwirken konnte. Halofantrin

zeigte außer dem eine leicht stimulierende Wirkung auf die Sporogoniestadien von *Plasmodium berghei*, wenn das 6 Stunde lang im Blut stoffverwechselt wurde.

7.2.3 Applikation von Mefloquin in infiziertem Blut

In dieser Versuchsreihe wurden mit *Plasmodium berghei* infizierte Mäuse in unterschiedlichen Abständen vor der Blutmahlzeit der Mücken mit unterschiedlichen Dosen (5,5 mg, 15 mg bzw. 30 mg Base pro Körpergewicht der Maus) Mefloquin behandelt, so dass das Medikament unterschiedlich lange auf die Parasiten, *Plasmodium berghei*, im Blut einwirken konnte.

7.2.3.1 Behandlung der infizierten Mäuse 2 Stunden vor Infektion der Mücken

In diesem Versuch wurden die Mäuse zwei Tage nach Infektion mit *Plasmodium berghei* mit Mefloquin behandelt und 2 Stunden danach zur Infektion der Mücken verwendet. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Oozystenanzahlen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe (Tabelle 39, Abb. 31).

7.2.3.2 Behandlung der infizierten Mäuse 24 Stunden vor Infektion der Mücken

In diesem Versuch wurden die Mäuse zwei Tage nach Infektion mit *Plasmodium berghei* mit Mefloquin behandelt und 24 Stunden danach zur Infektion der Mücken verwendet. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche und signifikante Verringerung der Oozystenanzahlen und Infektionsraten durch die Behandlung der Mäuse mit den unterschiedlichen Dosen von Mefloquin (Tabelle 41, Abb. 32).

7.2.4 Applikation von verstoffwechseltem Mefloquin in nicht infiziertem Blut

In dieser Versuchsreihe wurden die infizierten Mücken mit Mefloquin behandelt, indem sie ein Blutmahl an den gesunden Mäusen erhielten, denen zuvor Mefloquin mit unterschiedlichen Zeitabständen in unterschiedlichen Dosen injiziert worden war. Bei diesem

Versuch sollte der Einfluss von verstoffwechseltem Medikament auf die Sporogoniestadien von *Plasmodium berghei* in der Mücke untersucht werden.

7.2.4.1 Behandlung gesunder Mäuse mit Mefloquin 2 Stunden vor der zweiten Blutmahlzeit

Den Mücken wurde am 7. Tag nach Infektion mit *Plasmodium berghei* eine zweite Blutmahlzeit angeboten. Zu diesem Zweck wurden gesunde Mäuse 2 Stunden vor dieser Fütterung mit unterschiedlichen Dosen (5,5 mg, 15 mg und 30 mg Base pro Körpergewicht der Maus) Mefloquin behandelt.

Bei allen Versuchsgruppen waren keine signifikanten Unterschiede der Oozystenanzahlen gegenüber der Kontrollgruppe zu sehen (Tabelle 43, Abb. 33).

7.2.4.2 Behandlung gesunder Mäuse mit Mefloquin 24 Stunden vor der zweiten Blutmahlzeit

In einem anderen Versuch, wobei gesunde Mäuse 24 Stunden vor der zweiten Blutmahlzeit zur Behandlung infizierter Mücken mit Mefloquin appliziert worden waren, ergaben sich ebenso keine signifikanten Unterschiede der Oozystenanzahlen zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe (Tabelle 45, Abb. 34).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Mefloquin schizontozidale und/oder gametozide Wirkung auf *Plasmodium berghei* hat, wenn das Medikament 24 Stunden lang im infizierten Blut einwirken konnte, und dass Mefloquin keine sporontozide Wirkung auf diese Parasiten in den verwendeten Dosen.

7.2.5 Applikation von Chinin in infiziertem Blut

In dieser Versuchsreihe wurden mit *Plasmodium berghei* infizierte Mäuse in unterschiedlichen Abständen vor der Blutmahlzeit der Mücken mit unterschiedlichen Dosen (50 mg, 100 mg bzw. 150 mg Base pro Körpergewicht der Maus) Chinin behandelt, so dass

das Medikament unterschiedlich lange auf die Parasiten, *Plasmodium berghei*, im Blut einwirken konnte.

7.2.5.1 Behandlung der infizierten Mäuse 2 Stunden vor Infektion der Mücken

In diesem Versuch wurden die Mäuse zwei Tage nach Infektion mit *Plasmodium berghei* mit Chinin behandelt und 2 Stunden danach zur Infektion der Mücken verwendet. Bei einer Dosis von 50 mg/kg ergab sich eine signifikante Reduzierung der Oozystenanzahl; dieser hemmende Effekt nahm mit steigender Dosis stark zu (Tabelle 47, Abb. 35).

7.2.5.2 Behandlung der infizierten Mäuse 24 Stunden vor Infektion der Mücken

In diesem Versuch wurden die Mäuse zwei Tage nach Infektion mit *Plasmodium berghei* mit Chinin behandelt und 24 Stunden danach zur Infektion der Mücken verwendet. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche und signifikante Verringerung der Oozystenanzahl und Infektionsraten durch die Behandlung der Mäuse mit den unterschiedlichen Dosen von Chinin (Tabelle 49, Abb. 36).

7.2.6 Applikation von verstoffwechseltem Chinin in nicht infiziertem Blut

In dieser Versuchsreihe wurden die infizierten Mücken mit Chinin behandelt, indem sie ein Blutmahl an den gesunden Mäusen erhielten, denen zuvor Chinin mit unterschiedlichen Zeitabständen in unterschiedlichen Dosen injiziert worden war. Bei diesem Versuch sollte der Einfluss von verstoffwechseltem Medikament auf die Sporogoniestadien von *Plasmodium berghei* in der Mücke untersucht werden.

7.2.6.1 Behandlung gesunder Mäuse mit Halofantrin 2 Stunden vor der zweiten Blutmahlzeit

Den Mücken wurde am 7. Tag nach Infektion mit *Plasmodium berghei* eine zweite Blutmahlzeit angeboten. Zu diesem Zweck wurden gesunde Mäuse 2 Stunden vor dieser

Fütterung mit unterschiedlichen Dosen (50 mg, 100 mg und 150 mg Base pro Körpergewicht der Maus) Chinin behandelt.

Bei allen Versuchsgruppen waren keine signifikanten Unterschiede der Oozystenanzahlen gegenüber der Kontrollgruppe zu sehen (Tabelle 51, Abb. 37).

7.2.6.2 Behandlung gesunder Mäuse mit Halofantrin 24 Stunden vor der zweiten Blutmahlzeit

In einem anderen Versuch, wobei gesunde Mäuse 24 Stunden vor der zweiten Blutmahlzeit zur Behandlung infizierter Mücken mit Chinin appliziert worden waren, ergaben sich ebenso keine signifikanten Unterschiede der Oozystenanzahlen zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe (Tabelle 53, Abb. 38).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Chinin schizontozidale und/oder gametozide Wirkung auf *Plasmodium berghei* hat, aber keine sporontozide Wirkung auf diese Parasiten in den verwendeten Dosen.

Danksagung

Diese Arbeit zur Forschung im Institut für Medizinische Parasitologie, die mir viel Freude bereitete, wurde von engagierten Persönlichkeiten begleitet. Ihnen möchte ich an dieser Stelle danken:

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Walter A. Maier, der als Doktorvater diese Studie ermöglicht hat. Als Spezialist für Medizinische Parasitologie war er jederzeit ein kompetenter und hilfsbereiter Ansprechpartner, der über manche Schwierigkeiten hinweggeholfen hat.

Ferner danke ich Herrn Professor Dr. Peter K. Sauer, meinem zweiten Gutachter, der durch seine stete Hilfsbereitschaft und viele persönliche Gespräche mein Interesse an diesem Forschungsgebiet geweckt hat.

Dank schulde ich auch Herrn Professor Dr. Seitz, dessen große Kenntnisse in medizinischer Parasitologie mir immer wieder zur Anregung dienten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dorota Konsek, Frau Dr. Gabriella Chirolia, Herrn Dr. Helge Kampfen, Herrn Steffen Krug, Herrn Ralf Bleck, Herrn Dr. Josephat Shililu, Herrn Dr. Thomas Trammer, Frau Dr. Marita Esser, Frau Dr. Jana Proft und alle anderen Mitarbeiter und Kollegen vom Institut für Medizinische Parasitologie. Durch sie erhielt ich viele neue Informationen und Hinweise über die Malariaforschung.

Einen sehr persönlichen Dank möchte ich Pastor Abraham Lee und allen Glaubensgeschwistern in Köln aussprechen, die mir während meines Promotionsstudiums stets beistanden und mich ermutigten.

An dieser Stelle möchte ich meinen Eltern und meiner Frau danken, ohne deren anhaltende, mutmachende Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Schließlich möchte ich meinem Herrn Jesus Christus danken, der mir den klaren Sinn des Lebens schenkte und mich jeden Tag mit seiner Liebe und Treue trägt.