
Universität Rostock
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Institut für Biowissenschaften



***Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907 (Plathelminthes, Digenea) -
Entwicklung neuer therapeutischer und diagnostischer Ansätze**

Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Martha Holtfreter
geb. am 31.05.1982 in Gera
aus Rostock

Rostock, Dezember 2010

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger
Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten
Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Fakultät
Universität Rostock

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Ragnar Kinzelbach
Allgemeine und Spezielle Zoologie
Institut für Biowissenschaften
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Universität Rostock

3. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. vet. Arwid Dauschies
Institut für Parasitologie
Veterinärmedizinische Fakultät
Universität Leipzig

Eingereicht am: 22. Dezember 2010

Tag der öffentlichen Verteidigung: 20. Juli 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der **Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten** (Leiter: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger) der Medizinischen Fakultät (Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger) der Universität Rostock in Kooperation mit der **Abteilung für Allgemeine und Spezielle Zoologie** (Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Stefan Richter) der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät (Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Schick) der Universität Rostock angefertigt.

Um ein tadelloses Mitglied
einer Schafherde sein zu können,
muss man vor allem ein Schaf sein.

Albert Einstein

Inhalt

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Die Schistosomiasis.....	3
2.2	Biologie und Lebenszyklus von <i>S. mansoni</i>	3
2.3	Merkmale von Schistosomula, Prä-Adulten und adulten Würmern von <i>S. mansoni</i>	5
2.3.1	Schistosomula.....	5
2.3.2	Prä-Adulte.....	5
2.3.3	Adulte.....	6
2.4	Krankheitsverlauf der Intestinalen Schistosomiasis.....	6
2.4.1	Zerkariendermatitis.....	6
2.4.2	Akute Schistosomiasis (Katayama-Syndrom).....	7
2.4.3	Intestinale Schistosomiasis.....	7
2.4.4	Hepatolienale Schistosomiasis.....	7
2.5	Diagnostik der Intestinalen Bilharziose.....	8
2.6	Therapie und Prophylaxe der Intestinalen Schistosomiasis.....	9
2.6.1	Prophylaxe.....	9
2.6.2	Therapie.....	9
2.7	Getestete niedermolekulare Substanzen.....	11
2.7.1	Methotrexat und Aminopterin.....	11
2.7.2	Mefloquin.....	12
2.7.3	Primaquin.....	12
2.7.4	Diclofenac.....	13
2.7.5	Dexamethason.....	13
2.7.6	9-Aminoacridin (Aminacrine).....	14
2.7.7	8-Hydroxy-2-Quinolinecarbonsäure.....	14
2.8	„Drug targeting“ Modelle und Trägersubstanzen.....	15
2.8.1	Albumin und HSA-Konjugate.....	15
2.8.2	Polyethylenglycol und PEG-Konjugate.....	17
2.9	Getestete HSA- und PEG-Konjugate.....	18
2.9.1	AMPT (<i>Aminopterin</i>)-HSA und MTX (<i>Methotrexat</i>)-HSA.....	19
2.9.2	Diclo (<i>Diclofenac</i>)-HSA.....	19
2.9.3	DHAc (<i>Dexamethasonhydrazinoacetic acid</i>)-HSA.....	19
2.9.4	DHAc (<i>Dexamethasonhydrazinoacetic acid</i>)-AmPEG.....	19

2.9.5	9-ITC-AC (9-Isothiocyanato-Acridine)-HSA	19
2.9.6	HQCA (Hydroxyquinolinecarbonic acid)-HSA	20
2.10	Schistosoma mansoni: Ingestion von fluoreszenzmarkiertem Albumin	20
2.11	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	21
2.12	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	22
3	Material und Methoden	25
3.1	Tiere.....	25
3.2	Infektion und Euthanasie der NMRI-Mäuse.....	25
3.3	In vitro Experimente	25
3.3.1	Zytostatika und deren Albuminkonjugate.....	25
3.3.2	Malariatherapeutika sowie der Goldstandard Praziquantel.....	26
3.3.3	HSA-Konjugate und dazugehörige niedermolekulare Substanzen.....	26
3.3.4	Präparation der Lebensstadien von <i>Schistosoma mansoni</i>	27
3.3.5	Beurteilung der Vitalität und Beobachtungszeiträume	29
3.3.6	Statische Auswertung der <i>in vitro</i> Experimente	30
3.4	In vivo Experimente.....	31
3.4.1	Aminopterin und Aminopterin-HSA.....	31
3.4.1.1	Bestimmung der maximal tolerablen Dosis (MTD)	31
3.4.1.2	Applikation der Medikamente und Versuchsaufbau	31
3.4.1.3	Aufarbeitung	32
3.4.2	Primaquin.....	32
3.4.2.1	Bestimmung der maximal tolerablen Dosis (MTD)	32
3.4.2.2	Applikation von Primaquin und Versuchsaufbau	32
3.4.2.3	Aufarbeitung	33
3.4.2.4	Durchflusszytometrische Analysen	33
3.4.3	Statistische Auswertung der <i>in vivo</i> Experimente	34
3.5	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie zum Nachweis von <i>S. mansoni</i> Eiern im Darm	35
3.5.1	Mikroskopie-Systeme	35
3.5.1.1	Mikroskopie-System 1	35
3.5.1.2	Mikroskopie-System 2	36
3.5.2	Nachweis der Eier von <i>S. mansoni</i> im präparierten Maudarm	36
3.5.3	Nachweis der Eier von <i>S. mansoni</i> in Kolon mittels verschiedener Nachweismethoden	37
3.5.3.1	Präparation der Mäuse	37
3.5.3.2	Nachweis der Eier mittels Mikroskopie-System 2 <i>in situ</i>	37

3.5.3.3	Nachweis der Eier mittels Mikroskopie-System I.....	37
3.5.3.4	Nachweis der Eier mittels Lichtmikroskopie	38
3.5.4	Charakterisierung des Vitalitätsstatus der Eier von <i>S. mansoni</i>	38
4	Ergebnisse.....	39
4.1	<i>In vitro</i> Versuche.....	39
4.1.1	Morphologie unbehandelter Schistosomula, Prä-Adulte und Adulte <i>in vitro</i>	39
4.1.2	Schistosomizider Effekt der HSA-Konjugate und den dazugehörigen niedermolekularen Substanzen <i>in vitro</i>	40
4.1.2.1	Aminopterin (AMPT), Methotrexat (MTX), Aminopterin-HSA (AMPT-HSA) und Methotrexat-HSA (MTX-HSA).....	40
4.1.2.2	Diclofenac und Diclofenac-HSA (Diclo-HSA)	40
4.1.2.3	Dexamethason, Dexamethasonhydrazinoessigsäure-HSA (DHAc-HSA) und Dexamethasonhydrazinoessigsäure-PEG (DHAc-PEG).....	41
4.1.2.4	9-Aminoacridin (9-AAC) und 9-Isothiocyanato-Acridine - HSA (9-ITCAC-HSA)	45
4.1.2.5	8-Hydroxy-2-Quinolincarbonsäure (HQCA) und Hydroxyquinolinecarbonsäure - HSA (HQCA-HSA).....	48
4.1.3	Schistosomizider Effekt der Malariatherapeutika Mefloquin und Primaquin sowie des Goldstandards Praziquantel <i>in vitro</i>	51
4.1.3.1	Mefloquin.....	51
4.1.3.2	Primaquin	53
4.1.3.3	Praziquantel.....	55
4.2	<i>In vivo</i> Versuche	57
4.2.1	Schistosomizider Effekt von Aminopterin, AMPT-HSA und Praziquantel <i>in</i> <i>vivo</i>	57
4.2.1.1	Bestimmung der maximal tolerablen Dosis (MTD)	57
4.2.1.2	Bestimmung der durchschnittlichen Reduktion der Wurmlast nach AMPT, AMPT-HSA bzw. Praziquantel Applikation	58
4.2.2	Schistosomizider Effekt von verschiedenen Primaquindosierungen <i>in vivo</i>	59
4.2.2.1	Bestimmung der maximal tolerablen Dosis (MTD)	59
4.2.2.2	Bestimmung der durchschnittlichen Reduktion der Wurmlast	60
4.2.2.3	Durchflusszytometrische Analysen	61
4.3	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)	66
4.3.1	Nachweis der Eier von <i>S. mansoni</i> im präparierten Dick-und Dünndarm.....	66
4.3.2	Nachweis der Eier von <i>S. mansoni</i> im Kolon mittels verschiedener Nachweismethoden	67

5	Diskussion	70
5.1	Entwicklung eines „drug targeting“ Modells mit HSA bzw. AmPEG als Trägermolekül <i>in vitro</i>	70
5.1.1	Aminopterin, Methotrexat, AMPT-HSA und MTX-HSA	70
5.1.2	Diclofenac und Diclo-HSA	72
5.1.3	Dexamethason, DHAc-HSA und DHAc-AmPEG	73
5.1.4	9-Aminoacridin und 9-ITCAC-HSA	75
5.1.5	8-Hydroxy-2-Quinolincarbonsäure und HQCA-HSA	77
5.2	Schistosomizider Effekt der Malariatherapeutika Mefloquin und Primaquin <i>in vitro</i>.....	79
5.3	Schistosomizider Effekt von AMPT, AMPT-HSA und Praziquantel <i>in vivo</i>.....	81
5.4	Schistosomizider Effekt von verschiedenen Primaquindosierungen <i>in vivo</i>...	82
5.4.1	Reduktion der Wurmlast durch verschiedene Primaquindosierungen.....	83
5.4.2	FACS-Analysen 24 h nach der letzten Primaquinapplikation	83
5.4.3	FACS-Analysen 50 Tage nach Zerkarieninfektion	84
5.5	Einsatz der CLSM zur Diagnostik der intestinalen Schistosomiasis	85
5.6	Abschlussbetrachtung und Ausblick.....	87
5.6.1	Entwicklung eines „drug targeting“-Modells.....	87
5.6.2	Schistosomizider Effekt der Malariatherapeutika Mefloquin und Primaquin	88
5.6.3	CLSM zur Diagnostik der Intestinalen Schistosomiasis	88
6	Literaturverzeichnis	89
7	Anhang.....	101

Abbildungen

Abbildung 1. Lebenszyklus von <i>Schistosoma mansoni</i>	4
Abbildung 2. Leberschnitte von mit <i>S. mansoni</i> infizierten Mäusen	8
Abbildung 3. Liganden-Bindungskapazität von humanem Serumalbumin	16
Abbildung 4. Ingestion von fluoreszenzmarkiertem Albumin (Afl-HSA) durch Schistosomula, Prä-Adulte und Adulte von <i>S. mansoni in vitro</i>	21
Abbildung 5. Mikroskopie-Systeme 1 und 2	36
Abbildung 6. Unbehandelte Lebensstadien von <i>S. mansoni</i>	40
Abbildung 7. Vitalitätsrate von Prä-Adulten und Adulten von <i>S. mansoni</i> nach Inkubation mit Diclofenac	41
Abbildung 8. Vitalitätsrate von Prä-Adulten und Adulten von <i>S. mansoni</i> nach Inkubation mit Dexamethason, DHAc-HSA und DHAc-AmPEG	44
Abbildung 9. Morphologische Veränderungen der Prä-Adulten und Adulten von <i>S. mansoni</i> nach der Inkubation mit DHAc-HSA und DHAc-AmPEG	45
Abbildung 10. Vitalitätsrate von Prä-Adulten und Adulten von <i>S. mansoni</i> nach Inkubation mit 9-Aminoacridin und 9-ITCAC-HSA.	47
Abbildung 11. Morphologische Veränderungen der Prä-Adulten und Adulten von <i>S. mansoni</i> nach der Inkubation mit 9-Aminoacridin und 9-ITCAC-HSA	48
Abbildung 12. Vitalitätsrate von Prä-Adulten und Adulten von <i>S. mansoni</i> nach Inkubation mit 8-Hydroxy-2-Quinolinecarboxylsäure (HQCA) und HQCA-HSA	50
Abbildung 13. Morphologische Veränderungen der Prä-Adulten und Adulten von <i>S. mansoni</i> nach der Inkubation mit 8-Hydroxy-2-Quinolinecarbonsäure (HQCA) und HQCA-HSA.....	51
Abbildung 14. Vitalitätsrate der Zerkarien, Schistosomula, Prä-Adulten und Adulten von <i>S. mansoni</i> nach Inkubation mit Mefloquin	53
Abbildung 15. Vitalitätsrate der Zerkarien, Schistosomula, Prä-Adulten und Adulten von <i>S. mansoni</i> nach Inkubation mit Primaquin	55
Abbildung 16. Morphologische Veränderungen der Schistosomula von <i>S. mansoni</i> nach der Inkubation mit Mefloquin, Primaquin und Praziquantel.....	56
Abbildung 17. Morphologische Veränderungen der Prä-Adulten von <i>S. mansoni</i> nach der Inkubation mit Mefloquin, Primaquin und Praziquantel.....	56
Abbildung 18. Morphologische Veränderungen der adulten Würmer von <i>S. mansoni</i> nach der Inkubation mit Mefloquin, Primaquin und Praziquantel.....	56

Abbildung 19. Gewichtsverläufe nach Applikation von verschiedenen Dosen AMPT und AMPT-HSA zur Bestimmung der MTD bei weiblichen naiven NMRI-Mäusen.....	57
Abbildung 20. Gewichtsverläufe nach Applikation von verschiedenen Dosen Primaquin _{Base} zur Bestimmung der MTD bei weiblichen naiven NMRI-Mäusen.....	60
Abbildung 21. Prozentuale Anteile der Leukozytenpopulationen im peripheren Blut 24 h nach der letzten oralen Primaquin-Applikation.	62
Abbildung 22. Prozentuale Anteile der Leukozytenpopulationen im peripheren Blut 50 Tage nach Infektion mit Zerkarien.....	64
Abbildung 23. Prozentuale Anteile der Leukozytenpopulationen in den mesenterialen Lymphknoten 50 Tage nach Zerkarieninfektion.....	65
Abbildung 24. Mit Hilfe des Mikroskopie-Systems 1 visualisierte Eier von <i>S. mansoni</i> in der Dickdarmmukosa	67
Abbildung 25. Mit Hilfe des Mikroskopie-Systems 2 visualisierte Eier von <i>S. mansoni</i> in der Dickdarmmukosa	68
Abbildung 26. Mit Hilfe von Lichtmikroskopie visualisierte Eier von <i>S. mansoni</i> im Quetschpräparat des Dickdarmes.....	69
Abbildung 27. Strukturformel von Mefloquine hydrochloride	105
Abbildung 28. Strukturformel von Primaquine bisphosphate	105
Abbildung 29. Strukturformel von Methotrexat	105
Abbildung 30. Strukturformel von Methotrexat-HSA (MTX-HSA).....	106
Abbildung 31. Strukturformel von Aminopterin	106
Abbildung 32. Strukturformel von Aminopterin-HSA (AMPT-HSA).....	106
Abbildung 33. Strukturformel von Diclofenac.	106
Abbildung 34. Strukturformel von Diclofenac-HSA (Diclo-HSA)	107
Abbildung 35. Strukturformel von Dexamethason	107
Abbildung 36. Strukturformel von Dexamethasonhydrazinoessigsäure.....	107
Abbildung 37. Strukturformel von Dexamethasonhydrazinoessigsäure-HSA	108
Abbildung 38. Strukturformel von Polyethylenglycol (PEG).....	108
Abbildung 39. Strukturformel von 8-Hydroxy-2-Quinolincarbonsäure.....	108
Abbildung 40. Strukturformel von 9-Aminoacridine	108
Abbildung 41. Strukturformel von 9-Isothiocyanato-Acridine-HSA (9-ITC-HSA).....	109
Abbildung 42. Versuchsplan der <i>in vivo</i> -Experimente mit Aminopterin, Aminopterin-HSA und Praziquantel.....	110
Abbildung 43. Versuchsplan des <i>in vivo</i> Experimentes mit Primaquin	110

Abbildung 44. Gewichtsverläufe der infizierten und mit AMPT, AMPT-HSA bzw. Praziquantel behandelten Versuchstiere.....	111
Abbildung 45. Gewichtsverläufe der infizierten und mit Primaquin behandelten Versuchstiere.....	112

Tabellen

Tabelle 1. Merkmale von vitalen, geschädigten und toten Lebensstadien von <i>S. mansoni</i> ...	30
Tabelle 2. Dosierungen von AMPT und AMPT-HSA zur Bestimmung der maximal tolerablen Dosis <i>in vivo</i>	31
Tabelle 3. Im Rahmen der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper	34
Tabelle 4. Merkmale von vitalen und toten Eiern von <i>S. mansoni</i>	38
Tabelle 5. Schistosomizider Effekt von 500 µg/kg AMPT, 500 µg/kg AMPT-HSA und 40mg/kg Praziquantel auf Schistosomula, Prä-Adulte und Adulte von <i>S. mansoni in vivo</i>	59
Tabelle 6. Schistosomizider Effekt von 2 mg/kg, 8 mg/kg und 32 mg/kg Primaquin auf Schistosomula, Prä-Adulte und Adulte von <i>S. mansoni in vivo</i>	61
Tabelle 7. Anzahl der vitalen und toten Eier von <i>S. mansoni</i> in Dick-und Dünndarm einer mit Mikroskopie-System 1 untersuchten Maus.....	66
Tabelle 8. Anzahl der vitalen und toten Eier von <i>S. mansoni</i> im Kolon von fünf infizierten und mittels drei verschiedener Mikroskopiemethoden untersuchten Mäusen.....	113

Abkürzungen

9-AAC	9-Aminoacridin
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
Afl	Aminofluorescein
Afl-HSA	Aminofluorescein, an HSA gebunden
AK	Antikörper
AmPEG	Aminopolyethylenglycol
AMPT	Aminopterin
AMPT-HSA	Aminopterin, an HSA gebunden
BSA	Bovines Serumalbumin
CO ₂	Kohlendioxid
CLSM	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie
DAPI	4,6-diaminido-2-phenylindol
DHAc	Dexamethasonhydrazinoessigsäure
DHAc-AmPEG	Dexamethasonhydrazinoessigsäure, an AmPEG gebunden
DHAc-HSA	Dexamethasonhydrazinoessigsäure, an HSA gebunden
DHF	Dihydrofolsäure
DHFR	Dihydrofolatreduktase
Dicol-HSA	Diclofenac, an HSA gebunden
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTMP	Desoxy-Thymidinmonophosphat
dUMP	Desoxy-Uridinmonophosphat
EDTA	Ethyl diamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GvHD	Graft-versus-Host Disease
HIV	Human Immunodeficiency Virus
8-HQ	8-Hydroxyquinoline
HQCA	8-Hydroxy-2-quinolinecarbonsäure
HQCA-HSA	Hydroxyquinolinecarbonsäure, an HSA gebunden
HRT II	Heidelberg Retina Tomograph
HSA	Humanes Serumalbumin
IFA	Immunfluoreszenz Assay

IHA	Indirekter Hämagglutinationsassay
ITC	Isothiocyanat
KG	Körpergewicht
LK	Lymphknoten
N ⁵ -Methyl-THF	N ⁵ -Methyl-Tetrahydrofolat
MIF	Merthiolat-Jod-Formalin-Konzentration
MS	Mikroskopie-System
MTD	Maximal Tolerable Dosis
MTX	Methotrexat
MTX-HSA	Methotrexat, an HSA gebunden
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NMRI	Naval Medical Research Institute
i.p.	intraperitoneal
9-ITC-ACC	9-Isothiocyanato-Acridine, an HSA gebunden
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
pH	<i>potentia hydrogenium</i>
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>
PMMA	Polymethylmethacrylat
RASF	primäre synoviale Fibroblasten
RCM	Rostock Cornea Modul
Rh	Rhodamin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAF	Natriumacetat-Essigsäure-Formalin-Konzentration
SEA	lösliches Eiantigen
SD	Standardabweichung
smp	<i>Schistosoma mansoni</i> Protein
THF	Tetrahydrofolsäure
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
TS	Thymidylat-Synthase
WL	Wurmlast
WLR	Reduktion der Wurmlast

1 Zusammenfassung

Die Bilharziose, eine durch *Schistosoma* spp. verursachte Infektionserkrankung, ist weltweit in den Tropen und Subtropen verbreitet und führt zu einer akuten bzw. chronischen Erkrankung mit lang anhaltender Ausscheidung von Wurmeiern mit dem Stuhl bzw. Urin. Es kommt zur Ablagerung von Eiern unter anderem in der Leber, der Milz, den ableitenden Harnwegen, der Darmschleimhaut und seltener in der Lunge oder dem ZNS, die zu einer Entzündungsreaktion und Granulombildung führt. Der Lebenszyklus ist bei allen Schistosomenarten obligat an eine Süßwasserschnecke als Zwischenwirt und ein Wirbeltier als Endwirt gebunden. In der Haut des Endwirts erfolgt die Transformation der Zerkarien zu Schistosomula, welche anschließend in die Lunge wandern (Prä-Adulte). Nach der Einwanderung in das Pfortadersystem erfolgt die Heranreifung zu adulten Würmern.

Die Standardtherapie erfolgt mit Praziquantel, welches bei den Larvenstadien (Schistosomula und Prae-Adulte) jedoch nur eine geringe Wirksamkeit aufweist (Uttinger *et al.* 2003, Silva *et al.* 2003). Somit ist eine erfolgreiche Therapie der Schistosomiasis erst nach der Entwicklung zu adulten Würmern im Endwirt, also ca. zwei Monate nach der Infektion mit Zerkarien, möglich. In den letzten Jahren wurden jedoch zunehmend Fälle beschrieben, bei denen die Therapie mit Praziquantel nicht zum therapeutischen Erfolg führte (Gryseels *et al.* 2001, Silva *et al.* 2005). Die Entwicklung neuer Therapiestrategien steht demzufolge im Focus der aktuellen Schistosomenforschung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Eignung eines „drug targeting“-Modells zur Therapie der Schistosomiasis untersucht. Dazu wurden die niedermolekularen Pharmaka Aminopterin, Methotrexat, Diclofenac, Dexamethason, 9-Aminoacridin und 8-Hydroxyquinoline-2-Carbonsäure kovalent an Humanes Serumalbumin (HSA) bzw. Polyethylenglycol (PEG) gekoppelt. Da HSA im Verdauungssystem von Schistosomula, Prä-Adulten und adulten Würmern angereichert wird, soll die Wirksubstanz anschließend dort abgespalten und somit gezielt im Darmsystem der Parasitenstadien angereichert werden. Weiterhin wurden auch die niedermolekularen Substanzen in äquivalenten Dosierungen hinsichtlich ihres schistosomiziden Potentials untersucht.

Die Konjugate Dexamethasonhydrazinoessigsäure–HSA, Dexamethasonhydrazino-Essigsäure–PEG, 9-Isothiocyanato-Acridine-HSA und Hydroxyquinolinecarbonsäure –HSA sowie die ungekoppelten Substanzen Diclofenac, Dexamethason, 9-Aminoacridin und 8-Hydroxyquinoline-2-Carbonsäure zeigten *in vitro* einen deutlichen schistosomiziden Effekt auf Prä-Adulte und Adulte. Diese Effekte waren dosis- und zeitabhängig. Die Konjugate Aminopterin-HSA, Methotrexat-HSA und Diclofenac-HSA zeigten hingegen keinen

schädigenden Effekt. Zytostatika wie Aminopterin und Methotrexat wirken nur auf stark proliferierende Zellen. Da die Schistosomenstadien im Endwirt vermutlich schneller wachsen, als in einem Kultursystem, wurde das schistosomizide Potential von Aminopterin und dem dazugehörigen Albuminkonjugat nochmals in einer *in vivo*-Studie getestet. Allerdings konnte auch hier kein anthelminthischer Effekt nachgewiesen werden.

Da die Endemiegebiete von Bilharziose und Malaria nahezu identisch sind, wurde der schistosomizide Effekt der Malariatherapeutika Mefloquin und Primaquin auf Zerkarien, Schistosomula, Prä-Adulte und Adulte von *S. mansoni* *in vitro* untersucht. Beide Medikamente zeigten ein deutliches schistosomizides Potential auf alle untersuchten Stadien, die dosis –und zeitabhängig waren. Auf der Basis dieser *in vitro* Daten wurde der schistosomizide Effekt von verschiedenen Primaquin-Dosierungen in einer tierexperimentellen Studie untersucht. Im Rahmen der *in vivo* Experimente konnte der schistosomizide Effekt allerdings nicht bestätigt werden.

Der Goldstandard in der Diagnostik einer intestinalen Schistosomiasis ist der direkte mikroskopische Nachweis der charakteristischen Eier im Stuhl bzw. in einer Darmbiopsie. Der direkte Einachweis ist jedoch bei Patienten mit einer leichten oder beginnenden Infektion oftmals nicht möglich. Serologische Tests und PCR-Methoden sind wiederum nicht in der Lage zwischen einer persistierenden bzw. inaktiven Infektion und den verschiedenen Schistosomenspezies zu unterscheiden. Deshalb wurde die Eignung der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) als diagnostisches Instrument untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten Eier von *S. mansoni* erstmals mittels CLSM im Darm von infizierten Mäusen nachgewiesen werden. Weiterhin konnten die visualisierten Eier klar hinsichtlich ihres Vitalitätsstatus und der Spezies beurteilt werden.

2 Einleitung

2.1 Die Schistosomiasis

Die Schistosomiasis ist neben der Malaria mit weltweit 200 Millionen Infizierten eine der bedeutendsten parasitären Infektionen in tropischen und subtropischen Gebieten (WHO 1996, Löscher 2000). Erreger der Schistosomiasis (Bilharziose) sind Helminthen der Gattung *Schistosoma* sp. (Plathelminthes, Digenea), deren Entwicklungszyklus obligat an eine Süßwasserschnecke als Zwischenwirt und ein Wirbeltier als Endwirt gebunden ist. Neben den humanpathogenen Erregern der Darmbilharziose (*S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mekongi*,) und Urogenitalbilharziose (*S. haematobium*), sind mit *S. bovis* (Rinder), *S. mattheei* (Schafe), *S. rodhaini* (Nager) oder *S. edwardiense* (Nilpferde) auch tierpathogene Stämme bekannt.

2.2 Biologie und Lebenszyklus von *S. mansoni*

Die verpaarten Würmer (Pärchenegel) leben in den mesenterialen Venen und können sich mittels des Kopf- und Bauchsaugnapfes an den Gefäßwänden verankern bzw. fortbewegen. Im Zuge der Eiablage wandern die Weibchen in kleinere Kapillaren ein, um dort täglich bis zu 300 Eier ins Gefäßlumen abzusetzen. Die ca. 115 x 180 µm langen Eier, mit einem Durchmesser von 50-70 µm, besitzen einen für *S. mansoni* charakteristischen lateralen Stachel, mit dessen Hilfe sie sich an den Gefäßwänden verhaken und anschließend durch proteolytische Eischalenenzyme die Gefäßwand durchdringen. Innerhalb von einer Woche reift aus dem von Vitellinzellen umgebenen Embryo das Mirazidium heran. Nach der Durchwanderung des Darmgewebes werden die vollständig entwickelten Eier mit den Fäzes ausgeschieden und müssen zur Vervollständigung des Lebenszyklus in Süßwasser gelangen. Nach Wasserkontakt schlüpft das 80-100 µm große Mirazidium aus dem Ei und sucht mittels Chemorezeption eine geeignete Süßwasserschnecke auf, wobei es sich aktiv durch den Zilienschlag fortbewegt. Innerhalb des Zwischenwirtes findet eine ungeschlechtliche Vermehrung über die Stadien der Mutter- und Tochtorsporozyste statt, wobei sich aus einem Mirazidium bis zu 50.000 Zerkarien eines Geschlechts entwickeln können. Die 500 µm langen infektiösen und frei beweglichen Larvenstadien verlassen die Schnecke nach einem starken Lichtreiz. Mit Hilfe von Chemorezeptoren suchen die Zerkarien einen geeigneten Endwirt, dessen Haut anschließend mit Hilfe von histolytischen Enzymen penetriert wird. In der Haut erfolgt der Abwurf des Gabelschwanzes und die Transformation zum ca. 100 µm großen Schistosomulum, welches nach durchschnittlich fünf bis neun Tagen in die Lunge einwandert. Die ca. 200 µm großen, als Prä-Adulte

bezeichneten, Parasitenstadien wandern circa 8-10 Tage nach dem Eindringen in den Wirt in das Pfortadersystem ein, wo sie zu adulten Tieren heranwachsen und Pärchen bilden (Abbildung 1).

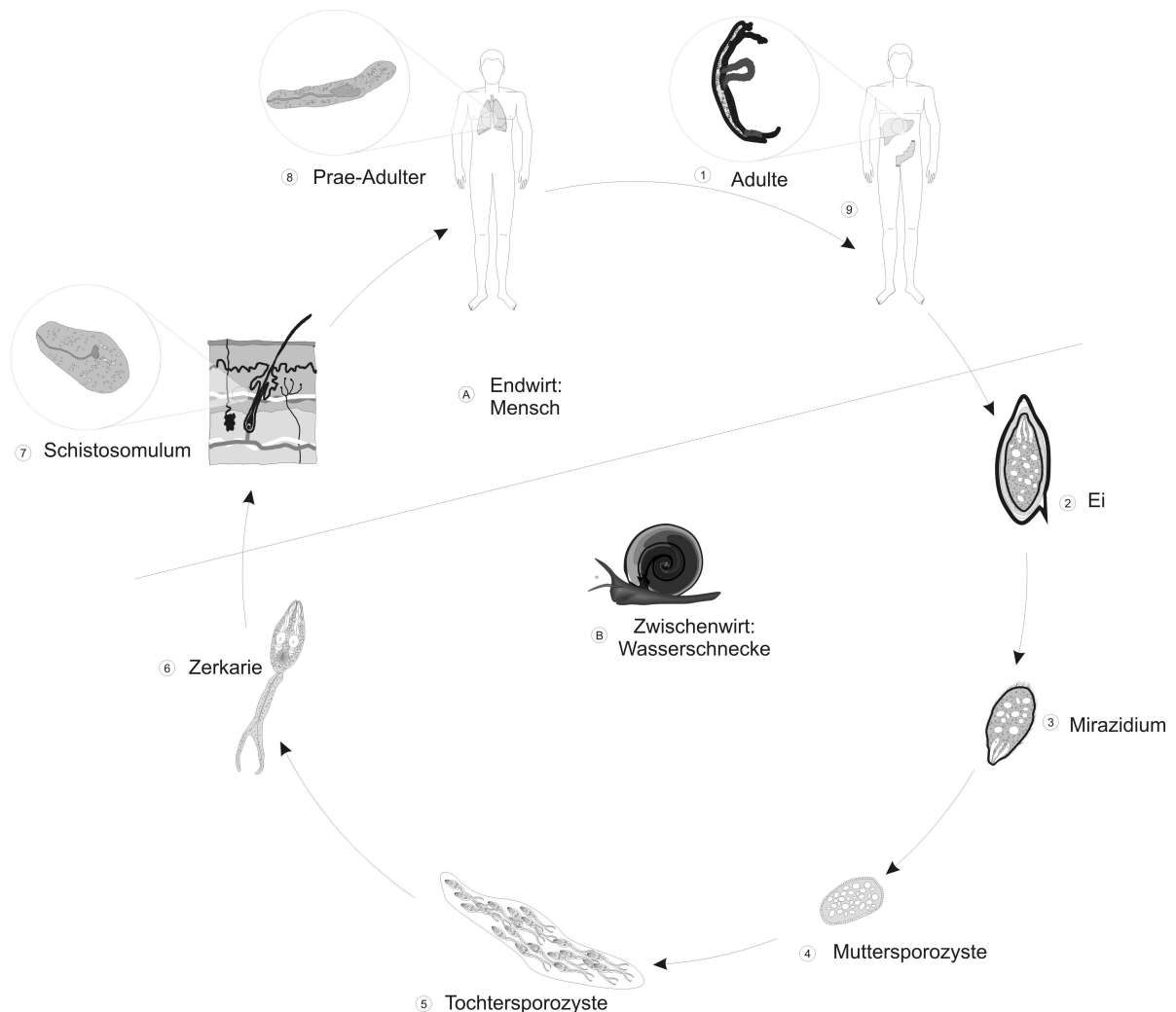


Abbildung 1. Lebenszyklus von *Schistosoma mansoni*. Die adulten Pärchen ① leben in den mesenterialen Venen des Endwirtes (A). Vom Weibchen abgelegte Eier ② reifen während der Durchwanderung des Darmgewebes und werden mit dem Stuhl ausgeschieden. Gelangen die Eier anschließend ins Süßwasser, schlüpft das Mirazidium ③. Dieses frei bewegliche erste Larvenstadium penetriert Wasserschnecken der Gattung *Biomphalaria glabrata* (B). Dort erfolgt über die Muttersporozysten ④ und die Tochterporozysten ⑤ eine ungeschlechtliche Vermehrung, die zur Entwicklung der Zerkarien ⑥ führt. Diese infektiösen Larven verlassen die Schnecken und penetrieren die Haut des Endwirtes. Nach dem Abwurf des Gabelschwanzes in der Haut erfolgt die Transformation zum Schistosomulum ⑦, welches anschließend in die Lunge einwandert und nun als

Prä-Adulter ® bezeichnet wird. Anschließend wandern die Parasitenstadien in das Pfortadersystem ein, wo sie zu Adulten heranreifen und erneut Pärchen © bilden.

2.3 Merkmale von Schistosomula, Prä-Adulten und adulten Würmern von *S. mansoni*

2.3.1 Schistosomula

Nach dem Eindringen in die Haut und dem Abwurf des Gabelschwanzes vollzieht die Zerkarie die Transformation zum Schistosomulum. Das ca. 100 µm lange und 20 µm dicke Schistosomulum unterscheidet sich strukturell und morphologisch durch die Wasserintoleranz, die Kryokonservierbarkeit, die Reduktion der Glycocalyx, eine negative Zerkarien-Hüllen-Reaktion, die Wanderung der Drüsengranula des Oesophagus, das mehrschichtige Oberflächentegument und das Euchromatin des Zellkerns von der infektiösen Larve (Stirewalt 1961, Cousin *et al.* 1986a, Cousin *et al.* 1986b). Der gesamte Transformationsprozess beginnt ca. 15 Minuten nach der Hautpenetration und ist nach ca. 48 Stunden abgeschlossen (Miller & Wilson 1978, Wilson *et al.* 1978). Die Nährstoffaufnahme dieses Entwicklungsstadiums erfolgt durch die orale Aufnahme von Dextranen (4000, 70.000 und 2.000.000 Da), humanem Serumalbumin (HSA) und Immunglobulinen (IgG) (Bennett & Caulfield 1991, Holtfreter *et al.* 2010). Es wird vermutet, dass diese Nährstoffe durch osmotischen Druck in den Ösophagus und anschließend, durch Peristaltik, in das Caecum gelangen. Die Peptide, die beim Abbau der Proteine durch Proteasen entstehen, werden durch die Darmzellen aufgenommen, was wiederum zur Reduktion des osmotischen Druckes und somit zu einer stetigen Nahrungsaufnahme führt (Bennett & Caulfield 1991)

2.3.2 Prä-Adulte

Um in die engen Lungengefäße einwandern zu können, kommt es zu einer Körperstreckung der Schistosomula. Die nun als Prä-Adulte bezeichneten Parasiten sind durchschnittlich 200-400 µm lang, während ihr Körperdurchmesser nur noch 10 µm beträgt (Wilson *et al.* 1978, Crabtree & Wilson 1980). Strukturell unterscheiden sie sich jedoch nur minimal von den Schistosomula. Prä-Adulte können bereits drei Tage nach Hautpenetration der Zerkarien in der Lunge nachgewiesen werden, eine gehäufte Einwanderung ist jedoch meist sechs bis neun Tage nach Infektion zu beobachten (Clegg 1965, Miller & Wilson 1978). Acht bis zehn Tage nach Zerkarieninfektion erreicht der Großteil der Prä-Adulten das Pfortadersystem, allerdings können einige Parasiten noch bis zu 30 Tage in der Lunge persistieren (Clegg 1965, Wilson *et al.* 1978). Wie schon für die Schistosomula beschrieben, wird das Darmsystem in Oesophagus und Caecum unterteilt. Neben humanem Serumalbumin werden

von diesem Entwicklungsstadium auch gelegentlich bereits Erythrozyten aufgenommen. Allerdings konnten die schwarzen Abbauprodukte des Hämoglobins nur bei 4% der untersuchten Prä-Adulten beobachtet werden (Clegg 1965). Die elektronenmikroskopischen Studien von Crabtree & Wilson (1980) belegen, dass die Mundöffnungen der Schistosomula und Prae-Adulten im Durchmesser für die Aufnahme von Erythrocyten in der Regel zu klein sind.

2.3.3 Adulte

Nach dem Erreichen des Pfortadersystems beginnt die Entwicklung zu adulten Würmern, welche einen ausgeprägten Geschlechtsdimorphismus aufweisen. Dabei nimmt das ca. 6-13 mm lange, abgeflachte Männchen das ca. 7-17 mm lange, runde Weibchen im *Canalis gynaecophorus* auf (Ikinger 1994, Lang 2000, Mehlhorn 2002). Die ersten geschlechtsreifen Würmer sind innerhalb von 35 Tagen nach Zerkarieninfektion in den mesenterialen Venen zu finden. Zu diesem Zeitpunkt beginnt auch die Eiproduktion (Clegg 1965). Mit dem Erreichen des Pfortadersystems beginnt die Aufnahme von Erythrozyten sowie humanem Serumalbumin (Delcroix *et al.* 2006, Holtfreter *et al.* 2010). Der Abbau der roten Blutkörperchen und des Albumins durch verschiedene Darmenzyme wie Asparaginyloxydase und Cathepsin-Proteasen dient der Gewinnung von Aminosäuren, die anschließend über die Zellen des Darmlumens aufgenommen werden (Clegg 1965, Bogitsh & Carter 1977, Delcroix *et al.* 2006). Das Darmsystem besteht aus zwei Abschnitten, dem Oesophagus und den zweigabeligen Darmschenkeln, die sich in der Mitte des Wurmkörpers wieder zu einem blind endenden Strang vereinigen. Der muskulöse Oesophagus erzeugt zusammen mit dem ebenfalls muskulösen Kopfsaugnapf einen Unterdruck und gewährleistet so die Aufnahme von Nahrungspartikeln (Bruce *et al.* 1971, Halton 1997). Der craniale Teil der Darmschenkel ist mit Mikrovilli tragenden Zellen ausgekleidet und erfüllt wahrscheinlich sekretorische und digestive Funktionen. Die Funktion des caudalen Parts der Darmschenkel liegt vermutlich in der Ausscheidung unverdauter Substanzen. Da Schistosomen keinen After besitzen, erbrechen sie ihren unverdauten Darminhalt regelmäßig alle 3-4 Stunden (Lawrence 1973).

2.4 Krankheitsverlauf der Intestinalen Schistosomiasis

2.4.1 Zerkariendermatitis

Nach der Penetration der Haut durch die infektiösen Larven kann es zu Hautreizungen, mit Erythemen, papulösen Exanthenen und Juckreiz kommen. Diese Symptome klingen

innerhalb weniger Tage ab und treten besonders häufig nach einer Erstinfektion mit *S. mansoni* auf (Gryseels *et al.* 2006).

2.4.2 Akute Schistosomiasis (Katayama-Syndrom).

Das Katayama-Syndrom tritt innerhalb von 14-84 Tagen nach der Erstinfektion mit Zerkarien auf. Als Hypersensitivitätsreaktion auf die wandernden Parasiten bzw. die ersten abgelegten Eier kommt es zu Fieber, Erbrechen, Kopf- und Gliederschmerzen, Urticaria (Nesselsucht) sowie Bluteosinophilie, Hepatosplenomegalie und gelegentlich anderen allergischen Reaktionen (Ross *et al.* 2007).

2.4.3 Intestinale Schistosomiasis

Im Gegensatz zur Zerkariendermatitis und der akuten Schistosomiasis werden die Symptome der Intestinalen Bilharziose nicht durch den Parasiten selbst, sondern durch die ausgeschiedenen Eier verursacht. Die Wanderung der abgelegten Eier durch die Darmwand von Dickdarm und Rektum verursacht Blutungen, Mikroulzerationen oder Pseudopolypen. Im Darmgewebe feststeckende Eier führen zu einem Entzündungsherd und zur Bildung von Granulomen (Gryseels *et al.* 2006; Andrade 2009).

2.4.4 Hepatolienale Schistosomiasis

Die hepatolienale Schistosomiasis wird durch Eier, die mit dem Blutstrom in die Leber transportiert werden, verursacht. Die Eier verfangen sich in den prä-sinusoidalen Lebergefäßen und lösen dort einen Entzündungsprozess und die anschließende Eigranulombildung aus (Abbildung 2). In der Anfangsphase führt dies gelegentlich zu einer Hepatosplenomegalie. Im weiteren chronischen Verlauf kommt es zu einer zunehmenden Fibrosierung (Pfeifenstielfibrose) des Lebergewebes und zur Leberzirrhose. Spontane Blutungen der gastro-ösophagealen Varizen sind eine der zumeist tödlich verlaufenden Komplikationen (Gryseels *et al.* 2006; Andrade 2009).

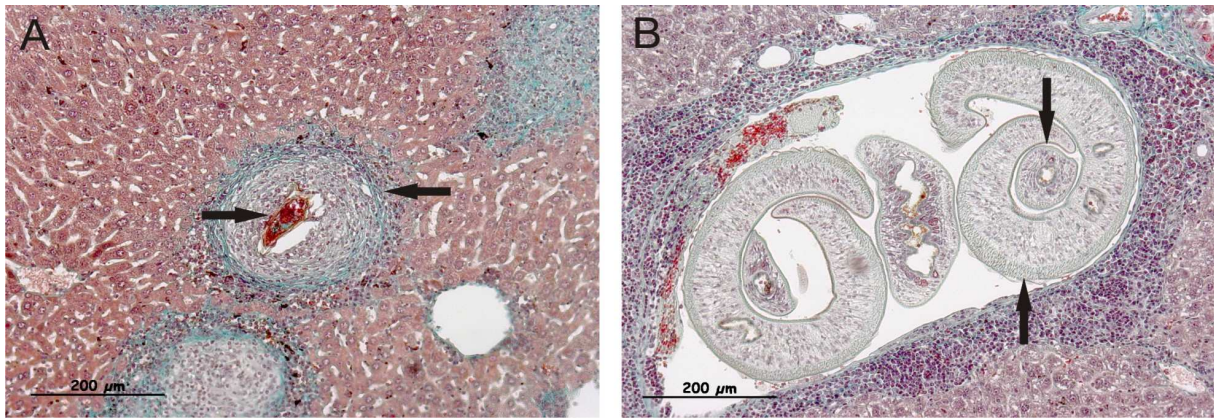


Abbildung 2. Leberschnitte von mit *S. mansoni* infizierten Mäusen. (A) Vitales Ei (→) im Zentrum eines Eigranuloms (←). (B) Adulte Pärchen in einem Blutgefäß, wobei das Weibchen (↓) im *Canalis gynaecophorus* des Männchens (↑) lokalisiert ist. Goldner Färbung, Lichtmikroskopie.

2.5 Diagnostik der Intestinalen Bilharziose

Eine Infektion mit *Schistosoma* sp. kann direkt, über die den Nachweis der Wurmeier im Untersuchungsmaterial, oder indirekt, z. B. über den Nachweis von Antikörpern gegen die Parasiten, erfolgen. Der Goldstandard bei der Diagnose einer Bilharziose ist der direkte Nachweis der charakteristischen Wurmeier im Stuhl. Da die tägliche Eiausscheidung stark variiert, sollten Stuhlproben von mindestens drei verschiedenen Tagen untersucht werden. Die Labordiagnostik erfolgt mit Hilfe von Anreicherungsverfahren wie der Telemann-Konzentrationsmethode, der Merthiolat-Jod-Formalin-Konzentration (MIF) oder der Natriumacetat-Essigsäure-Formalin-Konzentration (SAF; sodium-acetate-acetic-acid-formalin). In der Feldforschung werden hingegen einfachere Methoden wie native Stuhlausstriche oder die Kato-Katz-Methode genutzt. Weiterhin können Eier auch in Darmbiopsaten nachgewiesen werden. Von der Biopsie wird hierzu ein Quetschpräparat angefertigt, welches anschließend bei 100- bis 200facher Vergrößerung am Lichtmikroskop untersucht wird.

Die Methode der Wahl zum Vitalitätsnachweis der Schistosomeneier ist der Mirazidienschlupfversuch. Nach Zugabe von Leitungswasser wird dabei beobachtet, ob die Mirazidien Bewegungen aufweisen bzw. aus den Eiern schlüpfen.

Ein Vorteil des direkten Einachweises ist die schnelle Bestimmung der jeweiligen Schistosomenspezies über die Lage des charakteristischen Stachels. Trotz allem werden leichte Infektionen mit wenigen Pärchen oder frühe Infektionen aufgrund niedriger oder fehlender Eiausscheidung oft übersehen. Deshalb werden zur Detektion einer Schistosomiasis auch indirekte Nachweismethoden wie der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), der Immun-Fluoreszenz Assay (IFA) oder der Indirekte

Hämagglutinationsassay (IHA) verwendet, mit welchen Antikörper gegen das lösliche Eiantigen (SEA, soluble egg antigen) oder Wurmoberflächenantigene im Serum nachgewiesen werden können (Tarp *et al.* 2000, van Gool *et al.* 2002, Doenhoff *et al.* 2004). Da Antikörper jedoch auch nach einer erfolgreichen Eradizierung der Würmer über einen langen Zeitraum im Serum persistieren können, ist keine Unterscheidung zwischen einer aktiven oder ausgeheilten Infektion möglich (Doenhoff *et al.* 2004). Weiterhin erlauben serologische Methoden keine Differenzierung zwischen den verschiedenen humanpathogenen Schistosomenspezies und Kreuzreaktionen mit verwandten Helminthenarten können nicht ausgeschlossen werden. Eine weitere indirekte Nachweismethode ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Polymerase chain reaction), wobei schistosomale Ei-DNA in Stuhlproben nachgewiesen wird (Sandoval *et al.* 2006, ten Hove *et al.* 2008, Xu *et al.* 2009). Da die DNA-Isolierung aus dem Stuhl an das Vorhandensein von Eiern gebunden ist, sind diese PCR-Methoden jedoch bei leichten oder frühen Infektionen ähnlich limitiert wie der mikroskopische Nachweis. Der direkte Nachweis von parasitärer DNA, sogar in der frühen Infektionsphase, ist aus dem Serum möglich (Wichman *et al.* 2009). Bislang wird jedoch keine der beschriebenen PCR-Methoden in der Routinediagnostik angewendet.

2.6 Therapie und Prophylaxe der Intestinalen Schistosomiasis

2.6.1 Prophylaxe

Obwohl die Schistosomiasis neben der Malaria zu den häufigsten Tropenerkrankungen zählt, stehen bislang weder eine wirksame Chemoprophylaxe noch zerkarizide Repellentien zur Verfügung. Deshalb steht für Reisende zur Vermeidung einer Infektion nach wie vor die Expositionsprophylaxe im Vordergrund. Der Kontakt mit möglicherweise zerkarienhaltigem Süßwasser, wie Baden in unbekanntem stehenden und leicht fließenden Gewässern oder Kontakt mit Spritzwasser, sollte unbedingt vermieden werden (Löbermann *et al.* 2005). Weiterhin muss auch die in den Endemiegebieten lebende Bevölkerung über den Infektionsweg aufgeklärt werden, um die Infektionskette zwischen Wirt und Zwischenwirt dauerhaft unterbrechen zu können.

2.6.2 Therapie

Der Goldstandard für die Therapie einer Schistosomiasis ist Praziquantel (Biltricide®). Der Wirkmechanismus dieser Substanz beruht auf der Schädigung kleiner Tegumentareale, was die Präsentation von parasitenspezifischen Oberflächenantigenen und das Anlocken von eosinophilen Granulozyten zur Folge hat. Weiterhin führt Praziquantel zum raschen Einstrom

von Ca^{2+} - Ionen und verursacht so die spastische Lähmung der Wurmmuskulatur (Harder *et al.* 1987, Redman *et al.* 1996).

Praziquantel wirkt auf alle fünf humanpathogenen Schistosomenstämme. Die Therapieerfolge liegen zwischen 70-100% (Löscher *et al.* 2000, Cioli *et al.* 2003). Die Therapie der Intestinalen Schistosomiasis erfolgt mit Praziquantel in Dosen von 40 mg/kg KG (*S. mansoni*, *S. intercalatum*) bzw. 60 mg/kg KG (*S. japonicum*, *S. mekongi*) pro Tag an drei aufeinander folgenden Tagen (DTG 2001). Nebenwirkungen treten meist nur in milder Form auf und klingen zumeist innerhalb von 24 Stunden ab (Cioli *et al.* 2003). Im Tiermodell zeigt Praziquantel jedoch einen biphasischen Verlauf. Während Schistosomula und adulte Würmer ab Tag 42 *post infectionem* zu 80-100% abgetötet werden, ist die Wirksamkeit auf Prä-Adulte und junge Adulte deutlich geringer (Silva *et al.* 2003, Utzinger *et al.* 2003).

In den letzten Jahren wurden zunehmend Fälle beschrieben, bei denen die Standardtherapie mit Praziquantel versagte (Gryseels *et al.* 2001, Silva *et al.* 2005). Lange Zeit wurde diskutiert, ob dieses Phänomen auf die Entstehung von Resistenzen in den Populationen von *Schistosoma* sp. zurückzuführen ist. Wahrscheinlich handelt es sich jedoch um eine reduzierte Empfindlichkeit einzelner Schistosomenstämme aus fokalen Gebieten gegenüber Praziquantel (Utzinger *et al.* 2003, Doenhoff *et al.* 2009, Melman *et al.* 2009). Ein weiterer Grund für das Versagen der Therapie könnte im Vorhandensein von juvenilen Schistosomenstadien liegen, auf welche Praziquantel keine Wirksamkeit zeigt (Doenhoff *et al.* 2009).

Von der WHO wird neben Praziquantel nur Oxamniquin (Mansil[®]) als weiteres Medikament zur Therapie der Schistosomiasis empfohlen, jedoch nur bei einer Kontraindikation oder fehlgeschlagenen Ersttherapie mit Praziquantel (WHO 2009). Oxamniquin wird durch eine Sulfotransferase des Parasiten aktiviert und führt vermutlich zu einer irreversiblen Hemmung des Nukleinsäuremetabolismus (Utzinger & Keiser 2004, Pica-Mattocchia *et al.* 2006, Doenhoff *et al.* 2009).

Den verschiedensten Therapeutika wurde in den letzten Jahren ein schistosomizider Effekt zugeschrieben. Besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang die Medikamente, die bereits zur Malariatherapie eingesetzt werden, wie die semisynthetischen Artemisininderivate Artemether und Artesunat. Diese zeigten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen starken schistosomiziden Effekt (Yuanqing 2001 *et al.*, Lescano *et al.* 2004, Shaohong *et al.* 2006). In Feldstudien führte die präventive orale Gabe von Artemether mit *S. mansoni* und *S. japonicum* in 76-99% zu einer Verringerung der Neuinfektionen. Die Heilungsraten von

Infektionen mit *S. mansoni* und *S. haematobium* nach Applikation von Artesunate allein oder in Kombination mit Sulfadoxine-Pyrimethamin, Sulfomethoxypyrazine-Pyrimethamin oder Lumefantrin variierten jedoch stark zwischen 27-100% (Utzinger *et al.* 2000, Borrmann *et al.* 2001, de Clercq *et al.* 2001, N`Goran *et al.* 2003, Utzinger & Keiser 2004, Li *et al.* 2005, Adam *et al.* 2008, Mohamed *et al.* 2009, Sissoko *et al.* 2009). Aktuelle Studien belegen ferner erstmals den schistosomiziden Effekt von Mefloquin, welches als Standardmedikament in der Malariatherapie eingesetzt wird. Mefloquin zeigte sowohl *in vitro* als auch im Mausmodell einen starken schistosomiziden Effekt auf alle Lebensstadien von *S. mansoni*, jedoch konnte ein solcher nicht für *S. japonicum* nachgewiesen werden (Lademann *et al.* 2005, Keiser *et al.* 2009, Xiao *et al.* 2009, Holtfreter *et al.* 2010, Manneck *et al.* 2010). Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse wurden im Rahmen einer Feldstudie mit *S. haematobium* und *S. mansoni* nur geringe Heilungsraten von 21-38% bei einer Monotherapie mit Mefloquin beobachtet (Keiser *et al.* 2010). Weiterhin zeigten auch einer Reihe neuer synthetischer Substanzen wie Oxadiazole und Trioxalane *in vitro* einen vielversprechenden schistosomiziden Effekt (Keiser & Utzinger 2007, Xiao *et al.* 2007, Sayed *et al.* 2008).

Da trotz allem keines dieser Therapeutika von der WHO zur Standardtherapie der Schistosomiasis empfohlen wird, bleibt die Suche nach neuen Therapeutika weiterhin notwendig. Wünschenswert wären vor allen Dingen Substanzen, die alle Lebensstadien einer Schistosomiasis erfolgreich eradizieren und somit bisher notwendige Mehrfachbehandlungen unnötig machen. In diesem Zusammenhang stehen besonders Kombinationstherapien mit verschiedenen schistosomiziden Substanzen im derzeitigen Focus der Feldforschung. So wurden z. B. mit Mefloquin-Artesunate Heilungsraten von rund 60% bei Infektionen mit *S. haematobium* und *S. mansoni* erzielt (Keiser *et al.* 2010).

2.7 Getestete niedermolekulare Substanzen

2.7.1 Methotrexat und Aminopterin

Aminopterin (4-Aminofolsäure, Abbildung 31) und Methotrexat (4-Amino-10-Methyl-Folsäure, Abbildung 29) sind Zytostatika, die in den Folsäurestoffwechsel eingreifen und die Bildung von Tetrahydrofolat (THF) durch die Dihydrofolatreduktase (DHFR) verhindern. Da THF als Lieferant für C1-Einheiten (z. B. Methylgruppen) in der Purin- und Pyrimidinbiosynthese dient, wird die DNA-Synthese somit unterbrochen. Aminopterin kommt aufgrund seiner starken Toxizität in der Klinik nicht mehr zum Einsatz. Methotrexat wird insbesondere zur Therapie von Krebserkrankungen wie akuter lymphatischer Leukämie, Mammakarzinom

oder Non-Hodgkin-Lymphom und Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis und Psoriasis eingesetzt (Gry-Parma 2005, Sandoz 2010).

Experimente mit isolierter DHFR aus *S. mansoni* zeigten, dass diese bereits durch $0,07 \times 10^{-8}$ M Methotrexat inhibiert wird (Jaffee 1971, Jaffee *et al.* 1972). Nach einer 5-tägigen *in vitro*-Inkubation mit Methotrexat konnte jedoch kein schistosomizider Effekt auf Adulte bzw. sich entwickelnde Eier beobachtet werden, da die LD₅₀ nach fünf Tagen bei einer Konzentration von >1mg/kg Methotrexat (ca. 2×10^{-6} M) lag (Lee & Michaels 1967). Aminopterin ist im Vergleich zu Methotrexat deutlich zytotoxischer. In Zellkulturversuchen mit einer Tumorzell-Linie wies Aminopterin nach 72 Stunden eine etwa dreifach stärkere zytotoxische Wirkung auf als Methotrexat (Wright *et al.* 2000). Da es besonders in der Wachstumsphase der Schistosomula und Prae-Adulten vermehrt zu Zellteilungen kommt, scheinen Methotrexat und Aminopterin zur Evaluierung eines „drug targeting“ Modells trotz starker zytotoxischer Eigenschaften geeignet.

2.7.2 Mefloquin

Mefloquin (Abbildung 27) ist ein Quinolinmethanol, welches zur Malariatherapie und -prophylaxe eingesetzt wird, da es schizontozid auf die vier humanpathogenen Malaria-Arten *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* wirkt (Rote Liste 2006, Karbwang & White 1990). Mefloquin wird in den sauren Nahrungsvakuolen der Plasmodien angereichert und inhibiert dort vermutlich die Aufnahme von Hemozoin (Jacobs *et al.* 1987, Famin & Ginsburg 2002).

Seit kurzem ist bekannt, dass Mefloquin auch ein großes antihelminthisches Potential auf alle Entwicklungsstadien von *S. mansoni* besitzt, welches *in vitro*, *in vivo* und in Feldstudien nachgewiesen werden konnte (siehe Punkt 1.5 Therapie und Prophylaxe der Intestinalen Schistosomiasis).

2.7.3 Primaquin

Primaquin (Abbildung 28) ist ein 8-Aminochinolin, das zur Therapie der exoerythrozytären Stadien (Hypnozoiten) einer Malaria tertiana, verursacht durch *P. vivax* oder *P. ovale*, eingesetzt wird. Der Wirkmechanismus von Primaquin auf die Malariaparasiten beruht wahrscheinlich auf der Schädigung der Mitochondrien (Beaudoin & Aikawa 1968, Boulard *et al.* 1983, Lanners 1991).

Der direkte schistosomizide Effekt auf alle Lebensstadien wurde bisher noch nicht untersucht, allerdings konnten *in vitro* Versuche mit frisch transformierten Schistosomulae zeigen, dass 40 µM Primaquin bereits innerhalb von 30 Minuten die Vesikel des Wurmtegmentes zerstört (Carneiro-Santos *et al.* 2001).

2.7.4 Diclofenac

Diclofenac ist ein nicht-steroidales Antiphlogistikum (Abbildung 33). Der Wirkmechanismus beruht auf der Hemmung der Cyclo-Oxygenase, die die Synthese von Prostaglandinen, Thromboxan und Prostacyclin aus Arachidonsäure katalysiert und auf der Hemmung der Lipooxygenase, welche zur Synthese von Leukotrienen benötigt wird (Ku *et al.* 1986). Es wird weiterhin vermutet, dass Diclofenac auch die Phospholipase A2 hemmt (Makela *et al.* 1997). Diclofenac wird zur Schmerztherapie insbesondere bei Arthritiden, Muskel- und Gelenksbeschwerden eingesetzt (Rote Liste 2006, Fachinformation).

Aus Tiermodellen ist bereits ein schistosomizider Effekt von Diclofenac bekannt. Die tägliche Applikation von 2,5 mg/kg KG Diclofenac sieben Tage vor Zerkarieninfektion und an den darauf folgenden 35 Tagen erzielte eine Reduktion der Wurmlast um 40%. Wurden dagegen nur einmalig sieben Tage vor Zerkarieninfektion 2,5 mg/kg KG appliziert, wurde die Reduktion der Wurmlast um 38% beobachtet. Eine Therapie mit gleicher Diclofenac-Dosis für 28 Tage täglich ab dem Zeitpunkt der Zerkarieninfektion erreichte eine Reduktion der Wurmlast um 30% (Farag *et al.* 1995). Die einmalige orale Gabe von 1 mg Diclofenac im Mausversuch 24 Stunden nach Zerkarienexposition führte zu einer signifikanten Reduktion der Schistosomula, applizierte man 1 mg Diclofenac sechs Wochen nach Zerkarienexposition wurden auch die adulten Würmer signifikant reduziert (Nessim & Mahmoud 2007).

2.7.5 Dexamethason

Dexamethason gehört zur Gruppe der fluorierten Glucocorticoide (Abbildung 35). Die entzündungshemmende Wirkung beruht auf der Hemmung des Enzyms Phospholipase 2A, das die Bildung von Arachidonsäure aus Phospholipiden katalysiert (Flower 1985). Arachidonsäure dient dem Enzym Cyclooxygenase als Substrat für die Synthese von Prostaglandinen. Dexamethason kommt unter anderem zur Therapie von Asthma, rheumatoider Arthritis und in der Palliativtherapie maligner Tumoren zum Einsatz (Rote Liste 2006, Fachinformation).

In Tierversuchen konnte bereits eine schistosomizide Wirkung auf *S. mansoni* nachgewiesen werden. Bei Versuchstieren, die 1h vor Zerkarieninfektion und an den acht

nachfolgenden Tagen mit 50 mg/kg KG Dexamethason behandelt wurden, konnte eine Reduktion der Wurmlast um 58% beobachtet werden (Hermeto *et al.* 1990). Da die direkte Wirkungsweise auf den Parasiten bisher nicht untersucht wurde, wird weiterhin diskutiert, ob Dexamethason direkt auf die Schistosomenstadien wirkt oder das Immunsystem des Wirtes beeinflusst (Hermeto *et al.* 1990).

2.7.6 9-Aminoacridin (Aminacrine)

9-Aminoacridin (9-AAC, Abbildung 40) ist ein Acridin-Derivat, welches bereits während des 1. und 2. Weltkrieges als Desinfektionsmittel für frische Wunden und für eiternde, durch anaerobe Bakterien infizierte Wunden, eingesetzt wurde (Schmitz 1980). Seine antibakterielle Wirkung wird in frühen Studien als vergleichbar mit der von Penicillin oder Streptomycin beschrieben (Stark *et al.* 1968, Schmitz 1980). Der Wirkmechanismus von 9-Aminoacridin beruht vermutlich auf der Störung der DNA-Synthese durch die DNA-Interkalation und der Inhibition der Topoisomerase I bzw. II (Muravenko *et al.* 2003, Wang *et al.* 2005, Anderson *et al.* 2006, Oppegard *et al.* 2009). In neuesten *in vitro* Studien zeigte 9-AAC eine vielversprechende antivirale Wirkung auf das Human Immunodeficiency Virus (HIV), indem es die Virusreplikation inhibierte (Guendel *et al.* 2009). Durch die Induktion von Apoptose und die Aktivierung von Tumorsuppressorproteinen konnte 9-AAC auch das Wachstum von Tumorzelllinien inhibieren. Des Weiteren sind 9-AAC und seine Derivate auch aktiv gegen Prionen und Protozoen wie Trypanosomen und *Trichomonas vaginalis* (Wainwright 2001, Anderson *et al.* 2006). Die Wirkung dieser Substanz auf Schistosomen ist bislang noch nicht erforscht.

2.7.7 8-Hydroxy-2-Quinolinecarbonsäure

8-Hydroxy-2-Quinolinecarbonsäure ist ein Chinolinderivat (Abbildung 39), über welches in der Literatur bisher keine Daten zu antibiotischen Effekten verfügbar sind. So werden vor allem Dingen Chinin und Mefloquin (beide Chinolinmethanole), Chloroquin (ein 4-Aminochinolin) und Primaquin (ein 8-Aminochinolin) werden seit langem erfolgreich zur Therapie bzw. Prophylaxe der Malaria verwendet. Interessant ist der sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesene schistosomizide Effekt der Chinolinderivate Mefloquin, Chloroquin, Chinin und Quinacrine, der vermutlich eng mit der Inhibition der Hämozoin-Bildung zusammenhängt (Oliveira *et al.* 2004, Keiser *et al.* 2009, Correa Soares *et al.* 2009). Auch Standardtherapeutika der Bilharziose verwendeten Therapeutika sind Chinolinderivate, wobei Praziquantel zu den Isochinolin-Pyrazine Derivaten und Oxamniquine zu den Tetrahydrochinolinen zählt (Ding *et al.* 2004, Shen *et al.* 2007).

2.8 „Drug targeting“ Modelle und Trägersubstanzen

Unter „drug targeting“ versteht man die selektive Anreicherung eines Therapeutikums in spezifischen Organen, Geweben oder Zellen, wobei die Effektivität der Wirkung erhöht und die systemischen Nebenwirkungen verringert werden sollen (Yokoyama 2005, Torchilin 2010). Das Prinzip des „drug targetings“ stammt von Paul Ehrlich. Im Allgemeinen wird zwischen aktivem und passivem *drug targeting* unterschieden. Unter aktivem „drug targeting“ versteht man die zielgerichtete Anreicherung einer Substanz im Zielgewebe durch Ausnutzen von spezifischen immunologischen und biochemischen Eigenschaften, wie z. B. Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen. Das passive „drug targeting“ beruht auf den physikochemischen Eigenschaften von Trägermolekülen (carrier) wie Liposomen, Micellen, Polyethylenglycol oder HSA, die den Transport der wirksamen Substanzen zu den Zielstrukturen gewährleisten (Wunder *et al.* 2003, Canal *et al.* 2010, Cukierman & Khan 2010, Torchilin 2010).

2.8.1 Albumin und HSA-Konjugate

Mit einem Anteil von 60% aller Plasmaproteine ist Albumin das häufigste Protein im menschlichen Blut, wobei 40% in den Gefäßen und 60% in den Geweben lokalisiert sind. Humanes Serumalbumin besteht aus 3 Domänen (I, II und III), wobei jede Domäne nochmals in die Subdomänen A und B unterteilt ist (Abbildung 3). Da Albumin aus 585 Aminosäuren (vorwiegend Alanin, Isoleucin, Glutamin und Leucin) besteht, gilt es als größter Energie- und Aminosäurespeicher im Blut (Quinlan *et al.* 2005). Die relativ lange durchschnittliche Halbwertszeit von 17 bis 19 Tagen resultiert vermutlich aus den 17 Disulfidbrücken (Doweiko *et al.* 1991, van der Vusse 2009). Die Albuminsynthese findet in den Hepatozyten der Leber statt, wobei die täglich von einem gesunden Menschen produzierte Albuminmenge zwischen 9-12 g beträgt (Mendez *et al.* 2005). Der Albuminabbau findet überwiegend im Muskel statt.

Hauptfunktionen dieses Proteins sind die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes, die Stabilisierung des Blut-pH Wertes, der Schutz von Steroidrezeptoren und der Schutz vor freien Sauerstoff-Radikalen (Mitzner *et al.* 2006, Klammt *et al.* 2008). Eine der wichtigsten Funktionen ist jedoch der Transport von schlecht wasserlöslichen Substanzen wie Steroiden und Fettsäuren durch das Blut. Durch seine starke negative Ladung kann das Protein Moleküle kovalent und reversibel binden und dient somit als zirkulierendes Depot für eine Reihe von Substanzen. Bislang sind 3-4 Bindungsstellen für langkettige Fettsäuren bekannt, weiterhin existieren spezielle Bindungsstellen für NO sowie für Metall-Ionen wie Zink und Kupfer (Mitzner *et al.* 2006, Klammt *et al.* 2008, van der Vusse 2009). Daneben existieren

zwei weitere Hauptbindungsstellen, die insbesondere beim Transport von Medikamenten eine übergeordnete Rolle spielen. So werden an der Bindungsstelle 1 vorwiegend Substanzen wie Indomethacin, Bilirubin und Salicylate, an der Bindungsstelle 2 hingegen Substanzen wie Diazepam, Tryptophan, Ibuprofen und Gallensäuren gebunden (Klammt *et al.* 2008, Varshney *et al.* 2010).

Aufgrund seiner chemischen Stabilität, auch bei Temperaturen bis zu 60°C, ist Albumin in hohem Maße für die Synthese von Konjugaten geeignet. Weiterhin ist HSA weder immunogen noch toxisch, ubiquitär verfügbar und bereits als Medikament verfügbar.

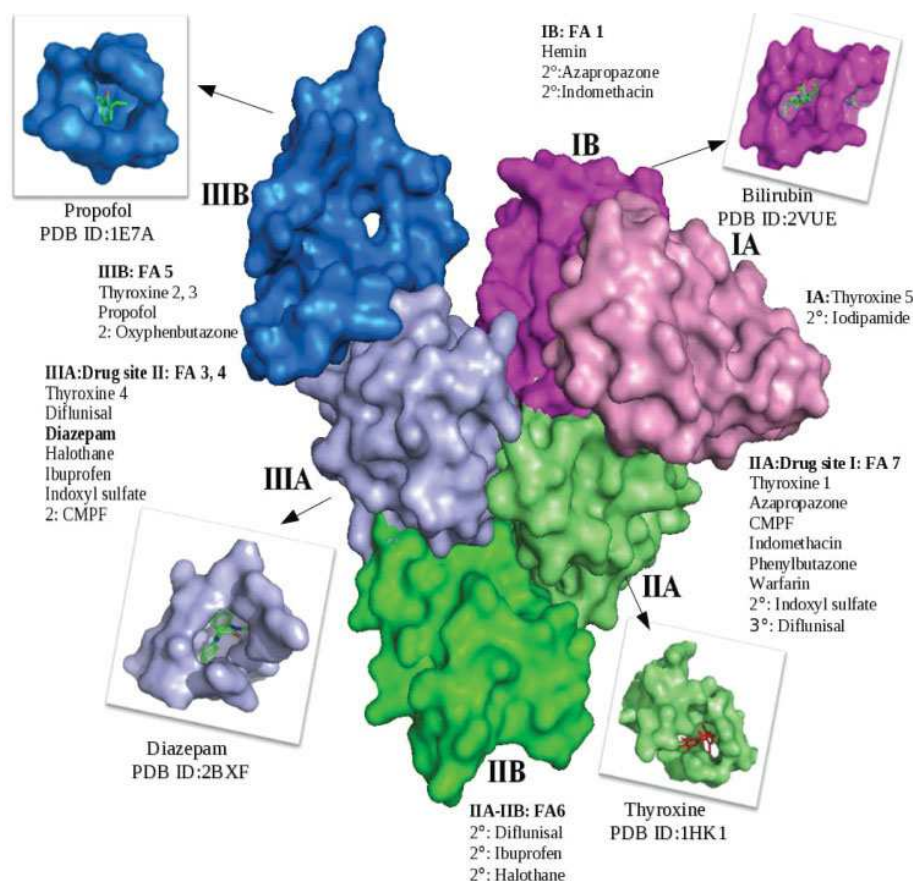


Abbildung 3. Liganden-Bindungs­kapazität von humanem Serumalbumin. Dargestellt sind die drei Hauptdomänen des herzförmigen Albuminmoleküls, wobei die Subdomänen A und B jeweils in einem helleren bzw. dunkleren Farbton dargestellt sind (Domäne I = magenta, Domäne II = grün, Domäne III = blau). Die eingefügten Kästchen zeigen die Bindungsstellen für typische Liganden an den jeweiligen Domänen (aus Varshney *et al.* 2010).

"Drug targeting" Modelle auf Basis von humanem Serumalbumin sind seit längerem aus der Krebsforschung bekannt. Dabei fungiert das Albuminmolekül als Trägersubstanz von Zytostatika wie Methotrexat, die so direkt in die Tumorzelle geschleust werden. In den

Zielzellen wird das Medikament durch körpereigene Enzyme vom HSA abgespalten und kann somit direkt in der Tumorzelle wirken (Wosikowski *et al.* 2003, Wunder *et al.* 2003, Wolff *et al.* 2006). Albumin wird im Körper nur von stark proliferierenden Zellen in größerem Umfang aufgenommen, während ruhende Zellen dieses Protein nahezu gar nicht aufnehmen (Strobel *et al.* 1986). Durch die Kopplung der therapeutisch wirksamen Substanzen an Albumin nehmen die entstandenen Konjugate die pharmakokinetischen Eigenschaften von Albumin an, wodurch toxische Effekte vermindert werden können. Im Vergleich zu niedermolekularen Medikamenten, die oftmals nur eine kurze Halbwertszeit haben, da sie schnell vom Körper ausgeschieden werden, resultiert die Kopplung an Albumin in einer höheren Halbwertszeit. Die Konjugate verbleiben länger im Körper und können z. B. in Tumorzellen effektiv angereichert werden. Therapeutische Effekte können selbst mit einer geringen Konjugatdosierung erreicht werden (Wunder *et al.* 2003, Wolff *et al.* 2006).

Insbesondere der Einsatz von Methotrexat-HSA und Aminopterin-HSA führte zu nachweisbaren therapeutischen Effekten auf Tumorzelllinien und im Tiermodell (Stehle *et al.* 1999, Burger *et al.* 2001, Weigand *et al.* 2001, Eschen *et al.* 2002, Kremer *et al.* 2002, Wosikowski *et al.* 2003). Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse von MTX-HSA wurden bereits klinische Phase I- und II-Studien durchgeführt (Hartung *et al.* 1999, Vis *et al.* 2002, Bolling *et al.* 2006). Dabei konnte mit einer Kombinationstherapie von MTX-HSA und Cisplatin eine Tumorregression bei 7 von 11 Patienten mit Blasenkrebs beobachtet werden (Bolling *et al.* 2006). Bei austherapierten Nierenzellkarzinomen zeigte die Therapie mit MTX-HSA in der Hälfte der Patienten „stable disease“ (Vis *et al.* 2002). Beide Phase II Studien belegen jedoch die gute Verträglichkeit des Albuminkonjugats mit milden bis mäßigen Nebenwirkungen. Weiterhin wurde Methotrexat-HSA im Tiermodell bereits erfolgreich zur Behandlung der rheumatischen Arthritis, als Prophylaxe einer GvHD (Graft-versus-Host Disease) und als Immunsuppressivum bei allogenen Nierentransplantationen eingesetzt (Wunder *et al.* 2003, Fiehn *et al.* 2004, Wolff *et al.* 2006, Hickstein *et al.* 2008).

2.8.2 Polyethylenglycol und PEG-Konjugate

Polyethylenglycol (PEG, Abbildung 38) ist ein synthetisches Polymer mit der allgemeinen Summenformel $C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$. PEG besteht aus sich wiederholenden Einheiten von Ethylenglycol, die sowohl chemisch inert als auch amphiphil sind. Je nach Kettenlänge kann PEG in fester und flüssiger Form vorliegen (Pisal *et al.* 2010). PEG wird seit längerem als Trägermolekül für Makromoleküle wie Proteine und Peptide genutzt. Die PEGylierung, also die Bindung von linearem oder verzweigtem PEG an Proteine, reduziert die Immunogenität des nativen Proteins, erhöht die Stabilität, vergrößert das Molekül und reduziert so die

Ausscheidungsgeschwindigkeit durch die Niere (Kang *et al.* 2009, Pisal *et al.* 2010). PEGylierte Substanzen wie Enzyme (z. B. PEG-Asparaginase), Cytokine (z. B. PEG-Interferone, PEG-Interleukine) und Hormone (z. B. PEG-Calcitonin) sind mittlerweile als Medikamente zugelassen und werden klinisch bereits erfolgreich eingesetzt (Haag & Kratz 2006, Pisal *et al.* 2010).

2.9 Getestete HSA- und PEG-Konjugate

Die Verknüpfung der wirksamen Substanzen mit dem Trägersystem (carrier) kann durch eine kovalente Bindung oder eine nicht-kovalente Bindung erfolgen. Die nicht-kovalente Bindung findet sich z. B. bei Liposomen. Dort können hydrophile Substanzen in den hydrophilen Kern eingeschlossen oder lipophile Wirkstoffe in die Lipid -Doppelschicht integriert werden (Cukierman & Khan 2010). Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konjugaten wurden alle Wirkstoffe ausschließlich kovalent bzw. kovalent über „linker“ (Verbindungs-Substanzen) an die „carrier“ (Trägermoleküle) gekoppelt. Bei der kovalenten Bindung (Elektronenpaarbindung) bilden die beiden Reaktionspartner ein gemeinsames Elektronenpaar aus, wodurch eine stabile Bindung entsteht.

Im menschlichen Organismus werden die Makromoleküle HSA und PEG, sowie auch die HSA bzw. PEG-Konjugate, durch Endozytose in die Zelle aufgenommen (Simionescu *et al.* 2002, Haag & Kratz 2006). Im Lysosom erfolgt anschließend der enzymatische Verdau im sauren Milieu. Die Spaltung der Makromoleküle erfolgt bei Schistosomen sowohl im Darmlumen als auch in den Zellen der Gastrodermis. Der Proteinabbau, insbesondere der Abbau von Albumin, wird durch ein Multienzym-Netzwerk, bestehend aus Cathepsinproteasen, Cysteinproteinasen und Aspartatproteinasen, gewährleistet (Delcroix *et al.* 2006, Planchart *et al.* 2007, Dvorak *et al.* 2009). Das pH-Optimum dieser Proteinasen liegt im sauren Milieu bei 4-6.5 (Delcroix *et al.* 2006, Dvorak *et al.* 2009). Vermutlich übernehmen die Cysteinproteasen die initiale Spaltung des Albuminmoleküls in drei große Hauptspaltprodukte, welche anschließend von den Cathepsin- und Aspartatproteinasen weiter verdaut werden (Delcroix *et al.* 2006). Der Großteil des Proteinverbaus findet in sauren Mikrokompartimenten innerhalb der Gastrodermis statt. Diese Mikrokompartimente entstehen vermutlich bei der Fusion von Darmlamellen und weisen einen pH-Wert von 4.0 auf. Somit herrschen im Darmsystem der Schistosomen und in menschlichen Lysosomen ähnliche pH-Verhältnisse.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Albumin- und PEG-Konjugate wurden deshalb unter dem Gesichtspunkt einer möglichen enzymatischen oder pH-abhängigen Spaltung im sauren Milieu synthetisiert.

2.9.1 AMPT (Aminopterin)-HSA und MTX (Methotrexat)-HSA

Aminopterin und Methotrexat wurden kovalent an HSA gebunden. Dabei bildeten die Carboxylgruppen der beiden Wirkstoffe mit einem Lysin des Albumins eine Säureamidbindung (Abbildung 30, Abbildung 32). Die Spaltung der Konjugate erfolgt bei Menschen vermutlich im Lysosom der Zielzelle, wobei HSA proteolytisch verdaut wird, bis am Wirkstoff nur noch ein Lysinrest vorhanden ist.

2.9.2 Diclo (Diclofenac)-HSA

Diclofenac wurde ebenfalls kovalent an HSA gebunden. Wie schon für MTX und AMPT beschrieben, bildete die Carboxylgruppe des Diclofenac mit einem Lysin des HSA eine Amidbindung (Abbildung 34). Auch bei diesem Konjugat soll eine proteolytische Spaltung im Lysosom stattfinden, wobei letztlich ein Lysin am Diclofenac verbleibt.

2.9.3 DHAc (Dexamethasonhydrazinoactic acid)-HSA

Dexamethason wurde über einen Hydrazon-Linker und Essigsäure kovalent an HSA gebunden (Abbildung 37). Dabei verknüpft Hydrazon die C-20-Position des Dexamethasons mit Essigsäure und es entsteht DHAc (Abbildung 36). Die Carboxylgruppe der Essigsäure stellt wiederum die kovalente Amidbindung mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins von HSA her. Die Spaltung des Konjugats erfolgt beim Menschen vermutlich im Lysosom, da Hydrazon zu den säurespaltbaren Linkern zählt.

2.9.4 DHAc (Dexamethasonhydrazinoactic acid)-AmPEG

Die Kopplung des Dexamethasons an PEG erfolgte analog zum DHAc-Konjugat. Allerdings wurde das PEG im Vorfeld mit einer Aminogruppe funktionalisiert, um die Amidbindung mit der Carboxylgruppe der Essigsäure zu ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein PEG-Molekül von 22 kDa verwendet.

2.9.5 9-ITC-AC (9-Isothiocyanato-Acridine)-HSA

Zur Bindung des 9-Aminoacridins an HSA wurde der Linker Isothiocyanat (ITC) benutzt, welcher weder enzymatisch noch durch einen sauren pH-Wert spaltbar ist (Abbildung 41). Nach dem enzymatischen Verdau des Albumins entsteht vermutlich ein Wirkstoff-ITC-Lysin-

Derivat, welches eine veränderte Wirksamkeit im Vergleich zum freien Wirkstoff aufweisen kann.

2.9.6 HQCA (Hydroxyquinolinecarbonic acid)-HSA

HQCA wurde über eine kovalente Bindung an HSA gebunden. Dabei bildete die Carboxylgruppe des Wirkstoffs mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysins von HSA ein Säureamid. Wie auch für AMPT-HSA und MTX-HSA beschrieben, erfolgt die Spaltung im menschlichen Organismus vermutlich im Lysosom.

2.10 *Schistosoma mansoni*: Ingestion von fluoreszenzmarkiertem Albumin

Bereits seit längerem ist bekannt, dass Schistosomula und adulte Schistosomen *in vitro* fluoreszenzmarkierte Albuminmoleküle wie FITC-BSA und Rh-BSA oral aufnehmen und vermutlich auch im Darmsystem durch verschiedene Proteinasen abbauen (Bennett & Caulfield 1991, Delcroix *et al.* 2006). Im Zuge der Digestion entstandene Peptidfragmente werden dabei vermutlich über die Darmzellen aufgenommen (Delcroix *et al.* 2006). In eigenen Vorarbeiten wurde erstmals die Ingestion und Anreicherung von fluoreszenzmarkiertem HSA (HSA-Afl) im Darmsystem von Schistosomula, Prä-Adulten und adulten Schistosomen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen (Holtfreter *et al.* 2010). Im zeitlichen Verlauf war ebenfalls eine grüne Fluoreszenz im Exkretionssystem der Adulten sichtbar, die Hinweise auf den Abbau des Albumins im Darm lieferte (Abbildung 4). Die Albuminaufnahme fand ausschließlich oral statt und nicht, wie z. B. für Glucose beschrieben, über im Tegument lokalisierte Transporterproteine (Fripp 1967, Uglem & Read 1976, Skelly *et al.* 1998). Da HSA das häufigste Protein und der größte Aminosäurespeicher im menschlichen Blut ist, dient es vermutlich als Hauptenergiequelle für Schistosomula und Prä-Adulte. Weiterhin dient Albumin, neben Erythrozyten, vermutlich als zusätzliche Energiequelle für adulte Schistosomen, da unterentwickelte männliche und weibliche Schistosomen aus Versuchstieren isoliert wurden, welche mit einer Proteinmangeldiät gefüttert wurden (Neves *et al.* 2001, Barros *et al.* 2008). Das im Rahmen der Vorversuche verwendete fluoreszenzmarkierte Albumin (HSA-Afl) besteht aus dem Fluoreszenzfarbstoff Aminofluorescein Isomer I (Afl) und humanem Serumalbumin (HSA), die durch den Linker Triazinchlorid verbunden sind. An jedem Albuminmolekül der verwendeten HSA-Afl-Lösung ist jeweils nur ein Molekül Aminofluorescein gebunden. Der native Charakter des Proteins bleibt somit erhalten, die gebundene Substanz kann ungehindert in die Zelle gelangen. Im Gegensatz dazu wirken Albuminmoleküle, an welche mehr als ein Molekül Aminofluorescein gekoppelt ist, häufig immunogen und werden schnell im retikuloendothelialen System abgebaut (Wolff *et al.* 2006, Stehle *et al.* 1997). Studien mit dem hier verwendeten HSA-Afl

belegen, dass sich dessen physiologische Eigenschaften nicht von ungebundenem Serumalbumin unterscheiden. Somit verhält sich das HSA-Afl im Körper identisch zu nativem HSA.

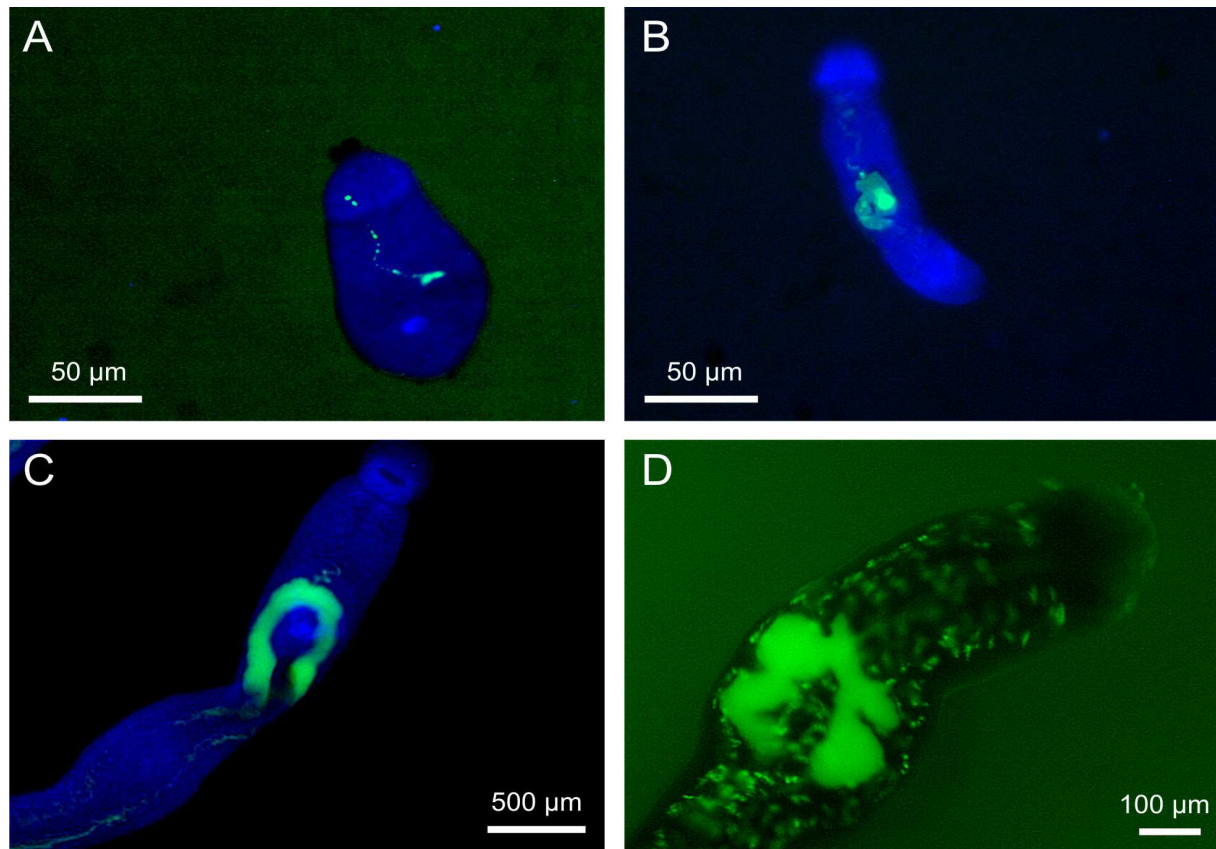


Abbildung 4. Ingestion von fluoreszenzmarkiertem Albumin (Afl-HSA) durch Schistosomula (A), Prä-Adulte (B) und Adulte (C) von *S. mansoni* *in vitro*. Nach einer 5-stündigen Inkubation mit Afl-HSA wurde bei den untersuchten Lebensstadien eine intensive grüne Fluoreszenz in Oesophagus und dem Caecum bzw. dem zweigabigen Darmsystem beobachtet. Nach einer verlängerten Inkubationsperiode von 30 h konnte ebenfalls eine starke grüne Fluoreszenz im Exkretionssystem der adulten Würmer (D) beobachtet werden. Fluoreszenzmikroskopie, FITC-Filter (A, B, C, D) und DAPI-Filter (A, B, C). (aus Holtfreter *et al.* 2010).

2.11 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Bei der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM, confocal laser scanning microscopy) wird das zu untersuchende Präparat mit Hilfe eines Laserstrahls Punkt für Punkt abgerastert. Dabei wird das vom Präparat abgestrahlte (emittierte) Licht vom Anregungslicht getrennt, indem es durch eine Lochblende gelenkt wird. Licht, welches nicht aus der Schärfenebene kommt bzw. außerhalb des Brennpunktes liegt, wird somit blockiert und nicht abgebildet. Hinter dieser Lochblende befindet sich ein spezieller Detektor (z. B. ein Photomultiplier), der

das Lichtsignal in ein elektronisches Signal umwandelt. Die so entstandenen Einzelbilder werden letztendlich zu einem Gesamtbild zusammengefügt, direkt im konfokalen Mikroskop ist jedoch zu keinem Zeitpunkt ein vollständiges Bild zu sehen (Lucitti & Dickinson 2006, Guthoff *et al.* 2009, Nohr-Westphal *et al.* 2009). Aufgrund der hochauflösenden Bilder und der Möglichkeit der 3-dimensionalen Rekonstruktion, wird die CLSM seit längerem auch zur nicht-invasiven Untersuchung von biologischen Strukturen wie Zellen und Zellverbänden benutzt. Dazu kann entweder das Rückstrahlungsvermögen des Untersuchungsmaterials (Reflexionsmikroskopie) oder die Fluoreszenz untersucht werden (Dailey 1995). Bei der Reflexionsmikroskopie lassen sich aufgrund der Änderung im Brechungsindex Rückschlüsse auf mögliche Veränderungen in bekannten zellulären Strukturen ziehen. Deshalb ist die Methode der CLSM insbesondere geeignet, um krankhafte Veränderungen in Geweben zu erkennen und wird deshalb auch in verschiedenen medizinischen Disziplinen bereits erfolgreich angewendet. So konnten Urothelkarzinome in Zystektomiepräparaten, orale Plattenepitheldysplasien im Mausmodell und Leberzellkarzinome (hepatozelluläres Karzinom) in Leberschnitten erfolgreich detektiert werden (Zhang *et al.* 2000, Nohr-Westphal *et al.* 2009, Farahati *et al.* 2010). Weiterhin wurde die CLSM zur *in vivo*-Differenzierung zwischen malignen Melanomen und gutartigen Nävi, seborrhoischer Keratose oder Basalzellkarzinomen erfolgreich eingesetzt (Gerger *et al.* 2005, Gerger *et al.* 2009). Besonders in der Ophthalmologie wurde die nicht-invasive CLSM gezielt weiterentwickelt, um Corneainfiltrate und Ulzerationen, Glaukome bzw. bakteriell, viral oder durch Protozoen verursachte Erkrankungen zu differenzieren (Guthoff *et al.* 2009).

2.12 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Schistosomiasis ist neben der Malaria mit weltweit 200 Millionen Infizierten eine der bedeutendsten parasitären Infektionen in tropischen und subtropischen Gebieten. Jährlich sterben 15.000 bis 20.000 Menschen an den Folgen einer chronischen Schistosomiasis. Diese Tropenkrankheit ist in 74 Ländern endemisch, etwa 80% der Infizierten leben jedoch in Afrika (WHO 1996, Löscher 2003). Die derzeit zur Therapie der Schistosomiasis von der WHO empfohlenen Medikamente Praziquantel und Oxamniquine wirken jedoch nicht auf alle Entwicklungsstadien sondern vorwiegend auf adulte Würmer (WHO 2005). Aufgrund von persistierenden Lebensstadien können Infektionen so trotz Therapie weiter bestehen. Weiterhin traten in den letzten Jahren vermehrt Fälle von Therapieversagern auf, die sich auf eine niedrigere Praziquantel-Suszeptibilität in fokalen Gebieten zurückführen lassen. Aus diesen Gründen steht die Entwicklung von neuen Therapeutika im Focus der aktuellen tropenmedizinischen Forschung. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung neuer

therapeutischer Ansätze, die insbesondere auf die Eradizierung aller Lebensstadien von *Schistosoma mansoni* abzielen.

(I) Entwicklung eines „drug targeting“ Modells zur Therapie der Schistosomiasis

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der schistosomizide Effekt von Therapeutika, die an humanes Serumalbumin gekoppelt wurden, auf Schistosomula, Prä-Adulte und Adulte von *S. mansoni* untersucht. Für ein solches „drug targeting“ Model wurden die Albuminkonjugate von Methotrexat, Aminopterin, Dexamethason, 9-Aminoacridin, Diclofenac und 8-Hydroxy-2-Quinolinecarbonsäure *in vitro* getestet. Weiterhin wurde die Wirksamkeit der Albuminkonjugate mit der Wirksamkeit der ungekoppelten Substanzen verglichen. Die Kopplung der HSA-Konjugate erfolgte nach dem bereits für HSA-Afl beschriebenen Prinzip, wobei ein Molekül HSA und das Therapeutikum in einem molaren Verhältnis von 1:1 gebunden wurden. Da Schistosomula, Prä-Adulte und adulte Würmer nachweislich HSA durch Ingestion aufnehmen, könnten antihelminthische Substanzen in das Verdauungssystem geschleust werden und dort nach ihrer enzymatischen Abspaltung direkt wirken. So könnte eine neuartige Therapie-Strategie mit möglichen wirksamen Medikamenten entwickelt werden, die eine Alternative zu den bislang bekannten Medikamenten darstellt, welche primär auf das Tegument der Schistosomen wirken.

(II) Evaluierung des schistosomiziden Potentials der Malariatherapeutika Mefloquin und Primaquin

Malaria ist weltweit die häufigste Erkrankung in tropischen und subtropischen Gebieten. Zur Therapie bzw. Prophylaxe werden Therapeutika wie Mefloquin und Primaquin eingesetzt. Da sich die Endemiegebiete von Malaria und Schistosomiasis überschneiden, soll in der vorliegenden Arbeit der schistosomizide Effekt der Malariatherapeutika Mefloquin und Primaquin auf Zerkarien, Schistosomula, Prä-Adulte und Adulte von *S. mansoni in vitro* untersucht werden.

Der Goldstandard der Diagnostik einer Schistosomiasis ist der direkte Nachweis vitaler Eier aus Stuhl bzw. Darmbiopaten. Der direkte Einachweis ist in der Routinediagnostik jedoch oft limitiert, da Patienten mit einer leichten Infektion nur wenige Eier ausscheiden, was fälschlicherweise zu negativen Ergebnissen führen kann. Auch die Ergebnisse von serologischen und molekularbiologische Nachweismethoden wie ELISA bzw. PCR erlauben nur eine unzureichende Aussage über eine persistierende oder bereits ausgeheilte Infektion. Die Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Wurmeiern, als Indikator für eine aktive oder inaktive Infektion, spielt jedoch eine große Rolle wenn der Therapieerfolg nach einer

antihelminthischen Therapie überprüft werden soll. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung einer neuen Methode zum diagnostischen Nachweis der Schistosomiasis.

(III) Evaluierung des Potentials der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie zur Diagnostik der Intestinalen Schistosomiasis

Seit längerem wird die CLSM in verschiedenen medizinischen Bereichen zur Untersuchung von biologischen Strukturen und der Früherkennung von krankhaft veränderten Geweben verwendet. In Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit diese Mikroskopiemethode zur direkten Visualisierung der Eier von *S. mansoni* im Darmgewebe geeignet ist. Weiterhin wurde untersucht, ob zwischen vitalen und avitalen Eiern unterschieden werden kann und die CLSM so zum Nachweis eines Therapieerfolges z. B. nach Behandlung mit HSA-Konjugaten, geeignet ist.

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

Der im Rahmen dieser Arbeit genutzte Schistosomen-Zyklus basierte auf einem afrikanischen *Schistosoma mansoni*-Stamm aus Mozambique. Als Zwischenwirte dienten Süßwasserschnecken der Gattung *Biomphalaria glabrata*. Die Schnecken wurden in mit gefiltertem Aquariumwasser befüllten, 600 ml-Bechergläsern gehalten und mit Kopfsalat gefüttert. Als Endwirte dienten weibliche NMRI-Mäuse (*Mus musculus*, Harlan & Winkelmann, Horst, Netherlands). Die Haltung der Mäuse erfolgte in Zehnergruppen in Käfigen mit handelsüblicher Kleintierstreu, Futterpellets (ssniff R/M-H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) und Leitungswasser *ad libitum*. In den Tierhaltungsräumlichkeiten herrschte eine durchschnittliche Temperatur von 30°C um die Entwicklung der Zerkarien in den Zwischenwirten zu gewährleisten, sowie ein 12 h Tag-Nacht-Zyklus.

3.2 Infektion und Euthanasie der NMRI-Mäuse

Zur Infektion mit Zerkarien von *S. mansoni*, wurden die Mäuse für 90 min einzeln in 1-Liter Bechergläser gesetzt, die 50 ml gefiltertes Aquariumwasser und 300 bis 1500 Zerkarien enthielten. Die Bechergläser wurden mit Glasplatten abgedeckt, um ein Herausspringen der Mäuse zu verhindern. Die Euthanasie der Mäuse erfolgte durch die intraperitoneale Injektion von 400 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital-Natrium (Narcoren®). Zur Gewinnung der adulten Würmer aus dem Pfortadersystem wurde das Pentobarbital-Natrium in den *in vitro* und *in vivo* Versuchen im Verhältnis 1:1 mit Heparin gemischt, um die vorzeitige Agglutination des Blutes zu verhindern. Alle im Rahmen der Promotionsarbeit durchgeführten Tierversuche wurden durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (Aktenzeichen LALLF-M-V/TSD/7221.3-1.2-001/07, LALLF-M-V/TSD/7221.3-1.2-009/08, LALLF-M-V/TSD/7221.3-2.5-003/10, LALLF-M-V/TSD/7221.3-2.5.1.002/10).

3.3 *In vitro* Experimente

3.3.1 Zytostatika und deren Albuminkonjugate

Zur Herstellung der Stammlösungen von Aminopterin (AMPT) und Methotrexat (MTX, ± Amethopterin Hydrat) wurde eine 5 mM NaOH-Lösung verwendet. Diese Stammlösung wurde nochmals in PBS verdünnt und anschließend dem Kulturmedium in der gewünschten Konzentration zugegeben. Die Albuminkonjugate AMPT-HSA und MTX-HSA wurden uns

freundlicherweise von Frau Dr. Eva Frei und Herrn PD Dr. Hans-Hermann Schrenk (Abteilung für Molekulare Toxikologie, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt und lagen in einer 20%igen Albuminlösung vor. Beide Zytostatika sowie die dazugehörigen Albuminkonjugate wurden *in vitro* an Prä-Adulten und Adulten von *S. mansoni* getestet. Hierbei wurden die Substanzen jeweils in den Konzentrationen 0.1 µM, 1 µM und 10 µM eingesetzt, welche auf Basis von *in vitro* Studien mit Krebszelllinien ausgewählt wurden, da in der aktuellen Literatur keine *in vitro* Daten zur Dosierung der Zytostatika bzw. der Albuminkonjugate bei einer Schistosomiasis verfügbar waren. Alle *in vitro* Experimente wurden in einem Doppelansatz durchgeführt, wobei unbehandelte Lebensstadien als Negativkontrolle dienten.

3.3.2 Malariatherapeutika sowie der Goldstandard Praziquantel

Zur Herstellung der Stammlösungen von Mefloquin hydrochloride (Mefloquin) und Praziquantel wurde DMSO als Lösungsmittel verwendet, Primaquin bisphosphate (Primaquin) wurde in *Aqua ad injectabilia* gelöst. Die Malariatherapeutika Mefloquin und Primaquin wurden in den Konzentrationen 0.5 µg/ml, 1 µg/ml und 2 µg/ml und das als Positivkontrolle verwendete Praziquantel in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Diese ausgewählten Mefloquin-, Primaquin- und Praziquantel-Konzentrationen spiegeln die Konzentrationen während einer Therapie bzw. Prophylaxe (Mefloquin) wieder (Karbwang & White 1990, Singhasivanon *et al.* 1991, Kollaritsch *et al.* 2000, Cioli & Pica-Mattocchia 2003, Elmes *et al.* 2006, Roche 2009). Alle Therapeutika wurden an Zerkarien, Schistosomula, Prä-Adulten und Adulten getestet, wobei unbehandelte und DMSO-behandelte Stadien als Negativkontrollen dienten. Alle Experimente wurden in einem Doppelansatz durchgeführt.

3.3.3 HSA-Konjugate und dazugehörige niedermolekulare Substanzen

Zur Herstellung der Stammlösungen von Dexamethason, 8-Hydroxy-2-Quinolinecarbonsäure (HQCA) und 9-Aminoacridin (9-AAC) wurde DMSO als Lösungsmittel verwendet. Diclofenac Natrium Salz (Diclofenac sodium salt, Diclofenac) wurde in *Aqua ad injectabilia* gelöst. Die HSA-Konjugate DHAc-HSA, HQCA-HSA und ITC-AC-HSA sowie das PEG-Konjugat DHAc-AmPEG wurden uns von Frau Dr. Eva Frei und Herrn PD Dr. Hans-Hermann Schrenk (Abteilung für Molekulare Toxikologie, DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die HSA-Konjugate lagen in einer 10%igen HSA-Lösung und das PEG-Konjugat als 50%ige Aminopolyethylenglycol-Lösung vor. Das HSA-Konjugat Diclofenac-HSA (Diclo-HSA) wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. Hans-Jörg Sinn (AlbuPharm, Heidelberg) zur Verfügung gestellt und lag als 10%ige HSA-Lösung vor. Alle Substanzen wurden *in vitro* an Prä-Adulten und Adulten von *S. mansoni* getestet. Die ungekoppelten Substanzen wurden in den

Konzentrationen 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml und 64 µg/ml getestet. Die dazugehörigen HSA-Konjugate wurden jeweils in einem Pilotversuch in den drei höchsten Konzentrationen 64 µg/ml, 32 µg/ml und 16 µg/ml eingesetzt. Bei einer antihelminthischen Wirkung innerhalb dieser Konzentrationsspanne wurden auch die Albuminkonjugate in den Konzentrationen 0.5 µg/ml – 64 µg/ml getestet. Die Konzentrationsangaben der Konjugate beziehen sich auf die gekoppelten Wirksubstanzen.

3.3.4 Präparation der Lebensstadien von *Schistosoma mansoni*

A – Zerkarien

Positiv auf Zerkarienausscheidung getestete *B. glabrata* Schnecken wurden für 24 Stunden abgedunkelt. Anschließend wurden je 5 Tiere in ein, mit 10 ml gefiltertem Aquariumwasser befülltes, 50 ml-Röhrchen überführt. Nach einer 90 minütigen Inkubationsperiode unter einer Warmlichtquelle wurden die im Wasser befindlichen infektiösen Larven gepoolt. Die Anzahl der Zerkarien wurde in einem 1:1 Gemisch aus Zerkarienzählung und Jod bei 40-facher Vergrößerung an einem Lichtmikroskop bestimmt. Anschließend wurde jeweils 1 ml der Zerkarienzählung in die mit Aquariumwasser und den zu testenden Substanzen in einem Gesamtvolumen von 4 ml befüllten Kavitäten einer 6-Well-Platte überführt.

B – Schistosomula (modifiziert nach Clegg & Smithers 1972)

Nach der Euthanasie 12 bis 14 Wochen alter, naiver Mäuse wurden die Haare des Abdomens mit Hilfe eines Haartrimmers entfernt. Anschließend wurde die Haut abpräpariert und in eine, mit 1 ml Waschlösung befüllte, Petrischale überführt. Mittels einer Pinzette, deren Ende mit sterilem Mull umwickelt wurde, wurden Fett- und Bindegewebe durch „Abrubbeln“ komplett entfernt. Das Hautstück wurde anschließend 2-3mal mit warmer Spüllösung gewaschen, um Fett- und Bindegewebsstücke zu entfernen. Die so präparierte Haut wurde über ein, vollständig mit 37°C warmem Schistosomula-Kulturmedium befülltes, 25 ml-Becherglas gezogen, so dass die Hautunterseite dem Kulturmedium auflag. Die Hautränder wurden mit medizinischem Klebeband am Becherglas fixiert. Zur Applikation der Zerkarienzählung wurde ein ca. 3-4 cm hoher Trichter aus Parafilm® über dem Hautstück geformt und ebenfalls mit medizinischem Klebeband fixiert. Um das Auslaufen der Zerkarienzählung zu verhindern, wurden Becherglas und Trichter nochmals mit Parafilm® umwickelt. Die Hautoberfläche wurde 2-3 Mal mit autoklaviertem Leitungswasser gespült, um Haare zu entfernen. Anschließend wurde der Trichter mit frisch gewonnener Zerkarienzählung befüllt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C und Lichtabschluss (Grabe & Haas 2004) wurde die alte Zerkarienzählung abgenommen und

frische Lösung hinzugegeben. Nach der letzten Zugabe von Zerkariensuspension folgte eine zweistündige Inkubationsperiode, um das Einwandern der Zerkarienköpfe aus der Maushaut in das Kulturmedium zu gewährleisten. Anschließend wurde das Kulturmedium in 15 ml-Röhrchen überführt und bei 1000 g für 3 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets in 300 µl Kulturmedium vorsichtig resuspendiert und anschließend gepoolt. Jeweils 30 bis 70 Schistosomula wurden in mit 3 ml warmem Kulturmedium befüllte Kavitäten einer 12-Well-Platte überführt und für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die zu testenden Substanzen appliziert.

C - Prä-Adulte (modifiziert nach Miller & Wilson 1987)

Vier bis acht Wochen alte Mäuse wurden mit 500 bis 1500 Zerkarien von *S. mansoni* infiziert. Sechs Tage nach der Infektion wurden die Mäuse euthanasiert und der Brustkorb eröffnet. Anschließend wurde zum Spülen des Lungenkreislaufs eine 20 ml-Spritze mit warmer Spüllösung aufgezogen und die daran befestigte Butterfly-Kanüle in die rechte Herzkammer eingestochen. Mit Hilfe einer sterilen Kanüle (Größe: 20Gx1½) wurde die linke Herzkammer punktiert, so dass Blut und Spülflüssigkeit aus der Punktionsstelle der linken Herzkammer wieder austreten konnten. Die gespülten Lungenflügel wurden heraus präpariert und in ein, mit 10 ml Waschlösung befülltes, 50 ml-Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Lunge dreimal mit Waschlösung gewaschen, um Blut und Haarreste zu entfernen und unter Zuhilfenahme zweier Skalpelle in einer Petrischale in feine Stücke geschnitten. Um die Wanderung der Prä-Adulten aus den Lungenkapillaren ins Medium zu gewährleisten, wurden die Lungenstücke in ein, mit 10 ml Kulturmedium befülltes 50 ml-Röhrchen überführt und für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden das Kulturmedium durch ein 200 µm Sieb filtriert, in 15 ml-Röhrchen überführt und bei 1000 g für 3 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets in 300 µl Kulturmedium vorsichtig resuspendiert und anschließend gepoolt. Jeweils 50 bis 70 Prä-Adulte wurden in mit 3 ml warmem Kulturmedium befüllte Kavitäten einer 12-Well-Platte überführt und für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die zu testenden Substanzen appliziert.

D – Adulte (modifiziert nach Duvall & DeWitt 1976)

Vier bis acht Wochen alte Mäuse wurden mit 300 Zerkarien von *S. mansoni* infiziert und an Tag 70 nach Infektion euthanasiert. Anschließend wurden Brustkorb und Bauchhöhle eröffnet und die Pfortader nahe der Hilusregion mit einer Schere horizontal durchtrennt. Zum Spülen des Lungen- und Körperkreislaufs wurde eine 20 ml-Spritze mit warmer Spüllösung aufgezogen und die daran befestigte Butterfly-Kanüle in die rechte Herzkammer

eingestochen. Die durch die Spüllösung aus der Pfortader gedrückten Adulten wurden in einem 600ml-Becherglas aufgefangen und in eine sterile Petrischale überführt. Anschließend wurden die Würmer mit warmer Waschlösung gewaschen, bis das Blut vollständig entfernt war. Jeweils fünf bis sieben Adulte wurden in mit 5 ml warmem Kulturmedium befüllte Kavitäten einer 6-Well-Platte überführt und für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die zu testenden Substanzen appliziert.

3.3.5 Beurteilung der Vitalität und Beobachtungszeiträume

Der Vitalitätsstatus der untersuchten Lebensstadien wurde nach den in Tabelle 1 aufgeführten Kriterien in die drei Kategorien vital, geschädigt und tot eingeteilt.

Da Zerkarien nach 12 h ihre Infektiosität verlieren (Löscher 2000), wurden diese Lebensstadien alle 3 h für einen Zeitraum von insgesamt 12 h hinsichtlich ihrer Vitalität untersucht. Immobile und tote Zerkarien, die auf den Boden der 6-Well-Platte abgesunken waren, wurden mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops (Nikon CK40) mit 100-facher Vergrößerung untersucht. Vitale, frei schwimmende Larven wurden mit einer Lupe bei 4-facher Vergrößerung untersucht.

Schistosomula, Prä-Adulte und adulte Würmer wurden alle 12 h für insgesamt sieben Tage hinsichtlich ihrer Vitalität unter einem inversen Lichtmikroskop untersucht. Schistosomula und Prä-Adulte wurden dabei mit 100-facher Vergrößerung und adulte Würmer mit 40-facher Vergrößerung untersucht.

Tabelle 1. Merkmale von vitalen, geschädigten und toten Lebensstadien von *S. mansoni*

	Zerkarien	Schistosomula & Prä-Adulte	Adulte
Vital	<ul style="list-style-type: none"> - frei schwimmend - keine Schädigung der Zerkarienköpfe 	<ul style="list-style-type: none"> - kriechende Bewegungen - regelmäßige Körperoberfläche - lichtdurchlässiger Körper 	<ul style="list-style-type: none"> - mit Kopf- und/ oder Bauchsaugnapf am Boden der Kulturplatte festgeheftet - bräunliches, lichtdurchlässiges Tegument - zuckende Körperbewegungen
Geschädigt	<ul style="list-style-type: none"> - immobil - gelähmte Schwänze - Köpfe mit zuckenden Bewegungen, aber ohne Schädigung 	<ul style="list-style-type: none"> - schwache Bewegungen - unregelmäßige Körperoberfläche und/ oder Schädigungen innerhalb des Parasitenkörpers - bräunlicher, lichtundurchlässiger Körper 	<ul style="list-style-type: none"> - schwache Bewegungen - nicht mehr mit den Saugnapfen am Boden der Kulturplatte festgeheftet - dunkles, lichtundurchlässiges Tegument
Tot	<ul style="list-style-type: none"> - immobil - massive Schädigung der Köpfe 	<ul style="list-style-type: none"> - immobil - Wurmmorphologie wie unter "geschädigt" beschrieben 	<ul style="list-style-type: none"> - immobil - Wurmmorphologie wie unter "geschädigt" beschrieben

3.3.6 Statische Auswertung der *in vitro* Experimente

Die statistische Auswertung erfolgte für alle untersuchten Substanzen hinsichtlich des Vitalitätsstatus 3 h, 6 h, 9 h und 12 h nach Substanzapplikation für Zerkarien und 96 h, 132 h und 168 h nach Substanzapplikation für Schistosomula, Prä-Adulte und adulte Würmer. Zur Untersuchung der Gruppenunterschiede innerhalb aller getesteten Konzentrationen einer Substanz wurden der Mantel-Haenszel-Chi-Quadrat Test verwendet. Zusätzlich wurde der Chi-Quadrat Test verwendet, um die Unterschiede zwischen der niedrigsten getesteten Konzentration (0.5 µg/ml) und der unbehandelten Kontrollgruppe sowie den 2 µg/ml Mefloquin bzw. Primaquin und der 1 µg/ml Praziquantelgruppe zu untersuchen. Die statistischen Analysen wurden mit der Statistiksoftware SAS, Version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt. Ein p-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

3.4 *In vivo* Experimente

3.4.1 Aminopterin und Aminopterin-HSA

3.4.1.1 Bestimmung der maximal tolerable Dosis (MTD)

Da in der Literatur keine Daten über die MTD von Aminopterin und AMPT-HSA bei den im Rahmen der Dissertation verwendeten NMRI-Mäusen vorlagen, wurde im Vorfeld der Experimente eine Dosisfindungsstudie durchgeführt. 18 fünf Wochen alten, naiven NMRI-Mäusen wurden AMPT bzw. AMPT-HSA in drei verschiedenen Konzentrationen an den Tagen 1, 3, 5 und 7 intraperitoneal (*i.p.*) injiziert (Tabelle 2). Einer Kontrollgruppe (n=3) wurde an den oben genannten Tagen PBS *i.p.* injiziert.

Tabelle 2. Dosierungen von AMPT und AMPT-HSA zur Bestimmung der maximal tolerablen Dosis *in vivo*

Dosierungen	AMPT ($\mu\text{g}/\text{kg KG}$)	n _{GESAMT}	AMPT-HSA ($\mu\text{g}/\text{kg KG}$)	n _{GESAMT}
I	250	3	500	3
II	375	3	1000	3
III	500	3	1500	3

Die Tiere aller Dosierungsgruppen wurden täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen nach Beginn der Medikamentengabe gewogen und der Allgemeinzustand wurde beurteilt. Als Zeichen akuter Toxizität wurden Gewichtsverluste um mehr als 10% vom Ausgangskörpergewicht, Apathie, Durchfall und struppiges Fell gewertet. Die höchste Medikamentendosis, bei der keine Zeichen akuter Toxizität beobachtet wurden, wurde als MTD definiert und für den Hauptversuch verwendet.

3.4.1.2 Applikation der Medikamente und Versuchsaufbau

45 fünf Wochen alte NMRI-Mäuse wurden mit 150 Zerkarien infiziert. 24 h (Schistosomula), sechs Tage (Prä-Adulte) oder 30 Tage (Adulte) nach Infektion mit Zerkarien wurden die Versuchsgruppen (n=6) mit 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aminopterin und 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AMPT-HSA behandelt. Die *i.p.* Applikation der Medikamente erfolgte an den Tagen 1, 3, 5 und 7 (Schistosomula); 6, 8, 10 und 12 (Prä-Adulte) sowie 30, 32, 34 und 36 (Adulte). Für jedes Entwicklungsstadium wurde eine Positivkontrollgruppe (n=6) mit 40 mg/kg KG Praziquantel behandelt, dessen subkutane Applikation an den Tagen 1 und 3 (Schistosomula); 6 und 8 (Prä-Adulte) sowie 30 und 32 (Adulte) erfolgte. Eine Negativkontrolle (n=9) erhielt an den Tagen 1, 3, 5 und 7 eine

i.p. Injektion mit 100 µl PBS (Abbildung 42, siehe Anhang). Alle Tiere wurden ab der ersten Injektion über einen Zeitraum von 14 Tagen täglich gewogen und der Allgemeinzustand beurteilt (Abbildung 44, siehe Anhang).

3.4.1.3 Aufarbeitung

An Tag 60 *p. i.* wurden alle Mäuse euthanasiert. Zur Isolation der adulten Würmer wurde die Pfortader der Tiere wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben mit Spüllösung gespült. Anschließend wurden die Gesamtzahl und das Geschlecht der Adulten unter einem Binokular bestimmt. Weiterhin wurden die Würmer auf mögliche morphologische Veränderungen untersucht.

3.4.2 Primaquin

3.4.2.1 Bestimmung der maximal tolerablen Dosis (MTD)

Da in der Literatur keine Daten über die MTD von Primaquin bei den im Rahmen der Dissertation verwendeten NMRI-Mäusen vorlagen, wurde im Vorfeld der Experimente eine Dosisfindungsstudie durchgeführt. Fünf Wochen alten, naiven Mäusen wurden 2, 8, 16, 32 bzw. 64 mg/kg KG Primaquin_{Base} (n=5) oral über eine Schlundsonde appliziert. Fünf weitere Tiere, denen 100 µl autoklaviertes Leitungswasser oral verabreicht wurden, dienten als Kontrollgruppe (siehe Anhang Tab). Alle Versuchstiere wurden täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen nach Beginn der Medikamentenapplikation gewogen und der Allgemeinzustand wurde beurteilt. Als Zeichen akuter Toxizität wurden Gewichtsverlust um mehr als 10% vom Ausgangskörpergewicht, struppiges Fell und Apathie gewertet. Die höchste Medikamentendosis, bei der keine Zeichen akuter Toxizität beobachtet wurden, wurde als MTD definiert und für den Hauptversuch verwendet.

3.4.2.2 Applikation von Primaquin und Versuchsaufbau

Die Applikation aller verwendeter Primaquindosierungen und des autoklavierten Leitungswassers erfolgte oral mit Hilfe einer Schlundsonde („schlündeln“) einmal täglich über einen Zeitraum von sieben aufeinander folgenden Tagen. 72 fünf Wochen alte NMRI-Mäuse wurden mit 150 Zerkarien infiziert. 24 h (Schistosomula), 5 Tage (Prä-Adulte) oder 30 Tage (Adulte) nach Infektion wurden die Versuchsgruppen (n=6) mit 2 mg/kg, 8 mg/kg bzw. 32 mg/kg Primaquin_{Base} geschlündelt. Eine naive Negativkontrollgruppe (n=6) wurde mit 32 mg/kg Primaquin_{Base} geschlündelt. Weiterhin wurden die Tiere der infizierten Positivkontrollgruppen (n=6) jeweils 24 h, 5 Tage oder 30 Tage nach Infektion mit 100 µl autoklaviertem Leitungswasser geschlündelt (Abbildung 43, siehe Anhang). Alle Tiere wurden nach der ersten Substanzapplikation über einen Zeitraum von 14 Tagen täglich gewogen und der Allgemeinzustand wurde beurteilt (Abbildung 45, siehe Anhang).

3.4.2.3 Aufarbeitung

An Tag 8 nach Beginn der oralen Substanzapplikation wurden den Versuchstieren mit einer EDTA beschichteten Kapillare 150 µl Vollblut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen und in eine EDTA beschichtete Mikrovette aufgenommen. Während der Blutentnahme befanden sich die Tiere in einer ca. einminütigen Äthernarkose. An Tag 60 *p. i.* wurden alle Mäuse euthanasiert. Anschließend wurden 150 µl Vollblut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen. Zur Isolation der adulten Würmer wurde die Pfortader der Tiere, wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben, mit Spüllösung gespült und die Gesamtzahl, das Geschlecht und mögliche morphologische Veränderungen der gewonnenen Adulten an einem Binokular bestimmt. Weiterhin wurden die mesenterialen Lymphknoten mit Hilfe einer Pinzette entfernt und in eisgekühlte PBS Lösung überführt. Vollblut und mesenteriale Lymphknoten wurden im Anschluss für durchflusszytometrische Analysen aufgearbeitet.

3.4.2.4 Durchflusszytometrische Analysen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellpopulationen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften untersucht werden. Mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper (AK) können zellspezifische Oberflächenantigene charakterisiert werden. Die Größe der Zelle wird mit Hilfe der Vorwärtsstreuung, die Zellgranularität und Membranbeschaffenheit mittels der Seitwärtsstreuung bestimmt. Im Rahmen der Versuche wurden die in Tabelle 3 aufgeführten AK benutzt, welche an die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC) als Grünfluoreszenz und Phycoerythrin (PE) als Rotfluoreszenz gebunden waren. Die untersuchten Zellpopulationen wurden durch „gaten“ eingeschlossen, während Zelltrümmer in der zu messenden Zellsuspension durch das Setzen eines Schwellenwertes (thresholds) ausgeschlossen wurden. Die Untersuchung der aus Vollblut und den mesenterialen Lymphknoten isolierten Leukozyten erfolgte mittels fluorescence activated cell sorting (FACS) am FACS *Calibur*. Pro Messung wurden jeweils 20.000 Zellen im „lifegate“ erfasst.

A - Blut

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden 150 µl Vollblut 1:1 mit Cell Wash verdünnt. Pro Ansatz wurden 50 µl des verdünnten Vollblutes mit 1 µg AK / 1×10^6 Zellen für 15-20 Minuten bei 4°C und Lichtabschluss inkubiert. Durch die anschließende 10 minütige Inkubation mit 1ml FACS™ Lysing Solution wurden die im Blut befindlichen Erythrozyten lysiert. Nach dem Abstoppen der Lyse durch die Zugabe von 500 µl Cell Wash wurden die Zellen für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 200 µl PBS aufgenommen.

B - Mesenteriale Lymphknoten

Zur Isolation der Leukozyten wurden die Lymphknoten mit dem Stempel einer 10 ml-Spritze durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt und in einem 50 ml-Röhrchen aufgefangen. Das Sieb wurde mit 5 ml PBS gespült und die Suspension anschließend für 8 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 2 ml PBS aufgenommen. Für die anschließende FACS-Analyse wurde die Anzahl vitaler Zellen pro ml Zellsuspension mit Hilfe einer 0.02%igen Trypanblaulösung in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden pro Ansatz je 1×10^6 vitale Zellen mit 1 µg AK für 30 min bei 4°C unter Lichtabschluss inkubiert. Nach Zugabe von 1ml PBS wurde die Suspension für 5 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstands wurde das Pellet in 200 µl PBS aufgenommen.

C - Verwendete Antikörper

Die im Rahmen der Versuche verwendeten monoklonalen Hamster bzw. Ratte anti-Maus AK richteten sich gegen den T-Zell-Rezeptor (CD3), einen weiteren Oberflächenmarker von T-Zellen (CD4), ein transmembranes Glycoprotein von B-Zellen (CD19), eine Untereinheit des Mac-1-Integrins (CD11b) und den Granulozytendifferenzierungsmarker (Gr-1).

Tabelle 3. Im Rahmen der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper

FITC-gekoppelte Antikörper	Zelltyp
CD 3	T-Helferzellen
CD 11b	Monozyten/ Makrophagen, Granulozyten, Mikrogliazellen, NK-Zellen, z.T. dendritische Zellen
CD 19	B-Zellen
PE-gekoppelte Antikörper	Zelltyp
CD 4	T-Zellen, regulatorische T-Zellen, z.T. NK-Zellen und dendritische Zellen
Gr-1	Granulozyten

3.4.3 Statistische Auswertung der *in vivo* Experimente

Zur Untersuchung der unabhängigen Stichproben wurde der Kruskal-Wallis-Test (Exakter Permutationstest) verwendet. Die statistischen Analysen wurden mit der Software SAS, Version 9.1 durchgeführt. Ein p-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

A – Statistischer Vergleich der Wurmlasten nach Applikation von AMPT, AMPT-HSA und Praziquantel

Der statistische Vergleich erfolgte zwischen AMPT, AMPT-HSA und Praziquantel, sowie zwischen AMPT, AMPT-HSA, Praziquantel und der infizierten, unbehandelten Kontrollgruppe.

B – Statistischer Vergleich der Wurmlasten nach Applikation verschiedener Primaquin Konzentrationen

Der statistische Vergleich erfolgte zwischen den drei Primaquinkonzentrationen, sowie zwischen den Primaquinkonzentrationen und der infizierten, unbehandelten Kontrollgruppe.

C – Statistischer Vergleich der durchflusszytometrischen Daten nach Applikation verschiedener Primaquin Konzentrationen

Der statistische Vergleich erfolgte zwischen den drei Primaquinkonzentrationen, sowie zwischen den drei Primaquinkonzentrationen, der infizierten, unbehandelten Kontrollgruppe und der naiven Kontrollgruppe. Weiterhin wurde die infizierte, unbehandelte Kontrollgruppe mit der naiven Kontrollgruppe verglichen.

3.5 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie zum Nachweis von *S. mansoni* Eiern im Darm

3.5.1 Mikroskopie-Systeme

Als Basis für die durchgeführten Versuche diente das Scanning System „Heidelberg Retina Tomograph II“ (HRT II), welches mit zwei verschiedenen Linsensystemen kombiniert wurde. Als optisches Kernstück diente ein Klasse 1 Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 670 nm. Mit beiden Linsensystemen wurden 30 Bilder pro Sekunde in einem Scanfenster von 400x400 µm und einer Größe von 348 x 384 Pixeln aufgenommen. Oberflächenparallele Schnitte konnten bis zu einer Tiefe von 150 µm aufgenommen werden. Als Gleitmittel und um einen Kontaktfilm zwischen den beiden Linsensystemen und dem zu untersuchenden Gewebe herzustellen, wurde Vidisic® Augengel verwendet.

3.5.1.1 Mikroskopie-System 1

Das Mikroskopie-System 1 bestand aus dem Heidelberg Retina Tomograph II (HRT II) in Kombination mit dem Rostock Cornea Modul (RCM). Durch das RCM wurde das Objektivsystem näher an die Fokalebene verlagert und somit eine höhere Vergrößerung erreicht. Das Objektivsystem bestand aus einem Wasserimmersionsobjektiv, welches über eine 0,5 mm dicke Polymethylmethacrylat (PMMA)-Kappe an die Darmmukosa gekoppelt

wurde. Die PMMA-Kappe diente dabei zur Gewinnung quantifizierbarer Tiefeninformationen, zur Erhöhung der Bildauflösung und zur Verbesserung des Kontrasts (Abbildung 5A).

3.5.1.2 Mikroskopie-System 2

Das Mikroskopie-System 2 bestand aus dem HRT II in Kombination mit einem starren Endoskop (Abbildung 5B). Das autoklavierbare Endoskop, mit einer Länge von 23 cm und einem Durchmesser von 5 mm, besaß ein integriertes Stablinsensystem (Just *et al.* 2009). Mit dem Mikroskopie-System 2 wurde eine räumliche Auflösung von 5 μm in der axialen und 1-2 μm in der lateralen Dimension erreicht.

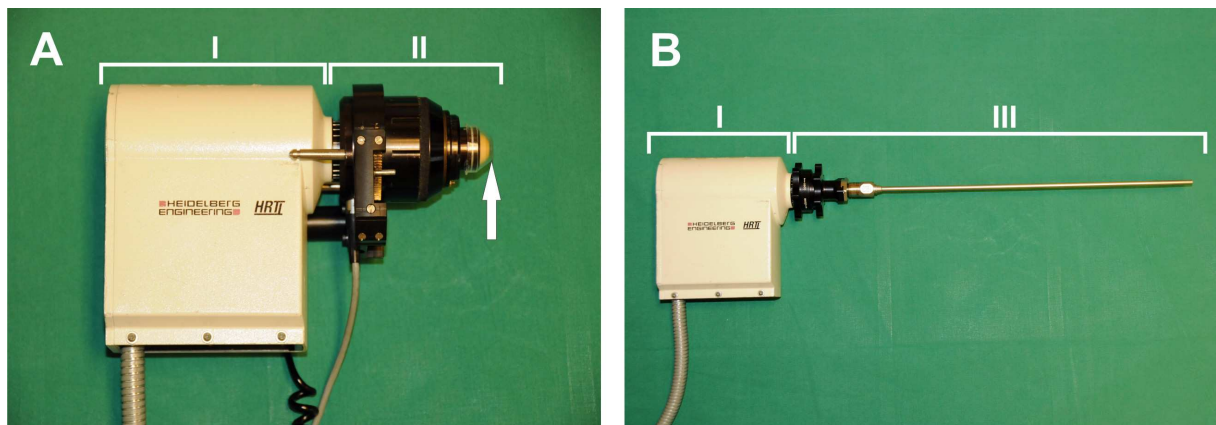


Abbildung 5. Mikroskopie-Systeme 1 und 2. Die Mikroskopie-Systeme 1 (A) und 2 (B) basieren auf dem HRT II (I) in Kombination mit dem RCM (II) inklusive der PMMA-Kappe (↑) bzw. dem starren Endoskop (III).

3.5.2 Nachweis der Eier von *S. mansoni* im präparierten Maudarm

Eine fünf Wochen alte Maus wurde mit 150 Zerkarien infiziert und 20 Wochen nach der Infektion euthanasiert. Nach der Eröffnung des Peritoneums wurden Dick- und Dünndarm heraus präpariert und mit Hilfe einer Schere longitudinal aufgeschnitten. Durch anschließendes Spülen mit 0.9% NaCl-Lösung wurden Kot- und Blutreste entfernt. Ein jeweils 2 cm langes Stück aus dem proximalen Dickdarm und dem distalen Dünndarm wurde mit Hilfe von Kanülen (Größe: 27Gx ¼) auf einer Styroporplatte fixiert und mit dem Mikroskopie-System 1 auf das Vorhandensein von Eiern in der oberliegenden Darmmukosa untersucht. Die visualisierten Eier wurden gezählt und hinsichtlich ihres Vitalitätsstatus beurteilt.

3.5.3 Nachweis der Eier von *S. mansoni* in Kolon mittels verschiedener Nachweismethoden

3.5.3.1 Präparation der Mäuse

Fünf fünf Wochen alte Mäuse wurden mit 150 Zerkarien infiziert und 20 Wochen nach der Infektion euthanasiert. 24 h vor Versuchsbeginn wurde den Versuchstieren das Futter entzogen, um größere Kotmengen im Kolon und damit Sichtbehinderungen bei der Mikroskopie zu verhindern. Den Tieren stand verdünnter Apfelsaft (1 Teil Apfelsaft, 3 Teile Wasser) und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Anschließend wurde die Bauchhöhle eröffnet. Um freie Sicht auf das Kolon und das Rektum zu haben, wurden die Darmschlingen mit Hilfe einer Pinzette auf die rechte Seite geschoben und die Beckenknochen durchtrennt. Der so freigelegte distale Darmabschnitt wurde mit Vidisic® Augengel bedeckt, um das Austrocknen und dadurch bedingtes Einreißen des Gewebes zu verhindern.

3.5.3.2 Nachweis der Eier mittels Mikroskopie-System 2 *in situ*

Zur Mikroskopie des Kolons *in situ* wurde das Mikroskopie-System 2 verwendet. Die Anusmuskulatur wurde mit Hilfe zweier Pinzetten leicht geweitet und vorsichtig über das Endoskop gezogen. Sowohl der vordere Teil des Endoskops sowie der Anus wurden dazu mit Vidisic® Augengel als Gleitmittel bedeckt. Anschließend wurde das Endoskop vorsichtig ca. 3 cm in den Maudarm eingeführt. Um direkten Gewebekontakt gewährleisten zu können, wurde die Darmmukosa mit dem Finger vor die Linse des Endoskopes geschoben. Die in einem ca. 1.5 cm langen Kolonabschnitt mittels dieser Methode visualisierten Eier wurden gezählt und hinsichtlich ihres Vitalitätsstatus beurteilt.

3.5.3.3 Nachweis der Eier mittels Mikroskopie-System I

Die mittels Mikroskopie-System 2 untersuchten 1.5 cm langen Kolonabschnitte wurden mit Hilfe einer Schere präpariert und longitudinal aufgeschnitten. Anschließend wurden Kot, Blutreste und durch das Endoskop abgeschilferte Gewebstücke durch Spülen mit 0,9% NaCl-Lösung entfernt. Die Darmstücke wurden mit Kanülen (27Gx ¼) auf einer Styroporplatte fixiert und mit dem Mikroskopie-System 1 auf das Vorhandensein von Eiern in der obenliegenden Darmmukosa untersucht. Visualisierte Eier wurden gezählt und hinsichtlich ihres Vitalitätsstatus beurteilt.

3.5.3.4 Nachweis der Eier mittels Lichtmikroskopie

Die mittels Mikroskopie-System 1 untersuchten Darmabschnitte wurden anschließend kurz in 0,9% NaCl-Lösung gewaschen, um abgeschilferte Gewebstücke und das Kontaktmittel zu entfernen. Anschließend wurden die Kolonstücke mit Hilfe einer Pinzette flach auf einen Objektträger ausgebreitet. Mittels einer Stanze wurde median ein Biopat (\varnothing 0.5 cm bzw. 0.2 cm²) entnommen und zwischen einem Objektträger und einem Deckglas „gequetscht“. Anschließend wurde das Biopat bei 100- und 200-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop auf das Vorhandensein von Eiern und deren Vitalitätsstatus untersucht.

3.5.4 Charakterisierung des Vitalitätsstatus der Eier von *S. mansoni*

Basierend auf bereits publizierten Klassifikationssystemen von Romeu *et al.* (1965) und Jurberg *et al.* (2009) wurden die Eier nach den in Tabelle 4 aufgeführten Kriterien als vital oder tot charakterisiert.

Tabelle 4. Merkmale von vitalen und toten Eiern von *S. mansoni*

Vitale Eier	Tote Eier
<ul style="list-style-type: none"> - vollständig entwickelte, nicht eingefallene Mirazidien - Protonephridien der Mirazidien mit Zilienbewegungen der Zyrtoocyte - Mirazidien mit zuckenden Bewegungen und/oder Zilienbewegungen - Entwicklungsstadien 1-4: morphologisch normale Embryonen, welche von vielen Dotterzellen umgeben sind 	<ul style="list-style-type: none"> - eingefallene, morphologisch veränderte Mirazidien bzw. Embryonen - Eier mit diffusem und/oder granulärem Inhalt - Eier ohne Inhalt

4 Ergebnisse

4.1 *In vitro* Versuche

4.1.1 Morphologie unbehandelter Schistosomula, Prä-Adulter und Adulter *in vitro*

Vitale Schistosomula wiesen kriechende Bewegungen, sowie eine regelmäßige Körperoberfläche auf. In dem lichtdurchlässigen Parasitenkörper war das bräunlich gefärbte Caecum gut erkennbar (Abbildung 6A). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Schistosomula-Kulturmedium kam es allerdings im Laufe der Inkubation auch bei einem Teil der unbehandelten Schistosomula zu einer Schädigung, welche durch Vakuolenbildung und sich anschließende Körperdeformation charakterisiert war. So waren bei den Experimenten mit Mefloquin und Primaquin nach 168 h 54% der Schistosomula geschädigt (Abbildung 14, Abbildung 15).

Vitale Prä-Adulte wiesen, wie auch für die Schistosomula beschrieben, eine regelmäßige Körperoberfläche und kriechende Bewegungen auf. Weiterhin konnte auch bei diesem Lebensstadium das bräunlich gefärbte Caecum im durchsichtigen Wurmkörper beobachtet werden. Im Rahmen der 7-tägigen Inkubation kam es bei einem Teil der Prä-Adulten zu einem Körperwachstum und zur Gabelung des ursprünglich sackartigen Caecums (Abbildung 6B).

Vitale Adulte waren mit dem Bauchsaugnapf am Boden der Kulturplatte festgeheftet, während sie mit dem Kopfsaugnapf rhythmische Strudelbewegungen zur Aufnahme des Kulturmediums erzeugten. Das regelmäßige Tegument hatte eine hellbraune Färbung. Aufgrund des durchsichtigen Wurmkörpers konnten das Darmsystem und der zirkulierende Darminhalt gut beobachtet werden (Abbildung 6C).



Abbildung 6. Unbehandelte Lebensstadien von *S. mansoni*. Unbehandelte Schistosomula (A), Prä-Adulte (B) und adulte Würmer (C, Weibchen (↑) im *C. gynaecephorus* des Männchens) dienen als Negativ-Kontrolle in den *in vitro* Experimenten.

4.1.2 Schistosomizider Effekt der HSA-Konjugate und der dazugehörigen niedermolekularen Substanzen *in vitro*

4.1.2.1 Aminopterin (AMPT), Methotrexat (MTX), Aminopterin-HSA (AMPT-HSA) und Methotrexat-HSA (MTX-HSA)

Nach der 168-stündigen Inkubation mit 10 µM, 1 µM und 0.1 µM Methotrexat und Aminopterin konnten keine schädigenden Effekte auf Prä-Adulte und Adulte beobachtet werden.

Auch die 168-stündige Inkubation mit 10 µM, 1 µM und 0.1 µM MTX-HSA und AMPT-HSA führte zu keiner Schädigung der untersuchten Prä-Adulten und Adulten.

4.1.2.2 Diclofenac und Diclofenac-HSA (Diclo-HSA)

A – Prä-Adulte

Die Inkubation mit 64 µg/ml Diclofenac führte nach 48 h zur Schädigung und nach 72 h zum Tod aller Prä-Adulten. Nach der 168-stündigen Inkubation mit 32 µg/ml Diclofenac waren 43% (26/61) der untersuchten Stadien geschädigt und 2% (1/61) tot. Die Inkubation mit 0.5-16 µg/ml führte zu keiner signifikanten Schädigung der Prä-Adulten (Abbildung 7). Die stark verlangsamten, unkoordinierten Bewegungen der geschädigten Prä-Adulten wurden als spezifisch durch Diclofenac verursachte Effekte eingeordnet. Weder geschädigte noch tote Stadien wiesen morphologische Veränderungen auf.

Nach der 168-stündigen Inkubation mit 32, 16 und 8 µg/ml Diclo-HSA konnte kein schädigender Effekt auf Prä-Adulte beobachtet werden.

B – Adulte

Die Inkubation mit 64 µg/ml Diclofenac führte nach 12 h zur Schädigung aller und nach 168 h zum Tod von 71% (12/17) der Adulten. Die Inkubation mit 32 µg/ml Diclofenac führte nach 24 h zur Schädigung aller Adulten, es konnten jedoch auch nach 168 h keine toten adulten Würmer beobachtet werden. Die 168-stündige Inkubation mit 16 µg/ml Diclofenac resultierte in der Schädigung von 27% (3/11) der untersuchten Stadien. Nach der 168-stündigen Inkubation mit 8, 4, 2, 1 und 0.5 µg/ml Diclofenac konnte kein schädigender Effekt auf adulte Würmer beobachtet werden (Abbildung 7).

Nach der 168-stündigen Inkubation mit 32, 16 und 8 µg/ml Diclo-HSA konnte kein schädigender Effekt auf Adulte beobachtet werden.

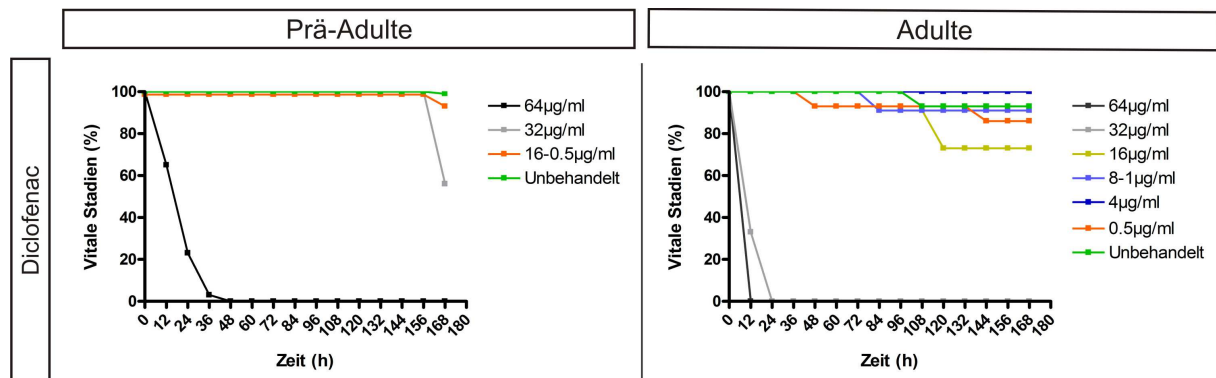


Abbildung 7. Vitalitätsrate von Prä-Adulten und Adulten von *S. mansoni* nach Inkubation mit Diclofenac. Die Vitalität der Lebensstadien wurde alle 12 h für insgesamt 168 h mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskopes überprüft.

4.1.2.3 Dexamethason, Dexamethasonhydrazinoessigsäure-HSA (DHAc-HSA) und Dexamethasonhydrazinoessigsäure-AmPEG (DHAc-AmPEG)

A – Prä-Adulte

Die Inkubation mit 64 µg/ml Dexamethason führte nach 156 h zur Schädigung aller Prä-Adulten, tote Stadien wurden nicht beobachtet. Nach der 168-stündigen Inkubation mit 32, 16, 8, 4, 2, 1 und 0.5 µg/ml Dexamethason konnte kein schädigender Effekt auf Prä-Adulte beobachtet werden (Abbildung 8). Eine leichte Vakuolisierung des Körpers und unkoordinierte Bewegungen der Prä-Adulten wurden als Dexamethason-spezifische Effekte eingeordnet.

Die Inkubation mit 64 und 32 µg/ml DHAc-HSA führte nach 36 h zur Schädigung aller Prä-Adulten. Nach einer 60-stündigen bzw. 168-stündigen Inkubationsperiode waren alle

Stadien der 16 µg/ml bzw. 8 µg/ml DHAc-HSA-Gruppen geschädigt. Tote Stadien wurden in keiner der Gruppen beobachtet. Nach der 168-stündigen Inkubation mit 4, 2, 1 und 0.5 µg/ml DHAc-HSA konnte kein schädigender Effekt auf Prä-Adulte beobachtet werden (Abbildung 8). Die starke Vakuolenbildung im Parasitenkörper und die Körperdeformation wurden als DHAc-HSA-spezifische Effekte eingeordnet (Abbildung 9A)

Die Inkubation mit 64, 32 und 16 µg/ml DHAc-AmPEG führte zur Schädigung aller Prä-Adulten nach 36 h. Nach einer 72-stündigen bzw. 156-stündigen Inkubationsperiode waren alle Stadien der 8 µg/ml bzw. 4 µg/ml DHAc-AmPEG-Gruppe geschädigt. Tote Stadien wurden auch hier in keiner der getesteten Konzentrationen beobachtet. Die Inkubation mit 2, 1 und 0.5 µg/ml DHAc-AmPEG führte zu keiner Schädigung der Prä-Adulten (Abbildung 8). Die starke Vakuolenbildung und teils massive Körperdeformation, sowie ein sehr stark aufgequollenes Caecum wurden als DHAc-AmPEG-spezifische Effekte eingeordnet (Abbildung 9B).

Nach 168 h wurde in den Konzentrationen 64 bzw. 32 µg/ml kein Unterschied hinsichtlich des schistosomiziden Potentials von Dexamethason, DHAc-HSA und DHAc-AmPEG beobachtet, da in den drei Versuchsgruppen alle Prä-Adulten geschädigt waren. Im Vergleich zur Dexamethason-Gruppe wurden nach 168 h in den Konzentrationen 16 µg/ml und 8 µg/ml signifikant mehr geschädigte Prä-Adulte in der DHAc-HSA-Gruppe beobachtet ($p < 0.0001$). In den Konzentrationen 4, 2, 1 und 0.5 µg/ml DHAc-HSA konnte kein Unterschied zur Dexamethason-Gruppe beobachtet werden, da alle Prä-Adulten vital waren. Dahingegen konnten im Vergleich zur Dexamethason-Gruppe nach 168 h in der DHAc-AmPEG-Gruppe signifikant mehr geschädigte Prä-Adulte in den Konzentrationen 16, 8 und 4 µg/ml beobachtet werden ($p < 0.0001$). Da in den Konzentrationen 2, 1 und 0.5 µg/ml alle Stadien vital waren, konnte kein Unterschied zwischen der Dexamethason-Gruppe und der DHAc-AmPEG-Gruppe beobachtet werden.

B –Adulte

Die Inkubation mit 64 µg/ml Dexamethason führte nach 168 h zur Schädigung von 11% (1/9) der untersuchten adulten Würmer. In den Konzentrationen 32, 16, 8, 4, 2, 1 und 0.5 µg/ml Dexamethason konnte nach 168 h kein schistosomizider Effekt beobachtet werden (Abbildung 8). Es wurden auch keine weiteren Dexamethason-spezifischen Effekte auf Adulte gefunden.

Die Inkubation mit 64 µg/ml DHAc-HSA führte nach 168 h zu einer Schädigung von 22% (2/9) der Adulten. Die 168-stündige Inkubation mit 32 µg/ml und 16 µg/ml resultierte in der

Schädigung von 14% (jeweils 1/7) der untersuchten Adulten. In den Konzentrationen 8, 4, 2, 1 und 0.5 µg/ml DHAc-HSA konnte auch nach 168 h kein schistosomizider Effekt beobachtet werden (Abbildung 8). Es wurden auch keine weiteren Dexamethason-spezifischen Effekte auf Adulte gefunden (Abbildung 9C).

Die Inkubation mit 64 µg/ml DHAc-AmPEG führte nach 168 h zur Schädigung von 25% (2/8) der Adulten. Die 168-stündige Inkubation mit 32 µg/ml DHAc-AmPEG resultierte in der Schädigung von 10% (1/10) der untersuchten adulten Würmer. In den Konzentrationen 16, 8, 4, 2, 1 und 0.5 µg/ml DHAc-AmPEG konnte kein schistosomizider Effekt beobachtet werden (Abbildung 8). Es wurden auch keine weiteren Dexamethason-spezifischen Effekte auf Adulte gefunden (Abbildung 9C).

Nach 168 h konnte in keiner der getesteten Konzentrationen ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des schistosomiziden Potentials von Dexamethason, DHAc-HSA und DHAc-AmPEG beobachtet werden.

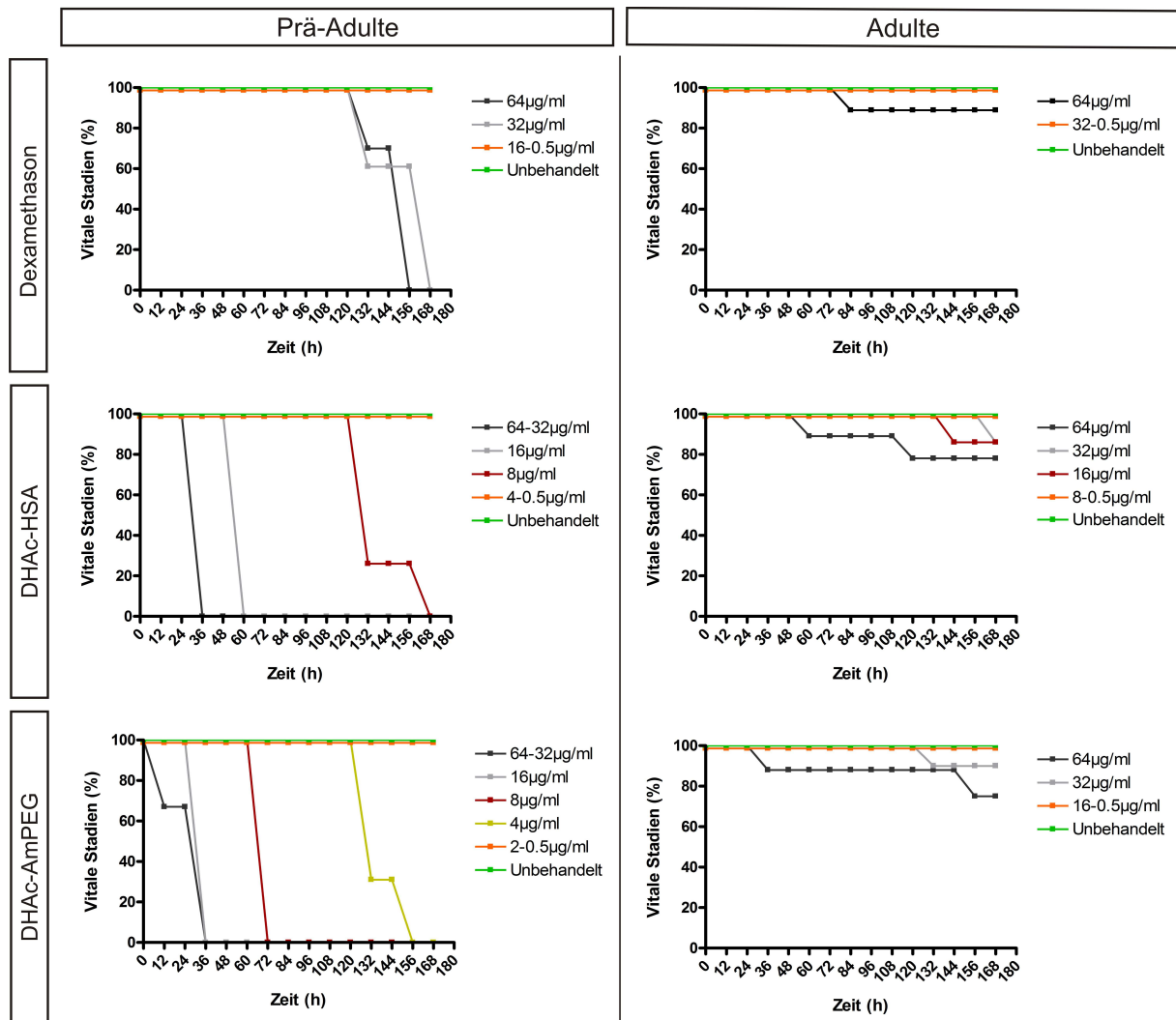


Abbildung 8. Vitalitätsrate von Prä-Adulten und Adulten von *S. mansoni* nach Inkubation mit Dexamethason, DHAc-HSA und DHAc-AmPEG. Die Vitalität der Lebensstadien wurde alle 12 h für insgesamt 168 h mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskopes überprüft.

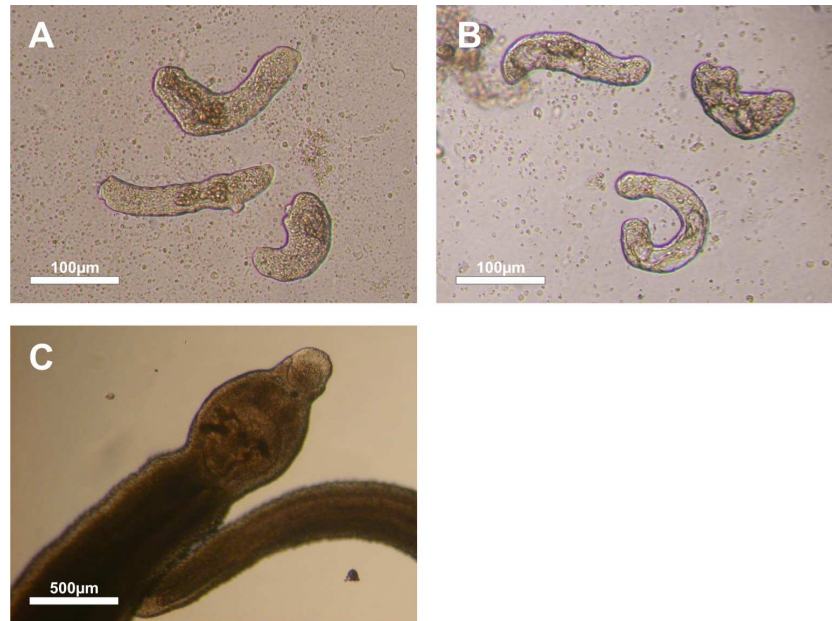


Abbildung 9. Morphologische Veränderungen der Prä-Adulten und Adulten von *S. mansoni* nach der Inkubation mit DHAc-HSA und DHAc-AmPEG. In Folge der Inkubation mit DHAc-HSA kam es zu einer starken Vakuolenbildung und leichter Körperdeformation der Prä-Adulten (A). Auch die Inkubation mit DHAc-AmPEG resultierte in einer starken Vakuolenbildung und teils starker Körperdeformation der Prä-Adulten(B). Weiterhin wurde das starke Aufschwellen des Caecums beobachtet. Mit DHAc-HSA und DHAc-AmPEG inkubierte Adulte (C) wiesen lediglich ein dunkelbraun verfärbtes Tegument auf.

4.1.2.49-Aminoacridin (9-AAC) und 9-Isothiocyanato-Acridine - HSA (9-ITCAC-HSA)

A –Prä-Adulte

Die Inkubation mit 64, 32, 16 und 8 µg/ml 9-Aminoacridin führte zum Tod aller untersuchten Prä-Adulten nach 12 h. Nach einer 12-stündigen Inkubation mit 4 µg/ml 9-AAC waren alle Stadien geschädigt und nach 24 h waren alle tot. Die Inkubation mit 2 µg/ml 9-ACC führte nach 12 h zur Schädigung und nach 60 h zum Tod aller Prä-Adulten. Nach einer 36-stündigen Inkubation mit 1 µg/ml 9-ACC waren alle Stadien geschädigt und nach 84 h waren alle tot. Die Inkubation mit 0.5 µg/ml 9-AAC führte nach 48 h zur Schädigung und nach 168 h zum Tod aller untersuchten Prä-Adulten (Abbildung 10). Die massive Vakuolenbildung und Körperdeformation der geschädigten und toten Prä-Adulten wurde als 9-ACC spezifischer Effekt eingeordnet (Abbildung 11A).

Die Inkubation mit 64 µg/ml 9-ITCAC-HSA führte zur Schädigung aller Prä-Adulten nach 36 h und zum Tod nach 120 h. Nach einer 108-stündigen Inkubationsperiode mit 32 µg/ml 9-ITCAC-HSA waren alle Stadien geschädigt und nach 156 h tot. Die Inkubation mit 16 µg/ml 9-ITCAC-HSA resultierte in der Schädigung aller Prä-Adulten nach 132 h. Nach der 168-

stündigen Inkubation mit 8, 4, 2, 1 und 0.5 µg/ml 9-ITCAC-HSA konnte kein schädigender Effekt auf Prä-Adulte beobachtet werden (Abbildung 10). Geschädigte und tote Prä-Adulte wiesen Vakuolenbildung und die Deformation des Körpers auf, die jedoch im Vergleich zu 9-ACC nicht so stark ausgeprägt war (Abbildung 11C).

Nach 168 h wurde in den Konzentrationen 64 bzw. 32 µg/ml kein Unterschied hinsichtlich des schistosomiziden Potentials von 9-ACC und 9-ITCAC-HSA beobachtet, da in beiden Gruppen alle Prä-Adulten tot waren. Bei 16 µg/ml wurden in beiden Versuchsgruppen nach 168 h keine vitalen Prä-Adulten mehr beobachtet, jedoch waren in der 9-ACC-Gruppe alle Stadien tot während in der HSA-Konjugate-Gruppe alle Stadien geschädigt waren. Im Vergleich zum HSA-Konjugat wurden nach 168 h in den Konzentrationen 8, 4, 2, 1 und 0.5 µg/ml signifikant mehr tote Prä-Adulte in der 9-ACC-Gruppe beobachtet ($p < 0.0001$).

B – Adulte

Die Inkubation mit 64, 32 und 16 µg/ml 9-Aminoacridin führte nach 12 h zum Tod aller Adulten. Nach der 12-stündigen Inkubation mit 8 µg/ml 9-ACC waren alle Stadien geschädigt und nach 36 h alle tot. Die Inkubation mit 4 µg/ml 9-ACC resultierte in der Schädigung aller Stadien nach 12 h und ihrem Tod nach 96 h. Nach einer 144-stündigen Inkubation mit 2 µg/ml 9-ACC waren alle Adulten geschädigt und nach 156 h alle tot. Die Inkubation mit 64, 32 bzw. 16 µg/ml 9-ACC zeigte keinen schädigenden Effekt auf Adulte (Abbildung 10). Die dunkelbraune Verfärbung des Teguments bei geschädigten, sowie das schwarze, undurchsichtige Tegument und der stark verkürzte Wurmkörper bei toten Würmern wurden als 9-ACC spezifische Effekte eingeordnet (Abbildung 11C).

Die Inkubation mit 64 µg/ml 9-ITCAC-HSA resultierte in der Schädigung von 12.5% (1/8) der Adulten. Nach der 168-stündigen Inkubation mit 9-ITCAC-HSA konnten keine schädigenden Effekte auf adulte Würmer beobachtet werden (Abbildung 10). Es wurden keine 9-ITCAC-HSA-spezifischen Effekte auf Adulte beobachtet (Abbildung 11D).

Im Vergleich zum HSA-Konjugat wurden in den Konzentrationen 64, 32 und 16 µg/ml signifikant mehr geschädigte bzw. tote Adulte in der 9-ACC-Gruppe beobachtet ($p < 0.05$).

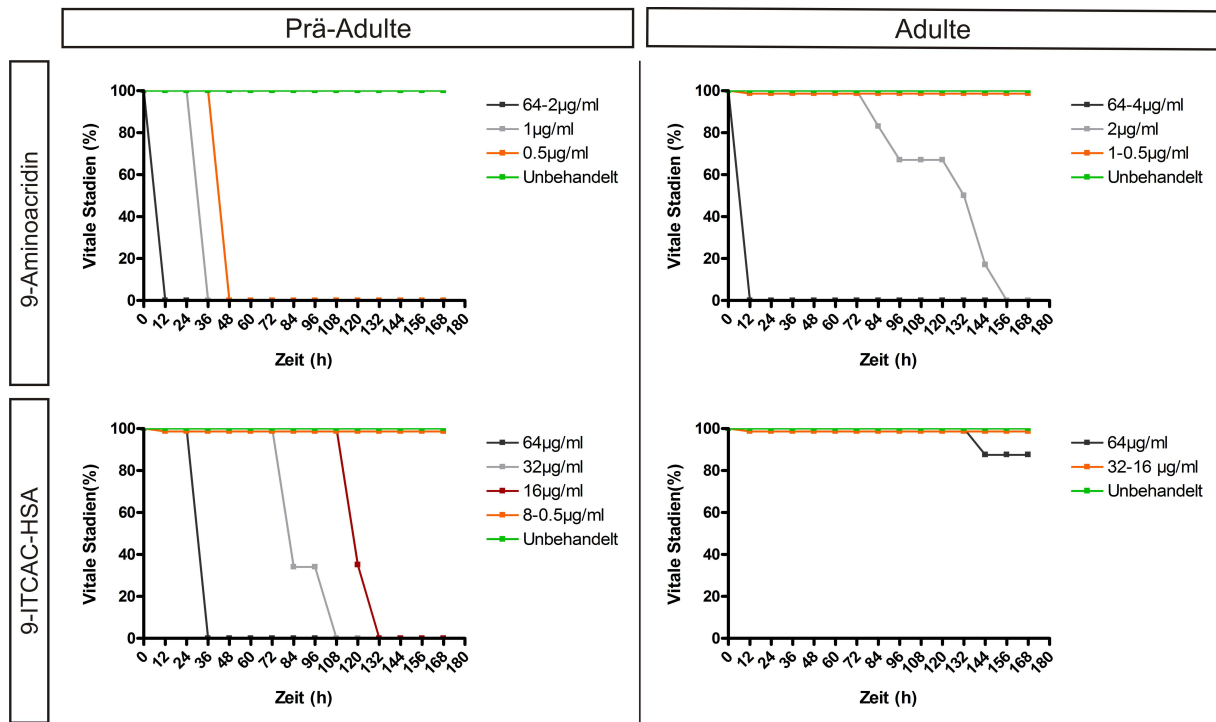


Abbildung 10. Vitalitätsrate von Prä-Adulten und Adulten von *S. mansoni* nach Inkubation mit 9-Aminoacridin und 9-ITCAC-HSA. Die Vitalität der Lebensstadien wurde alle 12 h für insgesamt 168 h mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskopes überprüft.

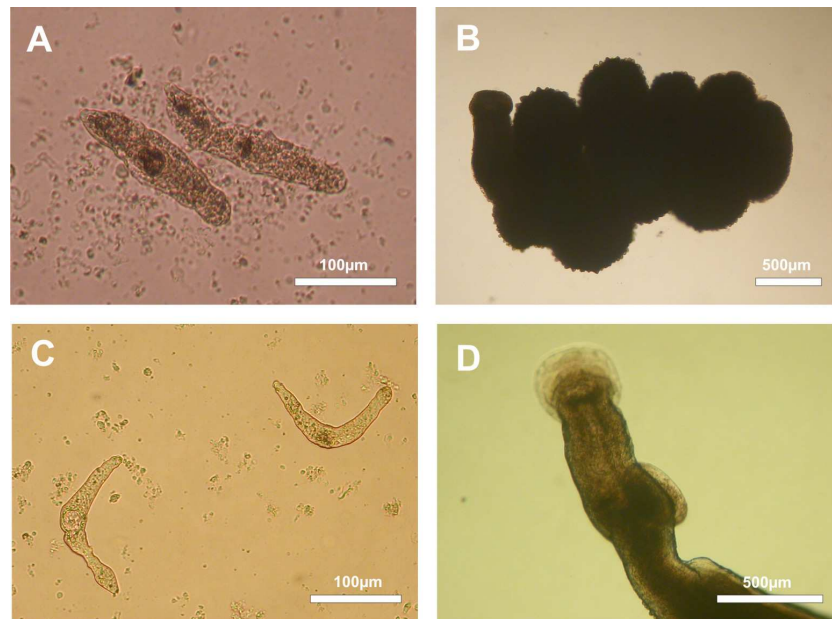


Abbildung 11. Morphologische Veränderungen der Prä-Adulten und Adulten von *S. mansoni* nach der Inkubation mit 9-Aminoacridin und 9-ITCAC-HSA. In Folge der Inkubation mit 9-Aminoacridin kam es zu einer massiven Vakuolenbildung und Körperdeformation der Prä-Adulten (A). Tote, mit 9-Aminoacridin inkubierte Adulte, zeigten ein schwarz verfärbtes, undurchsichtiges Tegument und einen stark verkürzten Wurmkörper (B). Die Inkubation mit 9-ITCAC-HSA resultierte in der Vakuolenbildung und Körperdeformation der Prä-Adulten (C). Mit 9-ITC-AC inkubierte Adulte wiesen lediglich ein dunkelbraun verfärbtes Tegument auf (D).

4.1.2.58-Hydroxy-2-Quinolincarbonsäure (HQCA) und Hydroxyquinolinecarbonsäure - HSA (HQCA-HSA)

A – Prä-Adulte

Die Inkubation mit 64 µg/ml HQCA führte zur Schädigung aller untersuchten Prä-Adulten nach 168 h. Nach der 168-stündigen Inkubation mit 32, 16, 8, 4, 2, 1 und 0.5 µg/ml HQCA konnte kein schädigender Effekt auf Prä-Adulte beobachtet werden (Abbildung 12). Die massive Körperdeformation sowie die starke Vakuolenbildung wurden als HQCA- spezifische Effekte eingeordnet (Abbildung 13A).

Die Inkubation mit 64 bzw. 32 µg/ml HQCA-HSA führte zur Schädigung aller Prä-Adulten nach 24 h. Nach 36 h waren alle Stadien der 64 µg/ml-Gruppe und nach 168 h waren 37% (22/59) der Stadien der 32 µg/ml-Gruppe tot. Die Inkubation mit 16 µg/ml HQCA-HSA führte zur Schädigung von 7% (5/69) der Prä-Adulten. Die Konzentrationen 8, 4, 2, 1 und 0.5 µg/ml HQCA-HSA hatten keinen schädigenden Effekt auf die untersuchten Prä-Adulten (Abbildung

12). Die starke Vakuolenbildung im Körper der Parasitenstadien wurde als HQCA-HSA-spezifischer Effekt eingeordnet (Abbildung 13C).

In den 64 µg/ml-Gruppen von HQCA und HQCA-HSA wurden nach 168 h keine Unterschiede hinsichtlich des schistosomiziden Potentials beobachtet, da in beiden Gruppen alle Prä-Adulten avital waren. Allerdings waren in der HQCA-HSA-Gruppe alle Stadien tot, während die Stadien bei der ungekoppelten Substanz nur geschädigt waren. Im Vergleich zur HQCA-Gruppe wurden nach 168 h bei 32 µg/ml in der HQCA-HSA-Gruppe signifikant mehr geschädigte und tote Prä-Adulte beobachtet ($p < 0.0001$). In den Konzentrationen 16, 8, 4, 2, 1 und 0.5 µg/ml wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Vitalitätsstatus zwischen HQCA und HQCA-HSA beobachtet, da nahezu alle Stadien vital waren.

B – Adulte

Die Inkubation mit 64 µg/ml HQCA resultierte in der Schädigung von 73% (8/11) der Adulten nach 168 h. Nach der 168-stündigen Inkubation mit 32, 16, 8, 4, 2, 1 und 0.5 µg/ml HQCA konnten keine schädigenden Effekte auf Adulte beobachtet werden (Abbildung 12). Es wurden auch keine sonstigen HQCA-spezifischen Effekte auf adulte Würmer beobachtet (Abbildung 13B).

Die Inkubation mit 64 µg/ml HQCA-HSA führte zur Schädigung aller Adulten nach 12 h und zum Tod aller Stadien nach 48 h. Die 168-stündige Inkubation mit 32 µg/ml HQCA-HSA führte zur Schädigung von 33% (3/9) und zum Tod von 11% (1/9) der untersuchten Stadien. Die Konzentrationen 16, 8, 4, 2, 1 und 0.5 µg/ml HQCA-HSA hatten keinen schädigenden Effekt auf die untersuchten Adulten (Abbildung 12). Die dunkelbraune bis schwarze Verfärbung des Teguments sowie die teils starke Verkürzung des Wurmkörpers wurden als HQCA-HSA-spezifische Effekte eingeordnet (Abbildung 13D).

Da in den 64 µg/ml-Gruppen von HQCA und HQCA-HSA nach 168 h alle Prä-Adulten avital waren, konnte kein Unterschied hinsichtlich des schistosomiziden Potentials beobachtet werden. In der HQCA-HSA-Gruppe waren jedoch alle Stadien tot, während die Stadien bei der ungekoppelten Substanz nur geschädigt waren. Im Vergleich zur HQCA-Gruppe wurden nach 168 h bei 32 µg/ml in der HSA-Konjugat-Gruppe signifikant mehr geschädigte und tote Prä-Adulte beobachtet ($p < 0.0001$). Da in den Konzentrationen 16, 8, 4, 2, 1 und 0.5 µg/ml alle Stadien vital waren, wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Vitalitätsstatus zwischen HQCA und HQCA-HSA beobachtet.

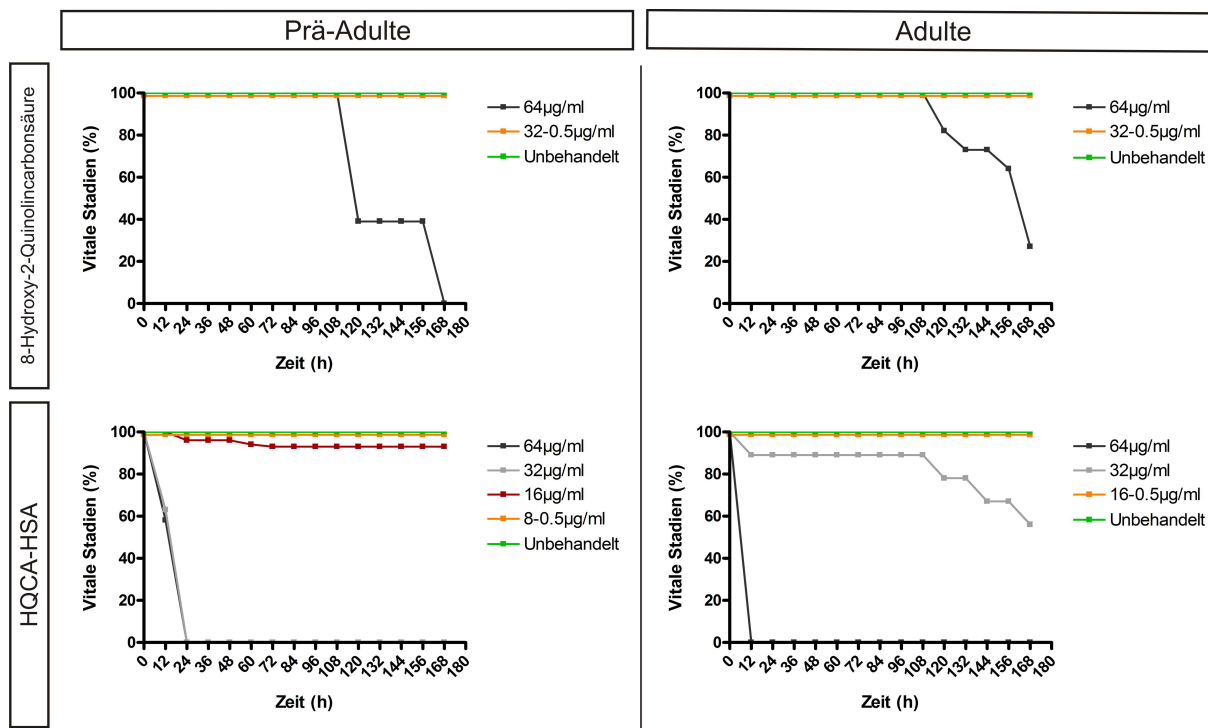


Abbildung 12. Vitalitätsrate von Prä-Adulten und Adulten von *S. mansoni* nach Inkubation mit 8-Hydroxy-2-Quinolinecarboxylsäure (HQCA) und HQCA-HSA. Die Vitalität der Lebensstadien wurde alle 12 h für insgesamt 168 h mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskopes überprüft.

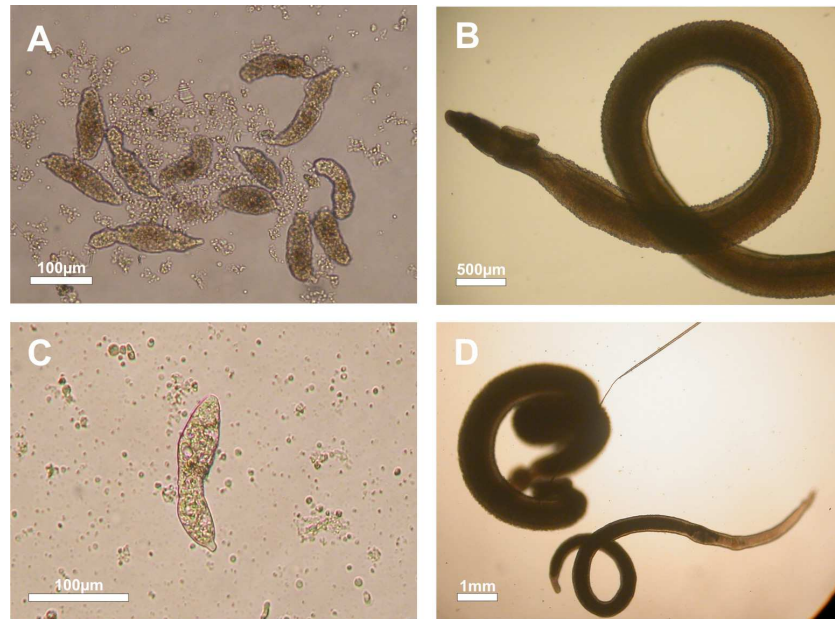


Abbildung 13. Morphologische Veränderungen der Prä-Adulten und Adulten von *S. mansoni* nach der Inkubation mit 8-Hydroxy-2-Quinolinecarbonsäure (HQCA) und HQCA-HSA. In Folge der Inkubation mit HQCA kam es zu einer massiven Vakuolenbildung und Körperdeformation der Prä-Adulten (A). Mit HQCA inkubierte, geschädigte Adulte wiesen ein dunkelbraun verfärbtes Tegument auf (B). Die Inkubation mit HQCA-HSA resultierte in der starken Vakuolenbildung, jedoch nur leichten Körperdeformation der Prä-Adulten (C). Mit HQCA-HSA inkubierte Adulte wiesen ein dunkelbraun bis schwarz verfärbtes Tegument und teils stark verkürzte Körper auf (D).

4.1.3 Schistosomizider Effekt der Malariatherapeutika Mefloquin und Primaquin sowie des Goldstandards Praziquantel *in vitro*

4.1.3.1 Mefloquin

A – Zerkarien

Die Inkubation mit 2 µg/ml Mefloquin führte nach 3 h zur Schädigung aller Zerkarien und nach 9 h zum Tod aller infektiösen Larven. Die Inkubation mit 1 µg/ml Mefloquin führte zur Schädigung aller Zerkarien nach 6 h und zum Tod von 20% (113/575) der untersuchten Stadien nach 12 h (Abbildung 14). Im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe konnte nach der 12-stündigen Inkubation mit 0.5 µg/ml Mefloquin kein zerkarizider Effekt beobachtet werden. Die starke Vakuolenbildung im Kopf von geschädigten und toten Zerkarien wurde als spezifisch durch Mefloquin verursachter Effekt eingeordnet.

B – Schistosomula

Die Inkubation mit 2 µg/ml, 1 µg/ml und 0.5 µg/ml Mefloquin führte zur Schädigung aller Schistosomula nach 48 h, 84 h bzw. 60 h (Abbildung 14). Nach der 168-stündigen Inkubation mit 2 µg/ml Mefloquin waren 94% (90/96) der untersuchten Schistosomula tot. Die Inkubation mit 1 µg/ml und 0.5 µg/ml Mefloquin führte nach 168 h zum Tod von 35% (45/130) bzw. 20% (28/138) der untersuchten Stadien. Die Bildung von kleinen Vakuolen, die im zeitlichen Verlauf zu einer massiven Vakuolenbildung und zur Körperdeformation bei geschädigten und toten Schistosomula führte, wurde als spezifisch durch Mefloquin verursachter Effekt eingeordnet (Abbildung 16A)

C – Prä-Adulte

Die Inkubation mit 2 µg/ml Mefloquin führte nach 60 h zur Schädigung aller Prä-Adulten und nach 168 h zum Tod von 41% (60/146) der untersuchten Stadien. Die Inkubation mit 1 µg/ml und 0.5 µg/ml Mefloquin führte zur Schädigung aller Prä-Adulten nach 84 h (Abbildung 14). Nach der 168-stündigen Inkubation mit 1 µg/ml und 0.5 µg/ml Mefloquin konnten jedoch nur 1% (1/151) bzw. 0% (0/146) der untersuchten Prä-Adulten als tot eingestuft werden. Wie bereits für das Stadium der Schistosomula beschrieben, konnten auch bei den Prä-Adulten die massive Vakuolenbildung und anschließende Körperdeformation bei geschädigten und toten Stadien als spezifisch durch Mefloquin verursachte Effekte beobachtet werden (Abbildung 17A).

D – Adulte

Die Inkubation mit 2 µg/ml Mefloquin führte nach 168 h zur Schädigung von 85% (22/26) und zum Tod von 4% (1/26) der untersuchten Adulten. Nach der 168-stündigen Inkubation mit 1 µg/ml Mefloquin konnten 52% (11/21) der untersuchten Adulten als geschädigt und 0% als tot eingestuft werden (Abbildung 14). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe konnte während der 168-stündigen Inkubation mit 0.5 µg/ml Mefloquin kein schistosomizider Effekt beobachtet werden. Die Inkubation mit Mefloquin führte zu keinen Substanz-spezifischen morphologischen Veränderungen in geschädigten und toten adulten Würmern (Abbildung 18A).

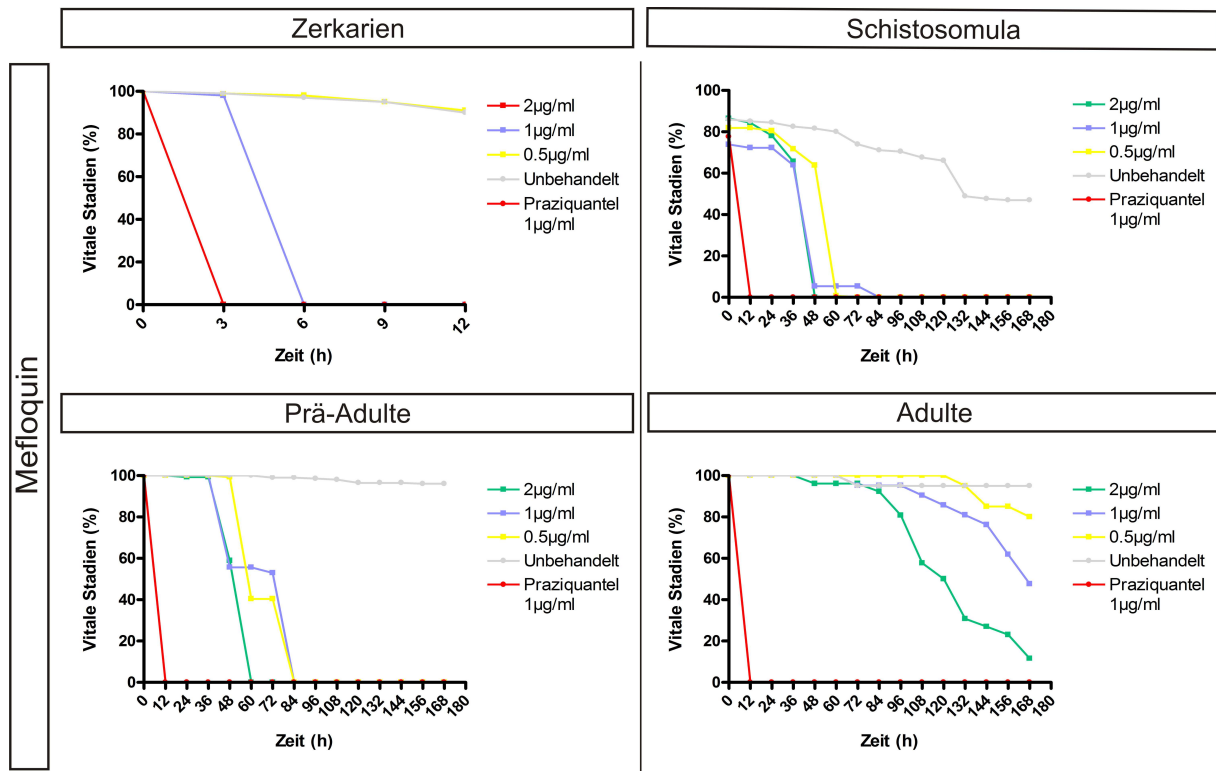


Abbildung 14. Vitalitätsrate der Zerkarien, Schistosomula, Prä-Adulten und Adulten von *S. mansoni* nach Inkubation mit Mefloquin. Die Vitalität von Zerkarien wurde alle 3 h für insgesamt 12 h und die Vitalität von Schistosomula, Prä-Adulten und Adulten alle 12 h für insgesamt 168 h mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskopes überprüft.

4.1.3.2 Primaquin

A – Zerkarien

Die Inkubation mit 2 µg/ml Primaquin führte nach 12 h zur Schädigung aller und zum Tod von 63% (365/575) der untersuchten Zerkarien (Abbildung 15). Die 12-stündige Inkubation mit 1 µg/ml und 0.5 µg/ml Primaquin führte zum Tod von 28% (164/575) und 25% (141/575) der untersuchten infektiösen Larven. Die massive Körperdeformation bei geschädigten und toten Zerkarien wurde als spezifisch durch Primaquin verursachter Effekt eingeordnet.

B – Schistosomula

Die Inkubation mit 2 µg/ml Primaquin führte nach 60 h zur Schädigung aller (165/165) und nach 168 h zum Tod aller untersuchten Schistosomula (Abbildung 15). Nach der 168-stündigen Inkubation mit 1 µg/ml Primaquin waren alle Schistosomula geschädigt und 22% (38/169) wurden als tot eingestuft. Die Inkubation mit 0.5 µg/ml Primaquin für 168 h führte

zur Schädigung von 36% (49/135) und zum Tod von 28% (38/135) der untersuchten Stadien. Die massive Körperdeformation und Vakuolenbildung bei geschädigten und toten Schistosomula wurden als spezifisch durch Primaquin verursachte Effekte eingestuft (Abbildung 16A).

C – Prä-Adulte

Die Inkubation mit 2 µg/ml Primaquin führte nach 132 h zur Schädigung aller Prä-Adulten und zum Tod von 12% (20/163) aller untersuchten Stadien nach 168 h (Abbildung 15). Nach der 168-stündigen Inkubation mit 1 µg/ml und 0.5 µg/ml Primaquin wurden keine geschädigten oder toten Prä-Adulten beobachtet. Massive Körperdeformationen sowie Vakuolenbildung im Parasitenkörper bei geschädigten und toten Prä-Adulten wurden als spezifisch durch Primaquin verursachte Effekte eingestuft (Abbildung 17B).

D – Adulte

Die Inkubation mit 2 µg/ml Primaquin für 168 h führte zur Schädigung aller adulten Würmer und zum Tod von 9% (3/34). Nach der 168-stündigen Inkubation mit 1 µg/ml und 0.5 µg/ml Primaquin waren 88% (22/25) bzw. 79% (27/34) der untersuchten Adulten geschädigt, es wurden jedoch keine toten Tiere beobachtet (Abbildung 15). Die Inkubation mit Primaquin führte zu keinen Substanz-spezifischen morphologischen Veränderungen in geschädigten und toten adulten Würmern (Abbildung 18A).

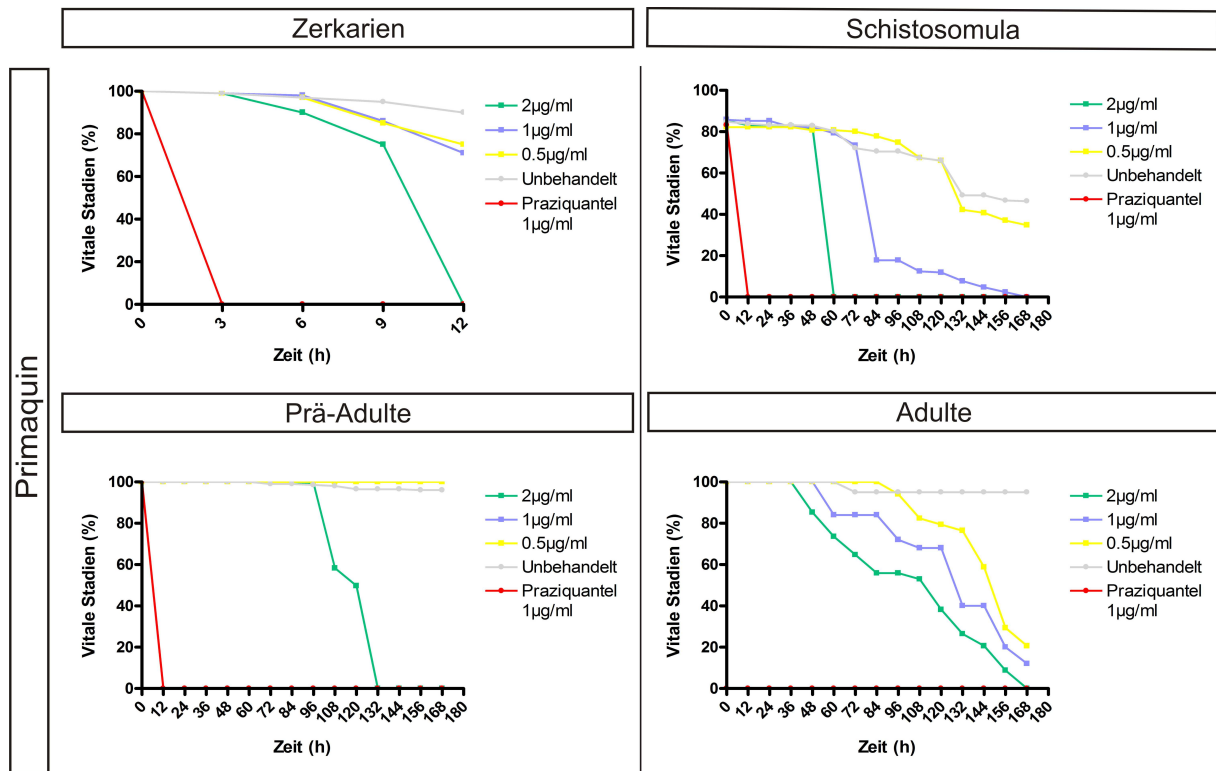


Abbildung 15. Vitalitätsrate der Zerkarien, Schistosomula, Prä-Adulten und Adulten von *S. mansoni* nach Inkubation mit Primaquain. Die Vitalität von Zerkarien wurde alle 3 h für insgesamt 12 h und die Vitalität von Schistosomula, Prä-Adulten und Adulten alle 12 h für insgesamt 168 h mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskopes überprüft.

4.1.3.3 Praziquantel

Die Inkubation mit 1 µg/ml Praziquantel führte zum Tod aller untersuchten Zerkarien (575/575) nach 3 h (Abbildung 14 und Abbildung 15). Die 168-stündige Inkubation mit 1 µg/ml Praziquantel führte zur Schädigung aller und zum Tod von 37% (66 /179) der untersuchten Schistosomula (Abbildung 14 und Abbildung 15). Alle untersuchten Prä-Adulten (86/86) und Adulten (20/20) wurden nach einer 12-stündigen Inkubationsperiode mit 1 µg/ml Praziquantel als tot eingestuft (Abbildung 14 und Abbildung 15). Infolge der Inkubation mit 1 µg/ml Praziquantel kam es zu einer massiven Körperdeformation der Schistosomula und Prä-Adulten (Abbildung 16B; Abbildung 17C). Adulte Würmer, die mit 1 µg/ml Praziquantel inkubiert wurden, wiesen eine massive Verkürzung des Körpers sowie ein schwarzes, undurchsichtiges Tegument auf (Abbildung 18B).

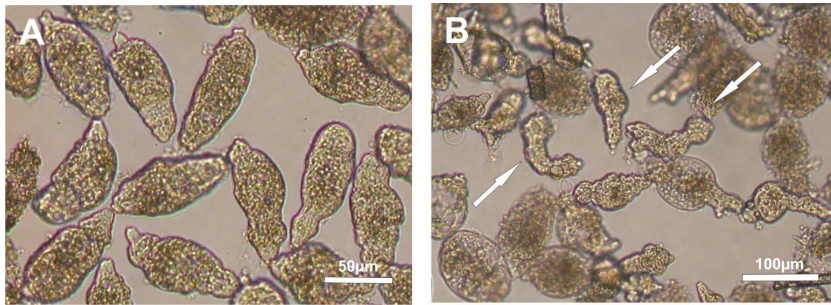


Abbildung 16. Morphologische Veränderungen der Schistosomula von *S. mansoni* nach der Inkubation mit Mefloquin, Primaquin und Praziquantel. In Folge der Inkubation mit Mefloquin (A) bzw. Primaquin kam es zu einer massiven Vakuolenbildung und Deformation des Parasitenkörpers. Die Inkubation mit Praziquantel (B) führte zur massiven Deformation des Teguments (Pfeile).



Abbildung 17. Morphologische Veränderungen der Prä-Adulten von *S. mansoni* nach der Inkubation mit Mefloquin, Primaquin und Praziquantel. Die Inkubation mit Mefloquin (A) führte zu einer starken Vakuolisierung des Parasitenkörpers, während die Inkubation mit Primaquin (B) eine starke Körperdeformation mit anschließender Vakuolisierung zur Folge hatte. Die Inkubation mit Praziquantel (C) führte, wie bereits für die Schistosomula beschrieben, zu einer massiven Körperdeformation (Pfeile).

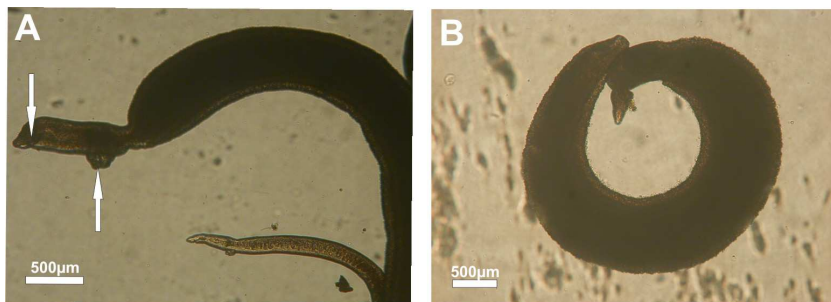


Abbildung 18. Morphologische Veränderungen der adulten Würmer von *S. mansoni* nach der Inkubation mit Mefloquin, Primaquin und Praziquantel. In Folge der Inkubation mit Mefloquin (A) bzw. Primaquin waren die Adulten nicht mehr mittels ihres Kopfsaugnapfes (↓) bzw. des Bauchsugnapfes (↑) am Boden der Kulturplatte festgeheftet. Weiterhin erschien das Tegument schwärzlich verfärbt und war nicht länger durchscheinend. Adulte, die mit Praziquantel (B) inkubiert wurden, waren ebenfalls nicht mehr am Boden der Kulturplatte festgeheftet und erschienen massiv verkürzt. Weiterhin war auch hier das Tegument schwarz verfärbt und nicht länger durchscheinend.

4.2 *In vivo* Versuche

4.2.1 Schistosomizider Effekt von Aminopterin, AMPT-HSA und Praziquantel *in vivo*

4.2.1.1 Bestimmung der maximal tolerablen Dosis (MTD)

Als maximal tolerable Aminopterin-HSA Dosis wurde der Wert von 500 µg/kg ermittelt, da bei vier-maliger Applikation dieser Konzentration an den Tagen 1, 3, 5 und 7 keine toxischen Effekte zu beobachten waren. Bei 1000 µg/kg und 1500 µg/kg AMPT-HSA wurden ab Tag 9 nach erstmaliger Medikamenteninjektion deutliche toxische Effekte wie struppiges Fell, Durchfall, schlechter Allgemeinzustand und Gewichtsverlust über 10% vom Ausgangsgewicht beobachtet (Abbildung 19). Bei keiner der getesteten AMPT Konzentrationen konnte ein toxischer Effekt beobachtet werden. Um Aminopterin und AMPT-HSA in der gleichen Dosierung zu testen, wurde Aminopterin deshalb in einer Konzentration von 500 µg/mg in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt. Als Kontrollgruppe dienten zusätzlich mit dem Goldstandard Praziquantel behandelte Tiere.

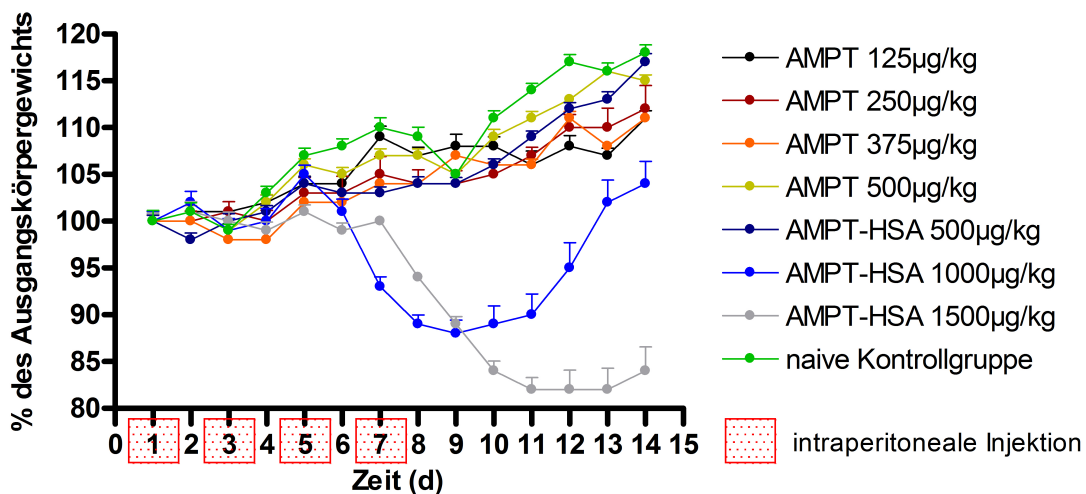


Abbildung 19. Gewichtsverläufe nach Applikation von verschiedenen Dosen AMPT und AMPT-HSA zur Bestimmung der MTD bei weiblichen naiven NMRI-Mäusen.

4.2.1.2 Bestimmung der durchschnittlichen Reduktion der Wurmlast nach AMPT, AMPT-HSA bzw. Praziquantel Applikation

A – Schistosomula

Die unbehandelte Kontrollgruppe wies eine durchschnittliche Wurmlast (WL) von 77.3 Würmern pro Tier auf. Nach der Applikation von 500 µg/kg Aminopterin und 40 mg/kg Praziquantel konnte keine Wurmlastreduktion (WLR) beobachtet werden. Auch die Applikation von 500 µg/kg Aminopterin-HSA resultierte nur in einer sehr niedrigen Wurmlastreduktion von 1.2%. Keine der getesteten Substanzen bewirkte eine signifikante Reduktion der Wurmlast im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Tabelle 5).

B – Prä-Adulte

Die unbehandelte Kontrollgruppe wies eine durchschnittliche Wurmlast von 53.3 Würmern pro Tier auf. Die Applikation von AMPT führte zu einer Wurmlastreduktion von 45.9%, während die Applikation von AMPT-HSA keinen schistosomiziden Effekt hatte. Die höchste Wurmlastreduktion von 59.1% resultierte aus der Applikation von 40 mg/kg Praziquantel. Praziquantel war somit die einzige Substanz, die im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zu einer signifikant verringerten Wurmlast führte ($p < 0.05$). Allerdings führten im Vergleich zur AMPT-HSA-Gruppe sowohl Praziquantel als auch AMPT zu signifikant verringerten Wurmlasten ($p < 0.05$, Tabelle 5).

C – Adulte

Die unbehandelte Kontrollgruppe wies eine durchschnittliche Wurmlast von 39 Würmern pro Tier auf. Die Applikation von AMPT und AMPT-HSA führte zu Wurmlastreduktionen von 25.6% und 20.1%, die jedoch in Bezug auf die unbehandelte Kontrollgruppe nicht signifikant waren. Die Applikation von 40 mg/kg Praziquantel führte auch in der Adulten-Gruppe zur höchsten Wurmlastreduktion von 59.4%. Allerdings bewirkte keine der getesteten Substanzen eine signifikante Reduktion der Wurmlast im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Die durchschnittliche Wurmlast der Praziquantel-Gruppe war lediglich im Vergleich zur AMPT-HSA signifikant erniedrigt ($p < 0.05$, Tabelle 5).

Tabelle 5. Schistosomizider Effekt von 500 µg/kg AMPT, 500 µg/kg AMPT-HSA und 40 mg/kg Praziquantel auf Schistosomula, Prä-Adulte und Adulte von *S. mansoni* *in vivo*.

Schistosomula	Durchschnittliche WL/Tier	Durchschnittliche WLR (%) §	n _{untersuchte Tiere}
AMPT 500 µg/kg	76.3 ± 21.5	1.2	6
AMPT-HSA 500 µg/kg	93.0 ± 44.1	-20.4	6
Praziquantel 40 mg/kg	87.8 ± 19.4	-13.7	6
Unbehandelt	77.3 ± 24.3	-	4
Prä-Adulte	Durchschnittliche WL/Tier	Durchschnittliche WLR (%) §	n _{untersuchte Tiere}
AMPT 500 µg/kg	28.8 ± 16.1*	45.9	6
AMPT-HSA 500 µg/kg	53.2 ± 15.1	0.3	6
Praziquantel 40 mg/kg	21.8 ± 9.8*	59.1	6
Unbehandelt	53.3 ± 10.3 [#]	-	3
Adulte	Durchschnittliche WL/Tier	Durchschnittliche WLR (%) §	n _{untersuchte Tiere}
AMPT 500 µg/kg	29.0 ± 18.1	25.6	6
AMPT-HSA 500 µg/kg	31.2 ± 8.5	20.1	6
Praziquantel 40 mg/kg	15.8 ± 14.8*	59.4	6
Unbehandelt	39.0 ± 16.8	-	3

Kruskall-Wallis-Test (Exakter Permutationstest), MW ± SD

§ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe

* vs. 500 µg/ml AMPT-HSA, p<0.05

[#] vs. 40 mg/kg Praziquantel, p<0.05

4.2.2 Schistosomizider Effekt von verschiedenen Primaquindosierungen *in vivo*

4.2.2.1 Bestimmung der maximal tolerablen Dosis (MTD)

Als maximal tolerable Primaquin-Dosis wurde 32 mg/kg Primaquin_{Base} ermittelt, da dies die höchste getestete Dosierung war, bei der keine toxischen Effekte zu beobachten waren. Bei einer Konzentration von 64 mg/kg Primaquin_{Base} wurde bereits nach der ersten oralen Applikation ein massiver toxischer Effekt beobachtet. Da die Tiere dieser Versuchsgruppe einen massiven Gewichtsverlust von ca. 10% vom Ausgangsgewicht und einen schlechten Allgemeinzustand aufwiesen, wurden von weiteren Applikationen abgesehen (Abbildung 20). Um ein breites Dosierungsspektrum abzudecken, wurden die anschließenden Versuche mit 2 mg/kg, 8 mg/kg und 32 mg/kg Primaquin_{Base} durchgeführt.

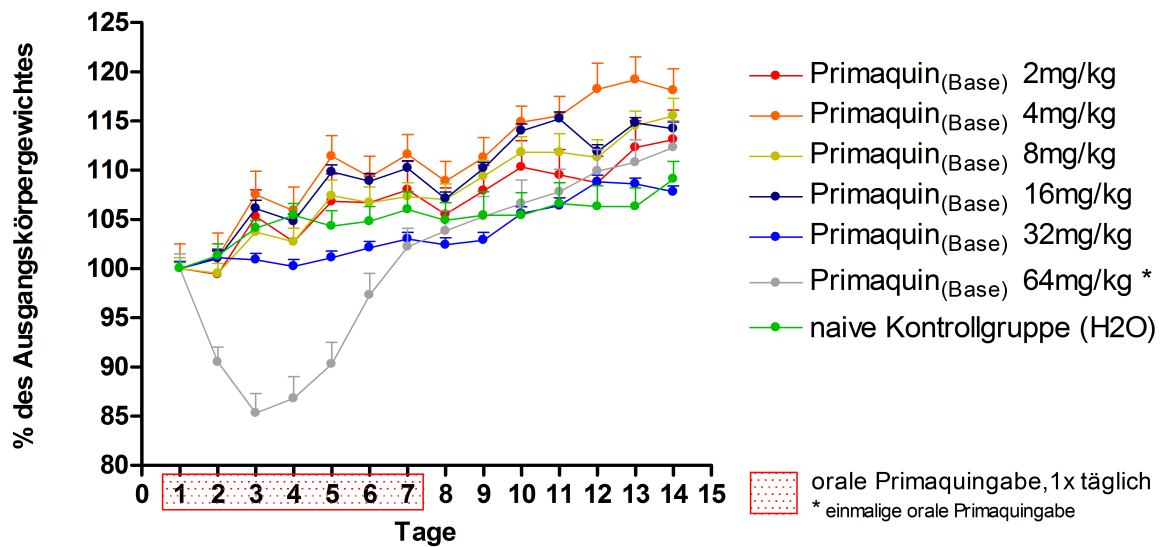


Abbildung 20. Gewichtsverläufe nach Applikation von verschiedenen Dosen Primaquin_{Base} zur Bestimmung der MTD bei weiblichen naiven NMRI-Mäusen.

4.2.2.2 Bestimmung der durchschnittlichen Reduktion der Wurmlast

A – Schistosomula

Die unbehandelte Kontrollgruppe wies eine durchschnittliche Wurmlast von 28.5 Würmern pro Tier auf. Die Applikation von 2 mg/kg, 4 mg/kg und 32 mg/kg Primaquin_{Base} führten zu Wurmlastreduktionen von 12.9%, 4.1% bzw. 21.4%. Keine der getesteten Substanzen bewirkte eine signifikante Reduktion der Wurmlast im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Tabelle 6).

B – Prä-Adulte

Die unbehandelte Kontrollgruppe wies eine durchschnittliche Wurmlast von 32.5 pro Tier auf. Die niedrigste Wurmlastreduktion von 2.1% wurde in der 2 mg/kg Primaquin_{Base}-Gruppe beobachtet. Die Applikation von 8 mg/kg bzw. 32 mg/kg Primaquin_{Base} führte zu Wurmlastreduktion von 39.5% bzw. 34.9% und somit im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zu einer signifikanten Verringerung der Wurmlast ($p < 0.05$). Des Weiteren führte die Applikation von 32 mg/kg Primaquin_{Base} auch im Vergleich zu 2 mg/kg Primaquin_{Base} zu einer signifikanten Verringerung der Wurmlast ($p < 0.05$, Tabelle 6).

C – Adulte

Die unbehandelte Kontrollgruppe wies eine durchschnittliche Wurmlast von 29.2 Würmern pro Tier auf. Im Rahmen der Applikation von 2 mg/kg, 4 mg/kg und 32 mg/kg Primaquin_{Base} konnte keine Wurmlastreduktion beobachtet werden (Tabelle 6).

Tabelle 6. Schistosomizider Effekt von 2, 8 und 32 mg/kg Primaquin auf Schistosomula, Prä-Adulte und Adulte von *S. mansoni* *in vivo*.

Schistosomula	Durchschnittliche Wurmlast	Durchschnittliche WLR (%) §	n _{untersuchte Tiere}
Primaquin 2 mg/kg	24.8 ± 3.7	12.9	6
Primaquin 8 mg/kg	27.3 ± 6.6	4.1	6
Primaquin 32 mg/kg	22.4 ± 10.8	21.4	5
Unbehandelt	28.5 ± 10.1	-	6
Prä-Adulte	Durchschnittliche Wurmlast	Durchschnittliche WLR (%) §	n _{untersuchte Tiere}
Primaquin 2 mg/kg	31.8 ± 6.9 *	2.1	6
Primaquin 8 mg/kg	19.7 ± 10.6 #	39.5	6
Primaquin 32 mg/kg	21.1 ± 7.4 #	34.9	6
Unbehandelt	32.5 ± 5.7	-	6
Adulte	Durchschnittliche Wurmlast	Durchschnittliche WLR (%) §	n _{untersuchte Tiere}
Primaquin 2 mg/kg	31.0 ± 14.7	-6.3	6
Primaquin 8 mg/kg	30.7 ± 9.0	-5.1	6
Primaquin 32 mg/kg	37.5 ± 4.1	-28.6	6
Unbehandelt	29.2 ± 6.6	-	6

Kruskall-Wallis-Test (Exakter Permutationstest), MW ± SD

§ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe

vs. infizierte, unbehandelte Kontrollgruppe (p<0.05)

* vs. Primaquin 32 mg/kg Gruppe (p<0.05)

4.2.2.3 Durchflusszytometrische Analysen**A - FACS-Analysen des peripheren Blutes 24 h nach der letzten Primaquin-Applikation**

Bei allen untersuchten Lebensstadien konnten im peripheren Blut keine signifikanten Unterschiede zwischen den CD3⁺/CD⁴, CD19⁺ und CD11b⁺/Gr-1⁺-Zellpopulationen der

Primaquin_{32 mg/kg} Kontrollgruppe und der infizierten, unbehandelten Kontrollgruppe beobachtet werden. Innerhalb der drei Primaquin-Therapiegruppen sowie zwischen den drei Primaquin-Therapiegruppen und den Kontrollgruppen konnten darüberhinaus keine signifikanten Veränderungen in den CD3⁺/CD4⁺, CD19⁺ und CD11b⁺/Gr-1⁺-Zellpopulationen beobachtet werden, die Rückschlüsse auf einen Therapieerfolg erlaubten. Allerdings wurde bei allen drei Lebensstadien ein tendenzielles Absinken der CD11b⁺/Gr-1⁺ Zellen von 2 mg/kg Primaquin zu 32 mg/kg Primaquin beobachtet (Abbildung 21).

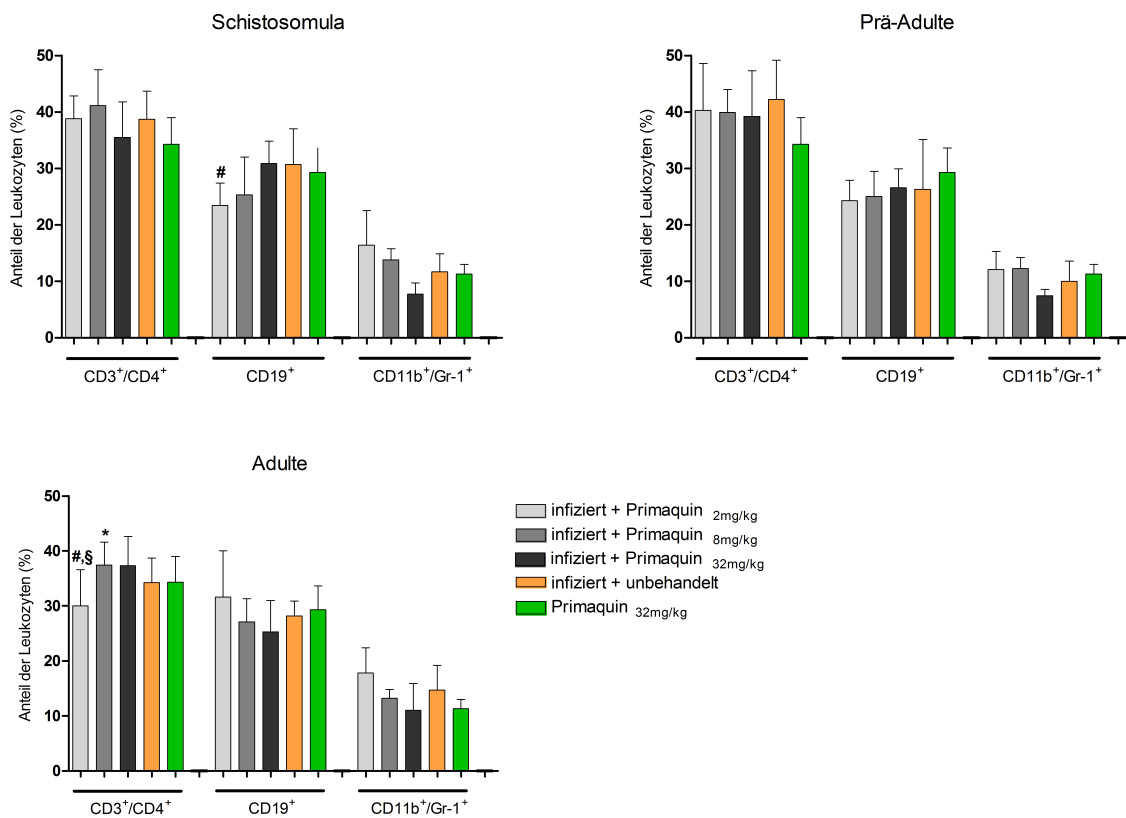


Abbildung 21. Prozentuale Anteile der Leukozytenpopulationen im peripheren Blut 24 h nach der letzten oralen Primaquin-Applikation.

Kruskall-Wallis-Test (Exakter Permutationstest), MW±SD, n=6 (Schistosomula: Primaquin 32 mg/kg n=5)

vs. Primaquin 32 mg/kg Kontrollgruppe (p<0.05)

* vs. infizierte + unbehandelte Kontrollgruppe (p<0.05)

§ vs. infiziert + Primaquin 8 mg/kg (p<0.05)

B - FACS-Analysen des peripheren Blutes an Tag 50 nach Zerkarieninfektion

Im Vergleich zu der prozentualen Verteilung der Leukozyten 24 h nach der letzten Primaquin Applikation waren bei allen Lebensstadien die prozentualen Anteile der CD3⁺/CD4⁺-T-Zellen und CD19⁺-Zellen in den Primaquin-Therapiegruppen sowie in der infizierten, unbehandelten Kontrollgruppe erniedrigt. Die Verringerung der CD4⁺-T-Zellen bei Schistosomula, Prä-Adulten und Adulten betrug durchschnittlich 10%, 16% bzw. 7%. Dahingegen wurde in der Primaquin_{32 mg/kg} Kontrollgruppe kein Unterschied beobachtet. Bei allen Lebensstadien waren die Anteile von CD19⁺-Zellen in allen Versuchsgruppen um durchschnittlich 9% erniedrigt. Demgegenüber kam es im Vergleich zu der prozentualen Verteilung der CD11b⁺/Gr-1⁺-Zellen 24 h nach der letzten Primaquin Applikation in den Primaquin-Gruppen sowie in der infizierten, unbehandelten Kontrollgruppe bei Schistosomula und Adulten zu einem Anstieg um durchschnittlich 16% und 23% bei den Prä-Adulten. In der Primaquin_{32 mg/kg} Kontrollgruppe war im Vergleich zu der Analyse nach 24 h eine Erhöhung um 12% zu beobachten. Bei allen untersuchten Lebensstadien im peripheren Blut konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den CD3⁺/CD4⁺, CD19⁺ und CD11b⁺/Gr-1⁺-Zellpopulationen der Primaquin_{32 mg/kg} Kontrollgruppe und der infizierten, unbehandelten Kontrollgruppe beobachtet werden. Innerhalb der drei Primaquin-Therapiegruppen sowie zwischen den drei Primaquin-Therapiegruppen und den Kontrollgruppen konnten darüberhinaus keine signifikanten Veränderungen in den untersuchten Zellpopulationen beobachtet werden, die Rückschlüsse auf einen Therapieerfolg erlaubten. Bei Schistosomula und Prä-Adulten wurde ein tendenzielles Absinken der CD11b⁺/Gr-1⁺ Zellen von 2 mg/kg Primaquin zu 32 mg/kg Primaquin beobachtet (Abbildung 22).

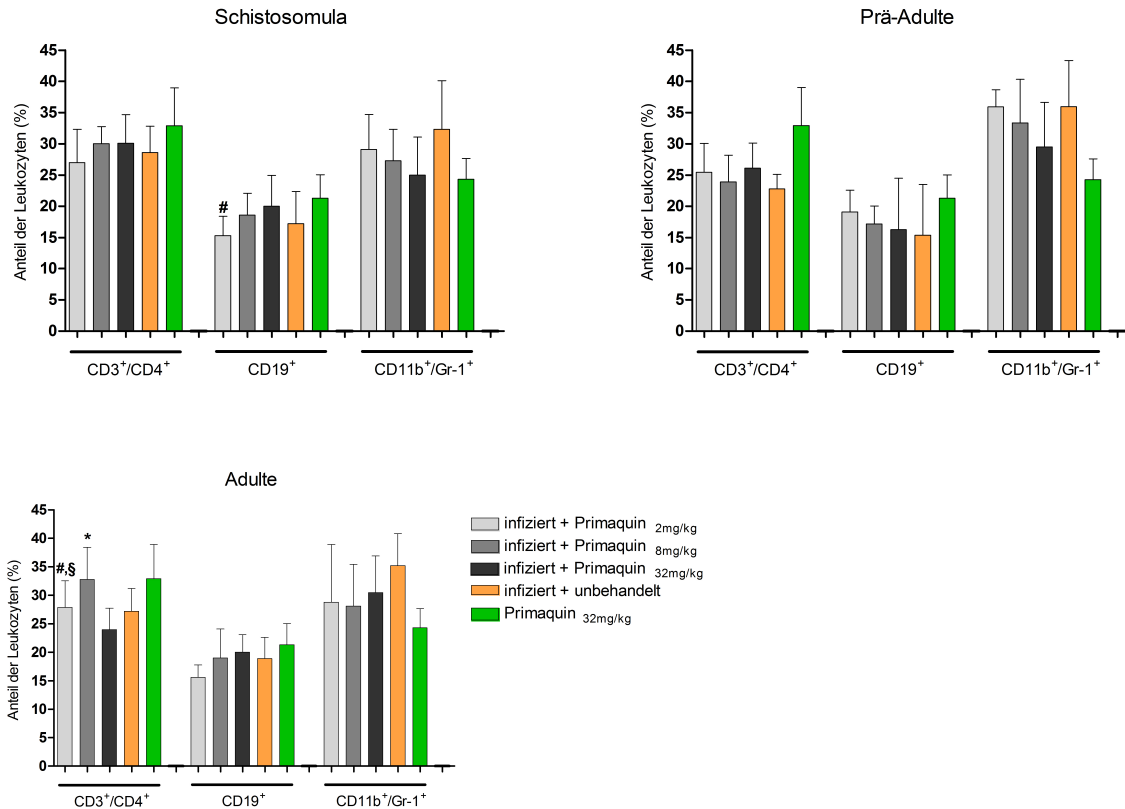


Abbildung 22. Prozentuale Anteile der Leukozytenpopulationen im peripheren Blut 50 Tage nach Infektion mit Zerkarien.

Kruskall-Wallis-Test (Exakter Permutationstest), MW±SD, n=6.

vs. Primaquin 32 mg/kg Kontrollgruppe (p<0,05)

* vs. infizierte + unbehandelte Kontrollgruppe (p<0,05)

§ vs. infiziert + Primaquin 8 mg/kg (p<0,05)

C - FACS-Analysen der mesenterialen Lymphknoten an Tag 50 nach

Zerkarieninfektion

In den mesenterialen Lymphknoten konnte im Vergleich zur Primaquin 32 mg/kg Kontrollgruppe bei allen untersuchten Lebensstadien eine signifikante Erniedrigung der prozentualen Anteile der CD3⁺/CD4⁺-Zellpopulationen der infizierten, unbehandelten Kontrollgruppen beobachtet werden. Ein Vergleich der prozentualen Anteile von infizierten, unbehandelten Kontrollgruppen mit der Primaquin 32 mg/kg Kontrollgruppe ergab hingegen einen signifikanten Anstieg der CD19⁺ - und CD11b⁺/Gr-1⁺-Zellpopulationen. Bei allen untersuchten Lebensstadien waren die prozentualen Anteile von CD4⁺-T-Zellen in allen drei Primaquin-Therapiegruppen signifikant niedriger als die der nicht-infizierten Primaquin 32 mg/kg Kontrollgruppe. Weiterhin kam es bei den Primaquin-Therapiegruppen im Vergleich zur Primaquin 32 mg/kg Kontrollgruppe zu einer signifikanten Erhöhung von CD11b⁺/Gr1⁺-Zellen

bei allen Lebensstadien. Tendenziell näherten sich die prozentualen Anteile von CD3⁺/CD4⁺ und CD11b⁺/Gr-1⁺-Zellpopulationen in den drei Primaquin-Therapiegruppen bei allen Lebensstadien eher dem Niveau der infizierten, unbehandelten Kontrollgruppe an. Bezüglich der CD19⁺-Zellen konnten innerhalb der drei Primaquin-Therapiegruppen sowie zwischen den drei Primaquin-Therapiegruppen und den Kontrollgruppen bei allen untersuchten Lebensstadien keine Veränderungen beobachtet werden, die Rückschlüsse auf einen Therapieerfolg erlaubten (Abbildung 23).

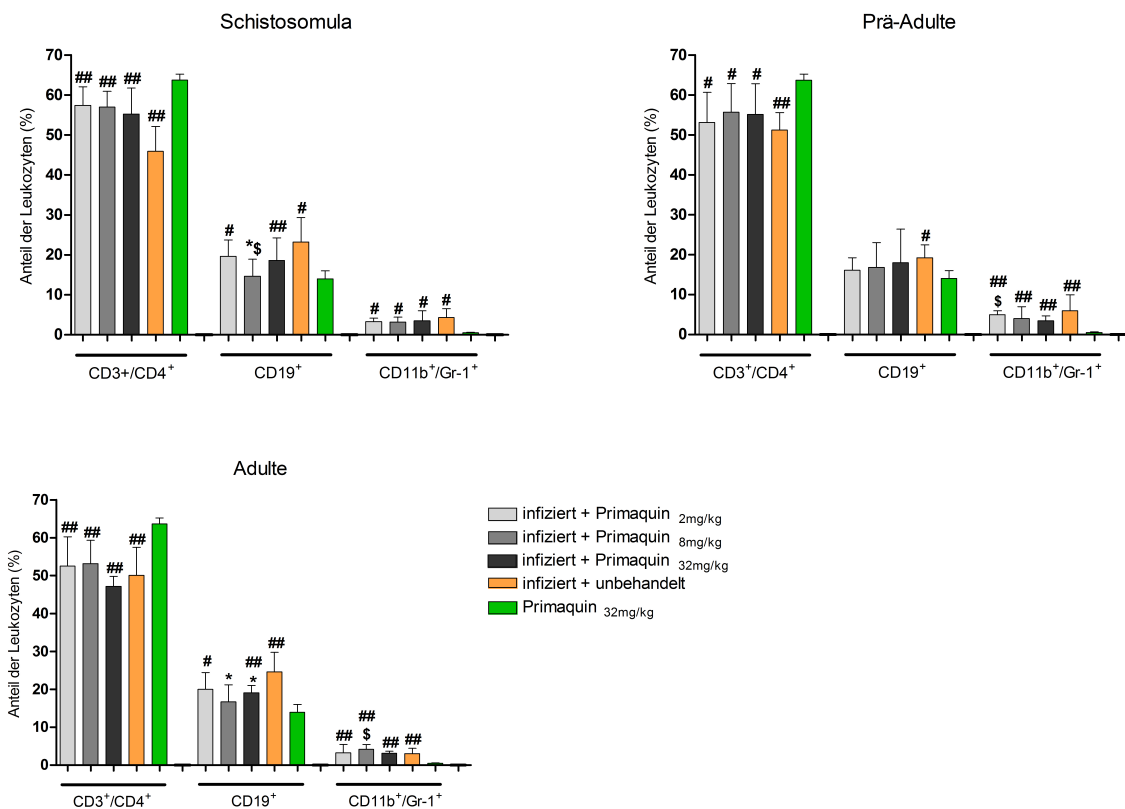


Abbildung 23. Prozentuale Anteile der Leukozytenpopulationen in den mesenterialen Lymphknoten 50 Tage nach Zerkarieninfektion.

Kruskal-Wallis-Test (Exakter Permutationstest), MW±SD, n=6.

($p < 0,05$); ## ($p < 0,01$) vs. Primaquin 32 mg/kg Kontrollgruppe

* vs. infizierte + unbehandelte Kontrollgruppe ($p < 0,05$)

\$ vs. infiziert + Primaquin 32 mg/kg ($p < 0,05$)

4.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

4.3.1 Nachweis der Eier von *S. mansoni* im präparierten Dick- und Dünndarm

Im dem untersuchten Stück des präparierten Dickdarms konnten mit Hilfe des Mikroskopie-System 1 (MS 1) insgesamt 32 Eier von *S. mansoni* nachgewiesen werden (Tabelle 7). Das Mukosagewebe wurde dabei von der Oberfläche bis zu einer Tiefe von ca. 150µm durchgemustert. Die Eier erschienen zuerst als helle Strukturen im Gewebe, die typische Form und der laterale Stachel wurden jedoch im weiteren Verlauf des Scanningprozesses sichtbar. 28 der 32 Eier (87.5%) enthielten vollständig entwickelte, dunkel gefärbte, morphologisch unauffällige Mirazidien und wurden deshalb als vital eingestuft (Abbildung 24A). Die Mirazidien in vier der 28 vitalen Eier (14%) wiesen zuckende Bewegungen in der Eischale auf. Die Eischalen von vier der insgesamt 32 Eier (12.5%) wiesen keinen Inhalt auf und wurden deshalb als tot eingestuft (Abbildung 24B). Auch das entzündliche Gewebe von Eigranulomen konnte gut vom Mukosagewebe unterschieden werden (Abbildung 24C).

In dem untersuchten Abschnitt des präparierten Dünndarms konnten insgesamt 20 Eier von *S. mansoni* nachgewiesen werden (Tabelle 7). 17 Eier (85%) wurden als vital eingestuft. 14 der 17 vitalen Eier (82%) enthielten vollständig entwickelte, dunkel gefärbte, morphologisch unauffällige Mirazidien. Die verbleibenden 3 Eier (18%) wurden als Entwicklungsstadium 1 eingestuft, da sie diverse Dotterzellen jedoch kein Mirazidium enthielten (Abbildung 24D). Weitere drei der insgesamt 20 Eier (15%) wurden als tot eingestuft.

Tabelle 7. Anzahl der vitalen und toten Eier von *S. mansoni* in Dick- und Dünndarm einer mit Mikroskopie-System 1 untersuchten Maus.

Darmteil	n Eier gesamt	%	n Vitale Eier	%	n Tote Eier	%
Dickdarm	32	100	28	88	4	12
Dünndarm	20	100	17	85	3	15

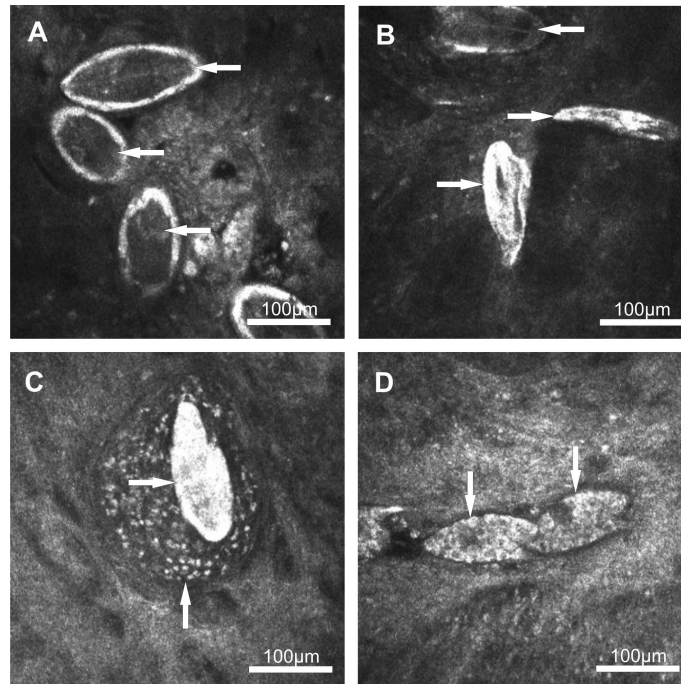


Abbildung 24. Mit Hilfe des Mikroskopie-Systems 1 visualisierte Eier von *S. mansoni* in der Dickdarmmukosa. (A) Dunkel gefärbte und voll entwickelte Mirazidien (←) in den hellen Eihüllen von vitalen Eiern. (B) Tote Eier (→) ohne Inhalt sowie vitales Ei (←) mit dunklem Mirazidium. (C) Totes Ei (→) mit umgebendem Eigranulom (↑). (D) Eier des Entwicklungsstadiums 1 (↓) mit zahlreichen Dotterzellen innerhalb der Eihülle.

4.3.2 Nachweis der Eier von *S. mansoni* im Kolon mittels verschiedener Nachweismethoden

Anhand der im Dick- und Dünndarm einer infizierten Maus visualisierten Eier von *S. mansoni* wurde nachgewiesen, dass die CLSM zur Detektion sowie zur Klassifikation von Schistosomeneiern geeignet ist. Anschließend wurde das Kolon von fünf weiteren infizierten Mäusen hinsichtlich der Ei-Last mit verschiedenen Mikroskopiemethoden untersucht.

In den circa $1.8 \pm 0.4 \text{ cm}^2$ großen Kolonstücken der fünf mittels des Mikroskopie-Systems 2 (MS 2) untersuchten Versuchstiere wurden insgesamt 196 Eier von *S. mansoni* nachgewiesen (Tabelle 8, siehe Anhang). 36 der 196 Eier (18%) wurden aufgrund des Vorhandenseins eines voll entwickelten Mirazidiums als vital (Abbildung 25A und C) und 160 Eier (82%) aufgrund einer leeren Eihülle als tot eingestuft (Abbildung 25B und C). Bei keinem der vitalen Eier wurde ein sich bewegendes Mirazidium beobachtet.

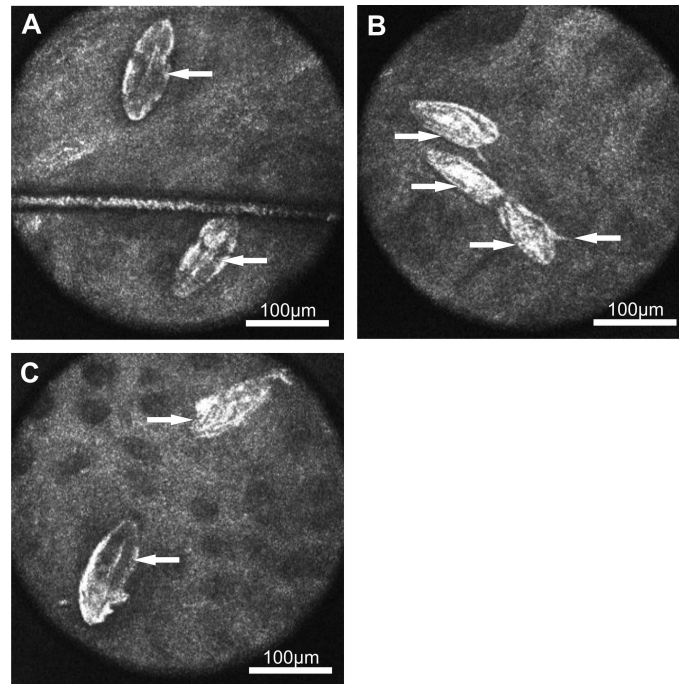


Abbildung 25. Mit Hilfe des Mikroskopie-Systems 2 visualisierte Eier von *S. mansoni* in der Dickdarmmukosa. (A) Dunkel gefärbte und voll entwickelte Mirazidien (←) in den hellen Eihüllen von vitalen Eiern. (B) Tote Eier (→) ohne Inhalt mit dem charakteristischen lateralen Stachel (←). (C) Totes Ei (→) ohne Inhalt sowie vitales Ei (←) mit dunkel gefärbtem, voll entwickeltem Mirazidium.

Mit Hilfe des MS 1 konnten in den präparierten fünf Kolonstücken insgesamt 255 Wurmeier nachgewiesen werden (Tabelle 8, siehe Anhang). Dabei wurden 85 der 255 Eier (33%) als vital eingestuft. Die Mirazidien von drei vitalen Eiern (4%) wiesen zuckende Bewegungen auf und 6 Eier (7%) konnten dem Entwicklungsstadium 1 zugeordnet werden. 170 der insgesamt 255 Eier (67%) wurden als tot eingestuft.

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der Quetschpräparate der fünf 0.2 cm² großen Kolonbiopäten wurden insgesamt 348 Eier von *S. mansoni* nachgewiesen (Tabelle 8, siehe Anhang). 79 Eier (23%) wurden als vital eingestuft (Abbildung 26A). Acht der 79 vitalen Eier (10%) enthielten zuckende Mirazidien und ein Mirazidium (1%) war bereits aus der Eischale ins umliegende Gewebe geschlüpft (Abbildung 26C). Weitere 269 Eier (77%) wurden als avital eingestuft (Abbildung 26B).

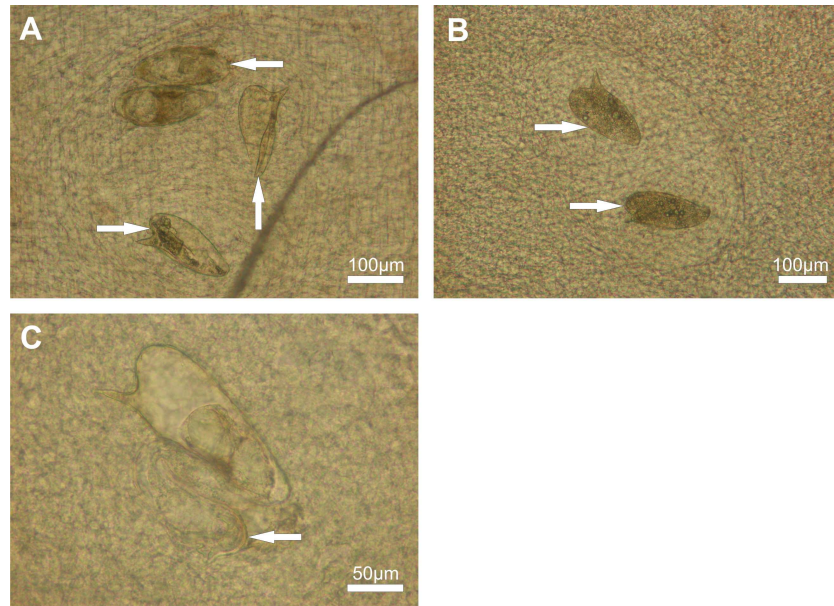


Abbildung 26. Mit Hilfe von Lichtmikroskopie visualisierte Eier von *S. mansoni* im Quetschpräparat des Dickdarmes. (A) Vitale Eier (←) mit voll entwickelten Mirazidien in der Eihülle, leere Eihülle (↑) eines bereits geschlüpften Mirazidiums und totes Ei (→) mit diffusem Inhalt. (B) Tote Eier (→) mit dunklem granulärem Inhalt. (C) Eihülle mit bereits ins Gewebe geschlüpftem Mirazidium (←).

5 Diskussion

5.1 Entwicklung eines „drug targeting“ Modells mit HSA bzw. AmPEG als Trägermolekül *in vitro*

Unter „drug targeting“ versteht man die Anreicherung einer therapeutischen wirksamen Substanz in spezifischen Arealen des Körpers zur Erhöhung der Wirksamkeit bei gleichzeitiger Reduktion der systemischen Nebenwirkungen (Yokoyama 2005, Torchilin 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Wirkstoffe und die dazu gehörigen HSA-bzw. PEG-Konjugate hinsichtlich ihres Potentials zur Etablierung eines *drug targeting* Modells zur Therapie der Schistosomiasis *in vitro* untersucht.

5.1.1 Aminopterin, Methotrexat, AMPT-HSA und MTX-HSA

Methotrexat und **Aminopterin** sind Folsäureanaloga, die das Enzym Dihydrofolatreduktase (DHFR) kompetitiv und reversibel hemmen. Folsäure liegt im Blut in der aktivierten Form N⁵-Methyl-Tetrahydrofolat (N⁵-Methyl-THF) vor. Die Methylgruppe dieser Verbindung wird durch die Thymidylat-Synthase (TS) auf das Desoxy-Uridinmonophosphat (dUMP) übertragen, wobei der DNA-Baustein Desoxy-Thymidinmonophosphat (dTMP) entsteht. Das N⁵-Methyl-THF wird in dieser Reaktion zu Dihydrofolat (DHF) oxidiert. Dies ist die einzige, der durch THF-abhängige Enzyme katalisierten C1 Übertragungen, in der das THF zu DHF oxidiert wird. Die DHFR ist daher essentiell für die Reduktion von DHF zu THF im Prozess der Thymidylatsynthese. Das entstandene THF kann nun mit einer, bei der Umwandlung von Serin zu Glycin abgespaltenen Methylgruppe versehen werden, wodurch erneut N⁵-Methyl – THF entsteht. Aufgrund der DHFR-Inhibition durch MTX kommt es zu einer Überproduktion an DHF und einem Mangel an THF und N⁵-Methyl-THF, was wiederum zur Hemmung der TS führt, die N⁵-Methyl-THF als Substrat benötigt. Weiterhin inhibieren erhöhte DHF-Spiegel rückkoppelnd Enzyme, die an der Purinsynthese beteiligt sind. Die durch MTX in ihrem Folsäurestoffwechsel beeinträchtigte Zelle verarmt also an wichtigen DNA-Bausteinen wie Thymidylaten und Purinen.

Adulte von *S. mansoni* besitzen nachweislich eine DHFR, welche *in vitro* durch die relativ geringe Konzentration von 0.07×10^{-8} M MTX inhibiert wird (Jaffee 1971, Jaffee *et al.* 1972). Da weder mit MTX noch mit AMPT *in vitro* ein schädigender Effekt auf Prä-Adulte und adulte Würmer von *S. mansoni* zu beobachten war, scheint die Inhibition der DHFR keinen Effekt auf die Vitalität der Parasiten zu haben. Dieser Umstand deutet darauf hin, dass Schistosomen die benötigten Purine nicht *de novo* synthetisieren, sondern die Purinbasen und Nukleotide über den „salvage-pathway“ aufnehmen. Dafür spricht weiterhin, dass

adulte Würmer und Schistosomula *in vitro* radioaktiv-markiertes Adenin, Adenosin, Guanin und Guanosin in den Purinring einbauen (Senft *et al.* 1972, Senft & Crabtree 1977, Dovey *et al.* 1983). Im Gegensatz dazu wurde radioaktiv-markiertes Glycin, ein während der *de novo* Purinsynthese benötigtes Molekül, nur in geringen Mengen bzw. gar nicht in den Purin-Pool aufgenommen (Senft *et al.* 1977, Dovey *et al.* 1983). Weiterhin konnten bei *S. mansoni* wichtige Enzyme des „salvage-pathways“ nachgewiesen werden. So dient die Adenosin-Kinase der Phosphorylierung von Adenosin zu Adenosinmonophosphat während die Purin Nucleosid Phosphorylase die Spaltung von Purinribosiden zur Freisetzung von Ribose-1-phosphaten und Nucleobasen katalysiert (Lawton 2005). Schistosomen scheinen daher nicht in der Lage Purine *de novo* zu synthetisieren, sondern können diese mit Hilfe des „salvage-pathways“ herstellen. Die dazu benötigten Purinvorstufen werden demzufolge über spezielle Transportsysteme des schistosomalen Teguments aufgenommen (Levy & Read 1975). Nicht nur Schistosomen, sondern alle Parasiten sind, bis auf wenige Ausnahmen wie z. B. *Angiostrongylus cantonensis* und *Acanthamoeba polyphaga* demzufolge nicht in der Lage Purinbasen *de novo* zu synthetisieren (el Konni 2003).

Weiterhin scheint auch die Aktivität der TS und somit die Thymidinsynthese von AMPT und MTX nicht inhibiert zu werden. Obwohl das Vorhandensein einer schistosomalen TS bisher experimentell nicht nachgewiesen wurde, wird jedoch vermutet, dass das Gen *smp_135460* (*Schistosoma mansoni* protein) die bifunktionale DHFR/TS codiert (Berriman *et al.* 2009). Im Gegensatz zur Purin-Biosynthese wurde jedoch für die Pyrimidin-Biosynthese bei Schistosomen nachgewiesen, dass sowohl der *de novo* pathway als auch der „salvage-pathway“ genutzt werden können. So wurden alle für die *de novo* Synthese von dUMP benötigten Enzyme *in vitro* bei *S. mansoni* und *S. japonicum* nachgewiesen. Andererseits wurde auch der Einbau von radioaktiv-markiertem Uridin, Cytidin, Desoxycytidin und Thymidin in die Nucleinsäuren beobachtet. Obwohl Schistosomen somit nachweislich in der Lage sind beide Synthesewege zur Thymidingewinnung zu nutzen, spielt der energiesparendere „salvage-pathway“ *in vivo* vermutlich die größere Rolle (el Konni & Naguib 1990). Im Falle einer Hemmung der DHFR und somit auch der TS durch AMPT und MTX, scheinen Schistosomen Thymidin also über den „salvage-pathway“ gewinnen zu können.

Da Schistosomula und adulte Würmer zur Pyrimidin- und Purinbiosynthese offensichtlich den „salvage-pathway“ nutzen, scheint die Dihydrofolatreduktase für die Entwicklungsstadien im Endwirt keine Rolle für die DNA-Synthese zu spielen. Allerdings könnte die DHFR in früheren Entwicklungsstadien, wie z. B. Mirazidium und Mutter-bzw.

Tochterporozyste, eine größere Rolle für eine mögliche *de novo*-Synthese von Pyrimidinen und Purinen spielen.

Zytostatika werden in der Regel bei stark proliferierenden Geweben, wie Tumoren eingesetzt, da diese aufgrund des schnellen Wachstums eine hohe Zellteilungsrate aufweisen. Auf langsam proliferierende Zellen haben Zytostatika kaum einen schädigenden Effekt, da kaum DNA-Synthese stattfindet. Adulte Würmer von *S. mansoni* weisen vermutlich eine geringe Zellteilungsrate auf, so dass selbst im Falle einer Inhibition der DNA- bzw. RNA- Synthese kein starker schädigender Effekt zu beobachten ist. Prä-Adulte weisen als juvenile Parasitenstadien innerhalb der 7-tägigen Kulturphase ein sichtbares Körperwachstum auf. Bisher ungeklärt ist, ob die Zellproliferation während dieser Phase so schnell stattfindet, dass die Inhibition des Folsäurezyklus eine bleibende Schädigung der Parasiten zur Folge hätte.

Auch die Albuminkonjugate **AMPT-HSA** und **MTX-HSA** zeigten keinen schistosomiziden Effekt auf Prä-Adulte und Adulte von *S. mansoni in vitro*. Im menschlichen Organismus werden die Konjugate über Endozytose in die Zelle eingeschleust und dort enzymatisch im Lysosom gespalten. Dabei wird das Albuminmolekül solange abgebaut, bis nur noch die Wirkstoffe mit einem Lysinrest verbleiben. Da MTX-HSA und AMPT-HSA sowohl in Zellkulturversuchen als auch im Tiermodell eine antiproliferative Wirkung bei Tumoren zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass der am Wirkstoff verbleibende Lysinrest die Wirksamkeit nicht beeinträchtigt. Im Rahmen der Versuche dieser Arbeit konnte jedoch nicht untersucht werden, ob und in welchem Maße die Spaltung des Konjugats tatsächlich im Schistosomendarm stattgefunden hat. Da jedoch weder niedermolekulares AMPT noch MTX einen schistosomiziden Effekt aufwiesen, ist eine Wirkung der Konjugate, selbst bei vollständiger Abspaltung der gekoppelten Wirkstoffe im Darmsystem der Parasiten, unwahrscheinlich.

5.1.2 Diclofenac und Diclo-HSA

Diclofenac zeigte *in vitro* nur in den höchsten Konzentrationen von 32 µg/ml und 64 µg/ml einen starken schistosomiziden Effekt auf Prä-Adulte und adulte Schistosomen. Obwohl der schistosomizide Effekt von Diclofenac bereits in Tiermodellen nachgewiesen wurde, ist der genaue Wirkmechanismus auf die Parasiten bislang unbekannt. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, waren insbesondere die stark verlangsamten Bewegungen der geschädigten Stadien auffällig. Da weiterhin weder bei geschädigten noch

bei toten Stadien Anzeichen von Vakuolenbildung oder Körperdeformation beobachtet wurden, deutet dies auf die Hemmung der Wurmmuskulatur der Würmer hin.

Diclofenac inhibierte *in vitro* die Kontraktionen der humanen glatten Muskulatur des Ureters sowie die Vanadat-induzierten Kontraktionen der Längsmuskulatur der Pfortader und der Uterusmuskulatur von Ratten (Perez Vallina *et al.* 1995, Sivrikaya *et al.* 2003, Shimamura *et al.* 2005, Davenport *et al.* 2006). Dabei ist Diclofenac in der Lage die Calmodulinaktivität konzentrationsabhängig zu inhibieren (Cantabrana *et al.* 1995, Perez Vallina *et al.* 1995, Perez Vallina *et al.* 1998). Calmodulin ist ein Protein, welches durch die Bindung von Ca^{2+} aktiviert wird und so die MLCK (myosin light chain kinase) aktiviert, welche wiederum zur Kontraktion der glatten Muskulatur führt (Walsh 1994). Basierend auf den publizierten Daten scheint die Immobilität der mit Diclofenac inkubierten Stadien auf eine Muskelinhibition zurückzuführen sein, da die Muskulatur des schistosomalen Teguments nur aus glatter Muskulatur besteht (Silk & Spence 1968) und Calmodulin auch in *S. mansoni* nachgewiesen wurde (Thompson *et al.* 1986, Siddiqui *et al.* 1991).

Trotz des schistosomiziden Effekts von Diclofenac auf Prä-Adulte, konnte während der Inkubation mit **Diclo-HSA** in äquivalenten Konzentrationen keine Schädigung der Stadien beobachtet werden. Das kovalent an HSA gebundene Diclofenac wurde vermutlich im Schistosomendarm unzureichend bzw. gar nicht abgespalten. Somit konnte der Wirkstoff nicht auf die im Parasitendarm lokalisierte Muskulatur wirken.

5.1.3 Dexamethason, DHAc-HSA und DHAc-AmPEG

Dexamethason wirkte *in vitro* nur auf Prä-Adulte. Die schwache Schädigung, charakterisiert durch die Bildung kleiner Vakuolen im Körper der Prä-Adulten, trat erst nach siebentägiger Inkubation mit den beiden höchsten Konzentrationen 64 $\mu\text{g/ml}$ und 32 $\mu\text{g/ml}$, auf. Adulte Würmer wiesen keine Schädigung auf.

Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen einer tierexperimentellen Studie, in welcher weder die intramuskuläre Applikation von 1 mg/kg Dexamethason (3x wöchentlich) ab Tag 0 *p.i.* noch ab Tag 35 *p.i.* nach 120 Tagen zur Reduktion der Wurmlast führte (Pyrrho Ados *et al.* 2002). Weiterhin konnte auch nach der Applikation von 50 mg/kg Dexamethason 1h vor Infektion mit *in vivo* transformierten Schistosomula bzw. ab Tag 2 bis Tag 8 *p.i.* keine Reduktion der Wurmlast beobachtet werden (Hermeto *et al.* 1993). Wurden 50 mg/kg Dexamethason allerdings 1 h vor der Infektion mit Zerkarien und an den darauffolgenden acht Tagen appliziert, wurde eine Reduktion der Prä-Adulten um durchschnittlich 47%

beobachtet (Hermeto *et al.* 1990). Dexamethason scheint somit in der Lage zu sein, die Zerkarien-Schistosomulum-Transformation zu inhibieren und hat keinen schädigenden Effekt auf alle weiteren Lebensstadien. Diese These wurde in einer weiteren Studie untermauert, in welcher die Gabe von 50 mg/kg Dexamethason in einer Erhöhung der intakten, nicht im Transformationsprozess befindlichen Zerkarien resultiert (de Melo *et al.* 1994).

Im Vergleich zum ungekoppelten Dexamethason zeigten die Konjugate **DHAc-HSA** und **DHAc-AmPEG** einen deutlich stärkeren schistosomiziden Effekt auf Prä-Adulte. Das HSA-Konjugat wirkte in einem Konzentrationsspektrum von 8-64 µg/ml, wobei es alle Prä-Adulten stark schädigte. Im Vergleich dazu wies das PEG-Konjugat, mit einem Wirkungsspektrum von 4-64 µg/ml, sogar einen stärkeren schistosomiziden Effekt auf Prä-Adulte auf. Wie auch das ungekoppelte Dexamethason, führte die Inkubation mit beiden DHAc-Konjugaten nicht zu einer Schädigung der adulten Würmer.

Mit beiden DHAc-Konjugaten trat eine massive Vakuolisierung und starke Körperdeformationen der geschädigten Prä-Adulten auf. In der Literatur gibt es keinen Hinweis darauf, dass Dexamethason zu einem Anschwellen von sauren Kompartimenten führt, in denen der Abbau der Konjugate vermutlich stattfindet. So scheint Dexamethason die Morphologie saurer Kompartimente nicht zu beeinflussen (Matthews & Neale 1990) und wird darüberhinaus sogar als Stabilisator von Lysosomen eingestuft (Hinz & Hirschelmann 2000).

Sowohl Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC)-markiertes HSA als auch TRITC-PEG wurden in Tumorzelllinien und in primären synovialen Fibroblasten (RASf) in die Lysosomen aufgenommen. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Spaltung der DHAc-Konjugate primär pH-abhängig ist. Bei nachfolgenden Spaltungsexperimenten mit DHAc-HSA und DHAc-PEG im sauren pH wurden 2 Spaltprodukte von DHAc nachgewiesen. Produkt 1 ist ein DHAc-Derivat mit Aminogruppe und Produkt 2 ist ein Hydrazinderivat. Somit entsteht durch die Spaltung der DHAc-Konjugate kein Dexamethason und die Wirksamkeit der DHAc-Konjugate wird wahrscheinlich durch die Spaltprodukte 1 und 2 vermittelt (Funk *et al.* 2010, Funk 2010).

Das Vorhandensein der Spaltprodukte 1 und 2 könnte somit auch die Diskrepanz in der Wirksamkeit von ungekoppeltem Dexamethason und den DHAc-Konjugaten erklären. Leider konnte die Wirksamkeit von ungebundenem DHAc auf Prä-Adulte und Adulte im Rahmen der

vorliegenden Arbeit nicht getestet werden, da die Substanz nicht in ausreichenden Mengen synthetisiert werden konnte.

5.1.4 9-Aminoacridin und 9-ITCAC-HSA

9-Aminoacridin zeigte sowohl auf Prä-Adulte, als auch auf adulte Würmer in nahezu allen getesteten Konzentrationen einen massiven schistosomiziden Effekt. So waren in den Konzentrationen 4-64 µg/ml alle Prä-Adulten und Adulten bereits nach 12 h geschädigt. Allerdings wirkten die niedrigen Konzentrationen 0.5 µg/ml und 1 µg/ml nur noch auf Prä-Adulte.

9-Aminoacridin ist eine schwache Base, die aufgrund des Konzentrationsgefälles in den sauren Kompartimenten, wie z. B. Lysosomen, anreichert und zum massiven Anschwellen dieser führen kann (Klemper & Styr 1983, Mangeat *et al.* 1990). Durch die Inkubation mit LysoTracker Red konnten in 24 h alten Schistosomula saure Zellkompartimente detektiert werden, welche über den gesamten Parasitenkörper verteilt waren und die Lysosomen-artige Organellen darstellen (Carneiro-Santos *et al.* 2001). Da sich Schistosomula und Prä-Adulte strukturell stark ähneln, besitzen vermutlich auch Prä-Adulte solche sauren Kompartimente. Die Inkubation mit 9-AAC resultierte in der starken Vakuolisierung des gesamten Parasitenkörpers bei Prä-Adulten. Somit scheint es wahrscheinlich, dass 9-AAC durch ein Konzentrationsgefälle in die sauren Kompartimente eindringt und diese durch die Alkalisierung stark anschwellen.

Weiterhin führte die Inkubation mit hohen Dosen von 9-ACC zu einer massiven Muskelverkürzung und starken Muskelspasmen direkt nach Applikation der Substanz. Somit scheint 9-ACC einen direkten Effekt auf die Muskulatur zu haben. Ein möglicher Wirkmechanismus von 9-AAC könnte die Inhibition der Acetylcholinesterase (AChE) sein. Die Acetylcholinesterase ist ein Enzym, welches auch in Schistosomen vorkommt und den Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh) aus dem synaptischen Spalt gewährleistet (Bently *et al.* 2005). Durch ein im Neuron ankommendes Aktionspotential werden Ca^{2+} -Kanäle geöffnet. Durch die erhöhte Konzentration von Ca^{2+} -Ionen wird schließlich ACh in den synaptischen Spalt freigesetzt. Durch die Bindung von ACh an spezielle ACh-Rezeptoren des Muskels werden Natriumkanäle geöffnet, die wiederum zur Depolarisation und zur Muskelkontraktion führen. Der Anteil des ACh, der nicht an einen Rezeptor gebunden wurde, wird umgehend von der AChE abgebaut, um somit den Ruhezustand des Muskels wieder herzustellen (Martyn *et al.* 2009). Durch die Inhibition der AChE kann überschüssiges ACh nicht abgebaut werden und führt zur anhaltenden Muskelkontraktion

(Cladwell 2009). So führte die Applikation von 9-AAC auf isoliertem Meerschweinchen-Ileum, welches mit ACh vorinkubiert wurde, zu einer moderaten Erhöhung der Muskelkontraktion (Jensen-Holm *et al.* 1961). Allerdings ist die Hemmung der AChE bei 9-Amino-1.2.3.4-tetrahydro Acridine, welches unter dem Wirkstoffnamen Tacrin bekannt ist, besser untersucht. Da Tacrin, eine reduzierte Form des 9-AAC ist und sich von diesem nur durch vier zusätzliche H-Atome unterscheidet, kann auf einem analogen Wirkmechanismus geschlossen werden. So konnten nach Tacrin-Applikation eine um bis zu 160% erhöhte Frequenz der Muskelzuckungen in der Beinmuskulatur der Ratte nach elektrischer Stimulation beobachtet werden (Ibejunjo *et al.* 1997). Weiterhin erhöhte die Inkubation mit 9-AAC auch die Muskelkontraktionsfrequenz des isolierten Rattenzwerchfells, welches ebenfalls indirekt über die Nervenbahnen stimuliert wurde (Bosch *et al.* 1993). Somit lassen sich sowohl Tacrin als auch 9-AAC in die Klasse der AChE-Inhibitoren einordnen, wobei Tacrine der potentere Inhibitor ist (Jensen-Holm *et al.* 1961).

Neben der Inhibition der AChE ist 9-AAC weiterhin in der Lage die Kalium (K^+)- Kanäle der Axone zu inhibieren. Nach der Depolarisierung des Axons durch den Einstrom von Na^{2+} -Ionen, erfolgt die Repolarisierung durch den Ausstrom von Kalium-Ionen über K^+ - Kanäle. Somit ist es dem Neuron möglich, wieder in den Ruhezustand zurückkehren. So konnte nachgewiesen werden, dass die Applikation von 9-AAC ins Innere eines Tintenfisch-Axons bzw. die Inkubation des *Musculus sartorius* (Schneidermuskel, Oberschenkelmuskulatur) mit 9-AAC zu einer Reduktion des K^+ - Ionen-Ausstroms aus den K^+ - Kanälen führte (Volle 1970, Yeh 1979). Die Inhibition der K^+ - Kanäle und der verzögerte Ausstrom der K^+ - Ionen resultiert in einer Verlängerung des Aktionspotentials (AP). Aufgrund des verlängerten AP kommt es zu einer erhöhten Ausschüttung von Ca^{2+} - Ionen, die wiederum eine erhöhte Ausschüttung von ACh und eine verlängerte Muskelkontraktion der adulten Würmer zur Folge haben.

Im Vergleich zur ungekoppelten Substanz wirkte **9-ITCAC-HSA** deutlich schlechter. Generell konnte hier nur in den Konzentrationen 64, 32 und 16 $\mu\text{g/ml}$ ein konzentrationsabhängiger schistosomizider Effekt auf Prä-Adulte beobachtet werden. Das 9-ITCAC-HSA enthält, bedingt durch den Konjugationsprozess, einen Anteil von $<0.25\%$ an freiem 9-AAC. Die höchste eingesetzte Konzentration des HSA-Konjugats von 64 $\mu\text{g/ml}$ enthielt somit 0.16 $\mu\text{g/ml}$ 9-AAC. Mit 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 9-AAC und damit der niedrigsten getesteten Konzentration, wurde das Einsetzen der Schädigung nach 48 h beobachtet. Die Wirkung des HSA-Konjugats bei einer Konzentration von 64 $\mu\text{g/ml}$ setzte allerdings bereits nach 36 h ein. Demzufolge wird der schistosomizide Effekt auf Prä-Adulte durch das HSA-Konjugat und

nicht durch das im Konjugat vorhandene freie 9-AAC. Im Gegensatz zu den Prä-Adulten zeigte 9-ITCAC-HSA keinen schädigenden Effekt auf adulte Würmer.

Die Schädigung der Prä-Adulten durch die Inkubation mit 9-ITCAC-HSA wurde, wie auch bei mit 9-ACC inkubierten Stadien, durch die Vakuolisierung des Parasitenkörpers und einer Deformation des Teguments charakterisiert. Da das Konjugat im Parasitendarm gespalten wird, könnte freies 9-AAC in seiner Funktion als schwache Base in die sauren Kompartimente des Darmes aufgenommen werden. Ein dadurch bedingtes Anschwellen dieser Vesikel würde als Vakuolenbildung sichtbar. Die Vakuolenbildung bei mit 9-ITC-HSA inkubierten Prä-Adulten war deutlich schwächer ausgebildet, als bei den, mit der äquivalenten Menge der ungekoppelten Substanz, inkubierten Stadien. Dies indiziert, dass im Schistosomendarm geringere Mengen des eigentlichen Wirkstoffes vorliegen, was zu einem milderem Verlauf der morphologischen Veränderungen führt.

5.1.5 8-Hydroxy-2-Quinolincarbonsäure und HQCA-HSA

Die Applikation von **8-Hydroxy-2-Quinolincarbonsäure** zeigte sowohl bei Prä-Adulten als auch bei Adulten nur in der höchsten getesteten Konzentration von 64 µg/ml einen schädigenden Effekt. Die Schädigung aller Stadien konnte jedoch erst nach 168 h beobachtet werden.

Im Vergleich zum ungekoppelten HQCA zeigte das dazugehörige Albuminkonjugat **HQCA-HSA** einen deutlich stärkeren schistosomiziden Effekt auf Prä-Adulte und Adulte. Bereits nach einer 24-stündigen Inkubationsperiode waren alle Prä-Adulten in den Konzentrationen 64 µg/ml und 32 µg/ml geschädigt. Bei Adulten wurde die Schädigung aller Würmer sogar bereits 12 h nach Applikation von 64 µg/ml HQCA-HSA beobachtet. Der Anteil von ungekoppeltem HQCA belief sich selbst bei der höchsten eingesetzten HQCA-HSA-Konzentration von 64 µg/ml nur auf 2.1 µg/ml. Bei der äquivalenten Konzentration in den Experimenten mit HQCA konnte keine Schädigung der untersuchten Stadien beobachtet werden, demzufolge ist der schistosomizide Effekt eindeutig auf das HSA-Konjugat zurückzuführen.

Die Inkubation mit HQCA-HSA führte in Prä-Adulten ebenso wie der ungekoppelte Wirkstoff zu einer Vakuolisierung des Parasitenkörpers. Bei Adulten verursachte das HQCA-HSA eine starke Verkürzung der Muskulatur, vermutlich in Folge einer starken Kontraktion. Über eine anthelminthische bzw. antiparasitäre Wirkung von HQCA sind in der aktuellen Literatur keine Daten zu finden.

Das Chinolinderivat und chemische Grundgerüst der HQCA, 8-Hydroxyquinonoline (8-HQ), ist hingegen schon länger als fungizide und antibakterielle Substanz bekannt (Narayana *et al.* 2008, Musiol *et al.* 2010). In neueren Studien wurde auch sein Potential bei der Behandlung von Tumorerkrankungen und Alzheimer diskutiert (Hider *et al.* 2008, Bush & Tanzi 2008, Ding & Lind 2009). 8-HQ fungiert als Chelator von bivalenten Ionen wie Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} und Fe^{2+} . Dabei verhält sich die Hydroxylgruppe (-OH) wie eine Säure und dissoziiert im sauren pH zu O^- , an welches anschließend die bivalenten Kationen binden können. In sauren pH-Verhältnissen von 5.5 dissoziieren demzufolge besonders viele OH-Gruppen und viele Ionen können gebunden werden (Fraser & Creanor 1975). Durch die Bildung solcher Chelatkomplexe ist die Wirksamkeit von 8-HQ auf *Entamoeba histolytica* zu erklären, wobei 8-HQ und Fe^{2+} -Ionen Komplexe bilden. Da Fe^{2+} -Ionen essentiell für das Wachstum der Amöben sind, führt die längere Applikation von 8-HQ zum Absterben der Protozoen (Latour & Reeves 1965, Lopez-Revilla & Cano Mancera 1982). Auch für die Entwicklung und Reproduktion von Schistosomen spielt Eisen vermutlich eine wichtige Rolle. So wurde die Entwicklung von Schistosomula *in vitro* durch Ferritin-gebundenes und nicht-Ferritin-gebundenes Eisen stimuliert. Dieser Effekt konnte jedoch durch den Eisenchelator Desferroxamin inhibiert werden (Glanfield *et al.* 2007). Da 8-HQ ebenfalls Chelatkomplexe mit Fe^{2+} -Ionen bilden kann, ist ein möglicher Effekt dieser Substanz auf die Entwicklung der Prä-Adulten nicht auszuschließen. Der Wirkmechanismus von Chinolinderivaten wie Chloroquine und Quinidine auf die Malariaparasiten *Plasmodium sp.* basiert auf der Hemmung der Polymerisation von Hämozoin. Diese metabolisch inaktive Form des toxischen Häms entsteht beim Abbau von Hämoglobin. Da 8-HQ jedoch nur schwach an Häm bindet und somit die Hämozoinbildung nicht inhibiert, kann dieser Wirkmechanismus bei Schistosomen ausgeschlossen werden (Sullivan *et al.* 1998). Zur Klärung des genauen Wirkmechanismus von 8-HQ auf Schistosomen sollten sich jedoch weitere Untersuchungen anschließen, da keine Daten bezüglich des schistosomiziden Effekts dieser Substanz zur Verfügung stehen.

5.2 Schistosomizider Effekt der Malariatherapeutika Mefloquin und Primaquin *in vitro*

Malaria und Bilharziose sind zwei der häufigsten Tropenerkrankungen weltweit und in nahezu den gleichen Regionen endemisch. Aus diesem Grund sollten die beiden gängigen Malariatherapeutika Mefloquin und Primaquin hinsichtlich eines möglichen schistosomiziden Effekts auf verschiedene Lebensstadien von *S. mansoni* getestet werden.

In den durchgeführten Experimenten konnte ein klarer schistosomizider Effekt von Mefloquin auf Zerkarien, Schistosomula und Prä-Adulte beobachtet werden. Die Schädigung der Stadien erfolgte auch bei der kleinsten eingesetzten Dosis von 0.5 µg/ml. Im Gegensatz zu den juvenilen Stadien wurde die Vitalität der adulten Stadien erst in der höchsten getesteten Dosis von 2 µg/ml beeinträchtigt. Mefloquin scheint deshalb *in vitro* einen größeren Effekt auf die juvenilen Stadien zu haben. In kürzlich publizierten *in vitro* Studien, welche mit Schistosomula und Adulten von *S. mansoni* durchgeführt wurden, konnte ebenfalls ein höheres schistosomizides Potential von Mefloquin auf die juvenilen Stadien beobachtet werden (Manneck *et al.* 2010). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit beschrieben die Autoren jedoch eine generell bessere Wirksamkeit von Mefloquin auf die untersuchten Stadien in einer Konzentration von 1 µg/ml. Dieser Unterschied in der Empfindlichkeit gegenüber Mefloquin könnte dadurch erklärt werden, dass die Versuche dieser Arbeit mit einem ostafrikanischen Stamm aus Mozambique durchgeführt wurden, während Manneck *et al.* einen westafrikanischen Stamm aus Liberia benutzten. Im Gegensatz zu *S. mansoni* hatte die Inkubation mit 1 µg/ml Mefloquin keinen Einfluss auf die Vitalität von Schistosomula, Prä-Adulten und Adulten von *S. japonicum* (Xiao *et al.* 2009).

Während einer Malariatherapie mit Mefloquin werden innerhalb von 24 h durchschnittliche Plasmaspiegel von 1-2 µg/ml erreicht. Diese sinken mit einer Halbwertszeit von durchschnittlich 17-23 Tagen relativ langsam ab (Karbwan & White 1990, Roche 2009). Während einer Mefloquinprophylaxe werden durchschnittliche Plasmaspiegel von 1 µg/ml erreicht (Kollaritsch *et al.* 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmaspiegel wurden gewählt, um die Serumspiegel zu reflektieren, die tatsächlich während einer Therapie bzw. Prophylaxe erreicht werden.

Ein schistosomizider Effekt von Primaquin war in allen getesteten Konzentrationen auf Zerkarien, Schistosomula und Adulte zu beobachten. Lediglich auf Prä-Adulte wirkte Primaquin nur in der höchsten Konzentration von 2 µg/ml. Während einer Therapie mit Primaquin werden täglich 30mg/kg Primaquin über einen Zeitraum von 14 Tagen appliziert.

Die orale Einmalgabe von 15 mg bzw. 30 mg Primaquin resultiert in durchschnittlichen Plasmaspiegeln von 0.1 µg/ml bzw. 0.15 µg/ml (Singhasivanon *et al.* 1991, Elmes *et al.* 2006). Im Gegensatz zu Mefloquin werden die durchschnittlichen Plasma Level von Primaquin innerhalb von 3 h erreicht und mit einer Halbwertszeit von durchschnittlich 6-8 h abgebaut.

Im Vergleich zu 1 µg/ml Praziquantel vermittelten sowohl Mefloquin als auch Primaquin in einer Konzentration von 2 µg/ml ein höheres schistosomizides Potential auf Schistosomula, da in den Gruppen der Malariatherapeutika signifikant mehr tote Schistosomula zu beobachten waren. Es konnte kein Unterschied in der Wirksamkeit von 1 µg/ml Mefloquin und 1 µg/ml Praziquantel auf Schistosomula beobachtet werden. Auf Zerkarien, Prä-Adulte und Adulte konnten jedoch weder Mefloquin noch Primaquin ein höheres anthelminthisches Potential im Vergleich zu Praziquantel entfalten.

Der Goldstandard in der Behandlung der Schistosomiasis ist Praziquantel, welches zur Schädigung des Teguments, zum Angriff von eosinophilen Granulozyten und zu Muskelspasmen führt (Harder *et al.* 1987, Redman *et al.* 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurde Praziquantel in einer Konzentration von 1 µg/ml verwendet, welches dem durchschnittlichen Plasmaspiegel nach einer Einmalgabe von 40 mg/kg entspricht. Praziquantel wird mit einer Halbwertszeit von durchschnittlich 1-3 h abgebaut (Cioli & Pica-Mattocchia 2003).

In Tiermodellen eradizierte Praziquantel 80-100% der Schistosomula und adulten Würmer, wenn es direkt nach Zerkarieninfektion bzw. 42 Tage *p.i.* applizierte wurde, während der anthelminthische Effekt auf Prä-Adulte signifikant niedriger war. Allerdings hing die Wirksamkeit innerhalb der einzelnen Studien stark von den gewählten Applikationsschemata (Silva *et al.* 2003, Utzinger *et al.* 2003, Keiser *et al.* 2009) und den somit im Organismus erreichten Serumspiegeln ab (Manneck *et al.* 2010). In den Versuchen dieser Arbeit führte die Inkubation mit Praziquantel jedoch zum Tod aller Prä-Adulten nach 12 h. Da *in vitro* keine metabolischen Prozesse ablaufen, wird dieser Effekt vermutlich primär durch die konstant hohen Medikamentenkonzentrationen im Kulturmedium verursacht. Die Diskrepanz zwischen dem anthelminthischen Effekt und dem Einsetzen der Wirksamkeit der Medikamente *in vitro* und *in vivo*, hängt vermutlich in hohem Maße mit den niedrigeren Serumspiegeln im lebenden Organismus zusammen (Manneck *et al.* 2010).

Durch Mefloquin und Primaquin geschädigte Zerkarien zeichneten sich durch die Bewegungsunfähigkeit der Gabelschwänze aus, wobei die Köpfe weiterhin zuckende

Bewegungen und keine strukturellen Schäden aufwiesen. Bereits in früheren Studien an Hasen- und Hühnermuskulatur konnte beobachtet werden, dass Mefloquin die Muskelkontraktion durch die Verminderung der Ca^{2+} -Aufnahme und der Inhibition der Ca^{2+} -ATPase blockiert (Lee & Go 1991, Go *et al.* 1995). Weiterhin führte Mefloquin zur Lähmung und letztlich zum Tod von Larven und Adulten der Filarienart *Brugia patei* und *B. malayi in vitro* (Walter *et al.* 1987). Primaquin inhibierte die glatte Muskulatur des Ileums von Meerschweinchen und reduzierte die Beweglichkeit von Adulten von *B. pahangi* (Fontaine *et al.* 1985, VandeWaa *et al.* 1989). Aufgrund dieser bereits publizierten Daten und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit scheinen sowohl Mefloquin als auch Primaquin die Myozyten der zirkulären und längsgestreiften Muskulatur des Gabelschwanzes zu inhibieren (Graefe *et al.* 1967, Dosey *et al.* 2002). Durch Mefloquin und Primaquin geschädigte Würmer waren nicht mehr am Boden der 6-Well-Platten festgeheftet, was für eine Hemmung der Muskulatur des Mund- und Bauchsaugnapfes spricht.

Im Zuge einer Malariatherapie wird Mefloquin in den sauren Nahrungsvakuolen der Plasmodien angereichert und inhibiert dort die Aufnahme von Hemozoin (Jacobs *et al.* 1987, Famin and Ginsburg 2002). Saure Vesikel wurden ebenfalls im Körper von frisch transformierten Schistosomula gefunden (Carneiro-Santos *et al.* 2001). Durch Mefloquin geschädigte Zerkarien, Schistosomula und Prä-Adulte wiesen eine massive Vakuolenbildung des gesamten Körpers auf. Mefloquin könnte durch eine Anreicherung das Anschwellen der sauren Vesikel verursachen, welches letztlich zum Tode führt. Die Applikation von Primaquin zur Schädigung der Mitochondrien der Malariaparasiten (Beaudoin & Aikawa 1968, Boulard *et al.* 1983, Lanners 1991). Allerdings führte die Inkubation mit Primaquin zu einer massiven Körperdeformation bei geschädigten und toten Zerkarien, Schistosomula und Prä-Adulten, was hingegen eher für eine Beeinflussung des Teguments spricht.

5.3 Schistosomizider Effekt von AMPT, AMPT-HSA und Praziquantel *in vivo*

Um zu überprüfen, ob ein mögliches schnelleres *in vivo*-Wachstum von Schistosomula, Prä-Adulten und Adulten einen schistosomiziden Effekt von AMPT und AMPT-HSA zur Folge hat, wurde das anthelminthische Potential beider Substanzen nochmals in einer tierexperimentellen Studie untersucht.

Allerdings hatten auch in den *in vivo* Experimenten weder 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AMPT noch 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AMPT-HSA eine signifikante Reduktion der Wurmlast im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zur Folge, die auf einen schistosomiziden Effekt schließen lassen würden.

Unter Einbezug der *in vitro*-Daten scheinen Folsäureantagonisten wie Aminopterin demzufolge keine anthelminthischen Wirkung auf sich entwickelnde bzw. bereits ausgewachsene Schistosomen zu besitzen. Wie bereits in Kapitel 4.1.1 beschrieben, scheinen Schistosomula, Prä-Adulte und adulte Würmer in der Lage zu sein, die zur Pyrimidin- und Purinsynthese benötigten Vorstufen aus dem Blut des Wirtes über den „salvage-pathway“ aufzunehmen und zu verwerten. Somit sind die untersuchten Schistosomenstadien nicht auf *de novo* Synthese und die Funktionsfähigkeit der DHFR angewiesen.

Um einen möglichen schistosomiziden Effekt der untersuchten Zytostatika im Vergleich zum Goldstandard einer Bilharziose-Therapie einordnen zu können, wurde in separaten Versuchsgruppen die Wirkung von Praziquantel auf Schistosomula, Prä-Adulte und Adulte getestet. Die in der Praziquantelgruppe erzielte hohe Reduktion der Wurmlasten von rund 59% in den Gruppen der Prä-Adulten und Adulten entsprechen bisher publizierten Ergebnissen (Utzinger *et al.* 2003, Keiser *et al.* 2009). In der Gruppe der Schistosomula wurde hingegen keine Reduktion der Wurmlast beobachtet. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen. Zwar gibt es bisher keine Daten über die Wirksamkeit von Praziquantel, wenn dieses 24 h nach Zerkarieninfektion appliziert wurde. Allerdings führte die Applikation von 40 mg/kg bzw. 250 mg/kg Praziquantel an Tag 0 *p.i.* zur hohen Reduktion der Wurmlasten von rund 80-90% (Utzinger *et al.* 2003, Keiser *et al.* 2009). Die Höhe der Reduktion der Wurmlasts scheint dabei jedoch stark abhängig von der Dosierung und dem Applikationsschema zu sein. Bei höheren Dosierungen und mehrtägigen Applikationen sind höhere Serumspiegel und somit auch eine höhere Reduktion der Wurmlasten zu beobachten. Auch ob der verwendete *S. mansoni* Stamm west- oder ostafrikanischen Ursprungs ist, könnte eine Rolle bei der Wirksamkeit der eingesetzten Praziquantelkonzentration spielen.

Trotz der höheren Wurmlastreduktionsraten von Praziquantel in den Gruppen der Prä-Adulten und Adulten waren diese im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe nicht signifikant. Dies scheint jedoch auf die stark schwankenden Einzelwurmlasten innerhalb einer Versuchsgruppe zurückzuführen zu sein, wie die hohen Standardabweichungen deutlich machen.

5.4 Schistosomizider Effekt von verschiedenen Primaquindosierungen *in vivo*

Aufgrund der vielversprechenden *in vitro*-Daten hinsichtlich des klaren schistosomiziden Effekts von verschiedenen Primaquin-Dosierungen auf Schistosomula, Prä-Adulte und

Adulte von *S. mansoni*, wurde das schistosomizide Potential dieses Malariatherapeutikums auch im Rahmen einer tierexperimentellen Studie untersucht.

5.4.1 Reduktion der Wurmlast durch verschiedene Primaquindosierungen

In der durchgeführten *in vitro*-Studie konnten die Ergebnisse der *in vitro*-Experimente nicht bestätigt werden. Weder 2 µg/kg, 8 µg/kg noch 32 µg/kg Primaquin führten zu einer signifikanten Verringerung der Wurmlast bei Schistosomula und Adulten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Dies ist vermutlich auf schnell absinkende Serumspiegel von Primaquin im lebenden Organismus zurückzuführen. Das niedermolekulare Primaquin wird im menschlichen Organismus rasch mit einer durchschnittlichen Halbwertszeit von 6-8 h abgebaut. In den *in vitro* Experimenten dauerte es selbst in der höchsten Konzentration von 2 µg/ml durchschnittlich 4 bis 5 Tage bis etwa 50% der untersuchten Schistosomula und Adulten geschädigt waren. Es waren weder in der aktuellen Literatur noch durch Nachfrage beim Primaquin-Hersteller/ Vertreiber Sanofi-Aventis Daten bezüglich der Serumspiegel und den dazu benötigten Primaquindosierungen bei Nagetieren zu finden. Demzufolge könnte selbst die höchste getestete Konzentration von 32 µg/ml Primaquin zu Serumspiegeln führen, die unterhalb des therapeutischen Bereichs liegen. Weiterhin könnte der erreichte Serumspiegel nur zu einer schwachen Schädigung geführt haben, die nicht im Absterben der Parasiten resultierte.

Im Vergleich zu den Schistosomula und Adulten führte die Applikation von 8 µg/kg und 32 µg/kg Primaquin zu einer signifikanten Reduktion der Wurmlast bei Prä-Adulten im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe. Erstaunlicherweise wirkte Primaquin gerade in den *in vitro*-Experimenten auf dieses Stadium am schlechtesten, da die Schädigung der Prä-Adulten nur bei der höchsten Konzentration von 2 µg/ml auftrat. Um die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der *in vitro*-Studie und der tierexperimentellen Studie zu klären, sind jedoch weitere Studien notwendig.

5.4.2 FACS-Analysen 24 h nach der letzten Primaquinapplikation

Den Versuchstieren aller Versuchsgruppen wurde 24 Stunden nach der letzten Primaquinapplikation Blut abgenommen, um eine mögliche Immunreaktion zu untersuchen. Es wurde vermutet, dass im Fall einer Abtötung der Parasiten durch Primaquin und der daraus resultierenden Präsentation von größeren Mengen an Wurmantigenen, eine Aktivierung des Immunsystems zu beobachten sein würde. Es zeigte sich allerdings, dass im Vergleich zur nicht infizierten Primaquin_{32 mg/kg} Kontrollgruppe weder in den drei Primaquin-Gruppen noch in der infizierten, unbehandelten Kontrolle signifikante Unterschiede in den

untersuchten CD3⁺/CD4⁺ und CD19⁺-Populationen beobachtet werden konnten. Weiterhin war auffällig, dass bei allen drei Lebensstadien keine signifikanten Unterschiede zwischen der infizierten, unbehandelten und der nicht-infizierten Primaquin_{32 mg/kg} Gruppe auftraten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass 8- und 12-Tage alte juvenile Schistosomen nicht vom Immunsystem erkannt werden. Adulte Würmer beginnen zum Zeitpunkt der Untersuchung, Tag 38 *p.i.*, vermutlich gerade mit der Eiablage, so dass noch keine bzw. kaum Eier vorhanden sind, die letztlich Aktivierung des Immunsystems und der Entzündungsreaktion führen.

5.4.3 FACS-Analysen 50 Tage nach Zerkarieninfektion

Um eine mögliche Reduktion der Wurmlast und somit eine veränderte Immunreaktion in den Primaquin-Gruppen zu untersuchen, wurde den Versuchstieren 50 Tage nach Zerkarienapplikation erneut Blut und die mesenterialen Lymphknoten entnommen.

Auch an Tag 50 *p.i.* waren im peripheren Blut und den mesenterialen Lymphknoten innerhalb der drei Primaquin-Gruppen keine signifikanten Unterschiede in den CD3⁺/CD4⁺ und CD19⁺-Populationen im Vergleich zur nicht-infizierten Primaquin_{32 mg/kg}-Gruppe zu beobachten, die auf eine reduzierte Wurmlast und somit eine Verminderung der Entzündungsreaktion schließen lassen würden. Im Vergleich zu der Lymphozytenverteilung im peripheren Blut 24 h nach der letzten Primaquinapplikation konnte an Tag 50 *p.i.* eine signifikante Erniedrigung der prozentualen Anteile der CD3⁺/CD4⁺ und CD19⁺-Populationen im Blut der infizierten Versuchsgruppen beobachtet werden. Infolge der Wurminfektion wandern die Leukozyten vermutlich aus dem peripheren Blut in die umliegenden lymphatischen Gewebe des Darms, der Milz und der Lymphknoten aus. Generell waren die CD3⁺/CD4⁺ und CD19⁺-Populationen der infizierten Versuchsgruppen im Vergleich zur nicht-infizierten Primaquin_{32 mg/kg}-Gruppe nahezu immer erniedrigt. Dies ist vermutlich ebenfalls auf die Aktivierung des Immunsystems und die damit verbundene Verteilung der Leukozyten aus dem Blut auf die umliegenden lymphatischen Gewebe zurückzuführen, welche in einem gesunden Tier nicht stattfindet.

Besonderes Augenmerk wurde im Rahmen der Untersuchungen auf die CD11b⁺/Gr-1⁺ - Zellen gelegt. Diese Zellen gehören zu einer spezifischen myeloiden immunregulatorischen Zellpopulation und werden als natürliche Suppressorzellen bezeichnet (Voisin *et al.* 2004, Terrazas *et al.* 2001). Ihre immunsuppressive Wirkung beruht wahrscheinlich auf der Inhibition der T-Zell-Antwort (Terrazas *et al.* 2001). Bei Befall mit Parasiten wie z. B. *Trypanosoma cruzi* modulieren CD11b⁺/Gr-1⁺ - Zellen vermutlich das Immunsystem, um die Ausbreitung des Parasiten im Körper zu gewährleisten bzw. eine überschießende

Immunreaktion zu unterdrücken (Goni *et al.* 2002). Auch bei der Injektion von Oligosacchariden von *S. mansoni* in das Peritoneum von Versuchstieren, war ein Anstieg der CD11b⁺/Gr-1⁺ - Zellen zu beobachten (Voisin *et al.* 2004). In den Versuchen, die im Rahmen der Promotionsarbeit durchgeführt wurden, könnte demzufolge in den Primaquingruppen eine, im Vergleich zur infizierten, unbehandelten Gruppe, erniedrigte CD11b⁺/Gr-1⁺ - Population für eine Reduktion der Wurmlast sprechen.

Obwohl 24 h nach der letzten Primaquin-Applikation die prozentualen Anteile der CD11b⁺/Gr-1⁺ - Population im peripheren Blut in allen Gruppen annähernd gleich waren, konnte jedoch ein tendenzielles Absinken von 2 mg/kg Primaquin zu 32 mg/kg Primaquin beobachtet werden, was auf eine konzentrationsabhängige Wirksamkeit von Primaquin hinweisen könnte. An Tag 50 *p.i.* kam es im peripheren Blut allerdings zu einer starken Erhöhung der CD11b⁺/Gr-1⁺ - Populationen in den Versuchsgruppen aller infizierten Tiere im Vergleich zur nicht-infizierten Primaquin_{32 mg/kg}-Gruppe, obwohl auch hier teilweise ein tendenzielles Absinken von der niedrigsten zu höchsten Primaquin-Konzentration beobachtet werden konnte. In den mesenterialen Lymphknoten waren die Unterschiede zwischen den prozentualen Anteilen in den infizierten Gruppen und der unbehandelten Primaquin_{32 mg/kg}-Gruppe allerdings signifikant unterschiedlich, dass ein deutlicher schistosomizider Effekt der Primaquindosierungen ausgeschlossen werden kann.

Die Daten der FACS-Analysen decken sich demzufolge größtenteils mit den Daten der Wurmlastbestimmung. Allerdings könnte z. B. eine signifikante Erniedrigung der CD11b⁺/Gr-1⁺ - Populationen auch erst bei einer noch höheren Reduktion der Wurmlast sichtbar werden. Um zu überprüfen ob FACS-Analysen unterstützenden Aussagen über einen möglichen schistosomiziden Effekt liefern können, sollten weitere Studien durchgeführt werden.

5.5 Einsatz der CLSM zur Diagnostik der intestinalen Schistosomiasis

Da die konfokale CLSM schon seit längerem zur Früherkennung von krankhaft veränderten Geweben verwendet wird, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, inwieweit diese Mikroskopiemethode zur direkten Visualisierung der Eier von *S. mansoni* im Darmgewebe geeignet ist.

Im Rahmen der Promotionsarbeit konnten erstmals mit Hilfe der CLSM Eier von *S. mansoni* direkt im Darm visualisiert werden. Die CLSM stellt sowohl eine adäquate Methode zur Visualisierung von Schistosomeneiern im präparierten Darm als auch im intakten Darm dar.

Weiterhin können mittels dieser Methode Vitalitätsstatus und Schistosomenspezies beurteilt werden.

Im Falle von negativen Stuhl- bzw. Urinproben werden in der Regel Biopate aus der Darmmukosa entnommen und anschließend auf Wurmeier untersucht. Die Vitalität solcher, im Gewebe feststeckender Eier, kann mittels eines Quetschpräparates bzw. gefärbten Paraffinschnitten untersucht werden. Da die Gewebsbiopsie einen invasiven Eingriff darstellt und die Entnahmestelle räumlich begrenzt ist, sollte im Rahmen dieser Studie getestet werden, inwieweit sich die CLSM als nicht-invasive Methode zum Nachweis von Wurmeiern im Gewebe eignet. Beim Scannen durch das Gewebe konnten vitale und tote Eier deutlich unterschieden werden, da vitale Eier ein dunkel gefärbtes, vollständig entwickeltes und morphologisch unauffälliges Mirazidium enthielten. Weiterhin war es möglich, verschiedene Entwicklungsstadien der Eier und, anhand der Lage des charakteristischen Stachels, die Schistosomenspezies zu bestimmen.

Obwohl die Darmbiopsie in den Versuchen dieser Arbeit die kleinste untersuchte Fläche darstellte, wurden in den mit Lichtmikroskopie untersuchten Quetschpräparaten die meisten Eier gefunden. Dies ist vermutlich auf die limitierte Eindringtiefe der laser-basierten Mikroskopiemethoden zurückzuführen. Mit den im Rahmen dieser Studie benutzten LaserMikroskopie-Systemen konnten nur Eier, die sich in einer Gewebstiefe zwischen 0 und 100 µm befanden, klar abgebildet werden. Die Wurmeier konnten zwar auch bis zu einer Gewebetiefe von 150 µm abgebildet werden, allerdings waren die Bilder dann verschwommen und innere Strukturen bzw. die Position des Stachels konnten nicht mehr zweifelsfrei bestimmt werden. Bei den Quetschpräparaten hingegen konnte die gesamte Dicke des Darmgewebes untersucht werden.

Die Unterscheidung zwischen vitalen und toten Eiern, die auf eine persistierende oder inaktive Infektion hinweisen, ist insbesondere bei der Behandlung der Schistosomiasis essentiell. Der Goldstandard bei der Therapie einer Schistosomiasis ist Praziquantel. Da in den letzten Jahren zunehmend Fälle von Therapieversagern beschrieben wurden (Gryseels *et al.* 2001, Silva *et al.* 2005), ist die Überprüfung des Therapieerfolgs durch ein geeignetes diagnostisches Werkzeug dringend notwendig. Die Mirazidien von *S. mansoni* sind eine Woche nach Eiablage vollständig entwickelt und überleben durchschnittlich zwei bis fünf Wochen in der Eischale. Vitale Eier zeigen somit eine aktive Infektion im Wirt und die Gegenwart von mindestens einem weiblichen Wurm. Werden vitale Eier demzufolge circa

zwei Monate nach einer abgeschlossenen anthelminthischen Therapie gefunden, kann von einem Therapieversagen ausgegangen werden (Cheever *et al.* 1992, Mudawi *et al.* 2006).

Im Vergleich zu den räumlich begrenzten Biopsien, erlaubt der Einsatz der CLSM die Untersuchung einer größeren Fläche des Darmgewebes auf Wurmeier. Weiterhin ist die CLSM nicht invasiv und die Ergebnisse liegen noch während der Untersuchung vor. Die Einbettung von Darmbiopsien in Paraffin bzw. die anschließende Durchführung eines Mirazidienschlupfversuchs werden nur in spezialisierten Laboren durchgeführt und sind zumeist zeitaufwendig. Weiterhin weisen diese Methoden oft nur eine geringe Sensitivität auf. So können besonders in der Entwicklung befindliche Eier nur schwer von abgestorbenen Eiern unterschieden werden (Giboda & Zdárská 1994).

5.6 Abschlussbetrachtung und Ausblick

5.6.1 Entwicklung eines „drug targeting“-Modells

Von den getesteten sieben HSA- bzw. PEG-Konjugaten zeigten die vier Konjugate DHAc-HSA, DHAc-AmPEG, 9-ITCAC-HSA und HQCA-HSA einen deutlichen schistosomiziden Effekt auf Prä-Adulte und Adulte von *S. mansoni*, welcher dosis- und zeitabhängig war. Dabei war das anthelminthische Potential auf Prä-Adulte grundsätzlich größer als auf adulte Würmer. Prä-Adulte nehmen fluoreszenzmarkiertes Albumin schneller auf als adulte Würmer, was auf die Aufnahme von größeren Mengen an HSA schließen lässt (Holtfreter *et al.* 2010). Ein „drug-targeting“ Modell als therapeutischer Ansatz scheint daher besonders zur Therapie der juvenilen Lebensstadien im Endwirt geeignet. Von allen getesteten Konjugaten zeigten die Dexamethason-Konjugate DHAc-HSA und DHAc-AmPEG das höchste schistosomizide Potential auf die getesteten Lebensstadien, da diese Konjugate auch bei niedrigen Konzentrationen zu einer starken Schädigung führten. Weiterhin wiesen diese Konjugate, ebenso wie HQCA-HSA, im Vergleich zur ungekoppelten Substanz ein stärkeres schistosomizides Potential auf. Auch die niedermolekularen Substanzen Diclofenac, Dexamethason, 9-AAC und HQCA zeigten teils starke schistosomizide Effekte auf Prä-Adulte und Adulte von *S. mansoni*.

Die *in vitro* Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ein „drug targeting“-Modell zur Therapie der Bilharziose geeignet sein könnte. In weiterführenden Versuchen sollte nun die Wirksamkeit aller *in vitro* wirksamen Substanzen in einem tierexperimentellen Ansatz überprüft werden. Da die genauen Wirkmechanismen im Rahmen der durchgeführten

Versuche nicht untersucht wurden, sollten diese ebenfalls in weiterführenden Versuchen aufgeklärt werden.

Die Zytostatika AMPT und MTX sowie die Albuminkonjugate AMPT-HSA, MTX-HSA und Diclofenac-HSA zeigten *in vitro* keine Wirksamkeit. Auch in der, mit AMPT und AMPT-HSA durchgeführten tierexperimentellen Studie, konnte kein schistosomizider Effekt beobachtet werden.

5.6.2 Schistosomizider Effekt der Malariatherapeutika Mefloquin und Primaquin

Sowohl Mefloquin als auch Primaquin zeigten in nahezu allen getesteten Konzentrationen einen starken schistosomiziden Effekt auf Zerkarien, Schistosomula, Prä-Adulte und Adulte von *S. mansoni*. Der vielversprechende schistosomizide Effekt von Primaquin konnte jedoch in einer *in vivo* Studie mit verschiedenen Primaquinkonzentrationen nicht bestätigt werden.

Demzufolge sind *in vitro* Experimente nicht geeignet, um alle Aspekte der anthelminthischen Wirkmechanismen zu untersuchen, besonders wenn diese im Zusammenhang mit pharmakologischen und immunologischen Wechselwirkungen mit dem Wirt stehen. Allerdings geben *in vitro*-Assays einen ersten Hinweis auf einen möglichen anthelminthischen Effekt sowie den Wirkmechanismus und könnten somit zur Entwicklung von neuen Therapiestrategien führen.

Da sich die Endemiegebiete der Schistosomiasis und Malaria zu einem großen Teil überschneiden, sollten zukünftig weitere Malariatherapeutika hinsichtlich ihres anthelminthischen Potenzials getestet werden.

5.6.3 CLSM zur Diagnostik der Intestinalen Schistosomiasis

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die CLSM erstmals zur Visualisierung von Wurmeiern im präparierten bzw. intakten Darm von Mäusen angewandt werden. Mit Hilfe dieser nicht-invasiven Methode konnten der Vitalitätsstatus der visualisierten Eier genau beurteilt werden. Weiterhin war eine genaue Bestimmung der Schistosomen-Spezies anhand der Lage des Stachels möglich. Die CLSM könnte also in Zukunft eine Alternative zu invasiven Biopsien darstellen. Eine mögliche Eignung als diagnostisches Werkzeug während einer Rektoskopie bzw. Zystoskopie sollte in einer Pilotstudie am Patienten untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

- Adam I, Elhardello OA, Elhadi MO, Abdalla E, Elmardi KA, Jansen FH (2008).** The antischistosomal efficacies of artesunate-sulfamethoxypyrazine pyrimethamine and artemether-lumefantrine administered as treatment for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann Trop Med Parasitol.* 102(1): 39-44
- Anderson MO, Sherrill J, Madrid PB, Liou AP, Weisman JL, DeRisi JL, Guy RK (2006).** Parallel synthesis of 9-Aminoacridins and their evaluation against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Bioorg Med Chem.* 14(2): 334-343
- Andrade ZA (2009).** Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunol.* 31: 656-663
- Barros LA, Neves RH, De Moura EG, Machado-Silva, JR (2009).** Effects of low-protein diet on *Schistosoma mansoni* morphology visualized by morphometry and confocal laser scanning microscopy. *J Helminthol.* 83: 13-21
- Beaudoin RL, Aikawa M (1968).** Primaquine-induced changes in morphology of exoerythrocytic stages of malaria. *Science.* 160: 1233-1234
- Bennett MW, Caulfield JP (1991):** *Schistosoma mansoni*: Ingestion of Dextran, Serum albumin, and IgG by Schistosomula. *Exp Parasitol.* 73: 52-61
- Bentley GN, Jones AK, Agnew A (2005).** Expression and comparative functional characterisation of recombinant acetylcholinesterase from three species of *Schistosoma*. *Mol Biochem Parasitol.* 141(1): 119-123
- Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, Mashiyama ST, Al-Lazikani B, Andrade LF, Ashton PD, Aslett MA, Bartholomeu DC, Blandin G, Caffrey CR, Coghlan A, Coulson R, Day TA, Delcher A, DeMarco R, Djikeng A, Eyre T, Gamble JA, Ghedin E, Gu Y, Hertz-Fowler C, Hirai H, Hirai Y, Houston R, Ivens A, Johnston DA, Lacerda D, Macedo CD, McVeigh P, Ning Z, Oliveira G, Overington JP, Parkhill J, Pertea M, Pierce RJ, Protasio AV, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Sajid M, Salzberg SL, Stanke M, Tivey AR, White O, Williams DL, Wortman J, Wu W, Zamanian M, Zerlotini A, Fraser-Liggett CM, Barrell BG, El-Sayed NM (2009).** The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature.* 460(7253): 352-358
- Bolling C, Graefe T, Lübbling C, Jankevicius F, Uktveris S, Cesas A, Meyer-Moldenhauer WH, Starkmann H, Weigel M, Burk K, Hanauske AR (2006).** Phase II study of MTX-HSA in combination with cisplatin as first line treatment in patients with advanced or metastatic transitional cell carcinoma. *Invest New Drugs.* 24(6): 521-527
- Borrmann S, Szlezak N, Faucher JF, Matsiegui PB, Neubauer R, Binder RK, Lell B, Kremsner PG (2001).** Artesunate and praziquantel for the treatment of *Schistosoma haematobium* infections: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *J Infect Dis.* 184(10): 1363-1366
- Bosch F, Morales M, Badia A, Baños JE (1993).** Comparative effects of velnacrine, tacrine and physostigmine on the twitch responses in the rat phrenic-hemidiaphragm preparation. *Gen Pharmacol.* 24(5): 1101-1105

- Boulard Y, Landau I, Miltgen F, Ellis DS, Peters W (1983).** The chemotherapy of rodent malaria, XXXIV. Causal prophylaxis Part III: Ultrastructural changes induced in exo-erythrocytic schizonts of *Plasmodium yoilii* by Primaquin. *Ann Trop Med Parasitol.* 77: 555-568
- Burger AM, Hartung G, Stehle G, Sinn H, Fiebig HH (2001).** Pre-clinical evaluation of a methotrexate-albumin conjugate (MTX-HSA) in human tumor xenografts *in vivo*. *Int J Cancer.* 92(5): 718-724
- Bush AI, Tanzi RE (2008).** Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis. *Neurotherapeutics.* 5(3): 421-432
- Caldwell JE (2009).** Clinical limitations of acetylcholinesterase antagonists. *J Crit Care.* 24(1): 21-28
- Canal F, Vicent MJ, Pasut G, Schiavon O (2010).** Relevance of folic acid/polymer ratio in targeted PEG-epirubicin conjugates. *J Control Release.* [Epub ahead of print]
- Cantabrana B, Perez Vallina JR, Menéndez L, Hidalgo A (1995).** Spasmolytic and calmodulin inhibitory effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs *in vitro*. *Life Sci.* 57(14): 1333-1341
- Carneiro-Santos P, Thornhill JA, Doenhoff MJ, Hagan P, Kusel JR (2001).** Acidic vesicles of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res.* 87: 1001-1006
- Cheever AW, Macedonia JG, Deb S, Cheever EA, Mosimann JE (1992).** Persistence of eggs and hepatic fibrosis after treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Am J Trop Med Hyg.* 46: 752-758
- Cioli D, Pica-Mattoccia L (2003).** Praziquantel. *Parasitol Res.* 90: 3-9
- Clegg JA, Smithers SR (1972).** The effects of immune rhesus monkey serum on schistosomula of *Schistosoma mansoni* during cultivation *in vitro*. *Int J Parasitol.* 2: 79-98
- Corrêa Soares JB, Menezes D, Vannier-Santos MA, Ferreira-Pereira A, Almeida GT, Venancio TM, Verjovski-Almeida S, Zishiri VK, Kuter D, Hunter R, Egan TJ, Oliveira MF (2009).** Interference with hemozoin formation represents an important mechanism of schistosomicidal action of antimalarial quinoline methanols. *PLoS Negl Trop Dis.* 3(7): e477
- Cukierman E, Khan DR (2010).** The benefits and challenges associated with the use of drug delivery systems in cancer therapy. *Biochem Pharmacol.* 80(5): 762-770
- Dailey ME, Manders E, Soll DR, Terasaki M.** In: Pawley JB, ed, Handbook of Biological Confocal Microscopy 2nd ed. New York, NY, Plenum Press, 1995; 381–398
- Davenport K, Timoney AG, Keeley FX (2006).** A comparative *in vitro* study to determine the beneficial effect of calcium-channel and alpha(1)-adrenoceptor antagonism on human ureteric activity. *BJU Int.* 98(3): 651-655
- De Clercq D, Vercruyse J, Kongs A, Verle P, Dompnier JP, Faye PC (2002).** Efficacy of artesunate and praziquantel in *Schistosoma haematobium* infected schoolchildren. *Acta Trop.* 82(1): 61-66

- Delcroix M, Sajid M, Caffrey CR, Lim KC, Dvorak J, Hsieh I, Bahgat M, Dissous C, McKerrow JH (2006).** A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a plathyhelminthic parasite. *J Biol Chem.* 281: 39316-39329
- de Melo AL, Hermeto MV, Bicalho RS, Vargas AP, Favaretto FJ, Pereira LH (1994).** *Schistosoma mansoni*: the effect of dexamethasone on the cercaria-schistosomulum transformation *in vivo*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 36(1):89-93.
- Ding K, Flippen-Anderson J, Deschampsb JR, Wanga S (2004).** An efficient synthesis of optically pure (S)-2-functionalized 1,2,3,4-tetrahydroquinoline. *Tetrahedron Lett.* 45: 1027-1029
- Ding WQ, Lind SE (2009).** Metal ionophores - an emerging class of anticancer drugs. *IUBMB Life.* 61(11): 1013-1018
- Dorsey CH, Cousin CE, Lewis FA, Stirewalt MA (2002).** Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. *Micron.* 33: 279-323
- Dovey HF, McKerrow JH, Wang CC (1984).** Purine salvage in *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Mol Biochem Parasitol.* 11: 157-167
- Doweiko J, Nompleggi D (1991).** Role of albumin in human physiology and pathophysiology. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 15: 207-211
- Duvall RH, DeWitt WB (1967).** An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *Am J Trop Med Hyg.* 16(4): 483-486
- Dvorák J, Mashiyama ST, Sajid M, Braschi S, Delcroix M, Schneider EL, McKerrow WH, Bahgat M, Hansell E, Babbitt PC, Craik CS, McKerrow JH, Caffrey CR (2009).** SmCL3, a gastrodermal cysteine protease of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis.* 3(6): e449
- el Kouni MH (2003).** Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. *Pharmacol Ther.* 99(3): 283-309
- el Kouni MH, Naguib FN (1990).** Pyrimidine salvage pathways in adult *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol.* 20(1): 37-44
- Elmes NJ, Bennett SM, Abdalla H, Carthew TL, Edstein MD (2006).** Lack of sex effect on the pharmacokinetics of primaquine. *Am J Trop Med Hyg.* 74: 951-952
- EI-Ridi R, Ozaki T, Inaba T, Ito M, Kamiya H (1997).** *Schistosoman mansoni* oviposition *in vitro* reflects worm fecundity *in vivo*: individual-, parasite age- and host-dependent variations. *Int J Parasitol.* 27(4): 381-387
- Eschen N, Bauder-Wüst U, Frei E, Schrenk HH, Sinn H, Kremer P, Kiprianova I, Hartung G (2002).** Aminopterin-human serum albumin conjugate (AP-HSA): uptake and cytotoxic effects in tumor cell lines. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 40(12): 564-566
- Farahati B, Stachs O, Prall F, Stave J, Guthoff R, Pau HW, Just T (2010).** Rigid confocal endoscopy for *in vivo* imaging of experimental oral squamous intra-epithelial lesions. *J Oral Pathol Med.* 39: 318-327

- Fiehn C, Müller-Ladner U, Gay S, Krienke S, Freudenberg-Konrad S, Funk J, Ho AD, Sinn H, Wunder A (2004).** Albumin-coupled methotrexate (MTX-HSA) is a new anti-arthritic drug which acts synergistically to MTX. *Rheumatology (Oxford)*. 43(9): 1097-1105
- Fraser RS, Creanor J (1975).** The mechanism of inhibition of ribonucleic acid synthesis by 8-hydroxyquinoline and the antibiotic lomofungin. *Biochem J*. 147(3): 401-410
- Fripp PJ (1967).** The sites of (1-¹⁴C) glucose assimilation in *Schistosoma haematobium*. *Comp Biochem Physiol*. 23: 893-898
- Funk D (2010).** Entwicklung von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis und Bildung von DNA-Addukten während entzündlicher Prozesse. *Promotionsschrift*
- Funk D, Schrenk HH, Frei E (2010).** Development of a novel polyethylene glycol-corticosteroid-conjugate with an acid-cleavable Linker. *J Drug Target*. [Epub ahead of print]
- Gerger A, Hofman-Wellenhof Samonigg H, Smolle J (2009).** *In vivo* laser scanning microscopy in the diagnosis of melanocytic skin tumours. *Br J Dermatol*. 160(3): 475-481
- Gerger A, Koller S, Kern T, Massone C, Steiger K, Richtig E, Kerl H, Smolle J (2005).** Diagnostic applicability of *in vivo* confocal laser scanning microscopy in melanocytic skin tumors. *J Invest Dermatol*. 124(3): 493-498
- Giboda M, Zdárská Z (1994).** Alkaline phosphatase as marker of *Schistosoma mansoni* egg viability. *Folia Parasitol*. 41: 55-58
- Glanfield A, McManus DP, Anderson GJ, Jones MK (2007).** Pumping iron: a potential target for novel therapeutics against schistosomes. *Trends Parasitol*. 23(12): 583-588
- Go ML, Lee HS, Palade P (1995).** Effects of mefloquin on Ca²⁺ uptake by crude microsomes of rabbit skeletal muscle. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 329: 255-271
- Goñi O, Alcaide P, Fresno M (2002).** Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr-1⁺/CD11b⁺) immature myeloid suppressor cells. *Int Immunol*. 14(10):1125-1134
- Grabe K, Haas W (2004).** Navigation within host tissues: cercariae orientate towards dark after penetration. *Parasitol Res*. 93(2): 111-113
- Graefe G, Hohorst W, Draeger H (1967).** Forked tail of the cercaria of *Schistosoma mansoni* – a rowing device. *Nature*. 215: 207-208
- Gry-Pharma GmbH (2005).** Fachinformation (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels/SPC): Methotrexat.
- Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L (2006).** Human Schistosomiasis. *Lancet*. 368: 1106-1118
- Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O (2009).** *In vivo* confocal microscopy, an inner vision of the cornea – a major review. *Clin Experiment Ophthalmol*. 37(1): 100-117

- Guendel I**, Carpio L, Easley R, Van Duyne R, Coley W, Agbottah E, Dowd C, Kashanchi F, Kehn-Hall K (2009). 9-Aminoacridine inhibition of HIV-1 Tat dependent transcription. *Virology* 6: 114
- Haag R**, Kratz F (2006). Polymer therapeutics: concepts and applications. *Angew Chem Int Ed Engl*. 45(8): 1198-1215
- Harder A**, Andrews P, Thomas H (1987). Praziquantel: mode of action. *Biochem Soc Trans*. 15: 68-70
- Hartung G**, Stehle G, Sinn H, Wunder A, Schrenk HH, Heeger S, Kränzle M, Edler L, Frei E, Fiebig HH, Heene DL, Maier-Borst W, Queisser W (1999). Phase I trial of methotrexate-albumin in a weekly intravenous bolus regimen in cancer patients. Phase I Study Group of the Association for Medical Oncology of the German Cancer Society. *Clin Cancer Res*. 5(4): 753-759
- Haerberlein S**, Haas W (2008). Chemical attractants of human skin for swimming *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitol Res*. 102(4): 657-662
- Hermeto MV**, Bicalho RS, de Melo AL, Pereira LH (1990). Kinetics of the pulmonary phase of *Schistosoma mansoni* in mice treated with dexamethasone. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 32(3): 168-171
- Hermeto MV**, Melo AL, Bicalho RS, Vargas AP, Favaretto FJ, Pereira LH (1993). Dexamethasone does not reduce the worm burden in mice infected with *in vivo* obtained schistosomules of *Schistosoma mansoni*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 35(4): 389-390.
- Hickstein H**, Wolff D, Stange J, Frei E, Hartung G (2008). Prolonged survival of renal allograft in rats by methotrexate-albumin conjugates as immunosuppressive therapy. *Transplant Proc*. 40(10): 3725-3727
- Hider RC**, Ma Y, Molina-Holgado F, Gaeta A, Roy S (2008). Iron chelation as a potential therapy for neurodegenerative disease. *Biochem Soc Trans*. 36(Pt 6): 1304-1308
- Hinz B**, Hirschelmann R (2000). Dexamethasone megadoses stabilize rat liver lysosomal membranes by non-genomic and genomic effects. *Pharm Res*. 17(12): 1489-1493
- Holtfreter MC**, Loebermann M, Frei E, Riebold D, Wolff D, Hartung G, Kinzelbach R, Reisinger EC (2010). Schistosomula, pre-adults and adults of *Schistosoma mansoni* ingest fluorescence-labelled albumin *in vitro* and *in vivo*: implication for adrug-targeting model. *Parasitology*. 137(11):1645-52
- Ibebunjo C**, Eshelby D, Donati F, Fox GS, Tchervenkov JI (1997). Tacrine does not alter the potency of succinylcholine in the rat. *Can J Anaesth*. 44(9):1021-1026
- Jacobs GH**, Aikawa M, Milhous WK, Rabbege JR (1987). An ultrastructural study of the effects of mefloquine on malaria parasites. *Am JTrop Med Hyg*. 36: 9-14
- Jensen-Holm J**, Teglbjerg KS, Hougs W (1961). The action of hydroaminacrine and some other acridine compounds on isolated guinea-pig ileum. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 18: 370-378
- Kang JS**, Deluca PP, Lee KC (2009). Emerging PEGylated drugs. *Expert Opin Emerg Drugs*. 14(2): 363-380.

- Karbwang J, White NJ (1990).** Clinical pharmacokinetics of mefloquine. *Clin Pharmacokin.* 19: 264-279
- Keiser J, Chollet J, Xiao SH, Mei JY, Jiao PY, Utzinger J, Tanner M (2009).** Mefloquin - An aminoalcohol with promising antischistosomal properties in mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 3: e350
- Keiser J, N'Guessan NA, Adoubryn KD, Silué KD, Vounatsou P, Hatz C, Utzinger J, N'Goran EK (2010).** Efficacy and safety of mefloquine, artesunate, mefloquine-artesunate, and praziquantel against *Schistosoma haematobium*: randomized, exploratory open-label trial. *Clin Infect Dis.* 50: 1205-1213
- Keiser J, Utzinger J (2007).** Artemisinins and synthetic trioxolanes in the treatment of helminth infections. *Curr Opin Infect Dis.* 20(6): 605-612
- Klammt S, Mitzner SR, Stange J, Looock J, Heemann U, Emmrich J, Reisinger EC, Schmidt R (2008).** Improvement of impaired albumin binding capacity in acute-on-chronic liver failure by albumin dialysis. *Liver Transpl.* 14(9): 1333-1339
- Klempner MS, Styrt B (1983).** Alkalinizing the intralysosomal pH inhibits degranulation of human neutrophils. *J Clin Invest.* 72(5): 1793-1800
- Kollaritsch H, Karbwang J, Wiedermann G, Mikolasek A, Na-Bangchang K, Wernsdorfer WH (2000).** Mefloquine concentration profiles during prophylactic dose regimens. *Wien Klin Wochenschr.* 112: 441-447
- Kremer P, Hartung G, Bauder-Wüst U, Schrenk HH, Wunder A, Heckl S, Zillmann U, Sinn H (2002).** Efficacy and tolerability of an aminopterin-albumin conjugate in tumor-bearing rats. *Anticancer Drugs.* 13(6): 615-623
- Lademann M, Stoevesand J, Loebermann M, Riebold D, Hemmer C, Reisinger EC (2005).** Inhibitory effect of mefloquine on *S. mansoni in vitro* and in a mouse model. *Infection.* 33 (201): Abstract P15
- Lane CA, Pax RA, Bennett JL (1987).** L-glutamine: an amino acid required for maintenance of the tegumental membrane potential of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology.* 94 (2): 233-242
- Lanners HN (1991).** Effect of the 8-aminoquinoline primaquine on culture-derived gametocytes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res.* 177: 478-481
- Latour NG, Reeves RE (1965).** An iron-requirement for growth of *Entamoeba histolytica* in culture and the antiamebal activity of 7-iodo-8-hydroxy-quinoline-5-sulfonic acid. *Exp Parasitol.* 17(2): 203-209
- Lawton P (2005).** Purine analogues as antiparasitic agents. *Expert Opin Ther Patents.* 15(8): 987-994
- Lee HG, Michaels RM (1968).** *In vitro* and *in vivo* effects of selected metabolic inhibitors and chemotherapeutic agents on adults and egg development of *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol.* 22(2): 256-263
- Lee HS, Go ML (1991).** Effects of mefloquine on the isolated chick biventer cervicis and rat phrenic nerve hemidiaphragm preparations. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 312: 158-167

- Lescano** SZ, Chieffi PP, Chanhassi RR, Boulos M, Amato Neto V (2004). Antischistosomal activity of artemether in experimental *Schistosomiasis mansoni*. *Rev Saude Publica*. 38(1): 71-75
- Levy** MG, Read CP (1975). Purine and pyrimidine transport in *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol*. 61(4): 627-632
- Li** YS, Chen HG, He HB, Hou XY, Ellis M, McManus DP (2005). A double-blind field trial on the effects of artemether on *Schistosoma japonicum* infection in a highly endemic focus in southern China. *Acta Trop*. 96(2-3): 184-190
- Löbermann** M, Lademann M, Riebold D, Reisinger EC (2005). Schistosomiasis nach Süßwasserkontakt bei Tropenreisenden. *Notarzt und Hausarztmedizin* 31: 338-345
- Löscher** T, Ruppel A, Schubert S (2000). Schistosomiasis (Bilharziose) und andere Trematodeninfektionen. In: Lang W., Löscher T. (Ed.), *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. 3rd edn., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 101-124
- López-Revilla** R, Cano-Mancera R (1982). Adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes. *Infect Immun*. 37(1): 281-285
- Lucitti** JL, Dickinson ME (2006). Moving toward the light: using new technology to answer old questions. *Pediatr Res*. 60(1): 1-5
- Mangeat** P, Gusdinar T, Sahuquet A, Hanzel DK, Forte JG, Magous R (1990). Acid secretion and membrane reorganization in single gastric parietal cell in primary culture. *Biol Cell*. 69(3): 223-231
- Manneck** T, Haggenmüller Y, Keiser J (2010). Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 137: 85-98
- Martyn** JA, Fagerlund MJ, Eriksson LI (2009). Basic principles of neuromuscular transmission. *Anaesthesia*. 64(1):1-9
- Matthews** N, Neale ML (1990). Agents which modify colonial morphology of tumor cells also affect acid vesicle function and fibronectin deposition in the extracellular matrix. *Exp Cell Res*. 191(1): 83-88
- Melman** SD, Steinauer ML, Cunningham C, Kubatko LS, Mwangi IN, Wynn NB, Mutuku MW, Karanja DM, Colley DG, Black CL, Secor WE, Mkoji GM, Loker ES (2009). Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neg Trop Dis*. 3(8): e504
- Mendez** CM, McClain CJ, Marsano LS (2005). Albumin therapy in clinical practice. *Nutr Clin Pract*. 20(3): 314-320
- Miller** P, Wilson RA (1978). Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from skin to lungs. *Parasitology*. 77: 281-302
- Mitzner** S, Klammt S, Stange J, Schmidt R (2006). Albumin regeneration in liver support-comparison of different methods. *Ther Apher Dial*. 10(2): 108-117

- Mohamed AA**, Mahgoub HM, Magzoub M, Gasim GI, Eldein WN, Ahmed Ael A, Adam I (2009). Artesunate plus sulfadoxine/pyrimethamine versus praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* in eastern Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 103(10): 1062-1064
- Mudawi HM**, Elhassan EA, Baraka OZ, El Hassan AM (2006). Schistosomal colitis without granuloma formation in a kidney transplant recipient. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 3: 700-704
- Muravenko OV**, Amosova AV, Samatadze TE, Popov KV, Poletaev AI, Zelenin AV (2003). 9-Aminoacridine: an efficient reagent to improve human and plant chromosome banding patterns and to standardize chromosome image analysis. *Cytometry A.* 51(1): 52-57
- Musiol R**, Serda M, Hensel-Bielowka S, Polanski J (2010). Quinoline-based antifungals. *Curr Med Chem.* 17(18): 1960-1973
- Narayana KJ**, Prabhakar P, Vijayalakshmi M, Venkateswarlu Y, Krishna PS (2008). Study on bioactive compounds from *Streptomyces* sp. ANU 6277. *Pol J Microbiol.* 57(1): 35-39
- Neves RH**, Machado-Silva JR, Pelajo-Machado, M., Oliviera SA, Coutino EM, Lenzi HL, Gomes DC (2001). Morphological aspects of *Schistosoma mansoni* adult worms isolated from nourished and undernourished mice: a comparative analysis by confocal laser scanning microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 96: 1013-1016
- N`Goran EK**, Utzinger J, Gnaka HN, Yapi A, N`Guessan NA, Kigbafori SD, Lengeler C, Chollet J, Shuhua X, Tanner M (2003). Randomized double-blind, placebo-controlled trial of oral artemether for the prevention of patient *Schistosoma haematobium* infections. *Am J Trop Med Hyg.* 68(1): 24-32
- Nohr-Westphal C**, Stachs O, Kröger M, Kram W, Guthoff R, Hakenberg OW (2009). Confocal laser scanning microscopy of the urothelium. *Urologe.* 48(9): 1025-1026
- Oliveira MF**, d'Avila JC, Tempone AJ, Soares JB, Rumjanek FD, Ferreira-Pereira A, Ferreira ST, Oliveira PL (2004). Inhibition of heme aggregation by chloroquine reduces *Schistosoma mansoni* infection. *J Infect Dis.* 190(4): 843-852
- Oppegard LM**, Ougolkov AV, Luchini DN, Schoon RA, Goodell JR, Kaur H, Billadeau DD, Ferguson DM, Hiasa H (2009). Novel acridine-based compounds that exhibit an anti-pancreatic cancer activity are catalytic inhibitors of human topoisomerase II. *Eur J Pharmacol.* 602(2-3): 223-229
- Pérez Vallina JR**, Cantabrana B, Hidalgo A (1995). Calcium- and G-protein-related spasmolytic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on rat uterus contractions *in vitro*. *Pharmacology.* 50(5): 324-332
- Pérez Vallina JR**, Menéndez Antolin L, Cantabrana B, Sánchez M, Hidalgo A (1998). Nitric oxide and cyclic nucleotides participate in the relaxation of diclofenac on rat uterine smooth muscle. *Gen Pharmacol.* 30(1): 25-29
- Pica-Mattoccia L**, Carlini D, Guidi A, Cimica V, Vigorosi F, Cioli D (2006). The schistosome enzyme that activates oxamniquine has the characteristics of a sulfotransferase. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101(1): 307-312

- Pisal DS, Kosloski MP, Balu-Iyer SV (2010).** Delivery of therapeutic proteins. *J Pharm Sci.* 99(6): 2557-2575
- Planchart S, Incani RN, Cesari IM (2007).** Preliminary characterization of an adult worm "vomit" preparation of *Schistosoma mansoni* and its potential use as antigen for diagnosis. *Parasitol Res.* 101(2): 301-309
- Pyrrho Ados S, Ramos JA, Neto RM, Silva CS, Lenzi HL, Takiya CM, Gattass CR (2002).** Dexamethasone, a drug for attenuation of *Schistosoma mansoni* infection morbidity. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(11): 3490-3498
- Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW (2005).** Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology.* 41(6): 1211-1219
- Redman CA, Robertson A, Fallon PG, Modha J, Kusel JR, Doenhoff MJ, Martin RJ (1996).** Praziquantel: An urgent and exciting challenge. *Parasitol Today.* 12: 14-20
- Roche (2009).** Summary of Product Characteristics: Lariam.
- Ross AG, Vickers D, Olds GR, Shah SM, McManus DP (2007).** Katayama syndrome. *Lancet Infect Dis.* 7: 218-224
- Sayed AA, Simeonov A, Thomas CJ, Inglese J, Austin CP, Williams DL (2008).** Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. *Nat Med.* 14(4): 407-412
- Sandoz (2010).** Fachinformation Methotrexat.
- Schmitz JP (1980).** 9-Aminoacridine--its present status and current recommendations for use as a surgical and endodontic irrigant in dentistry. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 50(3): 273-276
- Senft AW, Crabtree GW.** Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*--VII. Inhibition of adenine and guanine nucleotide synthesis by purineanalogs in intact worms (1977). *Biochem Pharmacol.* 26(20): 1847-1855
- Senft AW, Miech RP, Brown PR, Senft DG (1972).** Purine metabolism in *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol.* 2(2): 249-260
- Shaohong L, Kumagai T, Qinghua A, Xiaolan Y, Ohmae H, Yabu Y, Siwen L, Liyong W, Maruyama H, Ohta N (2006).** Evaluation of the anthelmintic effects of artesunate against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols. *Parasitol Int.* 55(1): 63-68
- Shen C, Kim J, Lee JK, Bae YM, Choi MH, Oh JK, Lim MK, Shin HR, Hong ST (2007).** Collection of *Clonorchis sinensis* adult worms from infected humans after praziquantel treatment. *Korean J Parasitol.* 45(2): 149-152
- Shimamura K, Kimura S, Zhou M, Wang Y, Toba M, Ohashi A, Higuchi T, Kawaguchi H, Kitamura K (2005).** Evidence for the involvement of the cyclooxygenase-metabolic pathway in diclofenac-induced inhibition of spontaneous contraction of rat portal vein smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res.* 41(4): 195-206

- Siddiqui AA, Podesta RB, Clarke MW (1991).** *Schistosoma mansoni*: characterization and identification of calcium-binding proteins associated with the apical plasma membrane and envelope. *Exp Parasitol.* 72(1): 63-68
- Silk MH, Spence IM (1969).** Ultrastructural studies of the blood fluke—*Schistosoma mansoni*. II. The musculature. *S Afr J Med Sci.* 34(1): 11-20
- Silva LM, Menezes RM, de Oliveira SA, Andrade ZA (2003).** Chemotherapeutic effects on larval stages of *Schistosoma mansoni* during infection and re-infection of mice. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36: 335-341
- Simionescu M, Gafencu A, Antohe F (2002).** Transcytosis of plasma macromolecules in endothelial cells: a cell biological survey. *Microsc Res Tech.* 57(5): 269-288
- Singhasivanon V, Sabcharoen A, Attanath P, Chongsuphajaisiddhi T, Diquet B, Turk P, (1991).** Pharmacokinetics of Primaquin in healthy volunteers. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 22: 527-533
- Sirotnak FM, Tolner B (1999).** Carrier-mediated membrane transport of folates in mammalian cells. *Annu Rev Nutr.* 19: 91-122
- Sissoko MS, Dabo A, Traoré H, Diallo M, Traoré B, Konaté D, Niaré B, Diakité M, Kamaté B, Traoré A, Bathily A, Tapily A, Touré OB, Cauwenbergh S, Jansen HF, Doumbo OK (2009).** Efficacy of artesunate + sulfamethoxypyrazine/pyrimethamine versus praziquantel in the treatment of *Schistosoma haematobium* in children. *PLoS One.* 4(10): e6732
- Sivrikaya A, Celik OF, Sivrikaya N, Ozgur GK (2003).** The effect of diclofenac sodium and papaverine on isolated human ureteric smooth muscle. *Int Urol Nephrol.* 35(4): 479-483
- Skelly PJ, Tielens AGM, Shoemaker CB (1998).** Glucose transport and metabolism in mammalian stage schistosomes. *Parasitol Today.* 14: 402-406
- Stark MM, Hall NC, Nicholson RJ, Soelberg K (1968).** 9-Aminoacridine, an effective antibacterial agent with caries-disclosing features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 26(4): 560-562
- Stehle G, Sinn H, Wunder A, Schrenk HH, Schutt S, Maier-Borst W, Heene DL (1997).** The loading rate determines tumor targeting properties of methotrexate-albumin conjugates in rats. *Anticancer Drugs.* 8(7): 677-685
- Stehle G, Wunder A, Schrenk HH, Hartung G, Heene DL, Sinn H (1999).** Methotrexate-albumin conjugate causes tumor growth delay in Dunning R3327 HI prostate cancer-bearing rats. *Anticancer Drugs.* 10(4): 405-411
- Sullivan DJ Jr, Matile H, Ridley RG, Goldberg DE (1998).** A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines. *J Biol Chem.* 273(47): 31103-31107
- Terrazas LI, Walsh KL, Piskorska D, McGuire E, Harn DA Jr. (2001).** The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1⁺ cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4⁺ cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections. *J Immunol.* 167(9): 5294-5303

- Thompson DP, Chen GZ, Sample AK, Semeyn DR, Bennett JL (1986).** Calmodulin: biochemical, physiological, and morphological effects on *Schistosoma mansoni*. *Am J Physiol.* 251(6 Pt 2): R1051-1058
- Torchilin VP (2010).** Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. *Handb Exp Pharmacol.* 197: 3-53.
- Uglem GL, Read CP (1976).** Sugar transport and metabolism in *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol.* 61: 390-397
- Utzinger J, N'Goran EK, N'Dri A, Lengeler C, Xiao S, Tanner M (2000).** Oral artemether for the prevention of *Schistosoma mansoni* infection: randomized controlled trial. *Lancet.* 355 (9212): 1320-1325
- Utzinger J, Keiser J, Shuhua X, Tanner M, Singer BH (2003).** Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 1487-1495
- Van der Vusse GJ (2009).** Albumin as fatty acid transporter. *Drug Metab Pharmacokinet.* 24(4): 300-307
- Varshney A, Sen P, Ahmad E, Rehan M, Subbarao N, Khan RH (2010).** Ligand binding strategies of human serum albumin: how can the cargo be utilized? *Chirality.* 22(1): 77-87
- Vis AN, van der Gaast A, van Rhijn BW, Catsburg TK, Schmidt C, Mickisch GH (2002).** A phase II trial of methotrexate-human serum albumin (MTX-HSA) in patients with metastatic renal cell carcinoma who progressed under immunotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 49(4): 342-345
- Voisin MB, Buzoni-Gatel D, Bout D, Velge-Roussel F (2004).** Both expansion of regulatory GR1⁺ CD11b⁺ myeloid cells and anergy of T lymphocytes participate in hyporesponsiveness of the lung-associated immune system during acute toxoplasmosis. *Infect Immun.* 72(9): 5487-5492
- Volle RL (1971).** Blockade by 9-Aminoacridine of potassium fluxes in frog Sartorius muscle. *Biochem Pharmacol.* 20(2): 315-324
- Wainwright M (2001).** Acridine-a neglected antibacterial chromophore. *J Antimicrob Chemother.* 47(1): 1-13
- Walsh MP (1994).** Calmodulin and the regulation of smooth muscle contraction. *Mol Cell Biochem.* 135(1): 21-41
- Walter RD, Wittich RM, Kuhlow F (1987).** Filaricidal effect of mefloquine on adults and microfilariae of *Brugia patei* and *Brugia malayi*. *Trop Med Parasitol.* 38: 55-56
- Wang W, Ho WC, Dicker DT, MacKinnon C, Winkler JD, Marmorstein R, El-Deiry WS (2005).** Acridine derivatives activate p53 and induce tumor cell death through Bax. *Cancer Biol Ther.* 4(8): 893-898
- Weigand M, Hartung G, Roboz J, Sieger S, Wolf M, Sinn H, Schrenk HH, Wiessler M, Frei E (2001).** Mode of action of methotrexate-albumin in a human T-cell leukemia line and activity against an MTX-resistant clone. *Anticancer Drug Res.* 16(4-5): 227-237

WHO Model Lists of Essential Medicines, 16th edition, 2009 (updated March 2010). <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>

Wolff D, Frei E, Hofmeister N, Steiner B, Kleine HD, Junghanss C, Sievert K, Terpe H, Schrenk HH, Freund M, Hartung G (2006). Methotrexate-albumin and aminopterin-albumin effectively prevent experimental acute graft-versus-host disease. *Transplantation*. 82(4): 527-533

Wosikowski K, Biedermann E, Rattel B, Breiter N, Jank P, Löser R, Jansen G, Peters GJ (2003). *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of methotrexate conjugated to human serum albumin in human cancer cells. *Clin Cancer Res*. 9(5): 1917-1926

Wunder A, Müller-Ladner U, Stelzer EH, Funk J, Neumann E, Stehle G, Pap T, Sinn H, Gay S, Fiehn C (2003). Albumin-based drug delivery as novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 170(9): 4793-4801

Xiao SH, Keiser J, Chollet J, Utzinger J, Dong Y, Endriss Y, Vennerstrom JL, Tanner M (2007). *In vitro* and *in vivo* activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. *Antimicrob Agents Chemother*. 51(4): 1440-1445

Xiao SH, Mei JY, Jiao PY (2009). The *in vitro* effect of mefloquine and praziquantel against juvenile and adult *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Res*. 106: 237-246

Yeh JZ (1979). Dynamics of 9-Aminoacridine block of sodium channels in squid axons. *J Gen Physiol*. 73(1): 1-21

Yokoyama M (2005). Drug targeting with nano-sized carrier systems. *J Artif Organs*. 8(2): 77-84

Yuanqing Y, Shuhua X, Tanner M, Utzinger J, Chollet J, Jiadong W, Jian G (2001). Histopathological changes in juvenile *Schistosoma haematobium* harboured in hamsters treated with artemether. *Acta Trop*. 79: 135-141

Zhang WH, Zhu SN, Lu SL, Huang YL, Zhao P (2000). Three-dimensional image of hepatocellular carcinoma under confocal laser scanning microscope. *World J Gastroenterol*. 6(3): 344-34

7 Anhang

I Chemikalien

RPMI-1640 (mit L-Glutamin und Phenolrot)	GIBCO
Fetal Bovine Serum „Gold“	PAA
Penicillin/ Streptomycin – Lösung (10x)	PAA
L-Arginine	Sigma
D-Glucose	Sigma
FACS Flow™	BD
FACS™ Lysing Solution	BD
FACS Clean	BD
FACS Wash	BD
FACS Rinse	BD
Cell Wash	BD
PBS (10x)	Invitrogen
DPBS (ohne Magnesium und Calcium)	PAN Biotech GmbH
Autoklaviertes Leitungswasser	
Natriumchlorid-Lösung (0.9%)	B. Braun
Heparin sodium salt, from porcine intestinal mucosa	Sigma
<i>Aqua ad injectabilia</i>	B. Braun
Pentobarbital- Natrium (Narcoren®)	Bayer
Dimethylsulphoxide	Sigma
Trypan Blue	Sigma
Vidisic® Augengel	Mann Pharma

II Antikörper für Durchflußzytometrie

<i>Hamster-anti-Maus CD3-FITC</i>	Immuno Tools, Friesoythe
<i>Ratte-anti-Maus CD4-PE</i>	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
<i>Ratte-anti-Maus CD11b-FITC</i>	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
<i>Ratte-anti-Maus Gr-1-PE</i>	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
<i>Ratte-anti-Maus CD19-FITC</i>	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

III Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien, Lösungen und Puffer

Kulturmedium für Schistosomula (Bennett & Caulfield 1991, modifiziert nach Lane *et al.* 1987, Haeberlein & Haas 2008)

- 100ml RPMI-1640
- 1ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung
- 100µl L-Arginine (1mM Stammlösung)
- 200µl D-Glucose (1mM Stammlösung)
- 10ml FBS

Kulturmedium für Prä-Adulte und Adulte (El-Ridi *et al.* 1997)

- 100ml RPMI-1640
- 1ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung
- 10ml FBS

Waschlösung für Schistosomula, Prä-Adulte und Adulte (El-Ridi *et al.* 1997, mod.)

- 100ml RPMI-1640
- 1ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung

Spüllösung für Prä-Adulte und Adulte (*in vitro* Experimente) (El-Ridi *et al.* 1997, mod.)

- 100ml RPMI-1640
- 1ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung
- 10mg Heparin

Spüllösung für Adulte (*in vivo* Experimente)

- 100ml Natriumchlorid-Lösung
- 10 ml Heparin

IV Verbrauchsmaterialien

sterile Einmalspritze mit und ohne integrierter Kanüle, 1ml	B. Braun
Greiner Röhrchen 15ml, 50ml	Greiner
Eppendorfgeläße 1.5ml, 2ml	Eppendorf
Kryoröhrchen 2ml	Nalgene
Spritzen 10ml, 20ml	BD
Einwegpetrischalen	Greiner
25 ml Bechergläser	Schott
600 ml Bechergläser	Schott
Einmalskalpell	Dahlhausen
Sterile Mulltupfer 20x20 cm	MaiMed® Medical

Einmalkanüle 20Gx1½ (0.9x40mm)	BD
Einmalkanüle 27Gx¾ (0.4x19mm)	BD
Zellsieb 100µl	BD Falcon™
Siebgewebe (Maschenweite 200µm)	Neo Lab
Perfusionsset mit Flügeln, 0.6mmx20mm	BD
Transferpipette 3.5ml	Sarstedt
Parafilm, Größe M	American National Can Company
Medizinisches Pflaster	Durapore®
Objektträger 76x26mm/ 3x1inch	Eschenbach
Deckgläschen 24x500mm	Menzel-Glaser
Zellkulturplatten 6-Wells, 12-Wells	NUNC
Pipettenspitzen 10µl, 100 µl, 1 ml	greiner bio-one
Einwegpipetten 5ml, 10ml, 25ml	greiner bio-one
FACS-Röhrchen, 5ml mit Rundboden	BD Falcon™
Microvette® 500 K3EDTA	Sarstedt
End-to-End Kapillaren 20µl K2EDTA	Sarstedt
Biopsy punch Hautstanze; Ø 5mm	Stiefel
Haartrimmer Precision Trimmer	Braun

V Geräte

Präparierbesteck	Dimeda, Karl Storz, Aesculap, Chirmed Poland
Knopfkanüle 20Gx30mm	Fine Science
Zentrifuge Biofuge stratos	Heraeus
Zentrifuge Fresco	NeoLab
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraus
Vortexer MS3 digital	IKA® Works, Inc.
Brutschrank Revco (37°C/ 5%CO ₂)	Thermo Scientific
Inkubationsschrank 7601 (37°C)	GFL
Flowbox Herasafe KS 12	Thermo Electron Corporation
Feinwaage Explorer	Ohaus
Präzisionswaage MXX-2001	Denver Instruments
Durchlichtmikroskop CH-2	Olympus
Auflichtmikroskop CK 40	Olympus
Binocular Stemi 2000C	Zeiss
Kaltlichtquelle KL200	Zeiss
Lupe 4-fache Vergrößerung	Eschenbach

Neubauer Zählkammer	Brandt
FACS Calibur™	Beckerton Dickinson
Heidelberg Retina Tomograph II	Heidelberg Engineering GmbH
Rostock Cornea Module	Heidelberg Engineering GmbH
Starres Endoskop mit Stablinsensystem	Storz
Wasserimmersionsobjektiv (Achromat 63x/0.95 W/AA 1.45mm)	Zeiss
Digitalkamera Coolpix 4500	Nikon

VI verwendete ungekoppelte Substanzen

Substanz	Abkürzung	Firma (Bestellnummer)
± Amethopterin hydrate (Methotrexat)	MTX	Sigma (A 7019)
9-Aminoacridine (Aminacrine)	9-AAC	Sigma (A 7295)
Aminopterin	AMPT	Sigma (A 1784)
Dexamethasone	Dexa	Sigma (D 1756)
Diclofenac sodium salt	Diclo	Sigma (D 6899)
8-Hydroxy-2-Quinolincarbonsäure	HQCA	Aldrich (55088)
Mefloquine hydrochloride	Mefloquin	Sigma (M 2319)
Primaquine bisphosphate	Primaquin	Aldrich (160393)
Praziquantel	-	Sigma (P4668)

VII verwendete Albumin-und Polyethylenglycol-Konjugate

Albumin-Konjugat	Abkürzungen	Anteil der enthaltenen ungekoppelten Substanz
Aminopterin-HSA	AMPT-HSA	Aminopterin < 0.005 %
Methotrexat-HSA	MTX-HSA	Methotrexat < 0.005%
Diclofenac-HSA	Diclo-HSA	Diclofenac 2-3%
Hydroxyquinolincarbonsäure- HSA	HQCA-HSA	Hydroxyquinolincarbonsäure < 3.5 %
9-Isothiocyanato-Acridine-HSA	ITCAC-HSA	9-Aminoacridin < 0.25 % 9-Isothiocyanato-Acridine = n. d.
Dexamethasonhydrazinoessig- säure-HSA	DHAc-HSA	Dexamethasonhydrazinoessig- säure <1.51% Dexamethason = n. d.

Aminopolyethylenglycol-Konjugat		Anteil der freien ungekoppelten Substanz
Dexamethasonhydrazinoessigsäure-AmPEG	DHAc-AMPEG	Dexamethasonhydrazinoessigsäure <1,51% Dexamethason = n. d.

VIII Strukturformeln der ungekoppelten Substanzen und den dazugehörigen Albumin bzw. AmPEG-Konjugaten

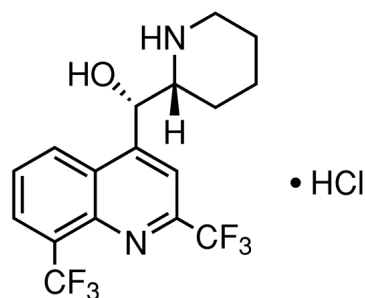


Abbildung 27. Strukturformel von Mefloquine hydrochloride. Quelle: Sigma-Aldrich

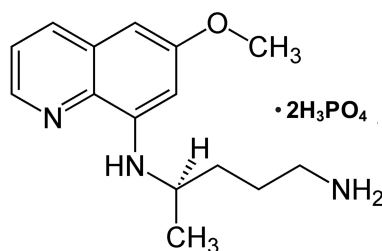


Abbildung 28. Strukturformel von Primaquine bisphosphate. Quelle: Sigma-Aldrich

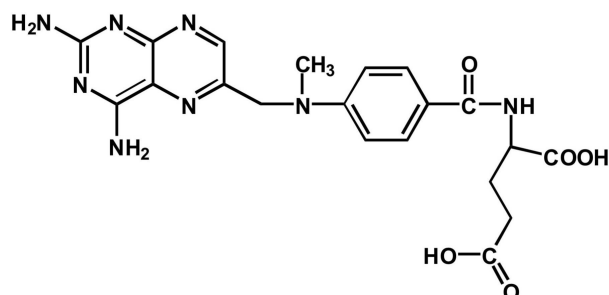


Abbildung 29. Strukturformel von Methotrexat.
Quelle: Abt. f. Molekulare Toxikologie, DKFZ, Heidelberg

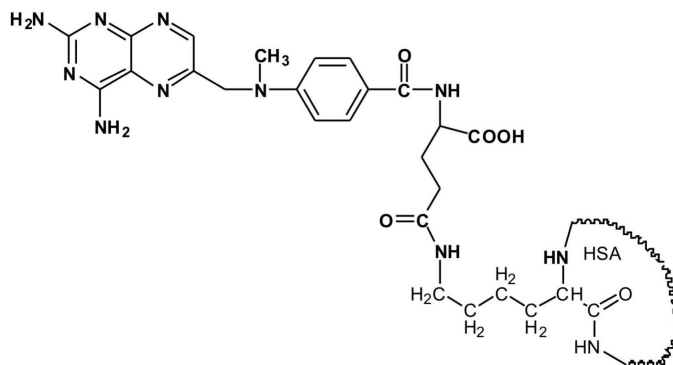


Abbildung 30. Strukturformel von Methotrexat-HSA (MTX-HSA).
Quelle: Abt. f. Molekulare Toxikologie, DKFZ, Heidelberg

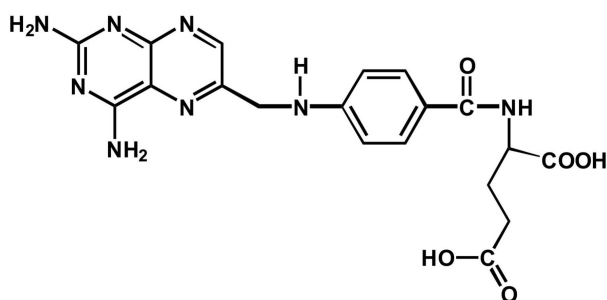


Abbildung 31. Strukturformel von Aminopterin.
Quelle: Abt. f. Molekulare Toxikologie, DKFZ, Heidelberg

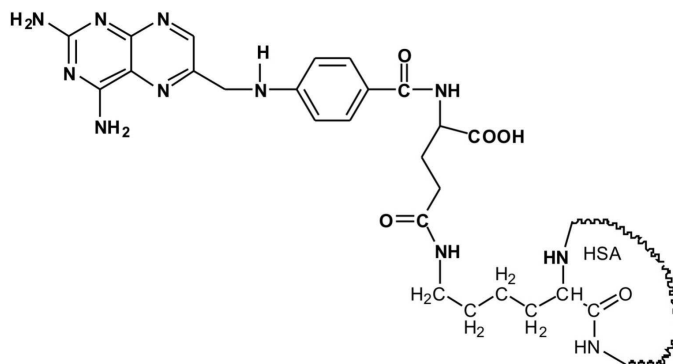


Abbildung 32. Strukturformel von Aminopterin-HSA (AMPT-HSA).
Quelle: Abt. f. Molekulare Toxikologie, DKFZ, Heidelberg

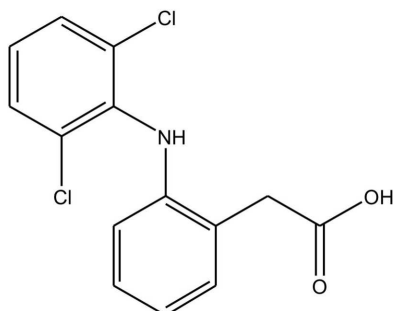


Abbildung 33. Strukturformel von Diclofenac. Quelle: AlbuPharm, Heidelberg

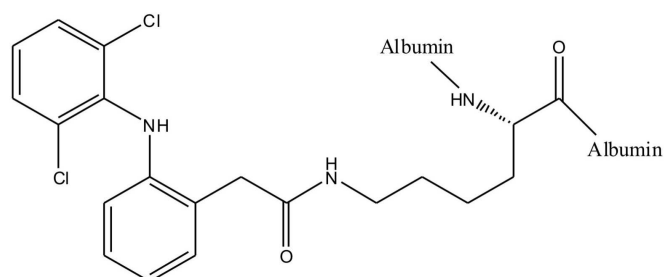


Abbildung 34. Strukturformel von Diclofenac-HSA (Diclo-HSA). Quelle: AlbuPharm, Heidelberg

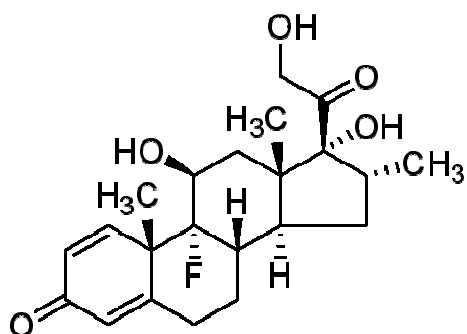


Abbildung 35. Strukturformel von Dexamethason. Quelle: Sigma-Aldrich

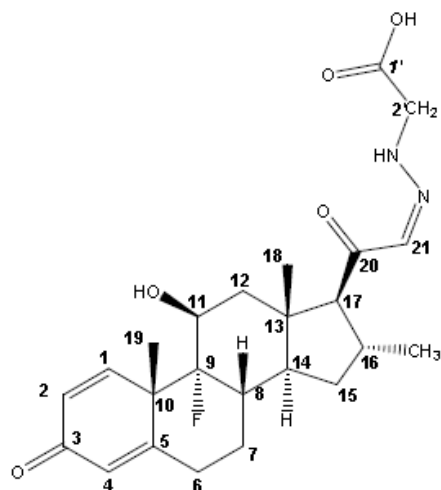


Abbildung 36. Strukturformel von Dexamethasonhydrazinoessigsäure.
Quelle: Abt. f. Molekulare Toxikologie, DKFZ, Heidelberg

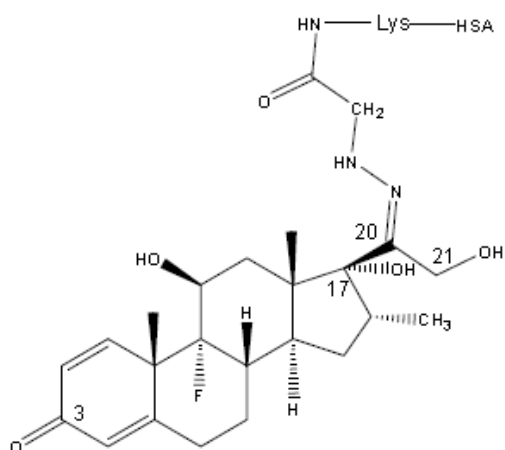


Abbildung 37. Strukturformel von Dexamethasonhydrazoneessigsäure-HSA.
Quelle: Abt. f. Molekulare Toxikologie, DKFZ, Heidelberg

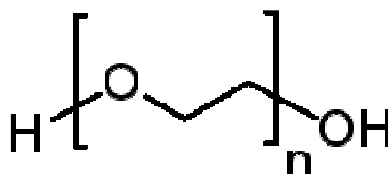


Abbildung 38. Strukturformel von Polyethylenglycol (PEG). Quelle: Sigma-Aldrich

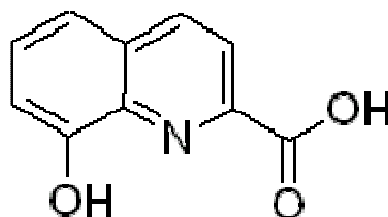


Abbildung 39. Strukturformel von 8-Hydroxy-2-Quinolincarbonsäure. Quelle: Sigma-Aldrich

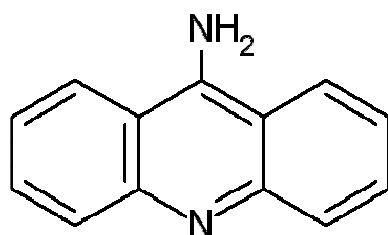


Abbildung 40. Strukturformel von 9-Aminoacridine. Quelle: Sigma-Aldrich.

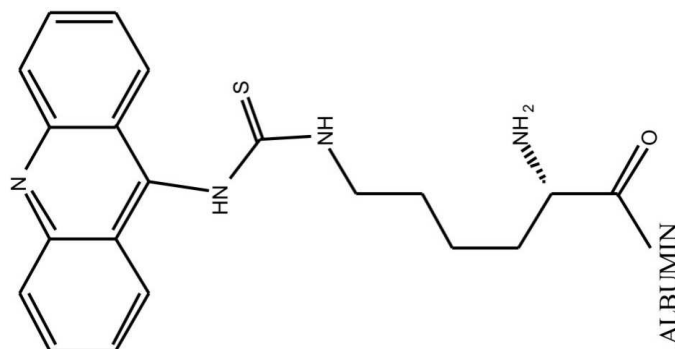


Abbildung 41. Strukturformel von 9-Isothiocyanato-Acridine-HSA (9-ITC-HSA).
Quelle: Abt. f. Molekulare Toxikologie, DKFZ, Heidelberg

VIII Software

CellQuest Software

BD Biosciences

GraphPad Prism 4

GraphPad Software, Inc., CA, USA

SAS 9.1

SAS Institute Inc, NC, USA

CorelDraw X3

Corel Corporation

IX Umrechnungsdaten von Primaquin_{Base} und Primaquin_{Bisphosphate}

<i>Primaquin</i> _{Base} (mg/kg KG)	2	4	8	16	32	64
<i>Primaquin</i> _{Bisphosphate} (mg/kg KG)	3,5	7	14	28	65,1	112,1

X Abbildungen

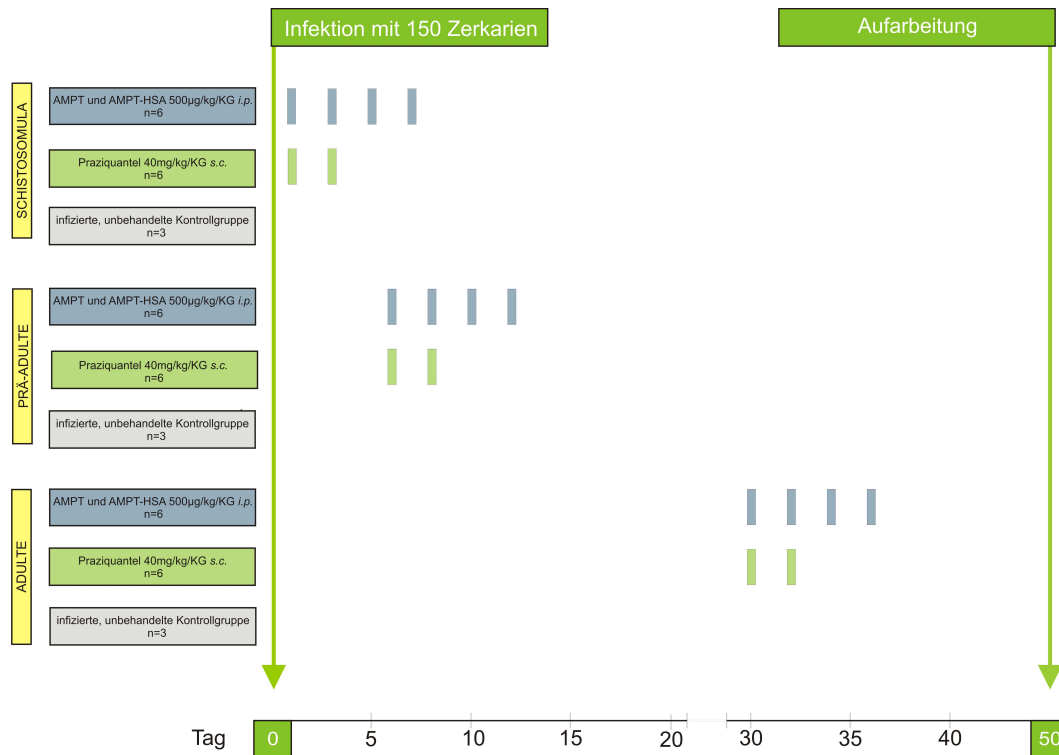


Abbildung 42. Versuchsplan der *in vivo*-Experimente mit Aminopterin, Aminopterin-HSA und Praziquantel.

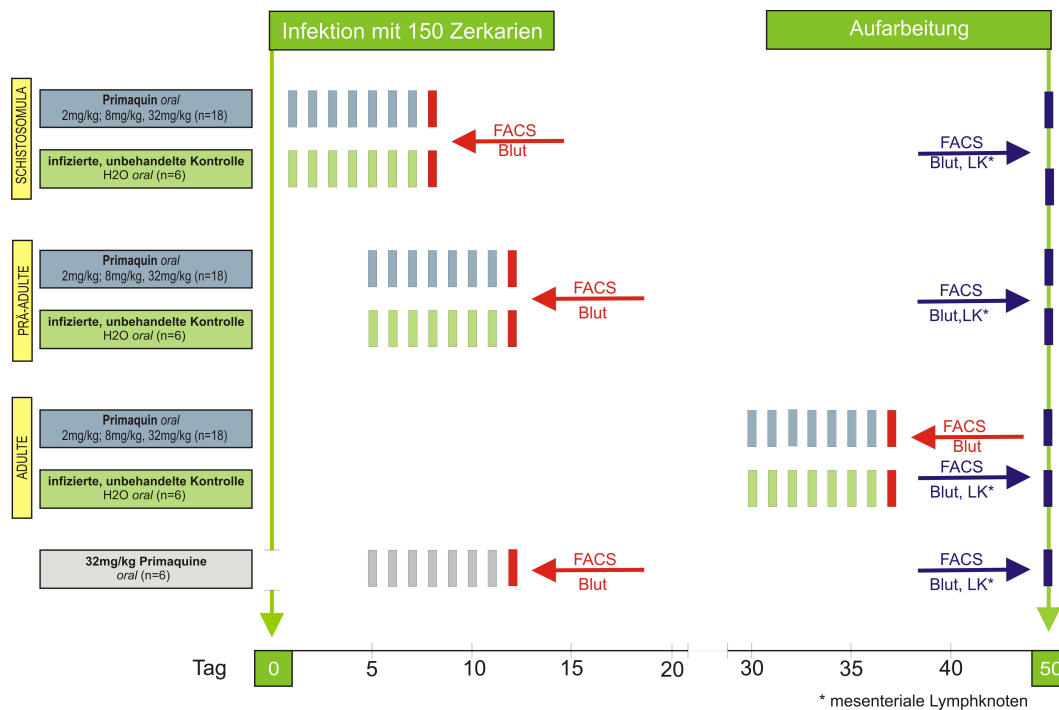


Abbildung 43. Versuchsplan des *in vivo* Experimentes mit Primaquin.

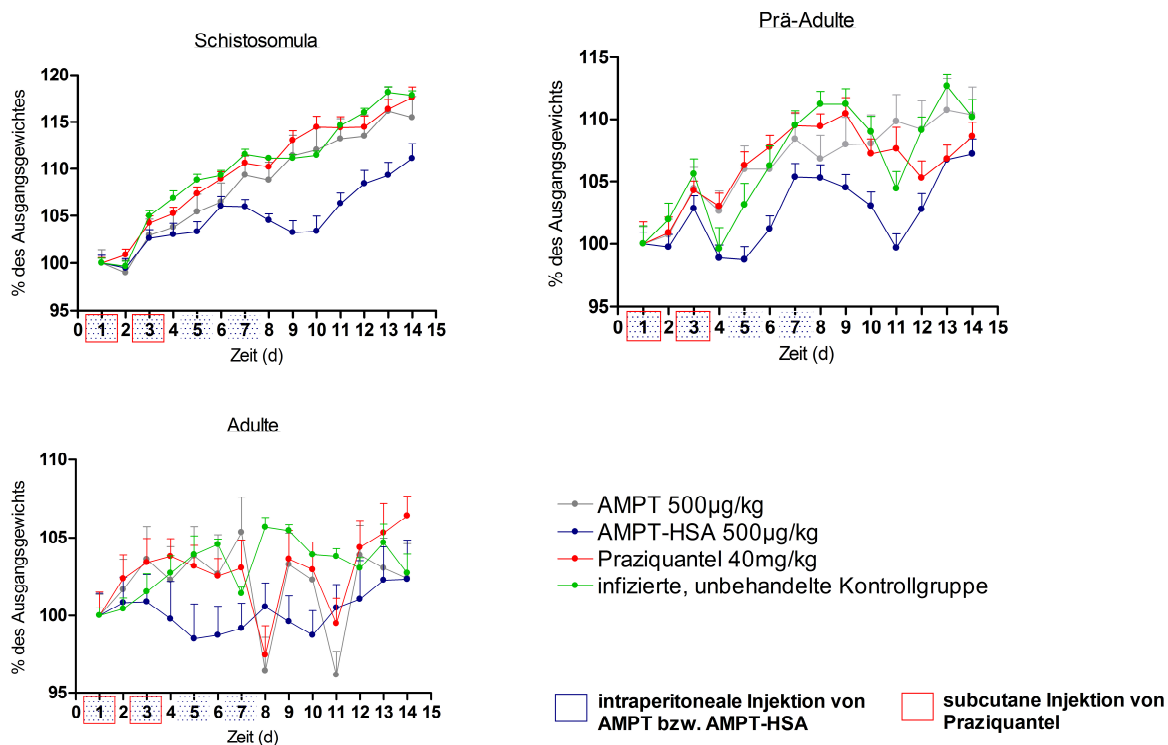


Abbildung 44. Gewichtsverläufe der infizierten und mit AMPT, AMPT-HSA bzw. Praziquantel behandelten Versuchstiere. Infizierte, unbehandelte Mäuse dienen als Negativkontrollgruppe.

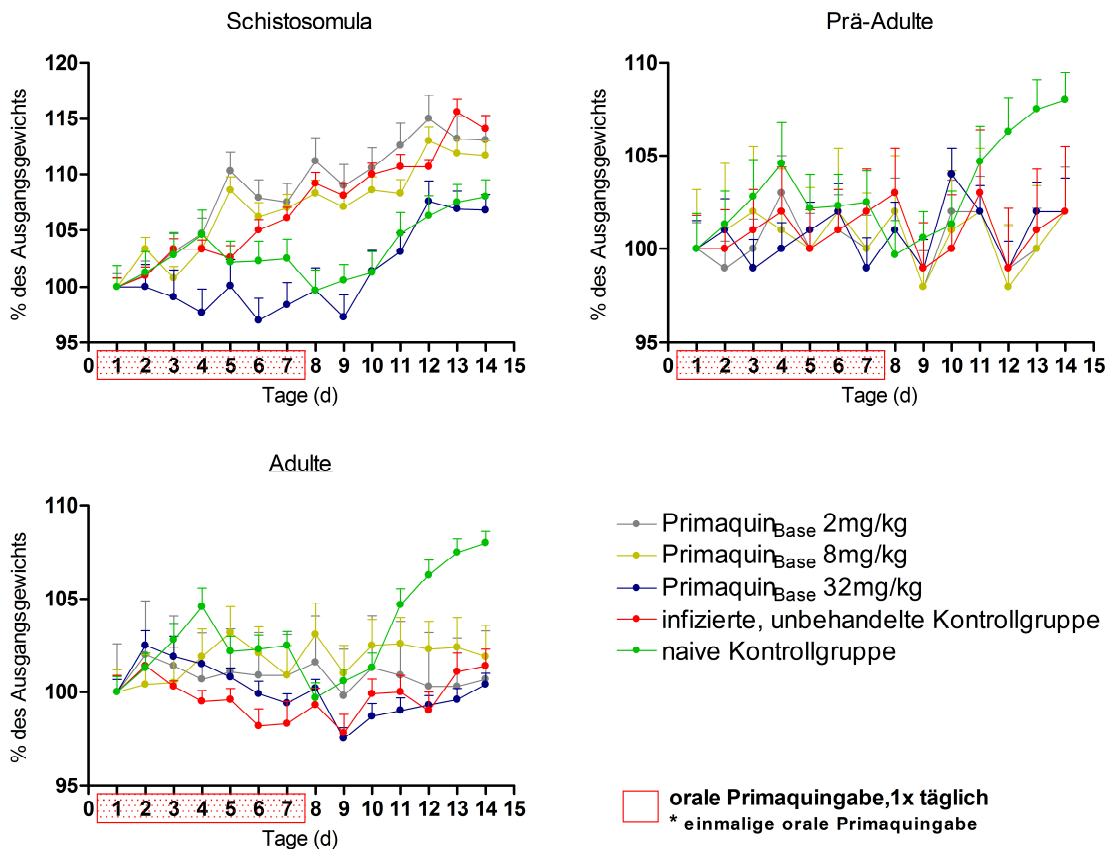


Abbildung 45. Gewichtsverläufe der infizierten und mit Primaquin behandelten Versuchstiere. Infizierte, unbehandelte Mäuse dienten als Negativkontrollgruppe.

XI Tabellen

Tabelle 8. Anzahl der vitalen und toten Eier von *S. mansoni* im Kolon von fünf infizierten und mittels drei verschiedener Mikroskopiemethoden untersuchten Mäusen.

Mikroskopiesystem Untersuchte Kolonfläche	Mikroskopiesystem 1 1.8 (±0.4) cm ²			Mikroskopiesystem 2 1.8 (±0.4) cm ²			Lichtmikroskopie 0.2 cm ²		
	Gesamt	Vital (%)	Tot (%)	Gesamt	Vital (%)	Tot (%)	Gesamt	Vital (%)	Tot (%)
∩ Eier Maus 1	55	35 (64)	20 (36)	21	5 (24)	16 (76)	195	55 (28)	140 (72)
∩ Eier Maus 2	20	8 (40)	12 (60)	12	12 (32)	25 (68)	35	3 (19)	13 (81)
∩ Eier Maus 3	78	8 (10)	70 (90)	70	6 (10)	52 (90)	3	6 (8)	71 (92)
∩ Eier Maus 4	86	26 (30)	60 (70)	1	12 (17)	58 (83)	6	9 (26)	26 (74)
∩ Eier Maus 5	16	8 (50)	8 (59)	52	1 (10)	9 (90)	71	6 (24)	19 (76)
∩ Eier Maus 1-5	255	85 (33)	170 (67)	196	36 (18)	160 (82)	348	79 (23)	269 (77)

XII Verzeichnis der Arten

- Acanthamoeba polyphaga* PUSCHKAREW, 1913
- Angiostrongylus cantonensis* CHEN, 1935
- Biomphalaria glabrata* SAY, 1818
- Brugia malayi* BRUG, 1927
- Brugia patei* BUCKLEY; NELSON & HEISCH, 1958
- Entamoeba histolytica* SCHAUDINN, 1903
- Mus musculus* LINNAEUS, 1758
- Plasmodium falciparum* WELCH, 1897
- Plasmodium malariae* GRASSI & FELETTI, 1890
- Plasmodium ovale* STEPHENS, 1922
- Plasmodium vivax* GRASSI & FELETTI, 1890
- Schistosoma bovis* SONSINO, 1876
- Schistosoma edwardiense* THURSTON, 1964
- Schistosoma haematobium* BILHARZ, 1852
- Schistosoma intercalatum* FISHER, 1934
- Schistosoma japonicum* KATSURADA, 1904
- Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907
- Schistosoma mattheei*, VEGLIA & LA ROUX 1929
- Schistosoma mekongi* VOGÉ; BRUCKNER & BRUCE, 1978
- Schistosoma rodhaini* BRUMPT, 1931
- Trichomonas vaginalis* DONNE, 1836
- Trypanosoma cruzi* CHAGAS, 1909

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn **Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger** für die Möglichkeit meine Promotion an der Abteilung für Tropenmedizin und Infektiologie anfertigen zu dürfen, für die kritische Durchsicht der Arbeit sowie für die vielen anregenden und lehrreichen fachlichen Diskussionen.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn **Prof. Dr. rer. nat. Ragnar Kinzelbach** für die Betreuung und Durchsicht dieser Arbeit, für konstruktive Gespräche und insbesondere für die stete Loyalität.

Ein riesiges Dankeschön an Frau **Dr. Eva Frei**, die mir den Einstieg in die wunderbare Welt der „Trojanischen Pferde“ ermöglicht hat, stets voller Enthusiasmus Probleme diskutiert und Anregungen gegeben hat und ohne die diese Arbeit zu großen Teilen gar nicht zu Stande gekommen wäre. Aber vor allen Dingen bedanke ich mich für den IMMERWÄHRENDEN Glauben an unser Projekt!

Ein riesiges Dankeschön an den weltbesten Betreuer Michär (**Dr. Micha Löbermann**) für`s Händchen halten in stürmischen Zeiten und für`s Korrekturlesen eines weiteren epochalen Meisterwerkes ... “Roses are red, violets are blue, sugar is sweet and so are you!”

„Wieso? Weshalb? Warum? Wer nicht fragt bleibt dumm!“ – ein ganz dickes Dankeschön an Herrn **PD Dr. Hans-Herrmann Schrank** und Doro (**Dr. Dorothee Funk**) für die 1000 Antworten auf meine 1000 Fragen und ihr Interesse an dieser Arbeit.

I would like to extend my thanks to „The incredible statistic man“ aka Basti (**Dr. Sebastian Klammt**), der unter den widrigsten Bedingungen und bis zur völligen Selbstaufgabe glorreiche Statistiken aus dem Hut zauberte, Zusammenhänge geduldig erklärte und dabei immer dieses Leuchten in den Augen hatte!

Ein dickes fettes Dankeschön an Oli (**PD Dr. Oliver Stachs**) und Maria (**Maria Reichard**) für Euer Engagement und Interesse während meines Ausflugs in die spannende Welt der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie. Hat immer riesig Spaß gemacht bei Euch!

Ich verbeuge mich vor meinem EXCEL-Elfchen Toni (**Dipl.-Biol. Toni Schumacher**), ohne dessen Gratis-Stunden in der Verdünnungs- und Tabellenlehre ich wohl eher nicht überlebt hätte. Weiterhin ein dickes Dankeschön an Claudia (**Dr. Claudia Maletzki**) für die vielen Anregungen und die tolle Unterstützung bei der Lösung von diversen Problemchen.

Mein wohl größtes Dankeschön gilt allerdings Dianär, Katisch, Tinchen und Peggitsch (**Dr. Diana Riebold, Kati Keil, Dipl.-Biol. Martina Sombetzki und Dipl.-Biol. Peggy Bodammer**) ... für den BEDINGUNGSLOSEN Zusammenhalt in guten wie in schlechten Zeiten... "Es gibt Dinge, die man nicht gemeinsam erleben kann, ohne dass man Freundschaft schließt [...]." (Joanne K. Rowling, HARRY POTTER UND DER STEIN DER WEISEN, Carlsen, 1998)

Romy, Sina, Riegi, Jack, Moni, Kirsten, Anjalein, Anja & Juschi, Majo und Krul danke ich für die tolle Unterstützung in wirklich allen Phasen dieser Promotion ... "No one could ever know me, no one could ever see me, seems you're the only one who knows, what it's like to be me, someone to face the day with, make it through all the rest with, someone I'll always laugh with, even at my worst I'm best with you" (The Rembrandts, L.P., 1995)

And last but not least: **Meinen Eltern** und **meinem Omileinchen** tausend Dank für's Glauben und für's Dasein!

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die, den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Rostock, Dezember 2010

Martha Holtfreter

Tabellarischer Lebenslauf

Name: Martha Charlotte Sylvia Holtfreter
Geburtsdatum: 31.05.1982
Geburtsort: Gera
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schule

1988-1989	Erich Lobert Oberschule Gera
1989-1992	15. Grundschule Gera
1992-1997	Georg-Christoph-Lichtenberg Gymnasium Gera
1997-2000	Johannes-Bugenhagen Gymnasium Franzburg, abgeschlossen mit Abitur

Studium und Beruf

10/2000 - 07/2006	Studium der Biologie an der Universität Rostock Hauptfach: Zoologie, Nebenfächer: Mikrobiologie, Immunbiologie, Medizinische Parasitologie abgeschlossen dem akademischen Grad Diplom-Biologin <i>Thema der Diplomarbeit:</i> „Ingestion von fluoreszenzmarkiertem Albumin bei verschiedenen Lebensstadien des Pärchenegels <i>Schistosoma mansoni</i> (Plathelminthes, Digenea)“
05/2003 – 07/2006	Tätigkeit als studentische Hilfskraft in der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universität Rostock
seit 10/2006	Promotion an der Universität Rostock (gefördert durch ein Stipendium der Landesgraduierten-Förderung Mecklenburg-Vorpommern) <i>Thema der Promotionsarbeit:</i> „ <i>Schistosoma mansoni</i> SAMBON, 1907 (Plathelminthes, Digenea) - Entwicklung neuer therapeutischer und diagnostischer Ansätze“
10/2008 – 12/2009	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universität Rostock
Seit 11/2010	Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf

Publikationen

Publizierte Manuskripte

Loebermann M, Sombetzki M, Langner C, Fuchsbichler A, Gumhold J, Silbert D, Riebold D, Holtfreter M, Fickert P, Nizze H, Trauner M, Reisinger EC (2009). Imbalance of pro- and antifibrogenic genes and bile duct injury in murine *Schistosoma mansoni* infection-induced liver fibrosis. *Trop Med Int Health*. 14: 1418-25

Holtfreter MC*, Loebermann M*, Frei E, Riebold D, Wolff D, Hartung G, Kinzelbach R, Reisinger EC (2010). Schistosomula, pre-adults and adults of *Schistosoma mansoni* ingest fluorescence-labelled albumin *in vitro* and *in vivo*: Implication for a drug targeting model. *Parasitology*. 137(11): 1645-1652

Holtfreter MC, Loebermann M, Klammt S, Sombetzki M, Bodammer P, Riebold D, Kinzelbach R, Reisinger EC (2010). *Schistosoma mansoni*: Schistosomicidal effect of mefloquine and primaquine *in vitro*. *Exp Parasitol*. [Epub ahead of print]

Bodammer P, Waitz G, Loebermann M, Holtfreter MC, Maletzki C, Krueger M, Emmrich J, Reisinger EC (2010). Infection with *Schistosoma mansoni* but not soluble egg antigen attenuates inflammation of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Dig Dis Sci*. [Epub ahead of print]

Eingereichte Manuskripte

Holtfreter MC*, Stachs O*, Reichard M, Loebermann M, Guthoff RF, Reisinger EC. Confocal laser scanning microscopy for detection of *Schistosoma mansoni* eggs in the gut of mice.

Eingereicht bei PLoS ONE, aktueller Status: *in revision*

Buchbeiträge

Holtfreter M, Möller FW, Riebold D, Loebermann M, Lademann M, Reisinger EC (2006). Die Schistosomiasis - Klinik, Diagnostik und Biologie. In: Janata O, Reisinger E (Hrsg.). Infektiologie-Aktuelle Aspekte Jahrbuch 2004/ 2006. pmVerlag

* Autoren haben im gleichen Maße zur Arbeit beigetragen

Abstracts

Sombetzki M, Fickert P, Loebermann M, Holtfreter M, Fuchsbichler A, Silbert D, Langner C, Reisinger EC, Trauner M (2008). 24-nor-ursodeoxycholic acid as novel therapeutic strategy for inflammation-induced liver fibrosis in a murine model of *Schistosoma mansoni* infection. *J Hepatol.* 48(2): S21-S22

Riebold D, Maruschke M, Holtfreter M, Sombetzki M, Korten G, Mitzner S, Fuehrer A, Loebermann M, Hakenberg OW, Reisinger EC (2009). Pneumocystis pneumonia (PCP) and *Pneumocystis jirovecii* carriage in renal transplant patients. *Transpl Int.* 22 (2): 170

Poster

Holtfreter MC, Löbermann M, Riebold D, Frei E, Keil K, Hartung G, Kinzelbach R, Reisinger EC (2007). Albumin-Aufnahme als Modell eines gekoppelten Medikamenteneinsatzes bei *Schistosoma mansoni* („drug targeting“). 42. Jahrestagung der Internisten Mecklenburg-Vorpommerns, Schwerin, 11.-12. Mai, **2007** - Posterpreis

Holtfreter MC, Löbermann M, Riebold D, Frei E, Keil K, Hartung G, Kinzelbach R, Reisinger EC. Albumin-uptake in *Schistosoma mansoni* as a drug-targeting model for helminthic infections. 100. Jahrestagung der Deutschen Tropenmedizinischen Gesellschaft, Berlin, 21.-23. September, **2007**

Holtfreter MC, Löbermann M, Riebold D, Frei E, Keil K, Hartung G, Kinzelbach R, Reisinger EC. Albumin-uptake in *Schistosoma mansoni* as a drug-targeting model for helminthic infections. 23. Jahrestagung der Deutschen Parasitologischen Gesellschaft, Hamburg, 05.-07. März, **2008**

Vorträge

Reisinger EC, Holtfreter M, Loebermann M. Drug-targeting for helminthic infections. Current Trends in Drug Discovery Research, Lucknow, 17.-21. Februar, **2007**