

AKTIVITAS ANTIPLASMODIAL *In Vivo* DAN MEKANISME AKSI SENYAWA TURUNAN FENANTROLIN-1,10

In Vivo ANTIPLASMODIAL ACTIVITY AND MECHANISM OF ACTION OF 1,10-PHENANTHROLINE DERIVATIVES

Mustofa¹, Ange Desire Yapi², Alexis Valentin³

* Bagian Farmakologi/Pusat Kedokteran Tropis, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta,

** Laboratoire de Chimie Organique Pharmaceutique,

*** Laboratoire de Parasitologie et Immunologie, Faculte de Pharmacie, Universite de Montpellier I, Montpellier, France

Abstrak

Penyebaran secara cepat *Plasmodium falciparum* yang resisten terhadap antimalaria umum digunakan menunjukkan keperluan yang mendesak adanya antimalaria baru. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa diantara 13 senyawa turunan fenantrolin-1,10 yang diteliti 4 senyawa terbukti mempunyai aktivitas antiplasmodial *in vitro* yang potensial untuk diteliti lebih lanjut. Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji aktivitas antiplasmodial *in vivo* dan kemungkinan mekanisme aksi empat turunan fenantrolin-1,10.

Uji aktivitas antiplasmodial *in vivo* ke senyawa turunan fenantrolin-1,10 ditetapkan dengan uji standard 4 hari pada mencit yang diinfeksi oleh *Plasmodium venckei petteri*. Penelitian terhadap akitivitas penghambatan polimerisasi hem (HPIA) dan efek potensiasi antara senyawa uji dengan halofantrin atau penghambat protease (E64) dilakukan untuk mengetahui mekanisme aksinya.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa **1** (2,10-metil-3-(2-kloroetil)-4-kloropirido [2,3-*f*]kuinolinum iodid) merupakan senyawa paling aktif dengan nilai DE₅₀ sebesar 0,22 ± 0,03 mg/kg BB. Namun demikian, senyawa ini kurang aktif dibandingkan dengan halofantrin, tetapi lebih aktif dari pada klorokuin. HPIA turunan fenantrolin-1,10 yang diuji (IC₅₀ HPIA antara 1,57-1,95 µmol/sumuran) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Nilai HPIA ini lebih rendah secara nyata dibandingkan dengan halofantrin (CI₅₀ HPIA = 0,12 ± 0,04 µmol/sumuran) dan klorokuin (CI₅₀ HPIA = 0,75 ± 0,03 µmol/sumuran). Kombinasi turunan fenantrolin-1,10 dan halofantrin menghasilkan efek aditif yang menunjukkan bahwa kedua mempunyai mekanisme aksi yang berbeda. Sebaliknya, interaksi turunan fenantrolin-1,10 dengan E64 bersifat antagonis yang menunjukkan keduanya mempunyai mekanisme yang sama.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa senyawa **1** yakni 2,10-metil-3-(2-kloroetil)-4-kloropirido [2,3-*f*]kuinolinum iodid merupakan senyawa antimalaria yang paling poten. Selain itu dapat diduga kemungkinan mekanisme aksi dari senyawa ini adalah menghambat protease yang berperan dalam degradasi hemoglobin oleh parasit malaria.

Kata kunci : fenantrolin-1,10 - antiplasmodial *in vivo* - aktivitas penghambatan polimerisasi hem - inhibitor protease

Abstract

The rapidly increasing resistance of *Plasmodium falciparum* to the most commonly used antimalarial drug indicates the urgent need for new antimalarial compounds. Previous study showed that among thirteen derivatives of 1,10-phenanthroline, four compounds were active in vitro and potential for further development. The study was conducted to provide the in vivo antiplasmodial activity of four 1,10-phenanthroline derivatives and to evaluate the possibility of their mechanism of action.

The in vivo antiplasmodial activity of the four compounds was evaluated by a standard 4-day test on *Plasmodium venckei petteri* infected mice. The study of haem polymerization inhibitory activity (HPIA) and the potentiating of those compounds in combination with halofantrine and inhibitor protease (E64) were carried out to evaluate its mechanism of actions.

The results showed that among four compounds tested, compound 1 (2,10-methyl-3-(2-chloroethyl)-4-chloropyrido [2,3-i] quinolineium iodide) was the most active compound with DE50 was 0.22 ± 0.03 mg/kg BW. This molecule less active than halofantrine, but more active than chloroquine. The HPIA of 1,10-phenanthroline derivatives tested (IC50 HPIA was 1.57-1.95 μ mol/well) did not vary significantly. These IC50 HPIA values were significantly lower than halofantrine (CI50 HPIA was 0.12 ± 0.04 μ mol/well) and than chloroquine (CI50 HPIA was 0.75 ± 0.03 μ mol/well). Combination the 1,10-phenanthroline derivatives and halofantrine produced simple additive effect that implies that each drug posses a different mechanism of action. Conversely, there was antagonist interaction between 1,10-phenanthroline derivatives and E64 showing that the drugs have a similar mechanism of action.

It can be concluded that the compound 1 appears as a potential antimalarial compound. In addition, the possible mechanism of action of this compound is inhibition of protease involved in haemoglobine degradation within the malaria parasite.

Key words : 1,10-phenanthroline – in vivo antiplasmodial – haem polymerization inhibitory activity – protease inhibitor .

Pendahuluan

Malaria masih merupakan masalah kesehatan dunia, utamanya di negara-negara sedang berkembang seperti Indonesia. Prevalensi dan insidensi malaria masih tinggi yang menempatkan sekitar 40% penduduk dunia berisiko terinfeksi malaria. *World Health Organisation* (WHO) mencatat pada tahun 1997, sekitar 1,5-2,7 juta orang meninggal karena malaria, utamanya kelompok anak balita dan ibu hamil di Afrika. Setiap tahunnya sekitar 300-500 juta kasus baru dilaporkan. Malaria menduduki peringkat ke 5 penyebab kematian setelah ISPA, tuberkulosis, diare dan HIV/AIDS (WHO, 1998). Diantara masalah utama dalam

pemberantasan malaria adalah timbulnya nyamuk vektor malaria yang resisten terhadap insektisida dan parasit malaria *plasmodium* yang resisten terhadap antimalaria yang tersedia utamanya klorokuin.

Penyebaran *plasmodium* yang resisten terhadap antimalaria yang begitu cepat dan luas di hampir seluruh daerah endemik, mendorong para peneliti berusaha untuk menemukan obat antimalaria baru diantaranya melalui modifikasi golongan senyawa yang telah dikenal mempunyai aktivitas antimalaria (Vial & Ancelin, 1998). Diantara golongan senyawa yang dikenal luas sebagai antimalaria adalah golongan fenantren. Dari golongan senyawa ini telah

berhasil dikembangkan antimalaria baru yaitu halofantrin yang aktif terhadap parasit yang resisten terhadap klorokuin. Namun demikian, antimalaria yang baru dipasarkan di akhir tahun 80an ini dilaporkan mempunyai efek kardiotoxik yang cukup membahayakan (Sowunmi *et al.*, 1998; van Agmael *et al.*, 1999). Bahkan oleh beberapa ahli dianjurkan untuk dilakukan reformulasi aturan pemakaian halofantrin dan bertindak hati-hati dalam penggunaannya (Touze *et al.*, 1995; 1997).

Dalam usahanya menemukan antimalaria yang lebih efektif dan aman dari halofantrin, Yapi *et al.*, (2000) memasukkan atom N pada cincin fenantren. Dari 5 senyawa yang dievaluasi pada uji pendahuluan menunjukkan, turunan fenantrolin-1,10 mempunyai aktivitas paling baik. Uji selanjutnya terhadap 13 senyawa turunan fenantrolin-1,10 diperoleh 4 senyawa dengan aktivitas antiplasmodial *in vitro* paling (Gambar 1) baik dengan nilai *Inhibitory Concentration 50%* (IC₅₀) antara 0,02 – 0,17 μ M pada strain *P. falciparum* yang resisten terhadap klorokuin. Ke 4 senyawa tersebut sangat potensial untuk diteliti lebih lanjut untuk mengkaji bagaimana aktivitas antiplasmodialnya secara *in vivo*. Tujuan utama dari penelitian ini adalah untuk mengkaji aktivitas antiplasmodial *in vivo* ke 4 senyawa turunan fenantrolin-1,10 yang mempunyai aktivitas antiplasmodial *in vitro* paling baik.

Usaha menemukan antimalaria baru ditujukan utamanya untuk menemukan senyawa baru dengan aktivitas yang berbeda dengan senyawa yang telah ada (Ye *et al.*, 1989). Hasil penelitian mengenai aktivitas plasmodial menggunakan metode visual menunjukkan golongan fenantrolin-1,10 bekerja pada awal fase ke 2 dari siklus parasit. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa ini bekerja dengan menghambat protease yang berperan dalam invasi merozoit ke dalam eritrosit yang kemungkinan berbeda dengan halofantrin (Mustofa, 2000). Penelitian selanjutnya dilakukan untuk mengkaji kemungkinan mekanisme aksi golongan fenantrolin-1,10 sebagai antimalaria, dengan

melihat HPIA-nya dan efek potensiasinya terhadap halofantrin dan inhibitor protease (E64).

Metodologi Penelitian

Bahan

Empat senyawa uji (Gambar 1) disintesis di Laboratorium Kimia Organik Farmasetik, Fakultas Farmasi, Universitas Montpellier I oleh Yapi *et al.*, (2000).

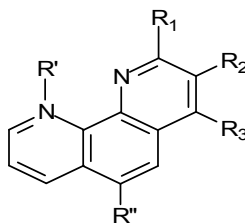
Uji aktivitas antiplasmodial *in vivo*

Aktivitas antiplasmodial *in vivo* setiap senyawa uji pada mencit yang diinfeksi dengan *P. vinckei petteri* dievaluasi dengan uji supresif 4 hari menurut metode yang dikembangkan oleh Peters (1987). Setiap senyawa diujikan pada 36 ekor mencit jantan (Swiss dengan berat badan 20 ± 2 g) yang terbagi menjadi 6 kelompok. Lima kelompok menerima senyawa uji dalam berbagai peringkat dosis (0,01 sampai 2 mg/kg BB), satu kelompok lainnya diberikan akuades sebagai kelompok kontrol negatif. Sebagai kontrol positif digunakan halofantrin dan klorokuin.

Pada hari ke 0, mencit diinfeksi secara intraperitoneal dengan 200 μ l eritrosit terinfeksi parasit yang diperoleh dari mencit donor. Dua jam setelah diinfeksi, mencit diinjeksi secara intraperitoneal dengan 200 μ l senyawa uji. Selanjutnya senyawa uji diberikan setiap hari sekali selama 3 hari berikutnya. Pada hari ke 5, diambil senyawa darah tepi lewat ekor mencit dan dibuat sediaan apus darah tipis. Parasitemia dihitung berdasarkan pemeriksaan secara mikroskopik sediaan darah tebal yang telah diwarnai dengan pewarnaan Giemsa (Diff-Quick®). Hambatan pertumbuhan parasit oleh senyawa uji dihitung dengan membandingkan parasitemia mencit kontrol. Dosis efektif yang mampu menghambat pertumbuhan parasit hingga 50% (DE₅₀) dihitung berdasarkan hubungan antara dosis pemberian dan prosentase hambatan pertumbuhan parasit oleh senyawa uji.

Uji aktivitas penghambatan hem polimerisasi (*Polymerization Inhibitory Activity = HPIA*)

Aktivitas HPIA ke empat senyawa yang diuji seperti yang dilakukan oleh Basilio *et al.*, (1998) setelah dilakukan modifikasi. Dalam setiap sumuran dari mikrokultur 96 sumuran diisi dengan 100 μ l larutan hematin 4 mM dalam larutan NaOH 0,1 M.



| No. | Substituen | | | | | | Turunan |
|-----|-------------------------------------|-----|-----------------|----------------------------------|----------------|-----|---|
| | R' | R'' | R ₁ | R ₂ | R ₃ | B | |
| 1. | CH ₃ , I | H | CH ₃ | C ₂ H ₄ Cl | Cl | 432 | 2,10-metil-3-(2-kloroetil)-4-kloropinido [2,3- <i>f</i>]kuinolinum iodid |
| 2. | H, Cl | H | CH ₃ | C ₂ H ₄ Cl | Cl | 327 | 2-metil-3-(2-kloroetil)-4-kloropinido [2,3- <i>f</i>]kuinolinum klorid |
| 3. | C ₂ H ₄ OH, I | H | CH ₃ | C ₂ H ₄ Cl | Cl | 462 | 2-metil-10-etanol-3-(2-kloroetil)-4-kloropinido[2,3- <i>f</i>]kuinolinum iodid |
| 4. | H | H | CH ₃ | C ₂ H ₅ | Cl | 255 | 2-metil-3-vinil-4-kloropinido[2,3- <i>f</i>]kuinolin |

Gambar 1. Senyawa turunan fenantrolin – 1, 10 yang diuji

Lima puluh μ l larutan senyawa uji dalam berbagai kadar (rasio senyawa uji/hem antara 1:1 sampai 8:1) ditambahkan ke dalam sumuran secara tripliket. Sebagai kontrol positif adalah halofantrin dan klorokuin, sedangkan sebagai kontrol negatif adalah akuades. Polimerisasi hematin diinisiasi dengan menambahkan 0,8 mmol asam asetat glasial (50 μ l) sehingga diperoleh pH larutan sama dengan 3. Suspensi dalam mikrokultur diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37^o C selama 24 jam agar berlangsung polimerisasi sempurna. Suspensi disentrifugasi pada 3300 g selama 15 menit dan supernatan dibuang. Endapan yang diperoleh dicuci dengan DMSO sebanyak 3 kali. Endapan yang masih tinggal, mengandung β -hematin hasil polimerisasi hematin, dilarutkan dalam larutan NaOH 0,1 M dan dibaca absorbannya menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 405 nm (*Molecular Devices Co., Manlo Park, CA, USA*). Apabila absorbannya terlalu tinggi, larutan dalam sumuran diencerkan sehingga konsentrasinya menjadi 1/2, 1/4, atau 1/8. Untuk kurva standar digunakan larutan hematin dengan berbagai kadar yang berbeda dalam larutan NaOH 0,1 M. Data yang diperoleh disajikan dalam molar yang dibutuhkan untuk menghambat polimerisasi hem hingga 50% (IC₅₀ HPIA).

Uji efek potensiasi

Setiap senyawa diuji efek potensiasinya dengan dikombinasikan dengan halofantrin atau E64 untuk ditetapkan aktivitas antiplasmodialnya secara in vitro. Seratus μ l larutan kombinasi dari berbagai rasio konsentrasi dimasukkan dalam mikrokultur 96 sumuran yang mengandung kultur *P. falciparum*, strain FcM₂₉ klorokuin resisten dengan IC₅₀ sebesar 230 \pm 15 ng/ml. Kultur dinkubasikan dalam inkubator pada 37^o C selama 24 jam. Aktivitas antiplasmodial larutan kombinasi ditetapkan dengan metode radioaktif seperti yang dilakukan oleh Desjardins *et al.* (1979). Hasil yang diperoleh ditampilkan dalam isobologram yang menunjukkan hubungan antara IC₅₀ fraksional antara senyawa uji dan halofantrin atau E64. Tiga tipe interaksi dapat dilihat pada isobologram yaitu kurva berbentuk konveks, konkaf dan sejajar diagonal yang secara berurutan menunjukkan adanya efek antagonis, sinergis dan aditif.

Hasil Dan Pembahasan

Hasil penelitian

Hasil uji aktivitas antiplasmodial *in vivo* (DE₅₀) dan HPIA (IC₅₀ HPIA) dari ke 4 senyawa yang diuji disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas antiplasmodial *in vivo* dan HPIA senyawa turunan fenantrolin-1,10

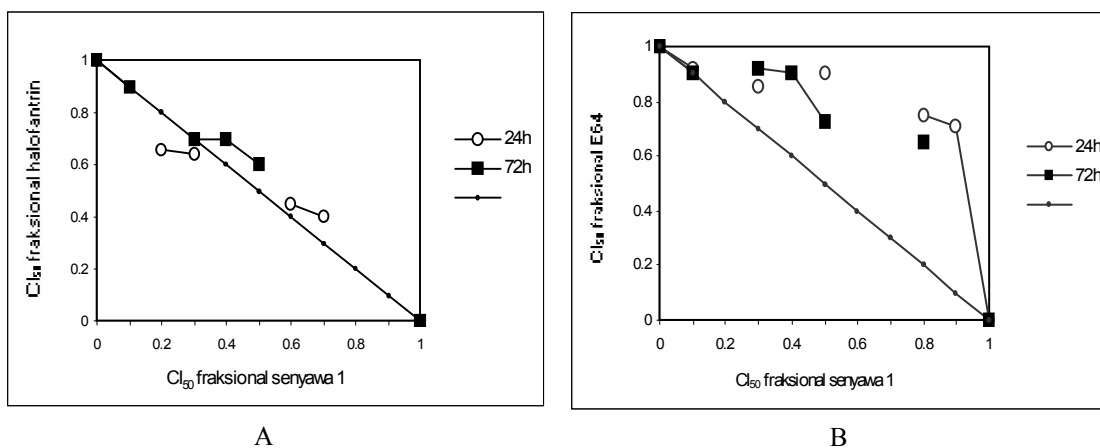
| No. Senyawa | Rerata DE ₅₀ ± SD (mg/kg BB/hari) | Rerata IC ₅₀ HPIA ± SD (µmol/sumuran) |
|-------------|--|--|
| 1. | 0,22 ± 0,03 | 1,57 ± 0,37 |
| 2. | 0,45 ± 0,07 | 1,74 ± 0,28 |
| 3. | 7,86 ± 0,16 | 1,77 ± 0,30 |
| 4. | 5,65 ± 0,15 | 1,95 ± 0,36 |
| Halofantrin | 0,08 ± 0,01 | 0,12 ± 0,04 |
| Klorokuin | 0,29 ± 0,08 | 0,75 ± 0,03 |

Senyawa 1 mempunyai aktivitas antiplasmodial *in vivo* lebih baik dibandingkan dengan senyawa 2, 3 dan 4 ($p < 0,05$). Dibandingkan dengan halofantrin, senyawa 1 mempunyai aktivitas lebih rendah ($p < 0,05$). Namun demikian, bila dibandingkan dengan klorokuin kedua senyawa ini mempunyai aktivitas yang lebih baik, meskipun tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna secara statistik ($p > 0,05$).

Hasil uji HPIA menunjukkan bahwa ke 4 senyawa uji mempunyai aktivitas yang sama. Hasil uji statistik terhadap nilai IC₅₀ dari ke 4 senyawa tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Namun demikian, bila dibandingkan halofantrin dan klorokuin ke 4

senyawa uji mempunyai HPIA yang lebih rendah. Nilai IC₅₀ HPIA ke empat senyawa uji lebih besar secara bermakna dibandingkan dengan halofantrin dan klorokuin ($p < 0,05$).

Isobologram hasil uji potensiasi senyawa 1 terhadap aktivitas antiplasmodial halofantrin dan klorokuin ditunjukkan pada Gambar 1A dan 1B. Hasil uji potensiasi senyawa uji lainnya (2, 3 dan 4) menunjukkan profil yang sama (hasil tidak ditampilkan). Gambar 1A menunjukkan bahwa kombinasi senyawa 1 bersifat aditif terhadap aktivitas halofantrin baik setelah 24 atau 72 jam inkubasi. Hal ini ditunjukkan dengan kurva dalam isobologram berbentuk sejajar dengan diagonal. Sedangkan



Gambar 2. (A) Efek potensiasi senyawa 1 terhadap aktivitas halofantrin, (B) terhadap aktivitas inhibitor protease E64.

kombinasi senyawa **1** dengan E64 menunjukkan efek antagonis baik setelah 24 atau 72 jam inkubasi, seperti ditunjukkan dengan kurva dalam isobologram berbentuk konvek.

Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari ke 4 senyawa yang diuji, senyawa **1** mempunyai aktivitas antiplasmodial *in vivo* paling baik ($DE_{50} = 0,22 \pm 0,03$ mg/kg BB). Meskipun belum dapat menyamai aktivitas halofantrin ($DE_{50} = 0,08 \pm 0,01$ mg/kg BB), namun demikian aktivitasnya lebih baik dengan klorokuin ($0,29 \pm 0,08$ mg/kg BB). Hasil penelitian *in vivo* ini mendukung hasil penelitian *in vitro* yang dilakukan sebelumnya yang menunjukkan bahwa substitusi metil pada atom N-10 dari cincin fenantrolin (senyawa **1**) memberikan aktivitas antiplasmodial *in vitro* yang optimal (Yapi *et al.*, 2000). Penghilangan rantai alkil (senyawa **2**) dan penggantian gugus metil dengan gugus alkohol (senyawa **3**) pada N-10, demikian juga penggantian gugus alkil dengan vinil pada C-3 (senyawa **4**) akan menurunkan aktivitasnya secara *in vivo* seperti juga ditunjukkan pada hasil penelitian *in vitro* sebelumnya.

Hasil uji HPIA menunjukkan bahwa ke 4 senyawa uji mempunyai HPIA setara yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} HPIA yang tidak berbeda bermakna untuk ke 4 senyawa uji. Namun demikian HPIA senyawa uji lebih rendah dibandingkan dengan halofantrin maupun klorokuin. Hal ini kemungkinan disebabkan senyawa uji tidak bekerja secara spesifik pada proses penghambatan polimerisasi hem menjadi hemazoin. Berbeda dengan halofantrin dan klorokuin yang telah terbukti jelas bekerja dengan menghambat pembentukan hemozoin (Dorn *et al.*, 1998; Hawley *et al.*, 1998) Disini kemungkinan letak perbedaan mekanisme aksi antiplasmodial antara fenantrolin-1,10 dengan halofantrin dan klorokuin.

Untuk membuktikan adanya perbedaan mekanisme aksi dua senyawa dapat dilakukan uji potensiasi. Prinsip uji potensiasi ini adalah menentukan aktivitas suatu senyawa, CI_{50} untuk

aktivitas antiplasmodial, dengan adanya senyawa lain dalam berbagai campuran dosis. Hasil yang diperoleh ditunjukkan dalam suatu isobologram yang menggambarkan hubungan CI_{50} fraksional masing-masing senyawa uji. Adanya perbedaan ditunjukkan dengan kurva sejajar dengan diagonal pada isobologram (efek aditif). Sebaliknya, apabila kurva pada isobologram berbentuk konvek atau konkaf menunjukkan tidak adanya perbedaan mekanisme aksi antara senyawa yang diuji (Gail & Havkiki, 1994; Winter *et al.*, 1996).

Uji potensiasi pertama kali dilakukan antara senyawa uji dengan halofantrin. Hasilnya menunjukkan semua senyawa uji (4 senyawa) mempunyai bentuk isobologram yang sama berupa kurva yang sejajar dengan diagonal yang menunjukkan adanya efek aditif. Gambar 2A menunjukkan isobologram hasil uji potensiasi antara senyawa **1** dengan halofantrin. Hal ini berarti bahwa mekanisme kerja senyawa uji (fenantrolin-1,10) kemungkinan berbeda dengan halofantrin. Perbedaan ini kemungkinan terletak pada aktivitas penghambatan pembentukan hemozoin seperti terlihat dari hasil uji HPIA.

Uji potensiasi selanjutnya dilakukan antara senyawa uji dengan E64. E64 dikenal sebagai inhibitor protease yang mempunyai efek sebagai antimalaria (Rosenthal, 1995; Mungthin *et al.*, 1998) melalui efeknya pada penghambatan secara spesifik protease sistein yang diperlukan dalam degradasi hemoglobin oleh parasit (Rosenthal, 1995; Gamboa *et al.*, 1996). Uji potensiasi ini dilakukan untuk melihat aktivitas senyawa uji pada penghambatan protease parasit. Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa senyawa uji kemungkinan juga bekerja dengan cara menghambat protease parasit. Hal ini ditunjukkan adanya interaksi secara antagonis antara senyawa uji dengan E64. Aktivitas fenantrolin-1,10 sebagai inhibitor protease (metalo protease) pada bakteri dan protozoa sudah pernah dilaporkan oleh beberapa peneliti (Wallace & MaKain, 1996; Wallace *et al.*, 1996).

Usaha menemukan antimalaria baru ditujukan utamanya untuk mendapatkan senyawa baru yang mempunyai mekanisme aksi yang berbeda dengan senyawa yang telah ada. Hal ini untuk mencegah timbulnya resistensi senyawa baru yang begitu cepat pada senyawa-senyawa yang mempunyai mekanisme aksi yang sama, akibat terjadinya resistensi silang (Ye *et al.*, 1989). Disamping itu penemuan antimalaria baru dengan mekanisme yang berbeda memberikan keuntungan dalam penggunaannya secara kombinasi dengan antimalaria yang sudah ada sehingga dapat mengurangi risiko terjadinya resistensi. Dari hasil penelitian ini dapat dilihat bahwa golongan fenantrolin-1,10, yang merupakan senyawa baru antimalaria, yang

kemungkinan mempunyai mekanisme aksinya berbeda dengan halofantrin.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa **1** yakni 2,10-metil-3-(2-kloroetil)-4-kloropirido [2,3-*z*]kuinolinum iodid merupakan senyawa paling aktif secara *in vivo*, yang sangat potensial untuk dikembangkan sebagai antimalaria baru. Selain itu, dari hasil penelitian mengenai mekanisme aksi menunjukkan bahwa fenantrolin-1,10 kemungkinan bekerja dengan cara menghambat protease yang berperan dalam degradasi hemoglobin oleh parasit malaria.

Daftar Pustaka

- Basilico, N., Pagani, E., Monti, D., Olliaro, P., Taramelli, D., 1998. A microtitre-based method for measuring the haem polymerization inhibitory (HPIA) of antimalarial drugs, *J. Antimicrob. Chemother.* 42, 55-66.
- Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D., Chulay, J.D., 1979. Quantitative assesment of antimalarial activity *in vitro* by semi-automated microdilution technique, *Antimicrob. Agents Chemother.* 16, 710-718.
- Dorn, A., Vippaguta, S.R., Matile, H., Bubendorf, A., Ridley, R.G., 1998, A comparison and analysis of several ways to promote haematin (haem) polymerisation and an assesment of its initiation *in vitro*, *Biochem. Pharmacol.*, 55, 737-747.
- Gail, E.S., Havkicki, I., 1994. *In vitro* drug interaction between amantadine and classical antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum* infections, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 683-686.
- Gamboa de Dominguez, N.D., Rosenthal, P.J., 1996, Cysteine proteinase inhibitors block early steps in hemoglobin degradation by cultured malaria parasites, *Blood*, 87, 4448-4454.
- Hawley, S.R., Bray, P.G., Mungthin, M., Atkinson, J.D., O'Neil, P.M., Ward, SA. Relationship between antimalarial drug activity, accumulation and inhibition of heme polymeration in *Plasmodium falciparum in vitro*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (3), 682-686.
- Mungthin, M., Bray, P.G., Ridley, R.G., Ward, S.A., 1998, Central role of hemoglobin degradation in mechanisms of action of 4-aminoquinolines, quinoline methanols and phenanthrene methanols, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 (11), 2973-2977.
- Mustofa, 2000. Activite in vitro et in vivo de divers antipaludiaux d'origine naturelle ou synthetiaue: effets potentialisateurs et modes d'action possibles, Universite Montpellier I.
- Peters, W., 1987. Chemotherapy and drugs resistance in malaria, Vol. 1, Academic Press, Inc., New York.

- Rosenthal, P.J., 1995, *Plasmodium falciparum* : effects of proteinase inhibitors on globin hydrolysis by cultured malaria parasites, *Exp. Parasitol.* 80, 272-281.
- Sowunmi, A., Falade, C.O., Oduola, A.M., Agundahusi, O.A., Fehintola, F.A., Gbotosho, G.O., Larcier, P., Salako, L.A. 1998. Cardiac effects of halofantrine in children suffering from acute uncomplicated falciparum malaria, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 92(4), 446-448.
- Touze, J.E., Fourcade, L., Peyron, F., Heno, P., Deharo, J.C., 1997, Is halofantrine still advisable in malaria attacks? *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 91(1), 867-873.
- Touze, J.E., Peyron, F., Mojon, M., Fourcade, L., 1995, Halofantrine : for new rules of prescription, *Presse Med.* 24, (7), 366-369.
- Vial, H., Ancelin, M.L., 1998, Recherches de nouvelles molecules antipaludiques: une urgence and un espoir, *Pathol. Biol.*, 42, 138-144.
- Wallace, R.J., McKain, N., 1996, Influence of 1,10-fenanthroline and its analogues, other chelators and transition metal ions on dipeptidase activity of rumen bacterium, *Provetella ruminicola*. *J. Appl. Bacteriol.*, 81 (1), 42-47.
- Wallace, R.J., Newbold, C.J., McKain, N., 1996, Inhibition by 1,10-phenanthroline of the breakdown on peptidase by rumen bacteria and protozoa, *J. Appl. Bacteriol.*, 80, 425-430.
- Winter, R.W., Cornell, K.A., Johnson, L.L., Ignatushchenko, M., Hinrichs, D.J., Riscoe, M.K., 1996, Potentiation of the antimalarial agent rufigallo, *Antimicrob. Agents Chemother.* 40(6), 1408-1411.
- World Health Organization, 1998, Roll back Malaria. A global partnership, WHO, Geneva.
- Van Agmael, M., Bouchaud, O., Malvy, D., Delmont, J., Danis, M., Barrette, S., Gras, C., Bernard, J., Touze, J.E., Gathmann, I., Mull, R. 1999, The comparative efficacy and tolerability of CGP 56697 (artemether + lumefantrine) versus halofantrine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in travellers returning from the Tropic to The Netherlands and France, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 12 (2), 159-169.
- Yapi, A.D., Mustofa, Valentin, A., Chavignon, O., Teulade, J.C., Mallie, M., Chapat, J.P., Blache, Y., 2000. New potential antimalarial agents : synthesis and biological activities of original diaza analogs phenanthrene, *Chem. Pharm. Bull.* 48 (12), 1886-1889.
- Ye, Z., Dykel, K.V., Castranova, V., 1989. The potentiating action of tetrandine in combination with chloroquine or qinghaosu against chloroquine sensitive and resistant falciparum malaria, *Biochem. Biophys. Re. Comm.* 159 (1), 242-247.