

Aus der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten
der Universitätsmedizin Rostock
(Direktor: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger)

Vergleichende Analyse zur Pathogenität eines afrikanischen
und eines brasilianischen *Schistosoma mansoni* Stammes

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Felix Daniel Kraft

geboren am 11.05.1990 in Tübingen

Rostock, 2020

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger, Universität Rostock

Gutachter:

Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger, Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten und Sektion Nephrologie, Zentrum für Innere Medizin, Universitätsmedizin Rostock, Deutschland

Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke, Arbeitsgruppe Klinische Immunologie, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Rostock, Deutschland

PD Dr. med. Dominic Wichmann, Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland

Jahr der Einreichung: 2020

Jahr der Verteidigung: 2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung	1
1.1 Die Schistosomiasis	1
1.2 Globale Verbreitung von <i>Schistosoma spp.</i>	1
1.3 Biologie und Lebenszyklus von <i>Schistosoma mansoni</i>	2
1.4 Krankheitsverlauf der Schistosomiasis	4
1.4.1 Akute Schistosomiasis	4
1.4.2 Chronische Schistosomiasis	4
1.4.2.1 Entstehung sowie Funktion hepatischer und intestinaler Eigranulome.....	5
1.4.2.2 Die Leberfibrose	7
1.5 Diagnostik, Therapie und Prävention der Schistosomiasis	8
1.5.1 Diagnostik der Schistosomiasis	8
1.5.2 Therapie und Prävention der Schistosomiasis.....	9
1.6 Aktueller Stand der Forschung und Zielsetzung der Arbeit.....	9
2 Material und Methoden	11
2.1 Versuchstiere	11
2.1.1 Herkunft der <i>Schistosoma spp.</i> Stämme	11
2.1.2 Haltung und Fütterung der Versuchstiere	11
2.2 Infektion mit <i>Schistosoma mansoni</i>	12
2.2.1 Infektion des Zwischenwirtes <i>Biomphalaria glabrata</i>	12
2.2.2 Infektion des Endwirtes NMRI Maus.....	12
2.2.2.1 Gewinnung der Zerkarien	12
2.2.2.2 Mausinfektion.....	13
2.2.2.3 Infektionsprotokoll NMRI Mäuse	13
2.2.2.3.1 Wurmlastbestimmung: Aufarbeitung sechs Wochen p.i.	13
2.2.2.3.2 Leber: Aufarbeitung acht Wochen p.i.	13
2.2.2.3.3 Darm: Aufarbeitung acht Wochen p.i.....	14

2.3	Euthanasie und Aufarbeitung der Versuchstiere.....	14
2.3.1	Bestimmung der Gesamtwurmlast.....	15
2.3.2	Leberaufarbeitung.....	15
2.3.3	Darmaufarbeitung.....	16
2.4	Histologische Analyse von Leber und Darm.....	17
2.4.1	Paraffin-Einbettung.....	17
2.4.2	Anfertigung histologischer Schnitte von Leber und Darm.....	17
2.4.3	Analyse der Granulomgröße in Leber und Darm.....	18
2.4.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	18
2.4.3.2	Bestimmung der Granulomgröße.....	18
2.4.4	Quantifizierung der Fibrose in Leber und Darm.....	18
2.4.4.1	Sirius Red Färbung.....	18
2.4.4.2	Bestimmung des Fibrosegrades mittels ImageJ.....	19
2.5	Makroskopische Analyse von Leber- und Darmschädigung.....	19
2.5.1	Makroskopische Beurteilung der Leber.....	19
2.5.2	Makroskopische Analyse des Darms.....	20
2.6	Bestimmung der Eilast in Leber und Darm.....	20
2.7	Bestimmung des Th1/Th2 Serum-Zytokinspiegels.....	20
2.8	mRNA-Expressionsanalysen aus dem Darmgewebe.....	22
2.8.1	Isolierung der Gesamt-RNA.....	23
2.8.2	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	24
2.8.3	Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).....	25
2.9	Statistische Auswertung.....	26
3	Ergebnisse.....	27
3.1	Vergleich der Infektiosität der <i>S. mansoni</i> Stämme.....	27
3.2	Auswertung der Eilast in Leber und Darm.....	27
3.3	Auswirkungen der unterschiedlichen Infektionsstärken auf den Krankheitsverlauf.....	29
3.3.1	Makroskopische Analyse der infektionsbedingten Veränderungen in Lebern und Milzen.....	29
3.3.2	Makroskopische Veränderungen des Darmes.....	33

3.4	Mikroskopische Veränderungen in Leber- und Darmgewebe	34
3.4.1	Auswertung der Granulomgröße in Leber und Darm	34
3.4.2	Quantifizierung der Fibrose in Leber und Darm	37
3.5	Analyse des Th1/Th2 Serum-Zytokinspiegels.....	39
3.6	Auswertung der mRNA-Expressionsanalysen	40
4	Diskussion	43
4.1	Diskussion der Methodik	44
4.2	Vergleich der Infektiosität der <i>Schistosoma mansoni</i> Stämme	44
4.3	Bewertung der Eilast in Leber und Darm	45
4.4	Auswirkungen der beiden <i>Schistosoma mansoni</i> Stämme und deren unterschiedliche Infektionsstärken auf den Krankheitsverlauf.....	46
4.4.1	Untersuchung der hepatolienalen Schistosomiasis	46
4.4.2	Untersuchung der intestinalen Schistosomiasis	47
4.5	Analyse der Th1/Th2-Antwort	48
4.6	Zusammenfassende Schlussbetrachtung und Ausblick.....	49
5	Zusammenfassung.....	51
6	Thesen.....	53
7	Literatur- und Quellenverzeichnis	54
8	Anhang	61
9	Eidesstattliche Erklärung	63
10	Danksagung.....	64
11	Curriculum vitae	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus von *S. mansoni*

Abbildung 2: Granulom- und Fibrosebildung infolge einer Infektion mit *Schistosoma* spp.

Abbildung 3: Steuerung der Immunantwort infolge einer Infektion mit *Schistosoma* spp.

Abbildung 4: Präparation der Leber

Abbildung 5: Gesamtwurmlast pro *S. mansoni* Stamm

Abbildung 6: Eilast im Darm

Abbildung 7: Eilast in der Leber

Abbildung 8: Übersicht repräsentativer Bilder von Leber und Milz

Abbildung 9: Makroskopischer Leberscore

Abbildung 10: Leberindices

Abbildung 11: Milzindices

Abbildung 12: Makroskopische Veränderungen des Darms

Abbildung 13: Hepatische Granulome

Abbildung 14: Intestinale Granulome

Abbildung 15: Übersicht repräsentativer Abbildungen der Fibrose im Lebergewebe

Abbildung 16: Fibrosegrad im Lebergewebe

Abbildung 17: Serumspiegel der Th1- und Th2-Zytokine

Abbildung 18: mRNA-Expression im Darmgewebe

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geographische Verbreitung der humanpathogenen Schistosoma-Arten

Tabelle 2: Infektionsprotokoll Wurmlastbestimmung

Tabelle 3: Infektionsprotokoll Leberaufarbeitung

Tabelle 4: Infektionsprotokoll Darmaufarbeitung

Tabelle 5: Score Makroskopischer Leberschaden

Tabelle 6: Übersicht der analysierten Zytokine im Serum

Tabelle 7: mRNA-Expression: Übersicht der analysierten Zytokine aus dem Darmgewebe

Tabelle 8: Mastermix/RT-PCR

Tabelle 9: Protokoll RT-PCR/Zyklen

Tabelle 10: Zusammensetzung und Protokoll qPCR

Abkürzungsverzeichnis

Arg1	Arginase 1
<i>B. glabrata</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>
bzw.	beziehungsweise
DALY	<i>disability adjusted life years</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAM	6-FAM-phosphoramidit
GAPDH	Glyeraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase
HCl-EtOH	Salzsäurealkohol
IL-1β	Interleukin 1 beta
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-5	Interleukin 5
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
IL-13	Interleukin 13
IFN-γ	Interferon-gamma
NaCl	Natriumchlorid
NMRI	Naval Medical Research Institute
NTDs	<i>Tropical Neglected Diseases</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
p.i.	<i>post infectionem</i> (nach der Infektion)
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s.c.	subkutan
SEA	lösliche Eiantigene (<i>soluble egg antigens</i>)
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SPF-Mäuse	Spezifisch pathogenfreie Mäuse
spp.	species
Th1	T-Helferzellen vom Subtyp 1

Th2	T-Helferzellen vom Subtyp 2
Th17	T-Helferzellen vom Subtyp 17
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
Treg	Regulatorische T-Zellen
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Die Schistosomiasis

Bei der Schistosomiasis bzw. Bilharziose handelt es sich um eine parasitäre Erkrankung, die durch eine Infektion mit Saugwürmern (Trematoden) der Gattung *Schistosoma spp.* hervorgerufen wird (1).

Schätzungen gehen davon aus, dass weltweit mehr als 200 Millionen Menschen infiziert und annähernd 800 Millionen Menschen einem potenziellen Infektionsrisiko ausgesetzt sind.

Die Infektion mit *Schistosoma spp.* ist daher nach der Malaria-Infektion die zweithäufigste parasitäre Tropenkrankheit (2,3).

Mit 1,7 bis 4,5 Millionen *disability adjusted life years* (DALYs) (4) führt sie die Liste der „*Tropical Neglected Diseases*“ (NTDs) an (5,6). Damit wurde die Erkrankung und deren soziale und wirtschaftliche Relevanz von der WHO sowie anderen Experten lange Zeit unterschätzt (7). Im Rahmen einer chronischen Infektion, wie sie häufig in Endemiegebieten vorkommt, scheinen Symptome wie Anämie, Diarrhö und Wachstumsverzögerungen eine deutlich höhere Prävalenz aufzuweisen als die „klassischen“ Symptome, wie Leberfibrose und portale Hypertension (6,8).

Zudem erhöht die Ansteckung mit *Schistosoma spp.* das Risiko möglicher Co-Infektionen deutlich. HIV oder eine Infektion mit dem Hepatitis B- und C-Virus treten gehäuft als Komorbiditäten von Schistosomiasis auf (9).

1.2 Globale Verbreitung von *Schistosoma spp.*

Aktuell erstreckt sich die weltweite Verbreitung von *Schistosoma spp.* auf mehr als 78 Länder (10), wobei die überwiegende Anzahl infizierter Menschen auf dem afrikanischen Kontinent lebt (11). Im Zuge des Sklavenhandels kam es im 19. Jahrhundert zum Import des Erregers nach Südamerika (12).

Tabelle 1: Geographische Verbreitung der humanpathogenen Schistosoma-Arten (13)

Schistosomen-Art	Zwischenwirt	Endemiegebiet
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Biomphalaria spp.</i>	Afrika, Südamerika, Karibik, Mittlerer Osten
<i>Schistosoma japonicum</i>	<i>Oncomelania spp.</i>	China, Ostasien, Philippinen
<i>Schistosoma haematobium</i>	<i>Bulinus spp.</i>	Afrika, Mittlerer Osten
<i>Schistosoma mekongi</i>	<i>Neotricula aperta</i>	Süd-Ost-Asien
<i>Schistosoma intercalatum</i>	<i>Bulinus spp.</i>	Afrika
<i>Schistosoma guineensis</i>	<i>Bulinus forskalii</i>	Westafrika

Die wichtigsten humanpathogenen Vertreter sind dabei *S. mansoni* und *S. japonicum*, als Auslöser der intestinalen bzw. hepatolienalen Schistosomiasis, sowie *S. haematobium*, als Auslöser der urogenitalen Schistosomiasis.

S. mekongi, *S. intercalatum* und *S. guineensis* weisen hingegen nur ein lokal begrenztes Ausbreitungsmuster auf (2).

1.3 Biologie und Lebenszyklus von *Schistosoma mansoni*

Der komplexe Lebenszyklus von Schistosomen bedarf eines obligaten Wirtswechsels von Zwischen- zu Endwirt. Je nach Schistosomen-Art fungieren Süßwasserschnecken unterschiedlicher Gattungen als Zwischenwirte und der Mensch bzw. andere Vertebraten als Endwirt (Tabelle 1). Eine Besonderheit von *Schistosoma spp.* stellt dabei das Vorhandensein eines Geschlechtsdimorphismus dar, wodurch sie sich von anderen Trematoden unterscheiden (9).

Im Fall der in dieser Arbeit untersuchten Schistosomen-Art *S. mansoni* findet die asexuelle Reproduktion in der Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata* (*B. glabrata*) statt, die sexuelle Fortpflanzung hingegen erfolgt im Blutgefäßsystem des Menschen bzw. in dem von Mäusen.

Nach der Verpaarung von männlichen und weiblichen Würmern, die für das Heranreifen des Weibchens essentiell ist, wandern die Pärchen in die kleinen Kapillaren der Mesenterialvenen ein, um dort im Schnitt 300 Eier pro Tag abzusetzen (14). Werden die Eier nach Durchwanderung der Gefäß- und Darmwand über den Faeces ausgeschieden, schlüpfen bei Süßwasserkontakt sogenannte Mirazidien.

Diese entwickeln sich durch asexuelle Reproduktion im Zwischenwirt zu infektiösen Zerkarien, die erneut den Endwirt befallen können und somit den Fortpflanzungszyklus fortsetzen (1). Eine schematische Darstellung des Reproduktionszyklus von *S. mansoni* ist in Abbildung 1 dargestellt.

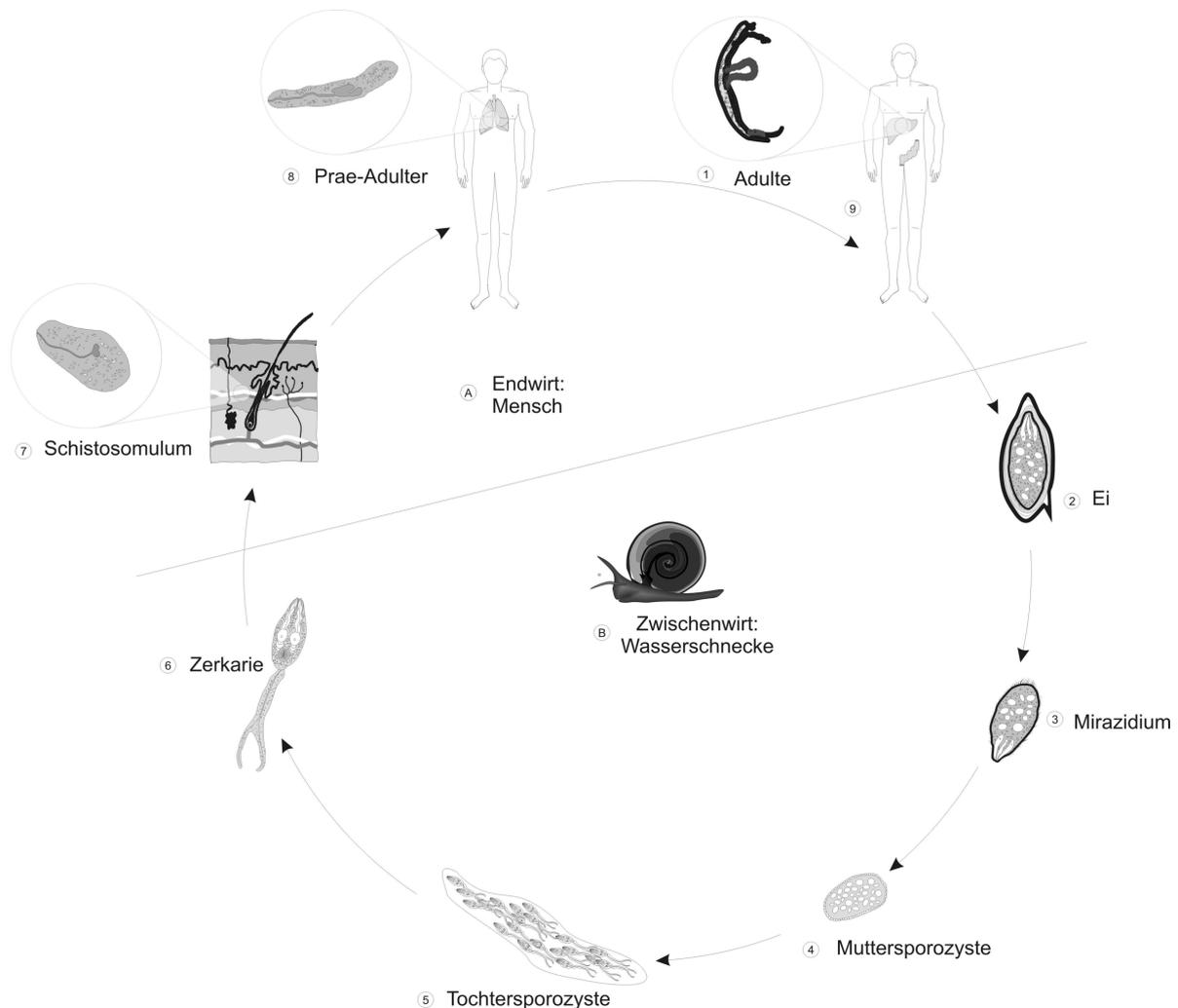


Abbildung 1: Lebenszyklus von *S. mansoni*. Gezeigt sind die verschiedenen Schritte der Parasitenentwicklung vom Schistosomulum bis zur infektiösen Larve unter Berücksichtigung des Wirtswechsels. (1) Die verpaarten, geschlechtsreifen adulten Egel persistieren in den Mesenterialvenen und produzieren bis zu 300 Eier täglich. (2) Die Parasiten-Eier durchwandern mit Hilfe einer lokal hervorgerufenen Entzündungsreaktion Gefäß- und Darmwand und werden mit dem Stuhl ausgeschieden. (3) Durch Frischwasserkontakt schlüpft das im Ei enthaltene Mirazidium (1. Larvenstadium), welches aktiv (Cilien) den Zwischenwirt (Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata*) sucht. Nach Penetration der Schnecke entwickelt sich aus dem Mirazidium die (4) Muttersporozyste. Durch ungeschlechtliche Vermehrung entstehen aus den Keimzellen der Muttersporozyste die (5) Tochterporozysten, aus denen entweder weitere Tochterporozysten oder (6) infektiöse Zerkarien (Gabelschwanzlarven) entstehen. Diese können nach Abwurf ihres Gabelschwanzes die Haut des

Endwirtes durchdringen und sich zum (7) Schistosomulum transformieren. Nach der Lungenpassage wandern die (8) Präadulten ins Pfortadersystem, wo sie als geschlechtsreife (9) adulte Pärchen erneut mit der Eiablage beginnen (Quelle: Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universitätsmedizin Rostock).

1.4 Krankheitsverlauf der Schistosomiasis

Infolge der Infektion mit *Schistosoma spp.* können sich eine akute und eine chronische Schistosomiasis entwickeln (1).

1.4.1 Akute Schistosomiasis

Die akute Form der Schistosomiasis tritt typischerweise bei Urlaubern auf und wird in erster Linie durch die Reaktion des menschlichen Immunsystems auf frühe Wurmstadien ausgelöst (9,15).

Kennzeichnend für die akute Form ist einerseits die Zerkariendermatitis, bei der es zur Ausbildung eines passageren, makulopapulösen Exanthems kommt (1,16), sowie andererseits das Katayama-Syndrom, bei dem die Betroffenen über plötzlich einsetzende Symptomatik mit Fieber, Nausea und Gliederschmerzen klagen und massive Eosinophilie im Blut auftritt (17,18).

1.4.2 Chronische Schistosomiasis

Die chronischen Formen der Schistosomiasis betreffen üblicherweise Bewohner von Endemiegebieten, die schon früh mit rezidivierenden Infektionen konfrontiert waren. Abgelegte Eier führen dabei zu einer Hypersensibilitätsreaktion des Immunsystems (19), dessen Folgen von organspezifischen bis hin zu systemischen Auswirkungen reichen.

Welche Organsysteme jeweils betroffen sind, hängt von der jeweiligen Schistosomenart und deren bevorzugtem venösen Eiablageort ab (2,20). Die überwiegend in den kleinen Kapillaren von Dickdarm und Rektum abgesetzten Eier von *S. mansoni* verursachen bei ihrer Durchwanderung der Darmwand fokale Entzündungsherde

(Granulome), die durch Pseudopolypen sowie Mikroulzerationen und Blutungen gekennzeichnet sind. Symptomatisch werden die Patienten mit relativ unspezifischen abdominellen Beschwerden, wie Diarrhöen und rektalen Blutungen. Im Gewebe retinierte Eier hingegen, die die Darmwand nicht (vollständig) passieren, führen zur Bildung von Fremdkörpergranulomen (1,21). Die hepato lienale Schistosomiasis ist eine schwerwiegende Komplikation bei Infektion mit *S. mansoni*, die allerdings selten auftritt (22).

Eier, die in den Mesenterialvenen abgesetzt wurden und die Darmwand nicht erfolgreich passieren konnten, werden passiv mit dem venösen Blutfluss zur Leber transportiert, wo sie sich in den kleinen prä-sinusoidalen Lebergefäßen verfangen und zur Ausbildung von Granulomen führen (23). Eine Hepatosplenomegalie ist die Folge, und die zunehmende Fibrosierung im Bereich der Leber kann zu portaler Hypertension sowie portokavalen Anastomosen führen, welche Ausgangspunkt lebensbedrohlicher Oesophagusvarizenblutungen sein können (1,24). Die von *S. haematobium* ausgelöste urogenitale Schistosomiasis (Blasenbilharziose) hingegen wird von retinierten Eiern verursacht, die zu Entzündungsreaktionen und Granulombildung im Bereich des Urogenitaltraktes führen (16). Auch Co-Infektionen mit zahlreichen bakteriellen, viralen Erregern und anderen Parasiten sind keine Seltenheit, weshalb *Schistosoma spp.* indirekt an weiteren Krankheiten beteiligt ist (2,13).

So ist beispielsweise bei Frauen mit bestehender Urogenitalschistosomiasis die Anfälligkeit für eine HIV-Erkrankung erhöht (25–27). Dahingegen sind Fälle ekto per Schistosomiasis, bei der andere Organsysteme, wie beispielsweise das zentrale Nervensystem (28–30) oder die Atemwege betroffen sind, untypisch (1,16).

1.4.2.1 Entstehung sowie Funktion hepatischer und intestinaler Eigranulome

Wie bereits in Kapitel 1.4.2 angesprochen, sind die Eier bzw. die von ihnen sezernierten löslichen Ei-Antigene (SEA) für die Entstehung der Fremdkörpergranulome in Darm und Leber verantwortlich (16).

Sie lösen eine Hypersensitivitätsreaktion aus, die unter die zellvermittelten allergischen Reaktionen vom Typ IV (Spättyp) nach Coombs und Gell fällt (31). Bei den Granulomen handelt es sich um einen Zellverbund, der sich im Gewebe um die

einzelnen Eier formiert und dessen Zusammensetzung sich im Verlauf der Infektion ändert (Abbildung 2). Bestandteile sind neben Lymphozyten, Epitheloidzellen und anderen inflammatorischen Zellen, wie zum Beispiel Monozyten/Makrophagen, auch Fibroblasten und hepatische Stellatzellen (32).

Die Regulation der Granulomentwicklung bzw. der Immunantwort des Wirtes erfolgt durch CD4+T-Helferzellen. Während in der Frühphase Zytokine dominieren, die von Typ-1-T-Helferzellen ausgeschüttet werden (TNF- α , IFN- γ und IL-2), kommt es im weiteren Verlauf zu einem Anstieg von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, die Typ-2-T-Helferzellen zuzuordnen sind (Abbildungen 2 und 3). Zeitgleich ist ein Abfall der erstgenannten Zytokine zu beobachten (10). Dieser Prozess wird als Th1/Th2-Polarisation bezeichnet (13).

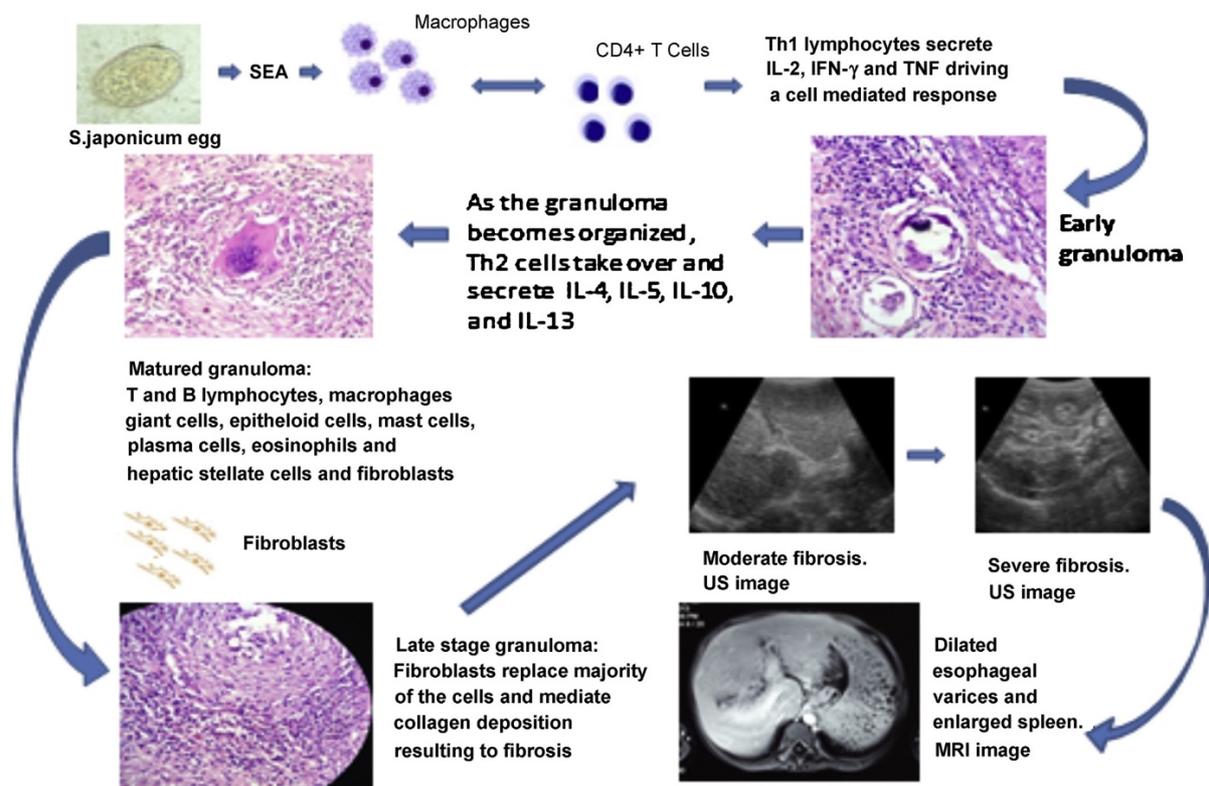


Abbildung 2: Granulom- und Fibrosebildung infolge einer Infektion mit *Schistosoma* spp.
(Quelle: Olveda et al., 2014)

Nach einer gewissen Zeit entwickeln die Betroffenen in den meisten Fällen eine angepasste, durch regulatorische T-Zellen gesteuerte Immunreaktion, die sich histologisch in einer Reduktion der Größe neugebildeter Granulome manifestiert (23,33) und zur Chronifizierung der Erkrankung beiträgt. Diese Reaktion nennt man

modifizierte Th2-Reaktion oder Th2/Treg-Reaktion. Sie dient dem Überleben beider, Parasit und Wirt, indem überschießende Th1- und Th2-Reaktionen unterdrückt werden. IL-10 scheint in diesem Prozess eine entscheidende Rolle zu spielen (9,34).

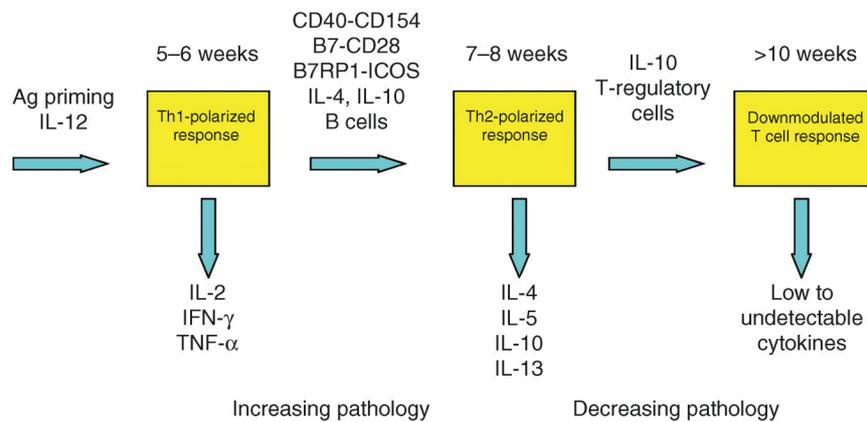


Abbildung 3: Steuerung der Immunantwort infolge einer Infektion mit *Schistosoma spp.* (Quelle: (33))

Abgesehen von ihrer Rolle als Ausgangspunkt der chronischen Schistosomiasis haben Granulome auch protektive Effekte. Mäuse, die nicht in der Lage waren, adäquate Granulome auszubilden, zeigten im Rahmen der akuten Schistosomiasis eine deutlich höhere Sterblichkeitsrate (35). So werden die hepatotoxischen Effekte, die von den Eiern bzw. deren sezernierten Toxinen ausgehen, durch die Granulome „eingemauert“ oder abgeschirmt und der entstehende Gewebeschaden auf diese Weise reduziert (36).

1.4.2.2 Die Leberfibrose

Infolge der Eiablage kann es zu einer massiven Fibrosierung kommen, die im schlimmsten Fall zur hepatolienalen Schistosomiasis führt. Diese stellt das gravierendste Stadium der Erkrankung dar, verbunden mit der Gefahr oberer gastrointestinaler Blutungen (vergleiche hierzu Kapitel 1.4.2).

Aufgrund ihrer histologischen Erscheinung wird diese Form der Leberfibrose nach ihrem Erstbeschreiber als „Symmers' pipestem fibrosis“ bezeichnet (37). Dabei

unterscheidet sie sich in ihrer klinischen Symptomatik wesentlich von anderen Formen der Leberfibrose. Zwar kommt es auch hier zur portalen Hypertension und portokavalen Anastomosen, allerdings bleibt in der Regel die Funktion der Hepatozyten weitestgehend erhalten (23,38). Dies ist überwiegend auf den schützenden Effekt der Lebergranulome zurückzuführen.

Nur in Ausnahmefällen treten Anzeichen hepatischen Funktionsverlustes auf.

In diesem Fall spricht man zur Unterscheidung von dekompensierter hepatolienaler Schistosomiasis (39).

Ein zentrales Ereignis der Fibrosierung ist der Switch der initialen Th1-Immunantwort zu einer durch alternativ aktivierte Makrophagen gesteuerten Th2-Reaktion mit dem profibrotischen Leitzytokin IL-13. Dieses steuert direkt die Transformation von Ito-Zellen zu myofibroblasten-ähnlichen hepatischen Stellatzellen. Diese wiederum produzieren massiv extrazelluläre Matrix und sind somit Hauptakteure der fibroproliferativen Vorgänge in der Leber (9).

Einem Ungleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Reaktion werden schwere Krankheitsverläufe der Schistosomiasis zugeschrieben (1,40). Trotz der Beteiligung unterschiedlicher T-Zellreaktionen, wie Th1, Th17 und Treg, bleibt die Th2-Reaktion die treibende Kraft in der Fibrosierung der Leber während einer Infektion mit *S. mansoni*.

1.5 Diagnostik, Therapie und Prävention der Schistosomiasis

1.5.1 Diagnostik der Schistosomiasis

Die Feststellung einer Infektion mit *Schistosoma spp.* kann sowohl über direkte als auch indirekte Methoden erfolgen, wobei sich keine der bisher bekannten als das ideale diagnostische Tool erwiesen hat.

Für den direkten Nachweis von *S. mansoni* hat sich die mikroskopische Untersuchung von Stuhlproben auf Eier als Goldstandard etabliert (41).

Weitere Nachweismethoden, wie die Polymerase-Kettenreaktion (direkt), der Antikörper- und Antigennachweis mittels ELISA (indirekt) oder die Bildgebung im Krankenhaus, können ebenfalls zur Diagnosefindung beitragen (42,43).

1.5.2 Therapie und Prävention der Schistosomiasis

Zwar ist mit dem Pyrazino-Isochinolin-Derivat Praziquantel (Biltricide® oder Cesol®) seit 1970 ein wirksames Anthelminthikum auf dem Markt; dieses wirkt jedoch ausschließlich gegen adulte Wurmstadien und generiert keinen Schutz vor einer erneuten Infektion (14,44,45). Weiterhin werden durch Massenbehandlung (unter anderem in der landwirtschaftlichen Tierhaltung und durch Therapieprogramme der WHO) immer wieder Fälle möglicher Resistenzentwicklungen beschrieben (46–48). Darüber hinaus steht mit dem Tetrahydrochinolin-Derivat Oxamniquin (Mansil®) lediglich ein weiteres schistosomizides Medikament zur Verfügung, das allerdings ausschließlich gegenüber *S. mansoni* eingesetzt werden kann und deutlich teurer ist als Praziquantel (13,49).

Der Einsatz von Malariamedikamenten im Rahmen einer Infektion mit *Schistosoma* spp. wird kritisch gesehen, da eine Resistenzentwicklung bei zusätzlicher Anwendung befürchtet wird (50–52).

Ein wirksamer Impfstoff ist zum jetzigen Zeitpunkt trotz Fortschritten in der Forschung und trotz Förderprogrammen nicht vorhanden (2,44,53). Von den inzwischen über hundert potenziellen Impfstoffkandidaten befanden sich aktuell lediglich drei Substanzen in der klinischen Testphase (54–56). Die Wirksamkeit des meistversprechenden Kandidaten Bilhvax konnte in jüngster Vergangenheit klinisch nicht bestätigt werden (57).

1.6 Aktueller Stand der Forschung und Zielsetzung der Arbeit

Den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit lieferten Untersuchungen des parasitologischen Forschungslabors der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universitätsmedizin Rostock. Im Jahr 2010 musste hier der traditionelle *S. mansoni* Lebenszyklus von einem afrikanischen (Mozambique) *S.*

mansoni Stamm auf einen brasilianischen (Belo Horizonte) umgestellt werden, da sich aufgrund der jahrzehntelangen Laborhaltung Infektionsresistenzen gebildet hatten. Es wurde festgestellt, dass Mäuse, die mit dem brasilianischen *S. mansoni* Stamm infiziert wurden, deutlich stärkere Krankheitsmerkmale aufwiesen und früher verstarben als diejenigen Mäuse, die mit dem ursprünglichen afrikanischen *S. mansoni* Stamm infiziert wurden.

Basierend auf diesen Beobachtungen hinsichtlich der unterschiedlichen Pathogenität innerhalb der *S. mansoni* Stämme entstand die Hypothese der vorliegenden Arbeit.

Diese besagt, dass der brasilianische *S. mansoni* Stamm (Belo Horizonte) im Vergleich mit einem afrikanischen *S. mansoni* Stamm deutlich pathogener ist. Da der ursprüngliche Stamm (Mozambique) nicht mehr zu beschaffen war, wurde ein anderer afrikanischer *S. mansoni* Stamm aus dem Institut für Parasitologie in Gießen als Vergleichsstamm herangezogen.

Um die genannte Hypothese zu überprüfen, wurden mehrere Infektionsreihen geplant. In diesen wurden NMRI Mäuse (*Mus musculus*, Charles River Laboratories, Deutschland) mit unterschiedlichen Infektionsstärken der beiden Parasitenstämme infiziert, um anschließend die Krankheitsverläufe miteinander zu vergleichen.

Folgende Fragen sollten hierbei beantwortet werden:

- 1. Zeigen die beiden Parasitenstämme bei identischer Infektionsstärke eine unterschiedlich starke Infektiosität?**
- 2. Ist ein hohes Maß an Infektiosität gleichbedeutend mit einer hohen Eilast?**
- 3. Wie wirken sich unterschiedliche Infektionsstärken (drei Grade: 25 Zerkarien, 50 Zerkarien und 100 Zerkarien) im Vergleich beider Stämme und innerhalb eines Erregerstammes aus?**
- 4. Können beobachtete Unterschiede der beiden *S. mansoni* Stämme hinsichtlich ihrer Pathogenität auf Veränderungen im Leber- und Darmgewebe bzw. im Blutserum und der mRNA-Expression zurückgeführt werden?**

2 Material und Methoden

Die verwendeten Materialien und deren Bezugsquellen sind in Kapitel 8 aufgelistet. Alle im Rahmen der Promotionsarbeit durchgeführten Tierversuche wurden durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (Aktenzeichen 7221.3-1-036/18 und 7221.3-1-025/16).

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Herkunft der *Schistosoma* spp. Stämme

Die Grundlage der in der Dissertation durchgeführten Untersuchungen bildeten ein brasilianischer *Schistosoma mansoni* Stamm (Belo Horizonte) und ein westafrikanischer *Schistosoma mansoni* Stamm (Liberia).

Der brasilianische Stamm ist ein Zuchtstamm des Forschungsinstitutes der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universität Rostock, wohingegen der liberianische Stamm freundlicherweise von Professor Dr. Grevelding aus Gießen bereitgestellt wurde.

Im Reproduktionszyklus von *S. mansoni* dienen Süßwasserschnecken der Gattung *Biomphalaria glabrata* (*B. glabrata*, Puerto Rico) als Zwischenwirte. Als Endwirt fungierten weibliche NMRI Mäuse (*Mus musculus*). Der verwendete Swiss-albino Mausstamm wird im Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover entsprechend den SOPF-Statuten gezüchtet (Charles River Laboratories, Deutschland).

2.1.2 Haltung und Fütterung der Versuchstiere

Die Haltung der NMRI Mäuse erfolgte im Tierhaus des parasitologischen Forschungslabors der Universitätsmedizin Rostock in einem Hell-Dunkel-Zyklus von jeweils 12 h bei 26 °C in Käfigen mit Beschäftigungsmaterial (enriched cages) sowie Leitungswasser und Standardfutterpellets *ad libitum* (ssniff R/M-H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany). Die Süßwasserschnecken wurden in gefiltertem Aquarienwasser bei 26 °C gehalten, wöchentlich gereinigt und täglich gefüttert.

2.2 Infektion mit *Schistosoma mansoni*

2.2.1 Infektion des Zwischenwirtes *Biomphalaria glabrata*

Zunächst wurden aus den infizierten Mäusen (Haltungsmäusen) nach Eröffnung des Bauchraumes die Leber und der Darm entnommen. Aus diesen Organen wurde mit Hilfe eines Metallsiebes eine Suspension gewonnen, die Eier von *S. mansoni* enthielt. Diese wurde durch Zentrifugation für 4 min bei 3000 rpm konzentriert. Das so erhaltene Pellet wurde in ein Becherglas (Volumen 2 l) gegeben, das Aquarienwasser und 30 Schnecken der Gattung *B. glabrata* enthielt. Für die Infektion wurden Schnecken mit maximal 0,5 cm Gehäusedurchmesser verwendet. Anschließend fand eine Inkubation bis zum nächsten Tag bei 26 °C statt, und die Schnecken wurden daraufhin in ein Becherglas mit frischem Aquarienwasser überführt.

2.2.2 Infektion des Endwirtes NMRI Maus

2.2.2.1 Gewinnung der Zerkarien

Zum Zeitpunkt der Zerkariengewinnung waren die Schnecken mindestens sechs Wochen infiziert. Um einem vorzeitigen Austritt von Zerkarien entgegenzuwirken, wurden die Schnecken ab der fünften Woche p.i. im Dunkeln gehalten.

Für den Prozess der Zerkarienausscheidung wurden die Schnecken aus dem Aquarium jeweils paarig in mit 2 ml Aquarienwasser befüllte Reagenzgläser umgesetzt und für die Dauer von 2 h einer Warmlichtquelle ausgesetzt.

Anschließend wurde der Inhalt der Reagenzgläser gepoolt und die Zerkarienkonzentration mikroskopisch bestimmt. Hierfür wurde ein Aliquot von 100 µl der Zerkariensuspension mit dem gleichen Volumen Jod versetzt. Jod färbt und tötet die Zerkarien, sodass diese unter dem Mikroskop (100-fache Vergrößerung) ausgezählt und die Anzahl der Zerkarien pro 100 µl bestimmt werden konnte.

2.2.2.2 Mausinfektion

Für den Infektionsvorgang wurden sechs bis acht Wochen alte Mäuse jeweils in ein Becherglas gesetzt, dessen Boden mit Aquarienwasser bedeckt war (1-2 cm). Das Aquarienwasser enthielt eine definierte Anzahl an Zerkarien (siehe Infektionsprotokoll unter 2.2.2.3).

Nach 90 min wurden die Mäuse entsprechend ihrer Infektionsgruppe zurück in die Käfige gesetzt. Zusätzlich wurden separate Kontrollgruppen mit uninfizierten (naiven) Mäusen angelegt.

2.2.2.3 Infektionsprotokoll NMRI Mäuse

Die Infektionsreihen lassen sich in drei Teile untergliedern:

2.2.2.3.1 Wurmlastbestimmung: Aufarbeitung sechs Wochen p.i.

Um die in Leber und Mesenterium befindliche Wurmanzahl des brasilianischen und des liberianischen Stammes zu vergleichen, wurden 10 Mäuse mit jeweils 300 Zerkarien infiziert. Die Aufarbeitung der Mäuse erfolgte dabei sechs Wochen p.i., da ab diesem Zeitpunkt die adulten Würmer von *S. mansoni* in den Bereich der Mesenterialvenen zur Eiablage wandern.

Tabelle 2: Infektionsprotokoll Wurmlastbestimmung

Infektion mit	Liberianischer Stamm	Brasilianischer Stamm
300 Zerkarien	n=10	n=10

n = Anzahl der Mäuse

2.2.2.3.2 Leber: Aufarbeitung acht Wochen p.i.

Ziel dieser Infektionsreihe war der Erhalt definierter Leberproben, um anhand dieser das unterschiedliche Ausmaß der Schädigung im Krankheitsverlauf zu bestimmen. Um einen Vergleich innerhalb der Erregerstämme einerseits sowie zwischen beiden Erregerstämmen andererseits vornehmen zu können, wurden Mäuse gemäß

folgendem Schema infiziert und acht Wochen nach erfolgter Infektion aufgearbeitet. Als Vergleichsgruppe dienten uninfizierte Mäuse.

Tabelle 3: Infektionsprotokoll Leberaufarbeitung

Infektion mit	Liberianischer Stamm	Brasilianischer Stamm
100 Zerkarien	n=7	n=9
50 Zerkarien	n=7	n=8
25 Zerkarien	n=7	n=8
Negativkontrollen	n=9	

n = Anzahl der Mäuse

2.2.2.3.3 Darm: Aufarbeitung acht Wochen p.i.

Zur vergleichenden Analyse der intestinalen Schistosomiasis beider Stämme wurden Mäuse mit 100 Zerkarien infiziert und eine zusätzliche Kontrollgruppe angelegt. Auch hier erfolgte die Aufarbeitung nach acht Wochen.

Tabelle 4: Infektionsprotokoll Darmaufarbeitung

Infektion mit	Liberianischer Stamm	Brasilianischer Stamm
100 Zerkarien	n=10	n=8
Negativkontrollen	n=6	

n = Anzahl der Mäuse

2.3 Euthanasie und Aufarbeitung der Versuchstiere

Allen Mäusen wurde vor der Euthanasie 0,2 ml eines Narkotikums s.c. verabreicht. Zur Herstellung von diesem wurden 0,6 ml Ketamin, 0,2 ml Rompun sowie 3,2 ml NaCl miteinander vermischt. Bei der Bestimmung der Gesamtwurmlast (siehe 2.3.1) wurden zudem 40 µg Heparin darin gelöst, um einer Koagulation des Blutes entgegenzuwirken.

Die Euthanasie der narkotisierten Versuchstiere erfolgte durch zervikale Dislokation (Kapitel 2.3.1), bei der Aufarbeitung von Leber und Darm (Kapitel 2.3.2 und 2.3.3) hingegen durch Dekapitation.

2.3.1 Bestimmung der Gesamtwurmlast

Zur Bestimmung der Wurmlast wurde nach stattgehabter Euthanasie der narkotisierten Versuchstiere der Abdomen- und Thoraxbereich eröffnet und die Vena portae hepatis mit Hilfe einer Federschere horizontal durchtrennt.

Zum Spülen der Leber wurde die rechte Herzkammer unter Verwendung einer Flügelkanüle punktiert und über eine 20 ml-Spritze jeweils 60 ml warme Spüllösung verabreicht. Die Schistosomen-Wurmpaare wurden dabei in einer sterilen Petrischale aufgefangen. Zusätzlich wurde das Mesenterium freipräpariert und ebenfalls in eine sterile Petrischale überführt. Unter dem Binokular konnte anschließend anhand der herausgespülten und in den Mesenterien sichtbaren Würmern die Wurmlast in Leber und Darm bestimmt werden.

2.3.2 Leberaufarbeitung

Nach der Euthanasie der narkotisierten Versuchstiere wurde das austretende Blut jeweils in 15 ml großen Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Diese wurden im Anschluss bei 3000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das dadurch gewonnene Blutserum wurde abpipettiert und bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Das Abdomen wurde eröffnet, und Milz und Leber wurden freipräpariert. Um definierte Leberanteile (s. Abbildung 4) zu kryokonservieren, wurden diese zunächst in Isopentan (2-Methylbutan/Stickstoff) schockgefroren. Die Gewebestücke wurden daraufhin in Kryoröhrchen gelagert. Zusätzlich wurde ein Teil des rechten Leberlappens (s. Abbildung 4) in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen in 4 % gepuffertem Formafix für 24 h bei Raumtemperatur fixiert.

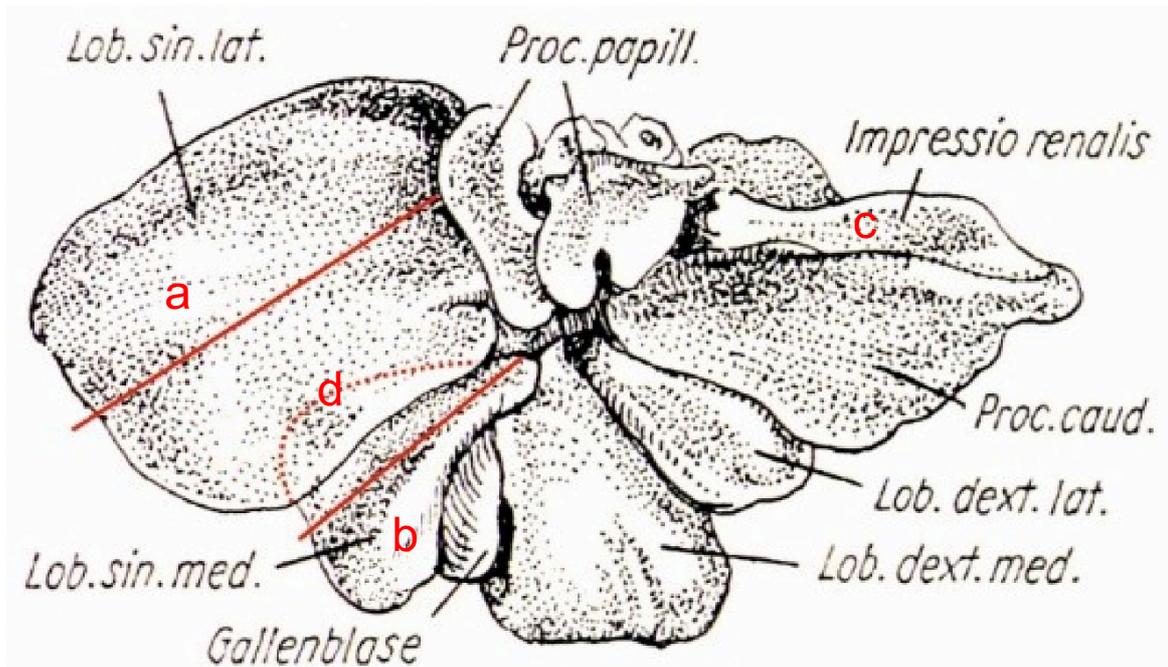


Abb. 4: Präparation der Leber (G. Hoffmann und H. Bentz, 1961, S.213)

Leberstück a) Fixierung Formalin; b) Bestimmung der Elast; c) Hydroxyprolin; d) Kryokonservierung für die mRNA-Expressionsanalyse

Mit Hilfe einer Sartorius-Analysewaage wurden die Gesamtgewichte der einzelnen Versuchstiere sowie die dazugehörigen Gewichte von Leber, Milz und der Leberanteile erfasst.

2.3.3 Darmaufarbeitung

Bei diesen Versuchstieren wurde das Blutserum auf dieselbe Weise gewonnen, wie bereits in 2.3.2 erläutert. Der Darm wurde am Magenausgang abgetrennt und gewogen. Anschließend wurden jeweils zwei Stücke Dickdarm mit einem Gewicht zwischen 20 und 30 μg für die mRNA-Expression sowie ein weiteres Stück für die Bestimmung der Eizahl kryokonserviert. Ein Dickdarmanteil wurde in Formafix fixiert. Bei den Stücken des Dickdarms handelte es sich dabei jeweils um denselben Darmabschnitt, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

2.4 Histologische Analyse von Leber und Darm

2.4.1 Paraffin-Einbettung

Wie in Punkt 2.3.2 und 2.3.3 beschrieben, wurden die Gewebeproben des rechten Leberlappens sowie definierte Anteile des Dickdarms fixiert. Hierdurch wurde eine größtmögliche Erhaltung der Gewebearchitektur gewährleistet. Die fixierten Gewebestücke wurden in Einbettkassetten überführt und in einem 1,5 l-Becherglas gesammelt.

Für die Dauer von 3 h wurden die Leber- und Darmproben unter fließendem, kaltem Leitungswasser gespült und so von überschüssigem Formafix befreit.

Die weitere Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (4 h in 70 % Ethanol, jeweils zweimal 4 h in 80 und 90 % Ethanol und dreimal 4 h in 100 % Ethanol). Daraufhin wurden die Proben zweimal 4 h im Intermediärmedium Xylol inkubiert.

Das Paraffin wurde für die Dauer von zweimal 4 h auf 56 °C erhitzt und die Gewebe in der Einbettform mit dem verflüssigten Paraffin übergossen. Anschließend wurden die Proben bei -5 °C abgekühlt, um das Paraffin zu verfestigen.

2.4.2 Anfertigung histologischer Schnitte von Leber und Darm

Unter Verwendung eines Rotationsmikrotoms wurden von den einzelnen Paraffinblöcken in Stufenschnitttechnik Gewebeschnitte von 5 µm Dicke angefertigt.

Die Blöcke wurden zuvor 24 h bei -20 °C gekühlt, um ein besseres Schnittergebnis zu erzielen. Über die Rutsche des Mikrotoms wurden die Schnitte in ein Streckbad, bestehend aus 40 °C warmem destilliertem Wasser, geleitet und auf Adhäsionsobjektträger gezogen. Überschüssige Wasserreste zwischen Paraffinschnitt und Objektträger wurden durch Lagerung im Brutschrank über Nacht bei 60 °C entfernt.

2.4.3 Analyse der Granulomgröße in Leber und Darm

2.4.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Gewebeschnitte von Leber und Darm wurden mit Xylol zweimal 5 min entparaffiniert und mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe (100 % und 95 % Ethanol jeweils zweimal 5 min, 70 % und 50 % Ethanol sowie Aqua dest. je 5 min lang) rehydratisiert. Die Kernfärbung erfolgte in Hämalun für 5 min. Das Waschen der Präparate fand durch kaltes Leitungswasser in Kombination mit nachfolgender Inkubation in HCl-

EtOH für 3 bis 4 sek statt. Das anschließende Bläuen unter warmem Leitungswasser sorgte über eine Erhöhung des pH-Wertes für einen Farbumschlag der Kernfärbung von rötlich-braun zum typischen Blauviolett. Die Zytoplasmafärbung fand in 0,1-prozentiger wässriger Eosinlösung für 3 min statt. Erneut wurde mit kaltem Leitungswasser gewaschen, um überschüssige Färbereste zu entfernen. Im letzten Färbeschritt wurde nun über eine aufsteigende Alkoholreihe (analog zu s.o.) eine Dehydratation der Schnitte erreicht, die daraufhin mit Xylol zweimal 5 min geklärt wurden. Die Proben wurden mit Eukitt® eingedeckt.

2.4.3.2 Bestimmung der Granulomgröße

Mit Hilfe eines Polarisationsmikroskops inklusive der AxioCam MRc von Zeiss und der Zen12 Imaging-Software wurden Granulome der angefertigten Leber- und Darmschnitte bei 100-facher Vergrößerung fotografiert. Diese wurden anschließend mit der Bildverarbeitungssoftware ImageJ (Version 1.50i; National Institutes of Health, USA) ausgemessen und ausgewertet.

2.4.4 Quantifizierung der Fibrose in Leber und Darm

2.4.4.1 Sirius Red Färbung

Die angefertigten Gewebeschnitte von Leber und Darm wurden zunächst mit Xylol zweimal 5 min entparaffiniert und mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe (100 %

zweimal 5 min, 95 % und 70 % Ethanol sowie Aqua dest. je 5 min lang) rehydratisiert. Nach Zugabe der Sirius Red Lösung (bestehend aus 0,5 g Direct Red, gelöst in 500 ml Pikrinsäure) wurden die Proben 1 h in einem abgedunkelten Gefäß auf einem Schüttler geschwenkt. Die anionischen Seitenketten der Sirius Red Lösung binden dabei an die basischen Seitenketten des Kollagens. Hierdurch kommt es zur parallelen Anlagerung an die Kollagenmoleküle, welche sich infolgedessen lichtmikroskopisch rot darstellen und sich gegenüber dem gelben Zytoplasma abgrenzen lassen. Das Waschen danach erfolgte mit jeweils zweimal 5 min 0,5 % Essigsäure sowie 100 % Ethanol. Zuletzt wurden die Proben mit Xylol 5 min geklärt und wieder mit Eukitt® eingedeckt.

2.4.4.2 Bestimmung des Fibrosegrades mittels ImageJ

Von den gefärbten Gewebeschnitten wurden Fotos bei 25-facher Vergrößerung (Leber) bzw. 100-facher Vergrößerung (Darm) angefertigt. Der Anteil Sirius Red gefärbter, fibrotischer Areale (Sirius Red Färbung, SR) wurde ins Verhältnis zum ungefärbten Zytoplasma gesetzt.

2.5 Makroskopische Analyse von Leber- und Darmschädigung

2.5.1 Makroskopische Beurteilung der Leber

Der äußerlich erkennbare Leberschaden wurde anhand des in Tabelle 5 dargestellten Scores ermittelt. Berücksichtigt wurden die Parameter Farbe, Knotenanzahl, Oberfläche und Konsistenz der Leber sowie das Gewicht von Leber und Milz. Innerhalb der einzelnen Parameter wurde das Ausmaß der Schädigung näherungsweise mit Hilfe der Abstufungen (-), (+) und (++) beschrieben. Die Skala reicht dabei von 0= gesund bis 12= starke Infektion mit *S. mansoni*.

Tabelle 5: Score Makroskopischer Leberschaden (59)

Parameter	Modalität	Score Level
Milzgewicht	≤0,1g (gesund)	-
	>0,11g	+
	>0,4g	++

Lebergewicht	≤1,2g (gesund)	-
	>1,21g	+
	>2g	++
Farbe	rot/glänzend	-
	dunkelrot/matt	+
	gräulich/blass	++
Knoten	keine	-
	gelegentlich	+
	flächendeckend	++
Außenoberfläche	regelmäßig	-
	Furchen/Höcker	+
	makronodulär	++
Konsistenz	weich/elastisch	-
	hart	+
	rigide	++

2.5.2 Makroskopische Analyse des Darms

Das Ausmaß der makroskopischen Darmschädigung wurde anhand der beiden Parameter Nekrose und Granulome analysiert und jeweils mit (1) bei Nichtauftreten und (2) bei Vorhandensein beschrieben.

2.6 Bestimmung der Eilast in Leber und Darm

Kryokonservierte Leber- und Dickdarmsstücke definierten Gewichtes wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und mit einer Pinzette auf einen Objektträger gegeben. Unter Zuhilfenahme eines zweiten Objektträgers wurden Quetschpräparate erzeugt und die sich darin befindlichen Eier zur Bestimmung der Eilast unter dem Durchlichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt.

2.7 Bestimmung des Th1/Th2 Serum-Zytokinspiegels

Die Serumkonzentrationen der Zytokine TNF- α , IFN- γ , IL-13 und IL-4 wurden mit Hilfe des Procartaplex Multiple Immunoassay Kits von ThermoFisher Scientific™ bestimmt. Verwendet wurden hierfür die in Kapitel 2.3.2 gewonnenen Serumproben

Tabelle 6: Übersicht der analysierten Zytokine im Serum

Zytokin	Brasilianischer Stamm	Liberianischer Stamm
TNF- α	n= 8	n= 7
IFN- γ	n=8	n= 7
IL-13	n= 7*	n= 7
IL-4	n= 8	n= 7

* Ein Messwert wurde aufgrund eines Messfehlers aus der Bewertung ausgeschlossen. n = Anzahl der Mäuse; TNF- α = Tumornekrosefaktor-alpha; IFN- γ = Interferon-gamma; ; IL-13 = Interleukin 13; IL-4 = Interleukin 4.

Hierfür wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

Vorbereitung:

1. Antigen-Standard lösen:
Die Standards wurden zunächst für 10 sek bei 2000 rpm zentrifugiert und in 250 μ l Assay Puffer durch Vortexen für 30 sek vermischt. Anschließend wurden die Proben 10 min auf Eis gestellt.
2. Waschpuffer wurde bei Raumtemperatur im Verhältnis 1:10 mit ddH₂O verdünnt: 20 ml Puffer + 180 ml ddH₂O.
3. Serumproben wurden bei 20-25 °C für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert und dann mit Puffer im Verhältnis 1:3 verdünnt: 34 μ l Puffer + 18 μ l Serum.
4. Standard-Verdünnungsreihe wurde mit Universal Assay Puffer erstellt (auf Eis).
5. Vorbereitung der Antikörper: Antikörper wurden im Verhältnis 1:50 verdünnt.

Durchführung:

6. Beads:
 - a) Verwendung von 4 Kits (TNF- α , IFN- γ , IL-4 und IL-13).
 - b) 400 μ l Bead Solution (100 μ l von jedem Kit) + 4500 μ l Waschpuffer wurden für 30 sek gevortext.
 - c) Zugabe von jeweils 50 μ l Beadmix in jedes Well (96 well Platte).
 - d) Um die Beads zu fixieren, wurden die Platten in einen Magneten gegeben.
Nach 2 min wurden die Platten ausgekippt bzw. ausgeklopft.
7. Waschen der Platten durch die Zugabe von jeweils 150 μ l Waschpuffer, Ausschütten und Abklopfen von diesem nach 30 sek.
8. Aufbringen der Serumproben bzw. der Standards auf die Platten:

Jeweils 50 µl der Serumproben bzw. Standards wurden in die Wells pipettiert, welche anschließend mit einer Folie abgedeckt wurden. Die Platten wurden aus dem Magneten genommen und für 1,5 h im Dunkeln gevortext. Während die Proben auf dem Vortexmischer waren, wurden die Antikörper vorbereitet (s. Punkt 5). Nach Ablauf der Inkubation wurden die Platten wieder in den Magneten gestellt und nach 30 sek ausgeschüttet bzw. ausgeklopft.

9. Dreimaliges Waschen der Platten: Hierfür erfolgte die Zugabe von jeweils 150 µl Waschpuffer in jedes Well und das Ausschütten bzw. Ausklopfen nach 30 sek.
10. Zugabe der Antikörper: Pro Well wurden 25 µl Antikörpersubstanz zugegeben und die Platten anschließend aus dem Magneten genommen, um sie für 30 min im Dunkeln zu vortexen (mit Folie abgedunkelt). Daraufhin wurden die Platten aus dem Magneten geholt und der Überstand abgeklopft bzw. ausgeschüttet.
11. Siehe 9.
12. SAP-Zugabe: Um die Ergebnisse zum Schluss photometrisch detektieren zu können, wurde pro Well 50 µl des Protein-Pigment-Komplexes Streptavidin-PE zugegeben. Wieder wurden die Platten aus dem Magneten entfernt und abgedeckt für 30 min im Dunkeln geschüttelt. Nach erneutem Zurückstellen in den Magneten wurden sie nach 30 sek ausgeklopft.
13. Siehe 9.
14. Nach Zugabe von 120 reading Puffer in jedes Well wurden die Proben aus dem Magneten entfernt und für 5 min auf dem Reagenzglasschüttler im Dunkeln geschüttelt. Hierdurch sollte ein Verklumpen der Beads verhindert werden.
15. Messung der Zytokinkonzentrationen im Serum in Relation zur Standardkurve.

2.8 mRNA-Expressionsanalysen aus dem Darmgewebe

Im Darmgewebe wurde die mRNA-Expression der unten aufgeführten proinflammatorischen Zytokine anhand kryokonservierter Darmproben mittels quantitativer Echtzeit-PCR bestimmt. Untersucht wurden dabei ausschließlich Infektionsstärken von 100 Zerkarien; ebenso wurden Kontrollgruppen mit uninfizierten Mäusen ausgewertet.

Tabelle 7: mRNA-Expression: Übersicht der analysierten Zytokine aus dem Darmgewebe

Zytokin	Brasilianischer Stamm	Liberianischer Stamm	Negativkontrolle
TNF- α	n= 8	n= 8	n= 6
IL-6	n= 8	n= 8	n= 6
IL-1 β	n= 8	n= 7*	n= 6

* Aufgrund eines Messfehlers wurde ein Wert aus der Bewertung ausgeschlossen. n = Anzahl der Tiere; TNF- α = Tumornekrosefaktor-alpha; IL-6 = Interleukin 6; IL-1 β = Interleukin 1 beta.

2.8.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die RNA-Isolierung erfolgte gemäß dem Protokoll des „RNeasy Plus Mini Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland). Hierfür wurden die Gewebeprobe(n) (max. 30mg) zunächst in Lysing Matrix-Tubes überführt und je 600 μ l RTL Plus-Puffer zugegeben, der zuvor mit β -Mercaoptoethanol versetzt wurde.

Dadurch wurden zum einen die Zellen des Darmgewebes lysiert und zum anderen wurde dem Abbau durch spezifische und unspezifische RNasen entgegengewirkt.

Im FastPrep Homogenisator erfolgte durch 40 sek Zentrifugieren bei 6,0 rpm die mechanische Homogenisierung der Proben. Anschließend wurde das homogenisierte Lysat für 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der gewonnene Überstand auf eine spezielle Säule (gDNA Eliminator spin column) pipettiert. Durch erneutes Zentrifugieren bei >10000 rpm für 30 sek wurden überschüssige Gewebereste herausgefiltert. Der Durchfluss wurde daraufhin mit 600 μ l 70-prozentigem Ethanol durch repetitives Pipettieren resuspendiert und der nach 15 sek Zentrifugieren bei 10000 rpm erhaltene Durchfluss verworfen. Das Waschen der Proben erfolgte unter Zugabe von im Kit enthaltenen Waschpuffern. Zunächst wurde jeweils 700 μ l RW1-Puffer zugegeben und die Proben für 15 sek bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Schritt wurde mit 500 μ l RPE-Puffer wiederholt. Daraufhin wurde erneut 500 μ l RPE-Puffer zugegeben, diesmal jedoch für 2 min zentrifugiert. Um Reste der Waschpuffer zu entfernen, wurden die Filter in neue 2 ml-Auffanggefäße überführt und für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die RNA, die am Filter gebunden ist, durch Zugabe von 30 μ l RNase free water für 1 min bei 10000 rpm

eluiert. Die Konzentration der RNA-Lösungen wurde mittels Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm quantifiziert.

Neben der optischen Dichte konnte auch die Ratio der jeweiligen Probe erfasst werden. Diese gibt Auskunft über die Reinheit der zugehörigen Probe und sollte dabei im Wertebereich zwischen 2,0 und 2,1 liegen. Vor Beginn der Messungen erfolgte der Nullabgleich des Photometers mit 2 μ l RNase free water.

2.8.2 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die reverse Transkription der zuvor isolierten Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits von ThermoFisher Scientific™, Germany. Ziel dieses Verfahrens ist die Transkription der RNA-templates in einzelsträngige cDNA unter Verwendung einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (MultiScribe™ Reverse Transkriptase) sowie die daran anschließende gezielte Amplifikation der cDNA. Hierfür wurden zunächst die in 2.8.1 gewonnenen RNA-Proben auf eine Konzentration von 500ng/ μ l eingestellt und folgender Mastermix erstellt:

Tabelle 8: Mastermix/RT-PCR (Quelle: High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits)

Mastermix/RT-PCR	Menge
10X RT Buffer	2 μ l
10X RT Random Primers	2 μ l
25X dNTP Mix (100mM)	0,8 μ l
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1 μ l
Nuclease-free H ₂ O	4,2 μ l

Daraufhin wurden jeweils 20 μ l verdünnte RNA-Lösung mit 20 μ l Mastermix durch mehrmaliges Pipettieren in einem 0,5 ml-Eppendorfgefäß vermischt.

Die RT-PCR wurde im Mastercycler gradient® von Eppendorf in vier Schritten durchgeführt. Als Kontrolle wurde eine Probe statt mit RNA-Lösung mit Aqua dest. versetzt.

Tabelle 9: Protokoll RT-PCR/Zyklen (Quelle: High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits)

Protokoll RT-PCR/Zyklen	
1. Schritt	25°C für 10 min
2. Schritt	37°C für 120 min
3. Schritt	85°C für 5 min
4. Schritt	4°C für ∞ min

2.8.3 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Nach einer 1:5 Verdünnung erfolgte die Amplifikation der cDNA im TaqMan 7900. Als Fluoreszenzfarbstoff diente dabei FAM bei den verschiedenen Zytokinen bzw. VIC bei GAPDH.

Tabelle 10: Zusammensetzung und Protokoll qPCR (Quelle: High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits)

Mastermix/qPCR Assays	Menge
2x TaqMan Gene Expression Master Mix	10 µl
20x TaqMan Gene Expression Assay	1 µl
RNase-free water	5 µl
Mastermix/qPCR GAPDH	Menge
2x TaqMan Gene Expression Master Mix	10 µl
GAPDH-Primer-Mix	1,5 µl
RNase-free water	4,5 µl
GAPDH-Primer-Mix	Menge
Forward Primer	0,7 µl
Reverse Primer	0,7 µl
Assay Probe	0,7 µl
Protokoll qPCR/ Zyklen	
1. Schritt	50°C für 2 min
2. Schritt	95°C für 10 min
3. Schritt	95°C für 15 sek x 45
4. Schritt	60°C für 1 min x 45

Die Analyse der erhaltenen ct-Werte (Threshold-Cycle) wurde mit der Statistiksoftware SPSS durchgeführt. Die mRNA-Expression der untersuchten Zytokine wurde als relativer Wert zum Referenz-Gen (housekeeping-gene) ermittelt.

2.9 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse wurde die Statistiksoftware SPSS (Version 25, 2017) verwendet. Die Prüfung der Normalverteilung erfolgte mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests. Zur Auswertung wurden folgende statistische Testsysteme herangezogen:

Normalverteilte Daten wurden mit dem Student's T-Test ausgewertet.

Nicht normalverteilte Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test/ Wilcoxon Rangsummen-Test verglichen. Die Signifikanzniveaus sind in dieser Arbeit mit * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich der Infektiosität der *S. mansoni* Stämme

Die Bestimmung der Gesamtwurmlast erfolgte bereits sechs Wochen p.i., da ab diesem Zeitpunkt die adulten Würmer von *S. mansoni* in den Bereich der Mesenterialvenen zur Eiablage wandern. Um die Wiederfindungsrate zu erhöhen, wurde die Infektionsdosis, ausschließlich zur Bestimmung der Wurmlast, auf 300 Zerkarien pro Maus erhöht (Abbildung 5).

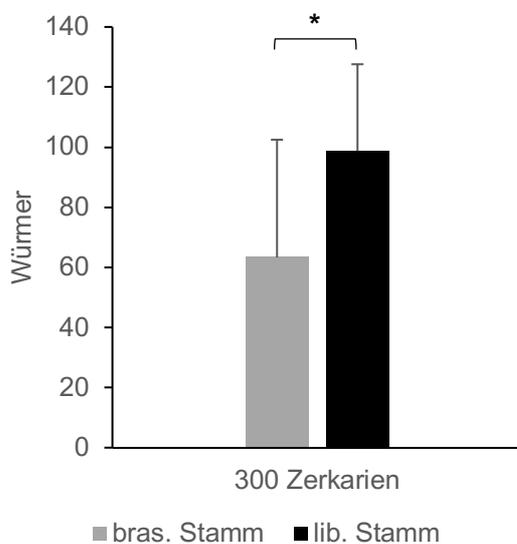


Abbildung 5: Gesamtwurmlast pro *S. mansoni* Stamm. Weibliche NMRI Mäuse wurden mit 300 Zerkarien des bras. oder lib. *S. mansoni* Stammes infiziert und die Gesamtwurmanzahl in Leber und Darm 6 Wochen p.i. bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils 10 Mäusen (bras. Stamm) und 10 Mäusen (lib. Stamm). * $p < 0,05$.
p.i. = *post infectionem*; bras. = brasilianisch; lib. = liberianisch.

Infolge einer Infektion mit dem liberianischen *S. mansoni* Stamm konnte mit einer durchschnittlichen Anzahl von $98,7 \pm 28,9$ Würmern pro Maus eine signifikant höhere Wurmlast festgestellt werden als in den mit dem brasilianischen Vergleichsstamm infizierten Mäusen, in denen sich lediglich ein Wert von $63,3 \pm 39,2$ Würmern pro Maus ergab.

3.2 Auswertung der Eilast in Leber und Darm

Zur Bestimmung der Eilast wurden Quetschpräparate von Lebern und Därmen definierten Gewichtes angefertigt und die ermittelte Anzahl von Eiern auf das jeweilige Gesamtgewicht des Organs übertragen. Untersucht wurden in der Leber die Infektionsstärken 25, 50 und 100 Zerkarien, im Darm die Infektionsdosis von 100 Zerkarien.

Bei der Auszählung der Eier unter dem Lichtmikroskop acht Wochen p.i. ergaben sich dabei Unterschiede zwischen den beiden Organen Leber (Abbildung 6) und Darm (Abbildung 7). Während im Lebergewebe von beiden Parasitenstämmen jeweils eine ähnliche Anzahl an Eiern gefunden werden konnte, befanden sich im Darmgewebe fast ausschließlich Eier des brasilianischen *S. mansoni* Stammes. Mit einer durchschnittlichen Eilast von 42290 ± 18409 im Vergleich zu 1046 ± 784 lag hier im Darm ein signifikanter Unterschied um den Faktor 40 vor.

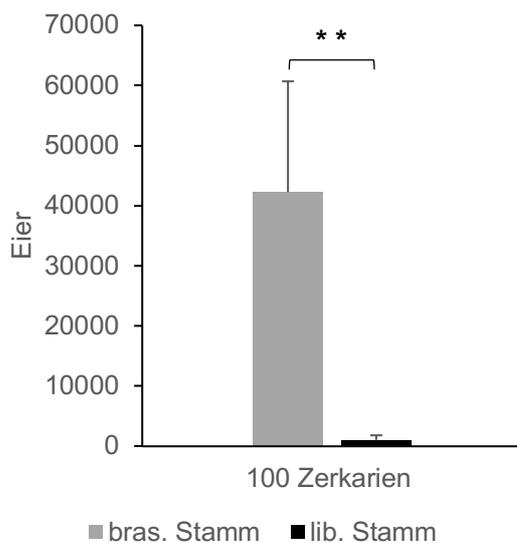


Abbildung 6: Eilast im Darm. Weibliche NMRI Mäuse wurden mit 100 Zerkarien des bras. oder lib. *S. mansoni* Stammes infiziert und die Eilast im Darm 8 Wochen p.i. ausgezählt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 8 Mäusen (bras. Stamm) und 10 Mäusen (lib. Stamm). ** $p < 0,01$. p.i. = *post infectionem*; bras. = brasilianisch; lib. = liberianisch.

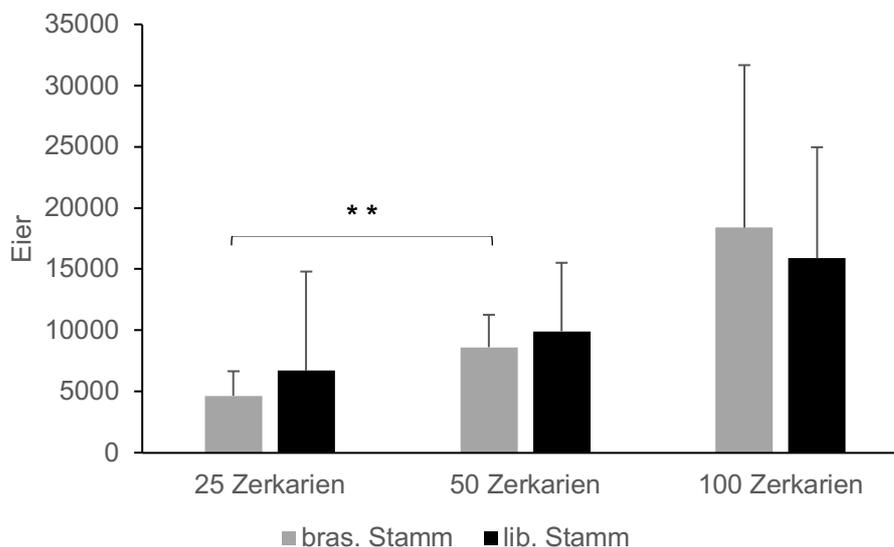


Abbildung 7: Eilast in der Leber. Weibliche NMRI Mäuse wurden mit 25, 50 oder 100 Zerkarien des bras. und lib. *S. mansoni* Stammes infiziert und die Eilast 8 Wochen p.i. bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung für den bras. Stamm (25 und 50 Zerkarien jeweils $n=8$, 100 Zerkarien $n=9$) und den lib. Stamm (25 Zerkarien $n=6$, 50 und 100 Zerkarien jeweils $n=7$). Die Eilast korreliert mit der ursprünglichen Infektionsdosis. ** $p < 0,01$ (zwischen den einzelnen Infektionsstärken). p.i. = *post infectionem*; bras. = brasilianisch; lib. = liberianisch; n = Anzahl der Mäuse.

Innerhalb der Leber zeigte sich bei beiden Stämmen eine positive Korrelation zwischen initialer Infektionsdosis und detektierter Eilast, wobei lediglich beim brasilianischen Stamm zwischen den Infektionsstärken 25 und 50 Zerkarien der Anstieg der Eilast signifikant war.

3.3 Auswirkungen der unterschiedlichen Infektionsstärken auf den Krankheitsverlauf

Um die unterschiedlichen Krankheitsverläufe zu analysieren, wurden Gewichtsveränderungen der untersuchten Organe in Relation zum Körpergewicht der jeweiligen Maus bestimmt. Zusätzlich erfolgte eine makroskopische Bewertung der Lebern und Därme anhand eines in der Laborgruppe ermittelten Scores.

3.3.1 Makroskopische Analyse der infektionsbedingten Veränderungen in Lebern und Milzen

Zur Analyse der Veränderungen von Lebern und Milzen acht Wochen p.i. wurde ein Scoring-System verwendet, welches anhand von strukturellen Organveränderungen das Ausmaß der Organschädigung widerspiegelt (vgl. hierzu Kapitel 2.5.1).

Die Charakterisierung morphologischer Änderungen wurde anhand von präparierten Lebern und Milzen vorgenommen (Abbildung 8).

Hierbei wiesen die Organe der mit dem liberianischen Stamm infizierten Mäuse in allen drei Infektionsstärken eine Oberfläche auf, die durch Unregelmäßigkeiten und zahlreiche Knoten gekennzeichnet war. Der brasilianische Stamm hingegen verursachte deutlich schwächer ausgeprägte Pathologien (Abbildung 9). Bei beiden Stämmen war eine positive Korrelation zwischen initialer Infektionsdosis und Score zu beobachten, wobei die Änderungen stets signifikant waren.

A. Brasilianischer *S. mansoni* Stamm

25 Zerkarien



50 Zerkarien



100 Zerkarien

**B. Liberianischer *S. mansoni* Stamm**

25 Zerkarien



50 Zerkarien



100 Zerkarien

**C. Uninfizierte Kontrolle**

Abbildung 8: Übersicht repräsentativer Abbildungen von Lebern und Milzen. Weibliche NMRI Mäuse wurden mit 25, 50 oder 100 Zerkarien des bras. und lib. *S. mansoni* Stammes infiziert und die Aufnahmen 8 Wochen p.i. erstellt. **(A)** bras. Stamm **(B)** lib. Stamm **(C)** Naive. p.i. = *post infectionem*; bras. = brasilianisch; lib. = liberianisch.

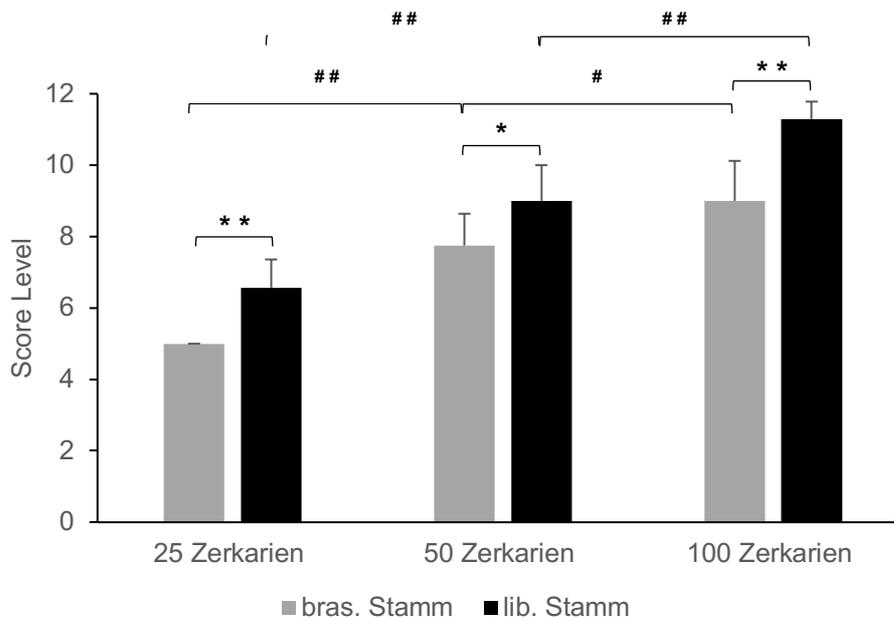


Abbildung 9: Makroskopischer Leberscore. Weibliche NMRI Mäuse wurden mit 25, 50 oder 100 Zerkarien des bras. und lib. *S. mansoni* Stammes infiziert und der Score 8 Wochen p.i. erhoben (genauere Übersicht über die 5 Parameter des Scoring-Systems in Tabelle 5). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung für den bras. Stamm (25 und 50 Zerkarien jeweils n=8, 100 Zerkarien n=9) und den lib. Stamm (25, 50 und 100 Zerkarien jeweils n=7). * p<0,05 bzw. ** p<0,01 (lib. Stamm vs. bras. Stamm). Der Score korreliert mit der initialen Infektionsdosis. # p<0,05 bzw. ## p<0,01 (zwischen den einzelnen Infektionsstärken). p.i. = *post infectionem*; bras. = brasilianisch; lib. = liberianisch; n = Anzahl der Mäuse.

Auch das Ausmaß der Hepatosplenomegalie (charakterisiert durch die Leber- und Milzindices in Abbildung 10 und 11) war in allen Infektionsstärken beim liberianischen Stamm deutlich ausgeprägter als beim brasilianischen Vergleichsstamm. Das Verhältnis von Leber in Relation zum Gesamtgewicht der Maus war in allen drei Infektionsstärken beim liberianischen Stamm signifikant höher (Abbildung 10). Insgesamt korrelierte die Lebervergrößerung in allen drei Infektionsstärken mit der initialen Infektionsdosis.

Nach Infektion mit dem brasilianischen Stamm war die Gewichtszunahme der Leber zwischen der Infektionsdosis 25 ($0,052 \pm 0,008$) zu 50 Zerkarien ($0,062 \pm 0,005$) signifikant, wohingegen beim liberianischen Stamm ein signifikanter Unterschied zwischen 50 ($0,073 \pm 0,007$) und 100 ($0,093 \pm 0,009$) Zerkarien festgestellt werden konnte.

Auch die Milzvergrößerung war beim brasilianischen Stamm geringer ausgeprägt, und wieder orientierte sich die Gewichtszunahme der Milz an der initialen Infektionsdosis.

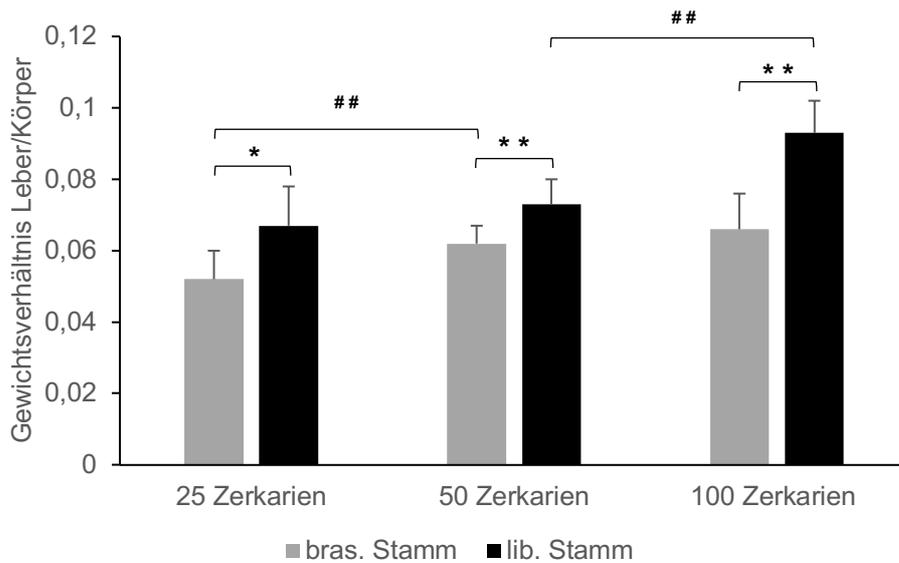


Abbildung 10: Leberindices. Weibliche NMRI Mäuse wurden mit 25, 50 oder 100 Zerkarien des bras. und lib. *S. mansoni* Stammes infiziert und das Verhältnis der Gewichte von Leber zu Gesamtkörpergewicht 8 Wochen p.i. ermittelt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung für den bras. Stamm (25 und 50 Zerkarien jeweils n=8, 100 Zerkarien n=9), den lib. Stamm (25, 50 und 100 Zerkarien jeweils n=7) und Naive (n=9). * p<0,05 bzw. ** p<0,01 (lib. Stamm vs. bras. Stamm). Die Gewichtszunahme im Verhältnis zum Gesamtkörpergewicht korreliert mit der initialen Infektionsdosis. ## p<0,01 (zwischen den einzelnen Infektionsstärken). p.i. = *post infectionem*; bras. = brasilianisch; lib. = liberianisch; n = Anzahl der Mäuse.

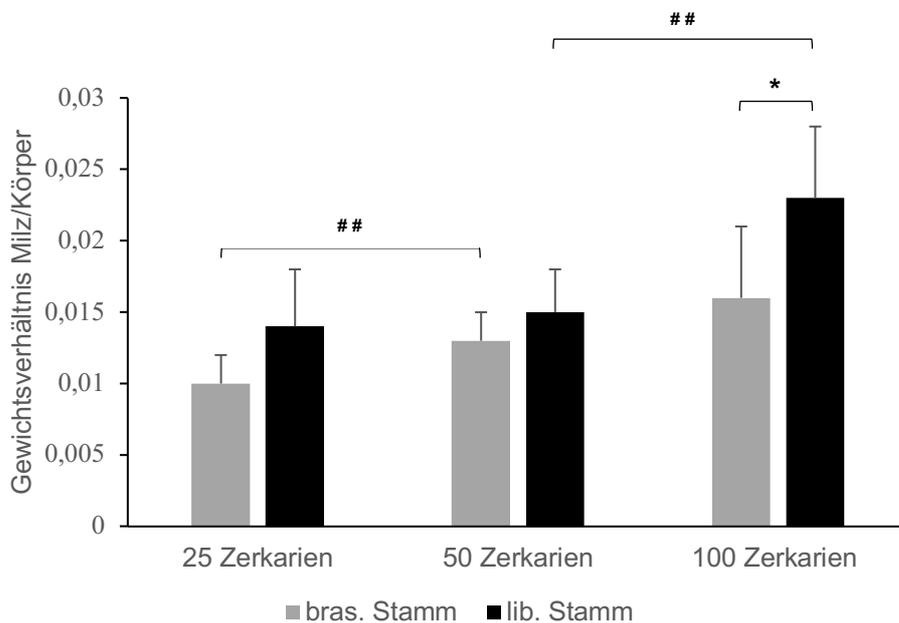


Abbildung 11: Milzindices. Weibliche NMRI Mäuse wurden mit 25, 50 oder 100 Zerkarien des bras. und lib. *S. mansoni* Stammes infiziert und das Verhältnis der Gewichte von Milz zu Gesamtkörpergewicht 8 Wochen p.i. ermittelt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung für den bras. Stamm (25 und 50 Zerkarien jeweils n=8, 100 Zerkarien n=9), den lib. Stamm (25, 50 und 100 Zerkarien jeweils n=7) und Naive (n=9). * p<0,05 (lib. Stamm vs. bras. Stamm). Die Gewichtszunahme der Milz im Verhältnis zum Gesamtkörpergewicht korreliert mit der initialen Infektionsdosis. ## p<0,01 (zwischen den einzelnen Infektionsstärken). p.i. = *post infectionem*; bras. = brasilianisch; lib. = liberianisch; n = Anzahl der Mäuse.

3.3.2 Makroskopische Veränderungen des Darmes

In Bezug auf makroskopisch feststellbare Veränderungen im Bereich des Darmes infolge einer Infektion mit 100 Zerkarien verursachte der brasilianische *S. mansoni* Stamm acht Wochen p.i. deutlich stärkere Veränderungen als der liberianische Stamm.

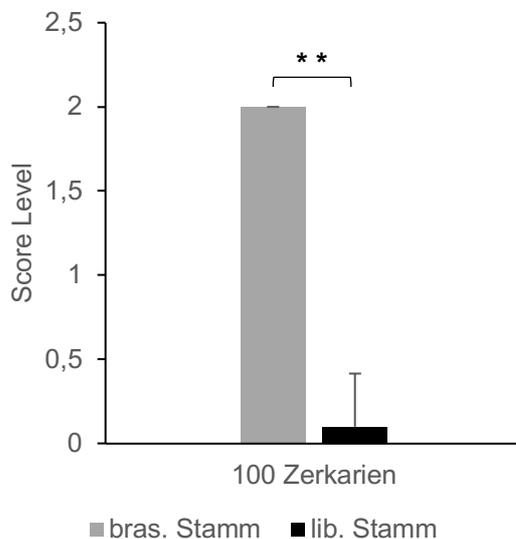
Morphologische Veränderungen des Darmes wurden anhand der präparierten Därme infizierter Mäuse (Abbildung 12A) mittels eines Scores (siehe hierzu Kapitel 2.5.2) bewertet. Die Därme der Mäuse, die mit dem brasilianischen Stamm infiziert wurden, wiesen im Vergleich deutlich mehr entzündliche Nekrosen und Granulome auf. Dies resultierte darin, dass der brasilianische Stamm mit einer Punktzahl von 2 ± 0 einen signifikant höheren Wert erzielte als der liberianische Stamm mit $0,1 \pm 0,32$ Punkten (Abbildung 12B).

Entsprechende Ergebnisse ergaben sich auch bei Auswertung der Darmindices (Abbildung 12C), bei denen die Darmgewichte jeweils in Bezug zum Gesamtgewicht der Maus gesetzt wurden. Die Därme der mit dem brasilianischen Stamm infizierten Mäuse machten einen signifikant höheren Anteil am Gesamtgewicht der Maus aus ($0,179 \pm 0,023$), verglichen mit den Mäusen, die mit dem liberianischen Stamm infiziert wurden ($0,127 \pm 0,021$). Bei beiden Stämmen war dieser Indexwert im Vergleich zur Kontrolle ($0,090 \pm 0,009$) signifikant erhöht.

A



B



C

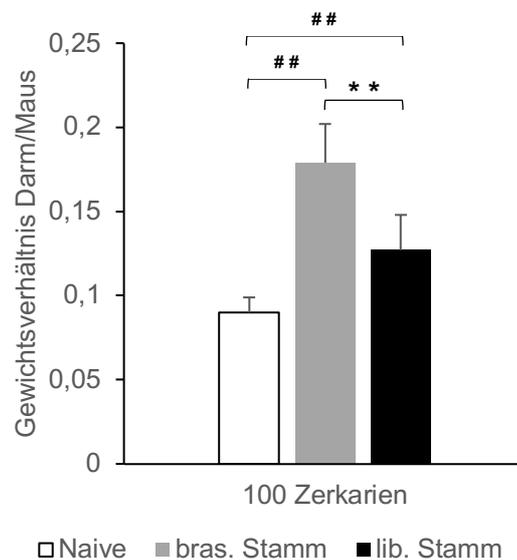


Abbildung 12: Makroskopische Veränderungen des Darmes. Weibliche NMRI Mäuse wurden mit 100 Zerkarien des bras. und lib. *S. mansoni* Stammes infiziert und die Ergebnisse 8 Wochen p.i. erhoben. **(A) Repräsentative Bilder vom Darm.** **(B) Darmscore** (genauere Übersicht über die 2 Parameter des Scoring-Systems in Kapitel 2.5.2). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 8 Mäusen (bras. Stamm) und 10 Mäusen (lib. Stamm). ** $p < 0,01$ (bras. Stamm vs. lib. Stamm). **(C) Darmindizes.** Abgebildet ist das Verhältnis der Gewichte von Darm zum Gesamtkörpergewicht der Maus. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 8 Mäusen (bras. Stamm), 10 Mäusen (lib. Stamm) und 6 Mäusen (Naive). ** $p < 0,01$ (bras. Stamm vs. lib. Stamm). ## $p < 0,01$ (lib. und bras. Stamm vs. Kontrolle). p.i. = *post infectionem*; bras. = brasilianisch; lib. = liberianisch.

3.4 Mikroskopische Veränderungen in Leber- und Darmgewebe

3.4.1 Auswertung der Granulomgröße in Leber und Darm

Die morphometrische Analyse der Eigranulome im Leber- und Darmgewebe wurde acht Wochen p.i. anhand von Gewebeschnitten durchgeführt (Abbildung 13A und Abbildung 14A).

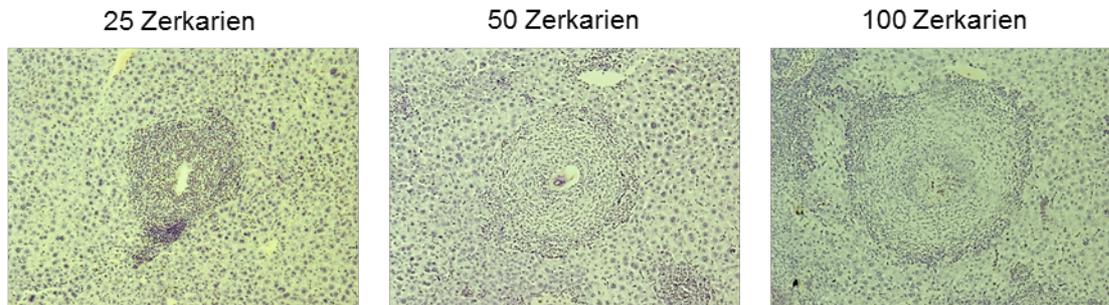
Bei beiden *S. mansoni* Stämmen zeigte sich eine positive Korrelation zwischen initialer Infektionsdosis und Zunahme der Granulomgröße (Abbildung 13B).

Bei dem liberianischen *S. mansoni* Stamm war dieser Anstieg zwischen allen drei Infektionsdosen jeweils signifikant. Bei dem brasilianischen Stamm war lediglich der Größenunterschied zwischen den Infektionsdosen 50 und 100 Zerkarien signifikant.

Im direkten Vergleich beider Stämme bei identischen Infektionsstärken verursachte der brasilianische Stamm in der niedrigsten (25) und mittleren Infektionsstärke (50) größere hepatische Granulome als der liberianische Stamm, wobei der Unterschied in der Infektionsstärke mit 25 Zerkarien mit $171,2 \pm 6,6 \mu\text{m}^2$ (brasilianischer Stamm) zu $150,9 \pm 17,9 \mu\text{m}^2$ (liberianischer Stamm) signifikant war. In der höchsten Infektionsdosis mit 300 Zerkarien hingegen waren die Granulome im Lebergewebe der Mäuse, die mit dem liberianischen Stamm infiziert wurden, mit einer durchschnittlichen Größe von $187,2 \pm 5,8 \mu\text{m}^2$ im Vergleich zu $178,7 \pm 7,1 \mu\text{m}^2$ (brasilianischer Stamm) signifikant größer.

In der Auswertung der intestinalen Granulome (Abbildung 14B) wies der brasilianische Stamm mit einer durchschnittlichen Granulomgröße von $180,0 \pm 5,1 \mu\text{m}^2$ einen signifikant höheren Wert auf als die intestinalen Granulome der mit dem liberianischen Stamm infizierten Mäuse ($172,6 \pm 6,4 \mu\text{m}^2$).

A

Brasilianischer *S. mansoni* StammLiberianischer *S. mansoni* Stamm

B

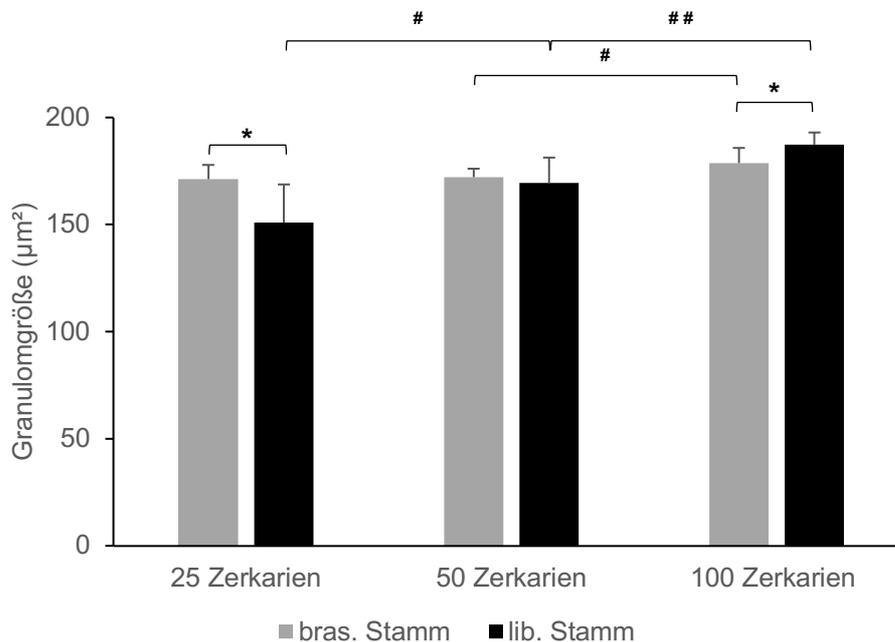


Abbildung 13: Hepatische Granulome. Weibliche NMRI Mäuse wurden mit 25, 50 oder 100 Zerkarien des bras. und lib. *S. mansoni* Stammes infiziert und die Ergebnisse 8 Wochen p.i. erhoben. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung für den bras. Stamm (25 und 50 Zerkarien jeweils n=8, 100 Zerkarien n=9) und den lib. Stamm (25, 50 und 100 Zerkarien jeweils n=7). **(A) Granulombilder.** Dargestellt sind Granulome repräsentativer Leberschnitte (Hämatoxylin/Eosin Färbung, H&E) bei 100-facher Vergrößerung. **(B) Granulomgröße.** * p<0,05 (lib. Stamm vs. bras. Stamm). Die Größenzunahme der Granulome korreliert mit der initialen Infektionsdosis. # p<0,05 bzw. ## p<0,01 (zwischen den einzelnen Infektionsstärken). p.i. = *post infectionem*; bras. = brasilianisch; lib. = liberianisch; n = Anzahl der Mäuse.

A

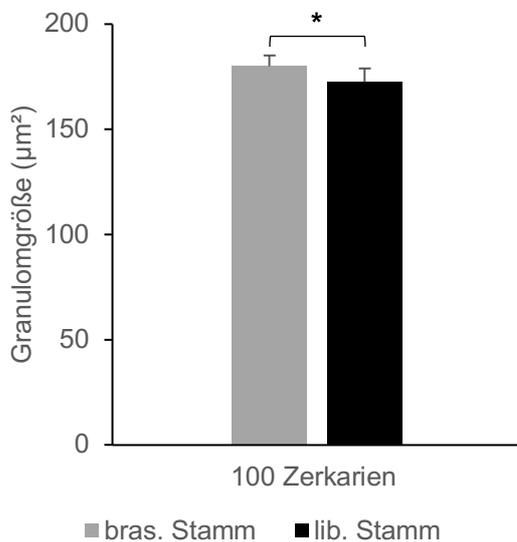
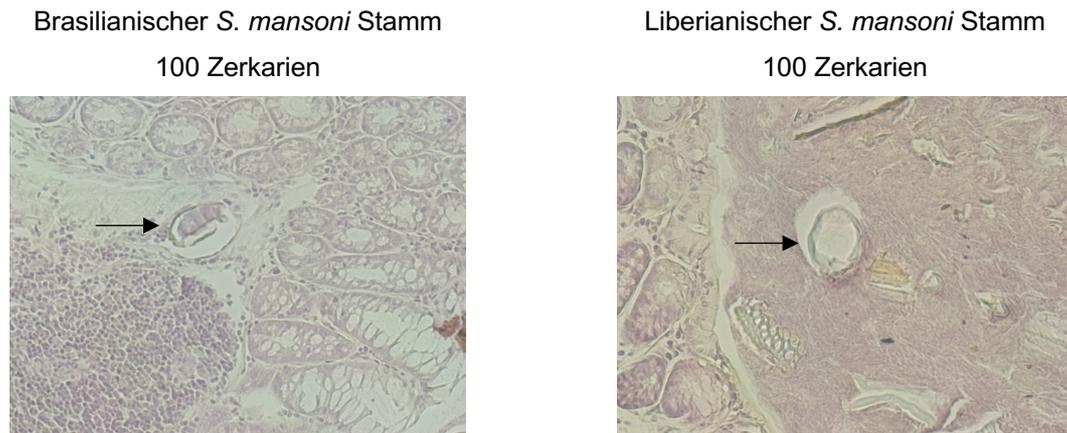


Abbildung 14: Intestinale Granulome. Weibliche NMRI Mäuse wurden mit 100 Zerkarien des bras. und lib. *S. mansoni* Stammes infiziert und die Ergebnisse im Darm 8 Wochen p.i. bestimmt. **(A) Granulombilder.** Darstellung repräsentativer Granulome (→) in Darmschnitten (Hämatoxylin/Eosin Färbung, H&E) bei 100-facher Vergrößerung. **(B) Granulomgröße.** Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 8 Mäusen (bras. Stamm) und 10 Mäusen (lib. Stamm). * $p < 0,05$ (bras. Stamm vs. lib. Stamm). p.i. = *post infectionem*; bras. = brasilianisch; lib. = liberianisch.

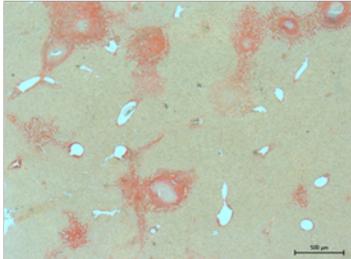
3.4.2 Quantifizierung der Fibrose in Leber und Darm

Das Ausmaß der Fibrose im Lebergewebe wurde acht Wochen p.i. anhand von Leberschnitten (Abbildung 15) bestimmt. Der Anteil fibrotischer Areale (Sirius Red Färbung, SR) wurde ins Verhältnis zum ungefärbten Zytoplasma gesetzt und so ein prozentualer Anteil berechnet (Abbildung 16). Bei beiden *S. mansoni* Stämmen konnte eine positive Korrelation zwischen initialer Infektionsdosis und dem Fibrosegrad beobachtet werden. Im Vergleich von brasilianischem und liberianischem Stamm ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

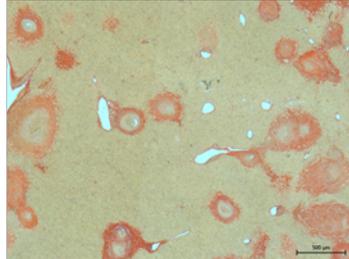
Im Darmgewebe ließ sich das Ausmaß der Fibrose nicht auf dieselbe Weise ermitteln. Aufgrund der Beschaffenheit bzw. Kontraktilität des Gewebes erwiesen sich die Darmpräparate als ungeeignet.

Brasilianischer *S. mansoni* Stamm

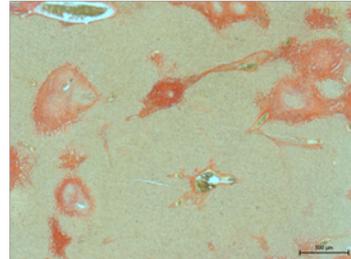
25 Zerkarien



50 Zerkarien

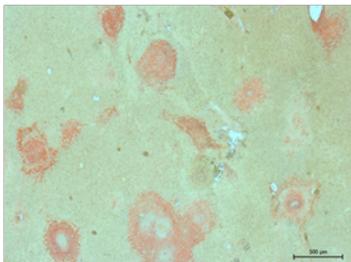


100 Zerkarien

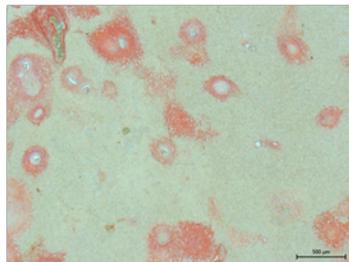


Liberianischer *S. mansoni* Stamm

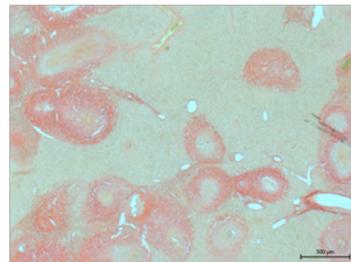
25 Zerkarien



50 Zerkarien



100 Zerkarien



Uninfizierte Kontrolle

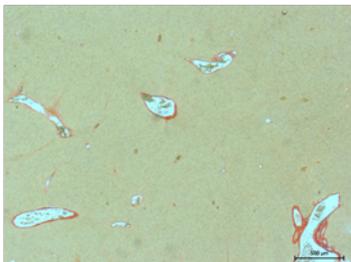


Abbildung 15: Übersicht repräsentativer Abbildungen der Fibrose im Lebergewebe. Weibliche NMRI Mäuse wurden mit 25, 50 oder 100 Zerkarien des bras. und lib. *S. mansoni* Stammes infiziert. Dargestellt sind repräsentative Leberschnitte 8 Wochen p.i. bei 25-facher Vergrößerung (Sirius Red Färbung, SR). Fibrosierte Areale sind durch Sirius Red rot angefärbt.

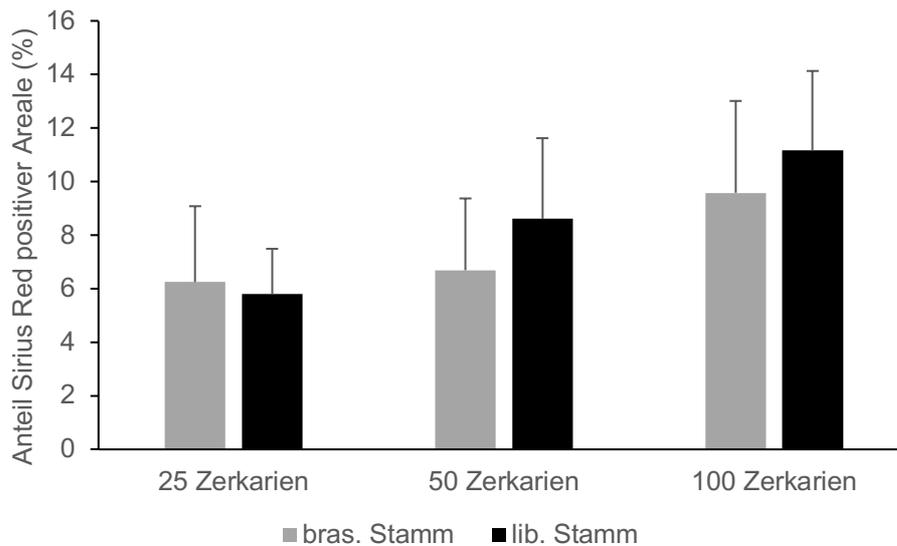


Abbildung 16: Fibrosegrad im Lebergewebe. Weibliche NMRI Mäuse wurden mit 25, 50 oder 100 Zerkarien des bras. und lib. *S. mansoni* Stammes infiziert und der Anteil Sirius Red gefärbter, fibrotischer Areale im Verhältnis zum Gesamtzytoplasma 8 Wochen p.i. bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung für den bras. Stamm (25 Zerkarien n=7, 50 Zerkarien n=8 und 100 Zerkarien n=9) und den lib. Stamm (25, 50 und 100 Zerkarien jeweils n=7). Die Zunahme des Fibrosegrades korreliert mit der initialen Infektionsdosis. p.i. = *post infectionem*; bras. = brasilianisch; lib. = liberianisch; n = Anzahl der Mäuse.

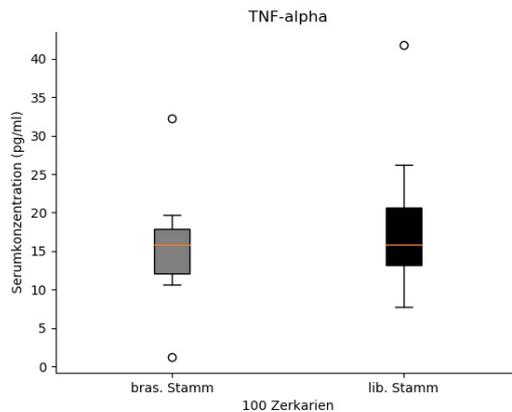
3.5 Analyse des Th1/Th2 Serum-Zytokinspiegels

Die Serumkonzentrationen der Th1-Zytokine TNF- α und IFN- γ sowie der beiden Th2-Zytokine IL-13 und IL-4 wurden acht Wochen p.i. mittels des Procartaplex Multiple Immunoassays bestimmt (Abbildung 17). Untersucht wurde jeweils nach einer Infektion mit 100 Zerkarien pro Maus. Aufgrund eines Messfehlers wurde bei IL-13 ein Messwert des brasilianischen Stammes ausgeschlossen.

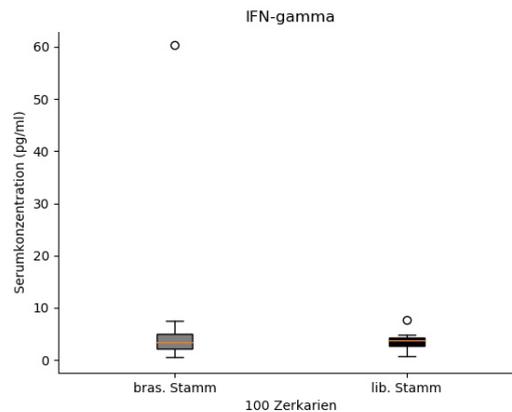
Bei keinem der vier untersuchten Zytokine ergaben sich im direkten Vergleich signifikante Unterschiede zwischen den beiden untersuchten *S. mansoni* Stämmen.

Th1-Antwort

A

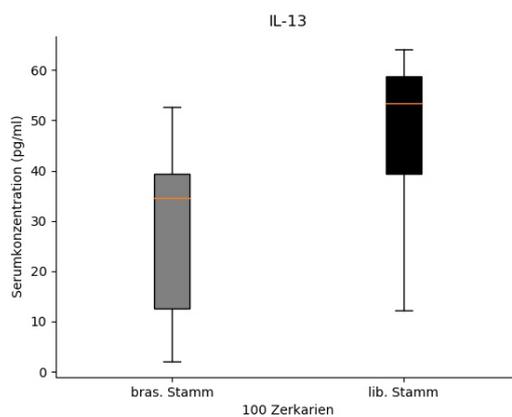


B



Th2-Antwort

C



D

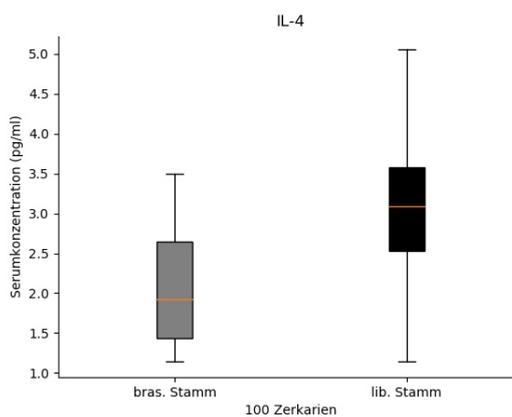


Abbildung 17: Serumspiegel der Th1- und Th2-Zytokine. Weibliche NMRI Mäuse wurden mit 100 Zerkarien des bras. und lib. *S. mansoni* Stammes infiziert und das Serumlevel der untersuchten Zytokine 8 Wochen p.i. bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung der Th1-Antwort **(A) TNF- α** (bras. Stamm n=8; lib. Stamm n=7) und **(B) IFN- γ** (bras. Stamm n=8; lib. Stamm n=7) sowie der Th2-Antwort **(C) IL-13** (bras. Stamm n=7*; lib. Stamm n=7) und **(D) IL-4** (bras. Stamm n=8; lib. Stamm n=7). * Ein Messwert wurde aufgrund eines Messfehlers aus der Bewertung ausgeschlossen. p.i. = *post infectionem*; bras. = brasilianisch; lib. = liberianisch; n = Anzahl der Mäuse; IFN- γ = Interferon-gamma; TNF- α = Tumornekrosefaktor-alpha; IL-13 = Interleukin 13; IL-4 = Interleukin 4.

3.6 Auswertung der mRNA-Expressionsanalysen

Aufgrund der festgestellten makroskopischen und histologischen Unterschiede im Bereich des Darmes wurden mRNA-Expressionsanalysen proinflammatorischer Zytokine im Darmgewebe durchgeführt. Hierfür wurde acht Wochen p.i. das Expressionslevel der Zytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β anhand von Gewebeproben des

Darmes bestimmt (Abbildung 18). Bei IL-1 β wurde ein Messwert des liberianischen Stammes wegen eines Messfehlers aus der Bewertung ausgeschlossen.

Bei allen drei untersuchten Zytokinen war die mRNA-Expression im Darmgewebe infolge einer Infektion mit dem brasilianischen oder liberianischen *S. mansoni* Stamm im Vergleich zu den uninfizierten Negativkontrollen erhöht. Dabei war der Unterschied bei IL-6 und IL-1 β jeweils statistisch signifikant, wohingegen bei TNF- α lediglich eine nicht signifikante Erhöhung vorlag.

Im direkten Vergleich der beiden *S. mansoni*-Stämme zeigte der liberianische Stamm erhöhte Expressionslevel bei den beiden Zytokinen TNF- α und IL-6. Die Erhöhung von IL-6 war mit durchschnittlich $85,09 \pm 52,23$ beim liberianischen Stamm zu $39,43 \pm 18,22$ beim brasilianischen Stamm statistisch signifikant. Beim TNF- α hingegen lag lediglich ein nicht signifikanter Unterschied von $2,98 \pm 1,76$ beim liberianischen Stamm gegenüber $2,05 \pm 0,49$ beim brasilianischen Stamm vor.

Bei IL-1 β wiederum war es der brasilianische Stamm, der mit einem durchschnittlichen Expressionslevel von $3,06 \pm 1,60$ eine nicht signifikante Erhöhung im Vergleich zum liberianischen Stamm mit $2,85 \pm 1,55$ aufwies.

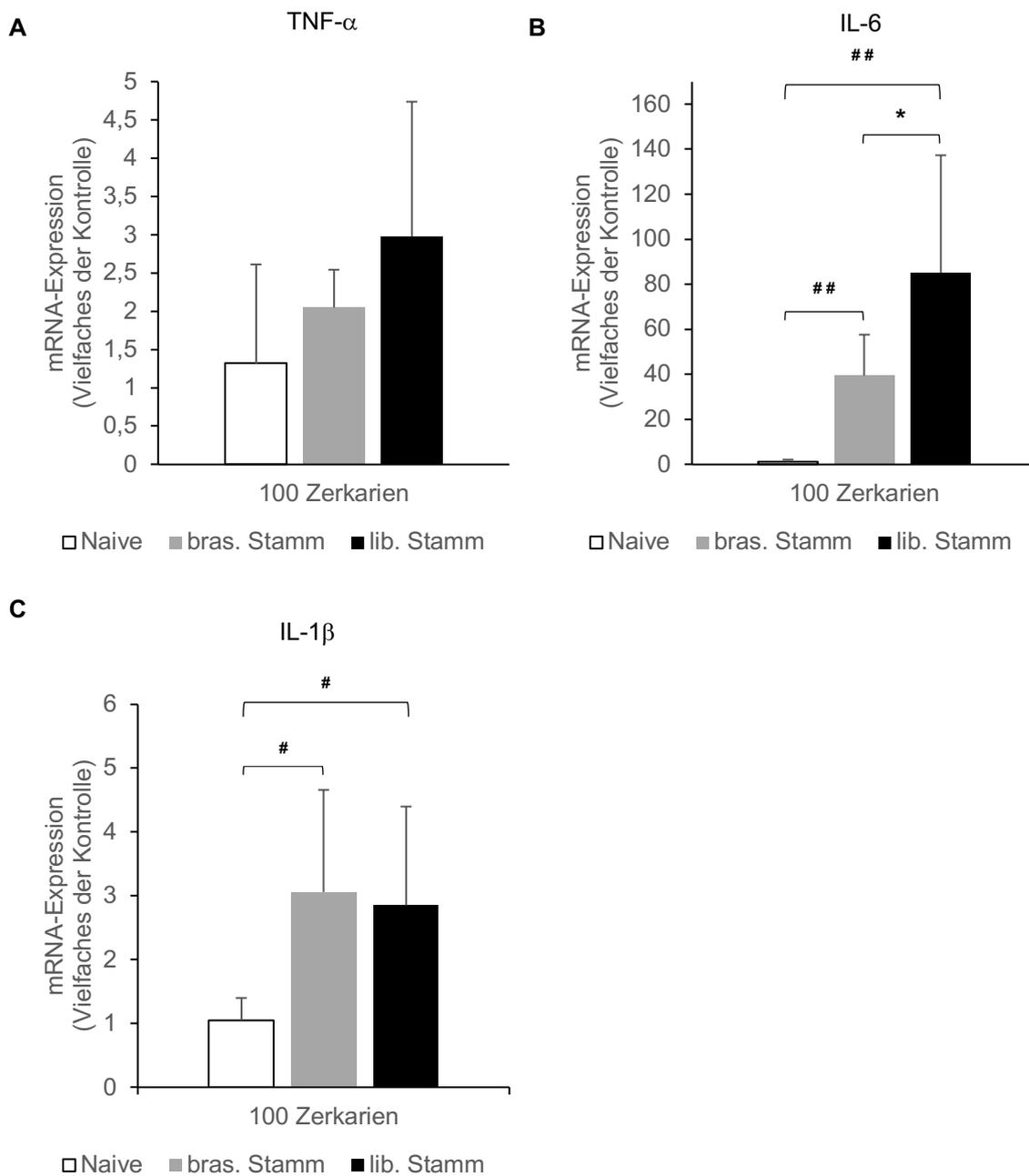


Abbildung 18: mRNA-Expression im Darmgewebe. Weibliche NMRI Mäuse wurden mit 100 Zerkarien des bras. und lib. *S. mansoni* Stammes infiziert und die Ergebnisse 8 Wochen p.i. erhoben. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung der untersuchten Zytokine als Vielfaches der Kontrolle GAPDH. **(A) TNF- α** und **(B) IL-6** (bras. Stamm n=8; lib. Stamm n=8; Naive n=6) und **(C) IL-1 β** (bras. Stamm n=8; lib. Stamm n=7; Naive n=6). * p<0,05 (bras. Stamm vs. lib. Stamm). # p<0,05 bzw. ## p<0,01 (lib. und bras. Stamm vs. Kontrolle). p.i. = *post infectionem*; bras. = brasilianisch; lib. = liberianisch; n = Anzahl der Mäuse; TNF- α = Tumornekrosefaktor-alpha; IL-6 = Interleukin 6; IL-1 β = Interleukin 1 beta.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Hypothese zu überprüfen, ob der brasilianische *S. mansoni* Stamm (Belo Horizonte) pathogener ist im Vergleich zum westafrikanischen Vergleichsstamm (Liberia).

In allen Analysen ergab sich zunächst eine positive Korrelation zwischen initialer Infektionsdosis und daraus resultierenden pathophysiologischen Veränderungen. Zudem konnte gezeigt werden, dass der liberianische Stamm eine höhere Infektiosität (Gesamtwurmlast) erreicht als der brasilianische. Trotz dieser Tatsache konnte bei einer Infektion mit dem brasilianischen Stamm eine 40-fach höhere Eilast im Darmgewebe nachgewiesen werden.

Des Weiteren ergaben die Analysen, dass der liberianische Stamm im Vergleich zum brasilianischen Stamm ausgeprägte makroskopische Veränderungen von Leber und Milz hervorruft. Da sich auf histologischer Ebene jedoch in diesen Bereichen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Stämmen zeigten, sind die stärkeren Pathologien vermutlich auf eine deutlichere Th1-Reaktion des Wirtes infolge einer Infektion mit dem liberianischen *S. mansoni* Stamm zurückzuführen.

Im Bereich des Darmes hingegen verursachte der brasilianische Stamm sowohl makroskopisch als auch histologisch stärkere Pathologien. Es stellte sich allerdings durch mRNA-Expressionsanalysen des Darmgewebes heraus, dass diese nicht durch eine ausgeprägte Th1-Reaktion des brasilianischen Stammes ausgelöst werden. Vielmehr war es der liberianische Stamm, der den Wirt zu einer vermehrten Produktion proinflammatorischer Zytokine anregte. Ein Erklärungsansatz könnte im Lebenszyklus der Parasiten liegen. Aufgrund der stärkeren inflammatorischen Reaktion des Wirtes, ausgelöst durch den liberianischen Stamm, konnten dessen Eier leichter die Darmwand passieren und ausgeschieden werden. Umgekehrt verblieben die Eier des brasilianischen Stammes länger im Wirt und konnten somit die ausgeprägten Darmschädigungen verursachen.

4.1 Diskussion der Methodik

Erste Studien zur Schistosomiasis, in denen Mäuse als Modellorganismen verwendet werden, stammen bereits aus dem Jahr 1915 (60). Der Infektionszyklus des brasilianischen *S. mansoni* Stammes (Belo Horizonte) mit *Biomphalaria glabrata* als Zwischen- und NMRI Mäusen als Endwirt wird seit etwa fünf Jahren im parasitologischen Forschungslabor der Universitätsmedizin Rostock verwendet. Zuvor wurde der Zyklus über Jahrzehnte mit einem afrikanischen (Mozambique) *S. mansoni* Stamm aufrechterhalten. Diese Umstellung erforderte erhebliche Anpassungsmaßnahmen. Der Infektionsvorgang der Schnecken wurde nicht mehr mit Hilfe von Kotproben infizierter Mäuse über sieben Tage lang durchgeführt, sondern nur noch einmalig durch die Zugabe von Quetschpräparaten von Lebern und Teilen des Darmes infizierter Mäuse. Auch mussten die Infektionsdosen herabgesetzt werden, da die Mäuse deutlich früher verstarben. Eine unterschiedliche Pathogenität der beiden Stämme wurde vermutet, bis dato allerdings nicht näher erforscht. Die Untersuchung eben dieser Fragestellung stand im Zentrum dieser Arbeit. Da der ursprünglich verwendete afrikanische *S. mansoni* Stamm aus Mozambique nicht zu beschaffen war, wurden die vergleichenden Analysen mit einem westafrikanischen (Liberia) *S. mansoni* Stamm einer kollaborierenden Arbeitsgruppe unter der Leitung von Prof. Christoph Grevelding (Institut für Parasitologie in Gießen) durchgeführt. Selbstverständlich unterscheidet sich der Verlauf der Schistosomiasis bei Mensch und Maus in einigen Punkten. Dies muss bei der Übertragung von Ergebnissen auf den Menschen bedacht werden (16,31,61). Dennoch sind sich die grundsätzlichen immunologischen Vorgänge bei Mensch und Maus sehr ähnlich. Nicht zuletzt aus ethischer Sicht stellen Mäuse daher einen guten Modellorganismus für die Erforschung der Schistosomiasis dar (62).

4.2 Vergleich der Infektiosität der *Schistosoma mansoni* Stämme

Sechs Wochen p.i. konnte, verglichen mit dem brasilianischen Stamm, im Gefäßsystem der Leber und des Darmes eine signifikant höhere Anzahl adulter Würmer des liberianischen Stammes festgestellt werden. Da die Infektionen unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt wurden (63), deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sich der liberianische Stamm leichter in den NMRI Mäusen etablieren lässt als der brasilianische Vergleichsstamm, und der liberianische Stamm somit eine

höhere Infektiosität besitzt. Eine geringe Wurmlast bzw. Infektiosität beim Stamm aus Belo Horizonte konnte bereits in einer Studie aus dem Jahr 2012 nachgewiesen werden (64). Für diese wurden weibliche SPF-Mäuse infiziert und die Anzahl adulter Würmer acht Wochen p.i. bestimmt. Verglichen wurden neben dem Stamm aus Belo Horizonte noch zwei weitere brasilianische Stämme aus dem Bundesstaat São Paulo (Vale do Rio Paraíba; Jardim São Domingos, Campinas). Sowohl bezüglich der ermittelten Gesamtwurmlast als auch hinsichtlich der Wurmanzahl im Verhältnis zur eingesetzten Zerkarienmenge war der Stamm aus Belo Horizonte den anderen beiden signifikant unterlegen.

Bedacht werden muss bei der Bewertung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass durch die Verwendung der Gesamtwurmlast als alleinigen Indikator für die Infektiosität ein Teilaspekt außer Acht gelassen wird: Der Anteil penetrierender Zerkarien, der sich zu adulten Würmern entwickelt, ist nicht bei allen Schistosomen-Arten identisch (65). Da jedoch nicht eingedrungene Zerkarien, sondern die von herangereiften Weibchen abgelegten Eier die schwerwiegenden Veränderungen im Rahmen der chronischen Schistosomiasis auslösen (1,66), stellt letztendlich die Anzahl adulter Wurmpaare den entscheidenden Faktor zur Beurteilung der Infektiosität dar.

4.3 Bewertung der Eilast in Leber und Darm

Trotz der signifikant geringeren Wurmlast führte der brasilianische Stamm acht Wochen p.i. zu einer in Summe deutlich höheren Eizahl als der liberianische Stamm. Ausgewertet wurde die Eimenge in den in erster Linie betroffenen Organen Leber und Darm (2,67). Während sich die Unterschiede in der Leber noch in allen drei Infektionsstärken als unerheblich darstellten, fand sich im Darmgewebe infolge einer Infektion mit dem brasilianischen Stamm eine 40-fach höhere Menge an Eiern als beim liberianischen Vergleichsstamm. Somit lässt sich die anfangs gestellte Frage, ob ein hohes Maß an Infektiosität gleichbedeutend mit einer hohen Eianzahl ist, anhand der vorliegenden Daten verneinen. Die Ergebnisse könnten auf eine erhöhte Reproduktivität des brasilianischen Stammes hinweisen, die in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestimmt wurde. Hierfür wären andere Untersuchungen notwendig,

beispielsweise eine Kultur der Würmer und eine Analyse der Eizahl unter in vitro Bedingungen.

Des Weiteren führte eine höhere Infektionsdosis bei beiden *S. mansoni* Stämmen zu einer erhöhten Eizahl in der Leber. Dies ist schlüssig, da aus einer größeren Menge von Zerkarien eine höhere Anzahl adulter Würmer entsteht. Dass diese Korrelation in gewissen Grenzen Bestand hat, ist in der Literatur beschrieben (68).

Die ähnliche Eizahl in der Leber und die wiederum signifikant unterschiedliche Summe an Eiern im Darm könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Anteil der via Blutstrom zur Leber transportierten Eier beim liberianischen Stamm deutlich höher ist als beim brasilianischen. Möglicherweise sind die Eier des brasilianischen Stammes durch den Stachel stärker im Bereich des Darmes verankert. Untersuchungen in diese Richtung sollten Bestandteil zukünftiger Studien sein.

4.4 Auswirkungen der beiden *Schistosoma mansoni* Stämme und deren unterschiedliche Infektionsstärken auf den Krankheitsverlauf

4.4.1 Untersuchung der hepatolienalen Schistosomiasis

Im Rahmen der hepatolienalen Schistosomiasis kommt es zu pathophysiologischen Veränderungen im Bereich von Leber und Milz. Diese sind auf Parasiteneier zurückzuführen, die sich in den präsinusoidalen Pfortaderästen des Wirtes verfangen und in der Folge zur Entstehung hepatischer Granulome und dem Einsetzen fibrotischer Prozesse im Lebergewebe führen (2,16).

In der vorliegenden Arbeit verursachte der liberianische *S. mansoni* Stamm acht Wochen p.i.in allen drei Infektionsstärken im Bereich dieser beiden Organe ausgeprägte makroskopische Veränderungen. So war das Ausmaß der Hepatosplenomegalie, bestimmt als relative Gewichtszunahme von Leber und Milz im Verhältnis zum Körpergewicht, beim liberianischen Stamm signifikant stärker ausgeprägt als beim brasilianischen Stamm. Ebenso wies die Leberoberfläche infolge einer Infektion mit dem liberianischen Stamm unter anderem mehr makronoduläre Knoten auf und war in ihrer Konsistenz deutlich härter. Sowohl die Granulombildung, reguliert durch CD4+ T-Lymphozyten und deren Zytokine (23), als auch die

Fibrosierung werden in der Literatur als mitverantwortliche Auslöser für die Vergrößerung von Leber und Milz im Rahmen der hepatolienalen Schistosomiasis genannt (21,69). Während hepatische Granulome eine allmähliche Vergrößerung der Leber bedingen, führen fibrotische Gefäßverschlüsse über portale Hypertension und Hyperplasie des retikuloendothelialen Systems zur Splenomegalie (31,70). Vor diesem Hintergrund können die histologischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht die signifikanten makroskopischen Unterschiede zwischen den beiden Parasitenstämmen erklären. Denn das Ausmaß der Fibrose war in den drei untersuchten Infektionsstärken bei beiden *S. mansoni* Stämmen auf einem ähnlichen Niveau. Zudem ergab sich bei der Auswertung der Granulomgröße ein heterogenes Bild. Während der brasilianische Stamm in den Infektionsstärken 25 und 50 Zerkarien größere Granulome verursachte, erzeugte der liberianische Stamm in der Infektionsstärke mit 100 Zerkarien signifikant größere Granulome. Da die ermittelte Eimenge im Lebergewebe bei beiden Parasitenstämmen in allen Infektionsstärken jeweils vergleichbar war, scheinen die verschiedenen Krankheitsausprägungen in diesen Organen direkt auf individuelle Unterschiede der beiden Parasitenstämme zurückzuführen zu sein. Daher könnten die Ergebnisse darauf hinweisen, dass der liberianische Stamm eine stärkere inflammatorische Wirkung auf den Wirtsorganismus ausübt, als es beim brasilianischen Stamm der Fall ist. Hierdurch ließen sich die größeren Indizes von Leber und Milz infolge einer Infektion mit dem liberianischen *S. mansoni* Stamm erklären. Beim Vergleich der verschiedenen Infektionsstärken miteinander ergab sich ein einheitliches Bild. Das Ausmaß makroskopischer Pathologien von Leber und Milz korrelierte mit der eingesetzten Infektionsstärke, wobei insbesondere im Scoring-System der Leber die Unterschiede stets signifikant waren. Ebenso konnte auf histologischer Ebene eine stetige Zunahme der Granulomgröße und des Fibrosegrades festgestellt werden, wobei die Unterschiede nicht immer signifikant waren.

4.4.2 Untersuchung der intestinalen Schistosomiasis

Da die vermutete stärkere Pathogenität des brasilianischen Stammes durch die Untersuchungen von Lebern und Milzen nicht bestätigt werden konnte, wurden infektionsbedingte Veränderungen des Darmes analysiert. Pathologien im Bereich des Darmes manifestieren sich im Rahmen einer chronischen Schistosomiasis in erster

Linie im Dickdarm (71). Neben Granulomen und Fibrosierungsprozessen können die ausgelösten Entzündungen auch zu Ulzerationen führen (16,72).

In der vorliegenden Arbeit verursachte der brasilianische *S. mansoni* Stamm acht Wochen p.i. sowohl auf makroskopischer als auch auf histologischer Ebene stärkere Veränderungen in diesem Bereich. So konnten infolge einer Infektion mit dem brasilianischen Stamm eine starke Erhöhung des relativen Darmgewichtes sowie deutlich mehr Nekrosen und intestinale Granulome als beim liberianischen Stamm festgestellt werden. Zudem waren die intestinalen Granulome des brasilianischen Stammes signifikant größer als beim liberianischen Stamm.

Bei isolierter Betrachtung der Ergebnisse des Darmes könnte daher vermutet werden, dass der brasilianische *S. mansoni* Stamm eine stärkere Th1-Reaktion auslöst und die stärkeren Pathologien im Bereich des Darmes damit zu erklären sind.

Allerdings würden die Erkenntnisse aus den Bereichen Leber und Milz dieser Annahme widersprechen. Diese deuten eher auf eine starke proinflammatorische Reaktion des liberianischen Stammes hin. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte im Lebenszyklus von *S. mansoni* liegen. Dessen Eier lösen notwendigerweise Entzündungsreaktionen im Bereich des Darmes aus, um die Darmwand zu passieren und schließlich mit dem Faeces ausgeschieden zu werden (1). Unter der Annahme, dass der liberianische Stamm eine stärkere inflammatorische Immunreaktion des Wirtes verursacht, würden dessen Eier deutlich kürzer im Darmbereich verbleiben. Umgekehrt könnten die Eier des brasilianischen Stammes aufgrund der längeren Verweildauer im Darm ausgeprägte intestinale Pathologien hervorrufen. Diese These würde auch die deutlich geringere Menge an Eiern des liberianischen Stammes im Darmgewebe erklären.

4.5 Analyse der Th1/Th2-Antwort

Um den Erklärungsansatz zu stützen, dass der liberianische Stamm eine stärkere inflammatorische Reaktion auslöst als der brasilianische Vergleichsstamm, wurden zunächst die Serumlevel der proinflammatorischen Th1-Zytokine IFN- γ und TNF- α sowie der profibrotischen Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 bestimmt. Hierfür wurde das Procartaplex Multiple Immunoassay Kits von ThermoFisher Scientific™ verwendet. Es

bietet im Gegensatz zum ansonsten häufig verwendeten ELISA-Verfahren (73) die Möglichkeit, aus geringeren Probenmengen umfassendere Analysen zur selben Zeit durchzuführen (74). In der Regel findet im Verlauf einer Erkrankung mit *Schistosoma spp.* ein fließender Übergang von einer Th1-dominierten zu einer Th2-dominierten Immunantwort statt, bis sich schließlich ein gewisses Gleichgewicht einstellt (75). Dass Störungen dieses Prozesses weitreichende Folgen nach sich ziehen, konnte in einer Studie mit Knockout-Mäusen gezeigt werden. In dieser wurde eine Th1-polarisierte Immunreaktion durch IL-10/IL-4-Knockout-Mäuse bzw. eine Th2-polarisierte Immunreaktion durch IL-10/IL-12-Knockout-Mäuse erzeugt. Durch eine Dominanz proinflammatorischer Zytokine einerseits kam es zu einem massiven Hepatozytenschaden, andererseits verursachte ein Überschuss profibrotischer Zytokine eine ausgeprägte Granulombildung (76). Die Auswertungen der untersuchten Zytokine ergaben allerdings, dass sich die Serumlevel der beiden *S. mansoni* Stämmen jeweils auf einem ähnlichen Niveau befinden. Aus diesem Grund wurde in einem nächsten Schritt die mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 sowie IL-1 β im Darmgewebe gemessen. Hierbei erreichte der liberianische Stamm deutlich höhere Expressionswerte, womit die stärkere inflammatorische Wirkung des liberianischen Stammes im Darmgewebe bestätigt werden konnte.

4.6 Zusammenfassende Schlussbetrachtung und Ausblick

Unter der Annahme der höheren Pathogenität des brasilianischen *S. mansoni* Stammes im Vergleich zum liberianischen Stamm gingen wir zunächst von einer stärker ausgeprägten hepatolienalen Schistosomiasis infolge einer Infektion mit dem brasilianischen Stamm aus. Die durchgeführten Untersuchungen bestätigten dies allerdings nicht. Vielmehr verursachte der liberianische Stamm ausgeprägte makroskopische Organveränderungen im Bereich von Leber und Milz. Da auf histologischer Ebene keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Stämmen festgestellt werden konnten (vergleichbares Ausmaß an Fibrose sowie ähnliche Granulomgrößen), ist im Rahmen einer Infektion mit dem liberianischen Stamm von einer Polarisation der T-Helferzellen hin zu einer proinflammatorischen Th1-Reaktion auszugehen.

Bei Betrachtung der intestinalen Schädigung bedingte der brasilianische Stamm sowohl auf makroskopischer als auch auf histologischer Ebene stärkere pathophysiologische Veränderungen, obwohl die mRNA-Expressionsanalysen im Darmgewebe, passend zu den Ergebnissen im Bereich von Leber und Milz, eine stärkere Th1-Reaktion des liberianischen Stammes ergaben.

Die Erklärung hierfür könnte im Lebenszyklus von *S. mansoni* liegen: Aufgrund der Tatsache, dass der liberianische Stamm eine stärkere Th1-Reaktion generiert, konnten dessen Eier schneller den Wirtsorganismus verlassen als die des brasilianischen Vergleichsstammes, da zur Durchdringung der Darmwand eine proinflammatorische Reaktion essentiell ist. Umgekehrt verblieben die Eier des brasilianischen Stammes länger im Darmbereich des Wirtes und konnten so stärkere pathophysiologische Veränderungen hervorrufen. Somit erweist sich die Th1-Polarisation im Rahmen einer Infektion mit dem liberianischen *S. mansoni* Stamm als protektiver Faktor für den Wirt.

In zukünftigen Studien sollte durch Untersuchungen des exkretorischen und sekretorischen Systems nach Ursachen für die unterschiedlich starke Th1-Reaktion der beiden *S. mansoni* Stämme gesucht werden.

Außerdem sollte die angenommene stärkere Th1-Reaktion des liberianischen Stammes im Bereich von Leber und Milz durch mRNA-Expressionsanalysen genau überprüft werden sowie die gesteigerte Eiausscheidung des liberianischen Stammes bestätigt werden.

Dies kann beispielsweise durch eine Kultur der Würmer und Analyse der Eizahl unter *in vitro* Bedingungen erfolgen.

Zur Vervollständigung der durchgeführten Analysen könnte zudem das Ausmaß der Fibrose im Darmgewebe bestimmt werden. Aufgrund der Gewebebeschaffenheit des Darmes und dessen Kontraktilität war die Auswertung des Kollagengehaltes nicht wie in der Leber mittels Sirius Red Färbung und ImageJ möglich. Eine alternative Quantifizierung der Fibrose könnte über die Messung des Hydroxyprolinegehaltes angestrebt werden (76,77).

5 Zusammenfassung

Bei der Schistosomiasis (Bilharziose) handelt es sich um eine parasitäre Erkrankung von hoher sozioökonomischer Relevanz, für die es bisher trotz intensiver Forschungsbemühungen keinen Impfstoff gibt (44,57).

Ausgehend von der Hypothese, dass der brasilianische *S. mansoni* Stamm (Belo Horizonte) deutlich pathogener ist als der liberianische *S. mansoni* Stamm (Liberia), wurde in der vorliegenden Arbeit die Pathogenität beider Stämme in unterschiedlichen Infektionsstärken miteinander verglichen. Hierfür wurden NMRI Mäuse mit 25, 50 und 100 Zerkarien infiziert und die Auswirkungen acht Wochen nach Infektion anhand makroskopischer, histologischer sowie laborchemischer Testungen analysiert.

In allen Analysen ergab sich eine positive Korrelation zwischen initialer Infektionsstärke und daraus resultierenden pathophysiologischen Veränderungen.

Beim brasilianischen Stamm konnte trotz einer signifikant geringeren Infektiosität (Gesamtwurmlast) in Summe eine signifikant höhere Eizahl festgestellt werden, was der 40-fach höheren Eimenge im Darmgewebe geschuldet war. Der liberianische Stamm löste eine ausgeprägte hepatolienale Schistosomiasis aus. Diese ist vermutlich auf eine starke Th1-Reaktion zurückzuführen, da auf histologischer Ebene keine eindeutigen Unterschiede bezüglich des Ausmaßes der Fibrose bzw. der Granulomgröße zwischen beiden Stämmen ausgemacht werden konnten. Im Bereich des Darmes hingegen verursachte der brasilianische Stamm sowohl makroskopisch als auch histologisch stärkere Pathologien. Diese sind jedoch nicht, wie die mRNA-Expressionsanalysen zeigten, auf eine stärkere Th1-Reaktion des brasilianischen Stammes zurückzuführen, sondern sind im Lebenszyklus des Parasiten begründet.

Die Eier des liberianischen Stammes provozierten eine stärkere Entzündungsreaktion, die zur Durchwanderung der Darmwand und der Ausscheidung über den Faeces notwendig ist. Umgekehrt verblieben die Eier des brasilianischen Stammes länger im Wirtsorganismus und konnten daher stärkere intestinale Pathologien verursachen. Dieser Mechanismus und die daraus resultierende ausgeprägte Darmschädigung könnte ein Erklärungsansatz für die höhere Letalität der Mäuse sein, die mit dem brasilianischen *S. mansoni* Stamm infiziert wurden. Insbesondere die Suche nach

Ursachen für die stärkere Th1-Reaktion des liberianischen Stammes sowie der Nachweis eben dieser auch im Lebergewebe sollte Gegenstand zukünftigen Studien sein.

6 Thesen

1. *S. mansoni* Stämme aus unterschiedlichen Herkunftsländern lösen verschiedene Krankheitsbilder aus.
2. Die Letalität des südamerikanischen *S. mansoni* Stammes ist auf eine starke hepatolienale Schistosomiasis zurückzuführen.
3. Der südamerikanische *S. mansoni* Stamm induziert größere hepatische Granulome als der westafrikanische Stamm.
4. Der südamerikanische *S. mansoni* Stamm verursacht eine stärkere hepatische Fibrose als der westafrikanische Stamm.
5. Der westafrikanische *S. mansoni* Stamm ist weniger infektiös als sein südamerikanischer Vergleichsstamm.
6. Der westafrikanische *S. mansoni* Stamm induziert eine stärkere Th2-Antwort als sein südamerikanischer Vergleichsstamm.
7. Der westafrikanische *S. mansoni* Stamm führt zu geringeren intestinalen Läsionen als sein südamerikanischer Vergleichsstamm.
8. Der westafrikanische *S. mansoni* Stamm induziert geringere intestinale Granulome als der südamerikanische Vergleichsstamm.
9. Die Expressionsprofile entzündungs- und wundheilungsassoziierter Gene in Leber- und Darmgewebe der Versuchstiere sind beim westafrikanischen und südamerikanischen *S. mansoni* Stamm unterschiedlich.
10. Eine Polarisation der T-Helferzellreaktion in Richtung Th1 führt zu einer gesteigerten Organschädigung der Versuchstiere, die mit dem südamerikanischen *S. mansoni* Stamm infiziert sind.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet* [Internet]. 2006 Sep;368(9541):1106–18.
2. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet* [Internet]. 2014;383(9936):2253–64.
3. Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2006 Jul;6(7):411–25.
4. Kassebaum NJ, Arora M, Barber RM, Bhutta ZA, Brown J, Carter A, et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* [Internet]. 2016 Oct;388(10053):1603–58.
5. Utzinger J, Keiser J. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: common drugs for treatment and control. *Expert Opin Pharmacother* [Internet]. 2004 Feb 2;5(2):263–85.
6. Utzinger J, Raso G, Brooker S, De Savigny D, Tanner M, Ørnberg N, et al. Schistosomiasis and neglected tropical diseases: Towards integrated and sustainable control and a word of caution. *Parasitology* [Internet]. 2009 Nov 11;136(13):1859–74.
7. Capron A, Riveau G, Capron M, Trottein F. Schistosomes: the road from host-parasite interactions to vaccines in clinical trials. *Trends Parasitol* [Internet]. 2005 Mar;21(3):143–9.
8. King CH, Dangerfield-Cha M. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. *Chronic Illn* [Internet]. 2008 Mar;4(1):65–79.
9. Pearce EJ, MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2002 Jul 1;2(7):499–511.
10. Olveda DU, Olveda RM, McManus DP, Cai P, Chau TNP, Lam AK, et al. The chronic enteropathogenic disease schistosomiasis. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2014 Nov;28:193–203.
11. Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop* [Internet]. 2002 May;82(2):139–46.

12. Guimarães RJPS, Fonseca FR, Dutra L V., Freitas CC, Oliveira GC, Carvalho OS. A Study of Schistosomiasis Prevalence and Risk of Snail Presence Spatial Distributions Using Geo-Statistical Tools. *Schistosomiasis*. 2012;(January).
13. Elbaz T, Esmat G. Hepatic and Intestinal Schistosomiasis: Review. *J Adv Res [Internet]*. 2013 Sep;4(5):445–52.
14. Doenhoff MJ, Pica-Mattoccia L. Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther [Internet]*. 2006 Apr 10;4(2):199–210.
15. King CL, Malhotra I, Mungai P, Wamachi A, Kioko J, Ouma JH, et al. B cell sensitization to helminthic infection develops in utero in humans. *J Immunol [Internet]*. 1998 Apr 1;160(7):3578–84.
16. Burke ML, Jones MK, Gobert GN, Li YS, Ellis MK, McManus DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol [Internet]*. 2009 Apr;31(4):163–76.
17. Ross AGP, Vickers D, Olds GR, Shah SM, McManus DP. Katayama syndrome. *Lancet Infect Dis [Internet]*. 2007 Mar;7(3):218–24.
18. Bottieau E, Clerinx J, de Vega MR, Van den Enden E, Colebunders R, Van Esbroeck M, et al. Imported Katayama fever: Clinical and biological features at presentation and during treatment. *J Infect [Internet]*. 2006 May;52(5):339–45.
19. Flores-Villanueva PO, Zheng XX, Strom TB, Stadecker MJ. Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment down-regulate egg antigen-specific delayed hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. *J Immunol [Internet]*. 1996 May 1;156(9):3315–20.
20. Pearce EJ. Priming of the immune response by schistosome eggs. *Parasite Immunol [Internet]*. 2005 Jul;27(7–8):265–70.
21. Ross AGP, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, et al. Schistosomiasis. *N Engl J Med [Internet]*. 2002 Apr 18;346(16):1212–20.
22. Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LFA, Silveira AMS, Oliveira RC, Gazzinelli G. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop [Internet]*. 2008 Nov;108(2–3):109–17. 33
23. Andrade ZA. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunol [Internet]*. 2009 Oct 7;31(11):656–63.

24. Stadecker MJ, Hernandez HJ, Asahi H. The identification and characterization of new immunogenic egg components: implications for evaluation and control of the immunopathogenic T cell response in schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2001;96 Suppl:29–33.
25. Kjetland EF, Ndhlovu PD, Gomo E, Mduluzza T, Midzi N, Gwanzura L, et al. Association between genital schistosomiasis and HIV in rural Zimbabwean women. *AIDS* [Internet]. 2006 Feb;20(4):593–600.
26. Kjetland EF, Leutscher PDC, Ndhlovu PD. A review of female genital schistosomiasis. *Trends Parasitol* [Internet]. 2012 Feb;28(2):58–65.
27. Mbabazi PS, Andan O, Fitzgerald DW, Chitsulo L, Engels D, Downs JA. Examining the Relationship between Urogenital Schistosomiasis and HIV Infection. Carvalho EM, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2011 Dec 6;5(12):e1396.
28. Ross AGP, McManus DP, Farrar J, Hunstman RJ, Gray DJ, Li Y-S. Neuroschistosomiasis. *J Neurol* [Internet]. 2012;259(1):22–32.
29. Carod-Artal FJ. Neurological complications of *Schistosoma* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2008 Feb;102(2):107–16.
30. Ferrari TC de A. Involvement of central nervous system in the schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2004;99(5 Suppl 1):59–62.
31. Dunne DW, Pearce EJ. Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. *Microbes Infect* [Internet]. 1999 Jun;1(7):553–60.
32. Coash M, Forouhar F, Wu CH, Wu GY. Granulomatous liver diseases: A review. *J Formos Med Assoc* [Internet]. 2012 Jan;111(1):3–13.
33. Stadecker MJ, Asahi H, Finger E, Hernandez HJ, Rutitzky LI, Sun J. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunol Rev*. 2004;201:168–79.
34. Sadler CH, Rutitzky LI, Stadecker MJ, Wilson RA. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. *Eur J Immunol* [Internet]. 2003 Apr;33(4):880–8.
35. Fallon PG, Dunne DW. Tolerization of mice to *Schistosoma mansoni* egg antigens causes elevated type 1 and diminished type 2 cytokine responses and increased mortality in acute infection. *J Immunol* [Internet]. 1999 Apr 1;162(7):4122–32.
36. Hams E, Aviello G, Fallon PG. The *Schistosoma* Granuloma: Friend or Foe?

- Front Immunol [Internet]. 2013;4.
37. Andrade ZA, Silva LM, De Souza MM. An Experimental Approach to the Pathogenesis of “Pipestem” Fibrosis (Symmers’ Fibrosis of the Liver). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997;92(5):699–706.
 38. Strauss E. Hepatosplenic schistosomiasis: a model for the study of portal hypertension. *Ann Hepatol* [Internet]. 2002;1(1):6–11.
 39. Andrade ZA. Schistosomal hepatopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2004;99(5 Suppl 1):51–7.
 40. Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol* [Internet]. 2007 Feb;85(2):148–54.
 41. Weerakoon KGAD, Gobert GN, Cai P, McManus DP. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2015 Oct 29;28(4):939–67.
 42. ten Hove RJ, Verweij JJ, Vereecken K, Polman K, Dieye L, van Lieshout L. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2008 Feb;102(2):179–85.
 43. Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2002 Feb;66(2):157–62.
 44. McManus DP, Loukas A. Current Status of Vaccines for Schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2008 Jan 1;21(1):225–42.
 45. Silva-Moraes V, Couto FFB, Vasconcelos MM, Araújo N, Coelho PMZ, Katz N, et al. Antischistosomal activity of a calcium channel antagonist on schistosomula and adult *Schistosoma mansoni* worms. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2013 Aug;108(5):600–4.
 46. Bergquist R, Utzinger J, Keiser J. Controlling schistosomiasis with praziquantel: How much longer without a viable alternative? *Infect Dis Poverty* [Internet]. 2017 Dec 28;6(1):74.
 47. Doenhoff MJ, Hagan P, Cioli D, Southgate V, Pica-Mattoccia L, Botros S, et al. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitology* [Internet]. 2009 Nov 13;136(13):1825.
 48. Fallon PG. Schistosome resistance to praziquantel. *Drug Resist Updat* [Internet].

- 1998 Jan;1(4):236–41.
49. Cioli D, Pica-Mattoccia L, Basso A, Guidi A. Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 2014 Jun;195(1):23–9.
 50. Xiao S, Tanner M, N’Goran EK, Utzinger J, Chollet J, Bergquist R, et al. Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. *Acta Trop* [Internet]. 2002 May;82(2):175–81.
 51. Utzinger J, N’Goran EK, N’Dri A, Lengeler C, Xiao S, Tanner M. Oral artemether for prevention of *Schistosoma mansoni* infection: randomised controlled trial. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2000 Apr 15;355(9212):1320–5.
 52. Bergquist R, Utzinger J, Chollet J, Shu-Hua X, Weiss NA, Tanner M. Triggering of high-level resistance against *Schistosoma mansoni* reinfection by artemether in the mouse model. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71(6):774–7.
 53. Hewitson JP, Hamblin PA, Mountford AP. Immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. *Parasite Immunol* [Internet]. 2005 Jul;27(7–8):271–80.
 54. Merrifield M, Hotez PJ, Beaumier CM, Gillespie P, Strych U, Hayward T, et al. Advancing a vaccine to prevent human schistosomiasis. *Vaccine* [Internet]. 2016 Jun;34(26):2988–91.
 55. Molehin AJ, Rojo JU, Siddiqui SZ, Gray SA, Carter D, Siddiqui AA. Development of a schistosomiasis vaccine. *Expert Rev Vaccines* [Internet]. 2016 May 3;15(5):619–27.
 56. Tebeje BM, Harvie M, You H, Loukas A, McManus DP. Schistosomiasis vaccines: where do we stand? *Parasit Vectors* [Internet]. 2016 Dec 30;9(1):528.
 57. Riveau G, Schacht A-M, Dompnier J-P, Deplanque D, Seck M, Waucquier N, et al. Safety and efficacy of the rSh28GST urinary schistosomiasis vaccine: A phase 3 randomized, controlled trial in Senegalese children. Dalton JP, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2018 Dec 7;12(12):e0006968.
 58. Hoffmann G, Bentz H. *Abriß der Laboratoriumstierkunde*. Jena: Fischer. 1961.
 59. Sombetzki M, Koslowski N, Doss S, Loebermann M, Trauner M, Reisinger EC, et al. Biosensor for Hepatocellular Injury Corresponds to Experimental Scoring of Hepatosplenic Schistosomiasis in Mice. *Biomed Res Int* [Internet]. 2016;2016:1567254.
 60. Fallon PG. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and

- men. *Immunol Today* [Internet]. 2000 Jan;21(1):29–35.
61. Cheever AW, Lenzi JA, Lenzi HL, Andrade ZA. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2002 Oct;97(7):917–40.
62. Abath FGC, Morais CNL, Montenegro CEL, Wynn TA, Montenegro SML. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends Parasitol* [Internet]. 2006 Feb;22(2):85–91.
63. Saoud MFA. The infectivity and pathogenicity of geographical strains of *Schistosoma mansoni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 1966 Jan;60(5):585–600.
64. Euzébio AA, Zuim NRB, Linhares AX, Magalhães LA, Zanotti-Magalhães EM. Experimental Evaluation of the Pathogenicity of Different Strains of *Schistosoma mansoni*. *Interdiscip Perspect Infect Dis* [Internet]. 2012;2012:1–7.
65. Warren KS. A comparison of Puerto Rican, Brazilian, Egyptian and Tanzanian strains of *Schistosoma mansoni* in mice: Penetration of cercariae, maturation of schistosomes and production of liver disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 1967 Jan;61(6):795–802.
66. McManus DP, Dunne DW, Sacko M, Utzinger J, Vennervald BJ, Zhou X-N. Schistosomiasis. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2018 Dec 9;4(1):13.
67. Ross AGP, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, et al. Schistosomiasis. *N Engl J Med* [Internet]. 2002 Apr 18;346(16):1212–20.
68. Jones JT, Breeze P, Kusel JR. Schistosome fecundity: Influence of host genotype and intensity of infection. *Int J Parasitol* [Internet]. 1989 Nov;19(7):769–77.
69. Bustinduy AL, King CH. Schistosomiasis. In: *Manson's Tropical Infectious Diseases* [Internet]. Elsevier; 2014. p. 698-725.e6.
70. Lambertucci JR, Cota GF, Pinto-Silva RA, Serufo JC, Gerspacher-Lara R, Drummond SC, et al. Hepatosplenic schistosomiasis in field-based studies: a combined clinical and sonographic definition. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2001 Sep;96(suppl):147–50.
71. Barsoum RS, Esmat G, El-Baz T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. *J Adv Res* [Internet]. 2013 Sep;4(5):433–44.
72. Ye C, Tan S, Jiang L, Li M, Sun P, Shen L, et al. IFN-gamma, IL-12, and TNF-alpha are required to maintain reduced liver pathology in mice vaccinated with

- Schistosoma mansoni eggs and IL-12. *Mol Med Rep* [Internet]. 2013 Oct;8(4):1089–93.
73. Morais CNL de, Souza JR de, Melo WG, Aroucha ML, Miranda P, Domingues ALC, et al. Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2008 Sep;103(6):561–8.
74. Cook DB, McLucas BC, Montoya LA, Brotski CM, Das S, Miholits M, et al. Multiplexing protein and gene level measurements on a single Luminex platform. *Methods* [Internet]. 2019 Apr;158:27–32.
75. Stadecker MJ, Hernandez HJ. The immune response and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni*: A key role of major egg antigen Sm-p40. *Parasite Immunol*. 1998;20(5):217–21.
76. Hoffmann KF, Cheever AW, Wynn TA. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol* [Internet]. 2000;164(12):6406–16.
77. Fickert P, Wagner M, Marschall H, Fuchsbichler A, Zollner G, Tsybrovskyy O, et al. 24-norUrsodeoxycholic Acid Is Superior to Ursodeoxycholic Acid in the Treatment of Sclerosing Cholangitis in Mdr2 (Abcb4) Knockout Mice. *Gastroenterology* [Internet]. 2006 Feb;130(2):465–81.

8 Anhang

1. Geräte und Werkzeuge

Bezeichnung	Hersteller
Bechergläser; 2l	Schott
Einmalspritzen, steril; 20ml	BD
Eppendorf-Tubes; 0,5ml	Eppendorf
Kryoröhrchen; 2ml	Nalgene
Petrischalen	Greiner
Parafilm, Größe M	American National Can Company
Pipettenspitzen; 10 µl, 100 µl, 1 ml	Greiner
Einwegpipetten; 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner
Mastercycler gradient®	Eppendorf
Polarisationsmikroskop inkl. AxioCam MRc	Zeiss
TaqMan 7900	Applied Biosystems™
Präparierbesteck	Dimedica, Karl Storz, Aesculap, Chirmed Poland
Rotationsmikrotom Hyrax M55	Zeiss
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Stratos	Heraeus
Fast Prep Homegenisator	MP Biomedicals
Sartorius-Analysewaage	Sartorius
Lichtmikroskop Axio Imager M2	Zeiss
Lichtmikroskop Axioplan 2 Imager	Zeiss
Lichtmikroskop CH-2	Olympus
Binokular	Olympus
Photometer Fluostar Omega	BMG Labtech
Brutschrank	Binder
Vortexer	IKA

2. Kits und Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Procartaplex Multiple Immunoassay Kits	ThermoFisher Scientific™
„RNeasy Plus Mini Kit“	Qiagen, Hilden, Deutschland
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits	ThermoFisher Scientific™
Rompun® 2%ige Lösung	Bayer
Ketamin 10%	Medistar
Heparin-Natriumsalz, > 180 USP Einheiten/mg	Sigma-Aldrich
Hydroxyprolin-Standard	Sigma-Aldrich
β-Mercaoctoethanol	Sigma-Aldrich
Eukitt®	Sigma-Aldrich
Hämatoxylin III nach Gill	Apotheke des Universitätsklinikums Rostock
Formalin	Merck
Hämalaun	Apotheke des Universitätsklinikums Rostock
Sirius Red (Direct Red 80)	Sigma-Aldrich
Pikrinsäure, gesättigt (1,3% in H ₂ O)	Sigma-Aldrich
Ethanol, reinst und vergällt	Apotheke des Universitätsklinikums Rostock

3. Software

Programm	Version	Hersteller
Excel	16.27 (2019)	Microsoft
ImageJ	1.50i (2016)	National Institutes of Health, USA
Statistiksoftware SPSS	25 (2017)	IBM

9 Eidesstattliche Erklärung

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema „Vergleichende Analyse zur Pathogenität eines afrikanischen und eines brasilianischen *Schistosoma mansoni* Stammes“ handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt
4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung ist mir bekannt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Tübingen, den _____

(Felix Kraft)

10 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger für das freundliche Überlassen der Thematik und die Unterstützung dieser Doktorarbeit bedanken.

Bei Frau Dr. rer. nat. Martina Sombetzki für ihre Betreuung, ihre hilfreichen Ratschläge und Anregungen sowie die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens.

Bei Frau Dr. rer. nat. Nicole Koslowski für Ihre Beratung und Hilfestellung.

Besonderer Dank gebührt allen weiteren Mitarbeitern des parasitologischen Forschungslabors der Universitätsmedizin Rostock für die freundliche Aufnahme und Unterstützung während meiner Labortätigkeit.

Großen Dank an Herrn Prof. Dr. C. Grevelding vom Institut für Parasitologie in Gießen für die Bereitstellung des liberianischen *S. mansoni* Stammes.

Zuallerletzt danke ich meiner gesamten Familie und meinen Freunden für die tolle Unterstützung.

11 Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Name	Felix Daniel Kraft
Anschrift	Friedrich–Zundel–Str. 16 72074 Tübingen
geboren am	11.05.1990
Telefon	017632925842
E-Mail	felix.kraft@uni-rostock.de

Beruflicher Werdegang

09/2019	Arzt in Weiterbildung am Marienhospital Stuttgart, Klinik für Orthopädie, Unfallchirurgie und Sporttraumatologie
---------	--

Akademische Laufbahn

2016 – 2020	Dissertation: „Vergleichende Analyse zur Pathogenität eines afrikanischen und eines brasilianischen <i>Schistosoma mansoni</i> Stammes“ bei Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger, Dekan der medizinischen Fakultät Rostock – Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten.
-------------	---

12/2018	Approbation als Arzt
---------	----------------------

2012 – 2018	Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen und der Universität Rostock, Endnote: gut (2,5) Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 11/2018, Note: gut Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 10/2017, Note: befriedigend Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 03/2014, Note: gut (2,5)
-------------	--

04 – 09/ 2014	Wissenschaftliche Mitarbeit im neurologischen Forschungslabor der Universitätsmedizin Göttingen
---------------	---

2010 – 2012	Studium der Biologie (B.Sc.) an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg und der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
-------------	---

2009 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife am humanistischen Uhlandgymnasium Tübingen

Klinische Erfahrung

PJ Tertial Orthopädie: Baumann-Klinik Orthopädie, Stuttgart

PJ Tertial Chirurgie: Kantonsspital Luzern

PJ Tertial Innere: Karl-Olga-Krankenhaus, Stuttgart

Famulaturen: Orthopädie und Unfallchirurgie:
Kantonsspital Luzern

Orthopädie: Uniklinikum Tübingen

Augenheilkunde:
Uniklinikum Hamburg-Eppendorf

Allgemeinmedizin:
Dipl. Med. H. Geißler,
Rostock

Innere Medizin: Uniklinikum Tübingen

04/ 2015 – 03/2017 Tätigkeit als 2. OP-Assistent in der Orthopädischen Universitätsklinik Rostock

06/ 2012 sowie 08 – 09/2013 Studentische Hilfskraft an der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik in Tübingen, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie

02 – 03/ 2013 Studentische Hilfskraft an der Uniklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin IV-Endokrinologie, Diabetologie, Angiologie und Nephrologie

10/2009 – 06/2010 Zivildienst an der Uniklinik Mainz, Neurochirurgische Station

Fremdsprachenkenntnisse Englisch, Französisch, Großes Latein