

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie
Universitätsklinikum Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Budach

**Untersuchung der Wirkung von
Nitazoxanide unter simultan ionisierender
Bestrahlung auf Echinococcus multilocularis
Metacestoden**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Raoul Ernst
2009

„Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf“

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: PD Dr. med. Stephan Gripp
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie

Korreferent: Prof. Dr. med. Colin MacKenzie
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

Abstract

Untersuchung der Wirkung von Nitazoxanide unter simultan ionisierender Bestrahlung auf Echinococcus multilocularis Metacestoden

Die alveoläre Echinokokkose, hervorgerufen durch eine Infektion mit Metacestoden des *Echinococcus multilocularis*, stellt auf Grund der hohen Letalität im Falle einer unbehandelten Erkrankung beim Menschen, eine noch immer große Gefahr dar. Besonders das destruktive Wachstum sowie die Fähigkeit des Parasiten Absiedelungen in Nachbarorgane und weiter entfernte Organe zu bilden, zeigen Parallelen zu den malignen Tumoren auf.

Der Einsatz ionisierender Strahlung in Kombination mit strahlensensibilisierenden Medikamenten zur Behandlung verschiedener maligner Erkrankungen des Menschen ist seit Jahren in der Medizin etabliert.

In der vorliegenden Arbeit wird die in vitro Anwendung von ionisierender Bestrahlung in Kombination mit Nitazoxanid an Metacestoden des *Echinococcus multilocularis* nach morphologischen und molekularbiologischen Gesichtspunkten untersucht. Durch die angewendeten Verfahren kann dabei nach Möglichkeit eine Aussage über die Viabilität des Metacestodengewebes getroffen werden.

Bei der Untersuchung von NTZ unter simultan ionisierender Bestrahlung konnten in vitro reproduzierbare ultrastrukturelle Veränderungen gezeigt werden. Die Veränderungen ließen sich in weiten Bereichen als Nekrosen des Metacestodengewebes interpretieren. Bezüglich der Viabilität ließen sich die angewendeten Verfahren nicht eindeutig miteinander korrelieren. Besonders die in der Rasterelektronenmikroskopie gesehenen Veränderungen der germinativen Zellschicht, sowie die mikroskopischen Beobachtungen bei den Kopfanlagen führten zu der Erwartung einer vollständigen Zerstörung des Parasiten. Makroskopisch imponierte eine verminderte Proliferation, welche sich möglicherweise auf bestrahlungsinduzierte Schäden in der Folge eines Zellzyklusarrestes zurückführen lässt.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Übersicht	6
1.2 Biologie	6
1.3 Epidemiologie	9
1.4 Klinik und Diagnostik	9
1.5 Therapie	10
1.6 Wirkung der ionisierenden Strahlung	11
2 Material und Methoden	14
2.1 <i>In vitro</i> Kultivierung der <i>Echinococcus multilocularis</i> Metacestoden	14
2.2 Separierung der Vesikel und Bestrahlung	14
2.3 <i>Echinococcus multilocularis</i> Alkalische Phosphatase Assay	17
2.4 Makroskopische Beobachtung und Lichtmikroskopie	17
2.5 Elektronenmikroskopie	17
2.6 Elektrophorese und Zymographie	18
3 Ergebnisse	20
3.1 <i>Echinococcus multilocularis</i> Alkalische Phosphatase Assay (EmAP)	20
3.2 Makroskopische Beobachtung und Lichtmikroskopie	21
3.3 Elektronenmikroskopie	24
3.4 Elektrophorese der sekretorischen Komponenten	29
4 Diskussion	31
5 Literaturverzeichnis	39
6 Anhang	45
6.1 Glossar	45
6.2 Übersicht über verwendete Materialien	46

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1 Lebenszyklus des Echinococcus multilocularis</i>	7
<i>Abb. 2 Schematischer Aufbau des Metacestodengewebe</i>	8
<i>Abb. 3 Strukturformeln Albendazol, Mebendazol, Nitazoxanide, Metronidazol</i>	11
<i>Abb. 4 Zellzyklus</i>	13
<i>Abb. 5 Versuchsaufbau der Bestrahlung am Telekobaltgerät</i>	15
<i>Abb. 6 Übersicht über die durchgeführten Versuche</i>	16
<i>Abb. 7 Ergebnisse des EmAP Assay graphisch dargestellt</i>	20
<i>Abb. 8 Mikroskopie der Metacestodenvesikel</i>	22
<i>Abb. 9 Mikroskopie von Kopfanlagen des Echinococcus multilocularis</i>	22
<i>Abb. 10 Makroskopie, Mikroskopie der E.m. Metacestoden</i>	23
<i>Abb. 11 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von aufgebrochenen Metacestodenvesikel des E.m.</i>	25
<i>Abb. 12 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Kontrollgruppe</i>	26
<i>Abb. 13 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen des mit NTZ bestrahlten Metacestodengewebes</i>	27
<i>Abb. 14 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen des Metacestodengewebes behandelt mit 100Gy + 1µg/ml NTZ</i>	28
<i>Abb. 15 Elektrophorese der Mediumüberstände und Vesikelflüssigkeiten</i>	30

1 Einleitung

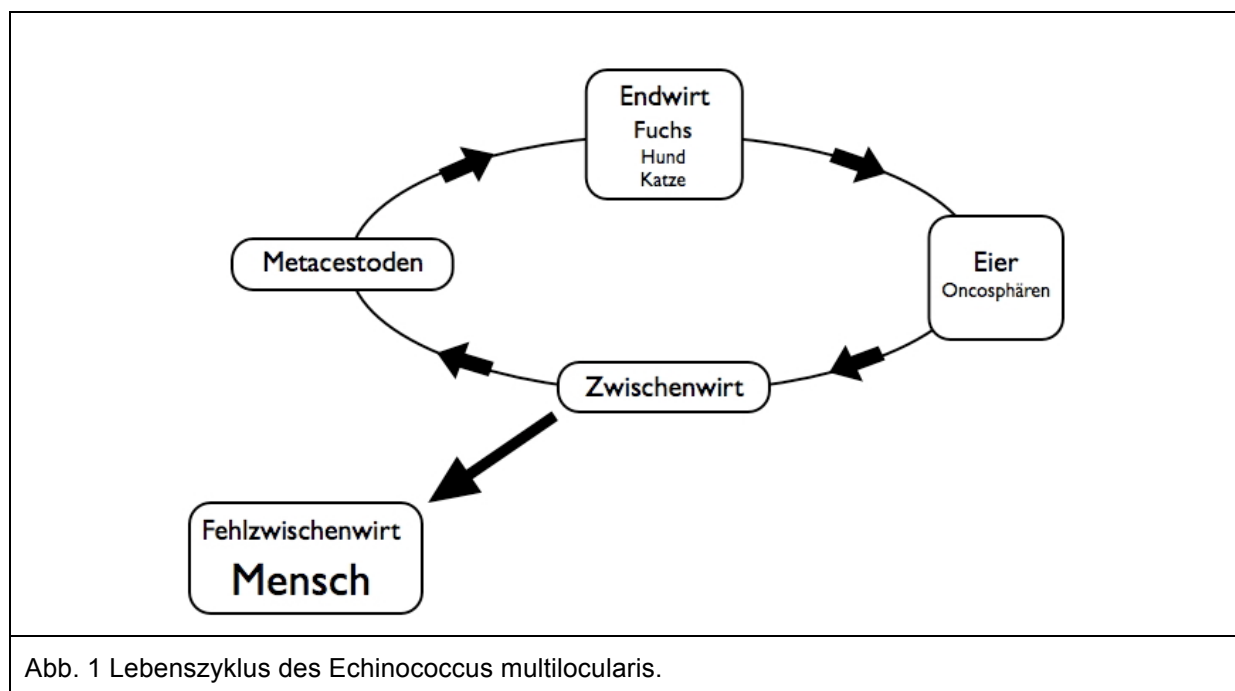
1.1 Übersicht

Die Infektion mit dem Larvenstadium des *Echinococcus multilocularis* stellt nicht zuletzt in Folge der begrenzten Therapiemöglichkeiten eine für den Menschen lebensbedrohliche Erkrankung dar [GOT00]. Biologisch betrachtet weist das Metacestodengewebe des *Echinococcus multilocularis* (E.m.) erstaunliche Parallelen zu malignen Tumoren auf. Wie diese wächst es lokal destruktiv und zerstört dabei das Wirtsgewebe, weiterhin besitzen undifferenzierte Zellen des Gewebes ein metastatisches Potential und verteilen sich so auf weitere Organe des Wirtes [MEL83]. Es ist daher naheliegend, Verfahren aus der Tumorthherapie in der Behandlung der alveolären Echinokokkose (AE) näher zu untersuchen. Gegenstand dieser Untersuchung ist die Wirkung eines parasitoziden Anthelminthikum bei simultaner Anwendung einer ionisierenden Bestrahlung des Larvenstadiums des E.m.. Von Benzimidazolen ist aus zahlreichen Versuchen an malignen Tumoren bekannt, dass sie zu einer Sensibilisierung gegenüber ionisierender Strahlung führen [SMI84] [ADA73] [URT75]. Die Anwendung eines den Benzimidazolen chemisch ähnlichen Anthelminthikum, in Form eines Nitrothiazolyl-Salicylamide-Derivat dem Nitazoxanide (NTZ), während einer Bestrahlung scheint daher in doppelter Hinsicht interessant.

1.2 Biologie

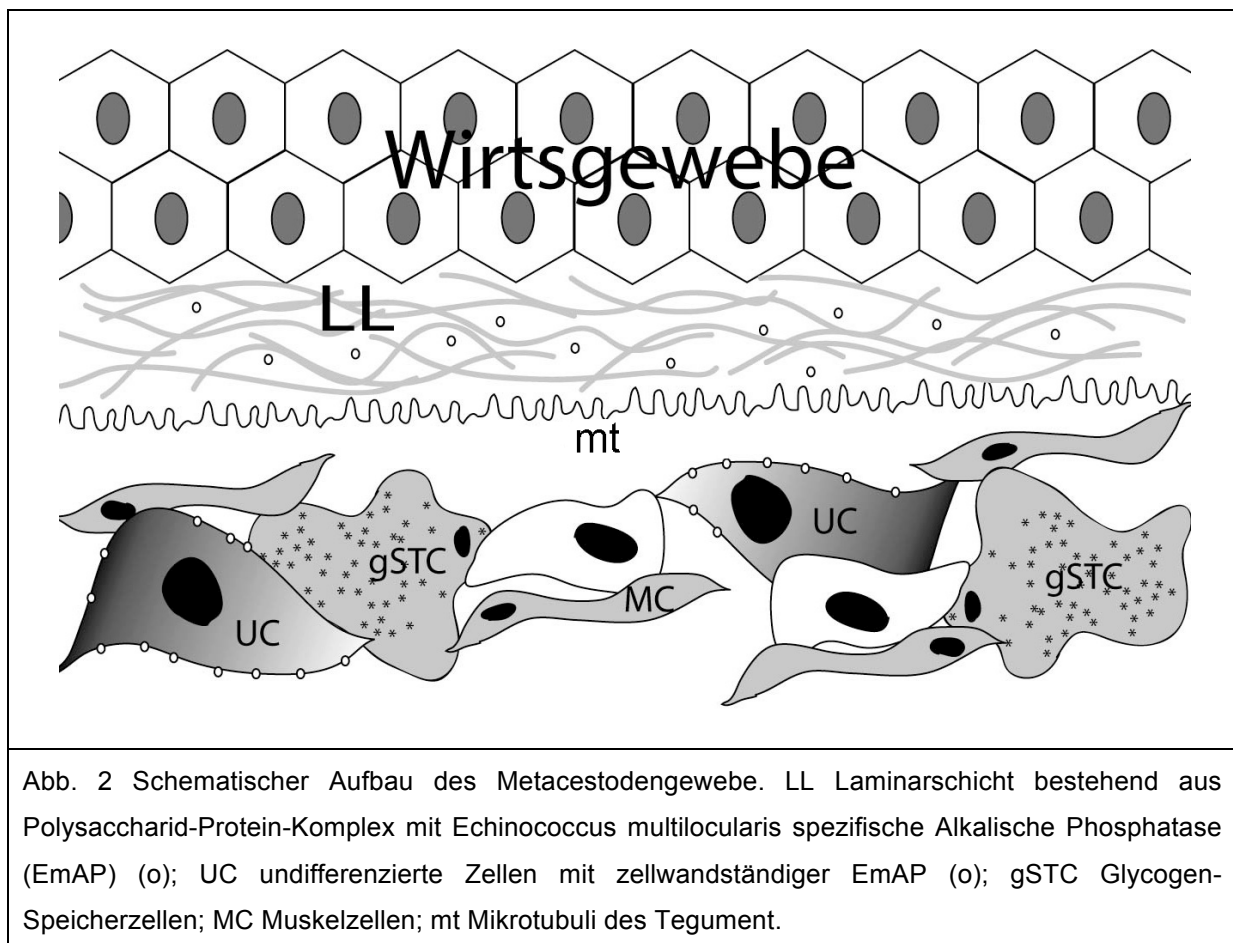
Der *Echinococcus multilocularis* als Erreger der alveolären Echinokokkose gehört wie auch der *Echinococcus granulosus* (E.g.), der Erreger der zystischen Echinokokkose (CE), zum Stamm der Plathelminthes (Plattwürmer) in die Klasse der Cestoden (Bandwürmer). Das Überleben des Parasiten ist an einen Zyklus gekoppelt, in dem der Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) der Endwirt ist. Weiterhin können Hund (*Canis lupus*) und Katze (*Felis domesticus*) auch als Endwirte dienen. Der adulte Parasit ist etwa vier Millimeter lang und gliedert sich in einen Scolex (Kopf mit Halteapparat) und drei bis fünf Proglottiden, welche einen Reproduktionsapparat und ca. 300 Eier je Proglottide beinhalten. Der adulte Parasit setzt sich im Darm des Endwirtes fest. Zirka vier Wochen nach einer Infektion beginnt die Ausscheidung der

Proglottiden und reifer Eier mit den Faeces. Die Eier sind nach innen eingestülpt und mit einer Kapsel versehen, so dass sie gegenüber Umwelteinflüssen resistent sind. Die Infektion des Zwischenwirts erfolgt durch orale Aufnahme der Eier. Im Normalfall ist der Zwischenwirt die Feldmaus (*Microtus agrestis*), welche besonders empfänglich für eine Infektion ist. Andere Säuger, wie z.B. die Schermaus (*Arvicola terrestris*), können auch als Zwischenwirte fungieren. Der Mensch als Fehlwirt, stellt in dem Zyklus eine Sackgasse dar. Ist das Ei im Darm des Zwischen-/ Fehlwirtes angekommen, stülpt es sich unter der Einwirkung von Signalstoffen und Gallensalzen aus. Die im Ei befindliche Oncosphäre penetriert aktiv mittels amöboider Bewegung und Zuhilfenahme proteolytischer Enzyme die Darmwand und erreicht über Blut- und Lymphabfluß in 98% der Fälle die Leber. Manifestationen in anderen Organen, wie Lunge, ZNS und Knochen, treten seltener auf [GOT00].



Aus den Oncosphären entwickeln sich zystische und tubuläre Strukturen, die das Metacestodenstadium repräsentieren. In den Metacestoden reifen neue Kopfanlagen heran. Der Zyklus schließt sich, wenn der Zwischenwirt (Maus) vom Endwirt (Fuchs, Hund oder Katze) gefressen wird und die Kopfanlagen im Darm des Endwirtes zu reproduktionsfähigen Parasiten heranreifen. Bei der Infektion des Menschen bilden sich jedoch nur in 5% der Fälle Kopfanlagen aus. [GOT00]

Die Metacestoden formieren sich in einer zystisch bis tubulär ausgebildeten Struktur, die in der Größe um fünf Millimeter und dem mikroskopischen Bereich schwankt. Die Zyste besteht aus einer azellulären PAS (Perjod-Schiff-Säure) positiven Laminarschicht, welche aus einem Polysaccharid-Protein-Komplex (vorwiegend Galaktosamin und Glucosamin) zusammengesetzt ist und den Parasiten gegen immunkompetente Zellen des Wirtes abgrenzt [HEM02]. Auf der Innenseite der Laminarschicht befindet sich eine germinative Zellschicht, welche aus differenzierten Zellen wie Muskelzellen, Glycogen-Speicherzellen und undifferenzierten Zellen besteht. Eine Aussaat des Parasitengewebes analog einer Metastasierung bei Karzinomen in andere Organe geht von den undifferenzierten Zellen aus [MEH83]. Zwischen der germinativen Zellschicht und der laminaren Schicht befindet sich das Tegument des Parasiten. Aus diesem ragen Mikrotubuli in die laminare Schicht hinein, welche für Resorptionsvorgänge auf Diffusionsbasis und die Sezernierung von Bausteinen der laminaren Schicht zuständig sind [HEM02]. Die Zysten wachsen durch Proliferation infiltrativ in das Wirtsgewebe ein.



1.3 Epidemiologie

Der Parasit findet auf nahezu der gesamten nördlichen Halbkugel Verbreitung. Hochendemiegebiete sind Japan, Alaska und Kanada und in Mitteleuropa vor allem die Schweiz, Süddeutschland und Frankreich [ECK00].

In Gebieten wie Deutschland, Schweiz, Frankreich und Österreich treten jährlich 0,2 bis 1,4 neue Infektionen mit AE pro 100.000 Einwohner auf [AMM00]. Die Bedeutung der AE beim Menschen liegt grundsätzlich in der außerordentlich hohen Letalität von 94% im Falle einer unbehandelten Erkrankung [AMM00]. Bisher ging man davon aus, dass die Infektion des Zwischenwirtes vor allem durch kontaminierte Waldfrüchte erfolgt. Da die Feldmaus als besonders empfänglicher Zwischenwirt jedoch das Kulturland bevorzugt und der Fuchs als Kulturfolger sich stärker auf diesen Lebensraum ausdehnt, ist die Kontaminationswahrscheinlichkeit der Kulturpflanzen und besonders des Erdbodens deutlich höher [ROM99]. Weiterhin dehnte der Fuchs seinen Lebensraum auch auf das Stadtgebiet aus, so dass neuerdings auch dort ein erhöhtes Infektionsrisiko besteht [ECK00].

1.4 Klinik und Diagnostik

Klinisch äußert sich eine Infektion mit E.m. in 30% der Fälle durch diffuse Oberbauchbeschwerden mit ikterischen Verläufen, bei weiteren 30% handelt es sich um Zufallsbefunde, die im Rahmen einer bildgebenden Leberuntersuchung erhoben werden. Die restlichen Infektionen werden im Rahmen von auffälligen Laborwerten der Leberenzyme entdeckt [GOT00]. Komplikationen treten bei fortgeschrittener AE durch Obstruktion der großen Gallenwege in Form von portaler Hypertension und Obstruktionen im Bereich der Vena cava inferior auf. In den Möglichkeiten zur Diagnostik haben bildgebende und serologische Verfahren die größte Bedeutung.

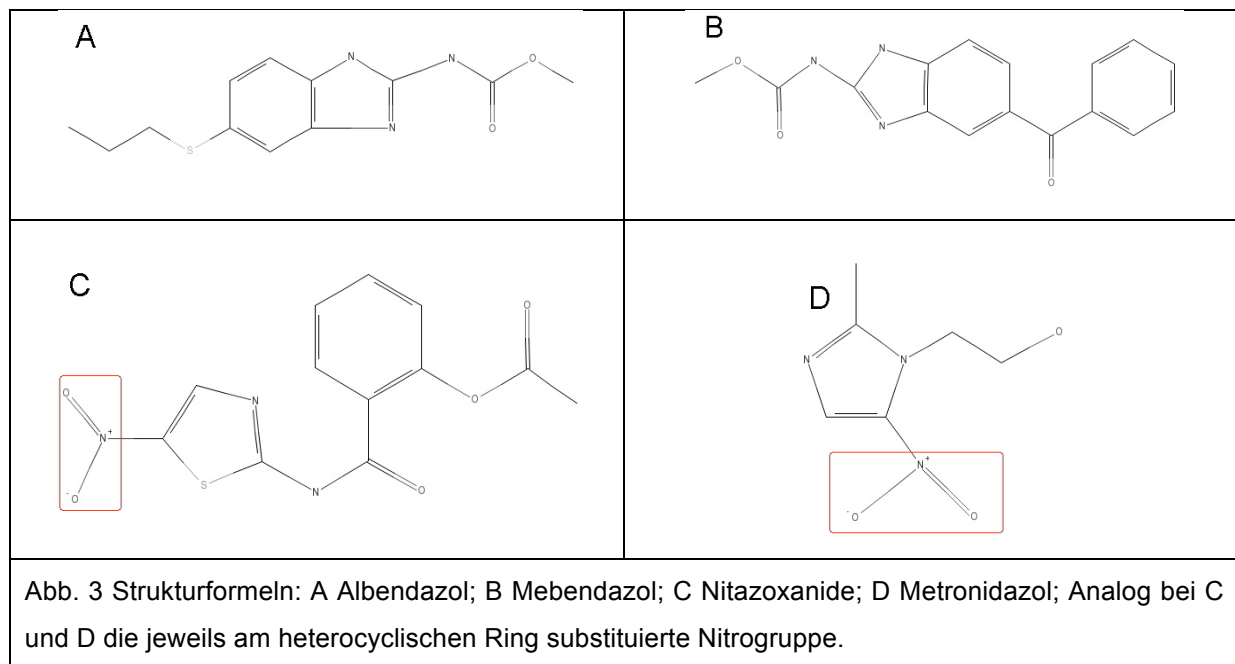
In der Sonographie stellt sich eine AE durch diffuse hyper-/ hypoechogene Leberherde mit unregelmäßigen Verkalkungen dar. Im CT findet man Kontrastmittel aufnehmende heterogene hypodense Herde mit unregelmäßigen Rändern und Kalzifizierungen. Die MRT-Untersuchung eignet sich besonders zur Untersuchung von wenig kalzifizierten Läsionen. Besonders der multivesikuläre Charakter der Läsionen kann bei zweifelhaften Befunden gut dargestellt werden. [REU01] [AMM00] [GOT00] Die serologische Diagnostik erfolgt mittels eines Enzym-

Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) gegen Antigene der Hydatidenflüssigkeit. Der Test weist sowohl eine hohe Sensitivität wie auch Spezifität auf. Durch affinitätsgereinigte E.m. Antigene, wie das E.m.-2 oder das rekombinante II/3-10 Antigen, ist eine Differenzierung zwischen alveolärer und zystischer Echinokokkose zu 95% möglich. Im Blut der Patienten lassen sich im Falle einer alveolären Echinokokkose E.m.-2 Antikörper nachweisen [GOT00].

1.5 Therapie

Die Standardtherapie der AE ist die radikalchirurgische Leberteilresektion mit einer anschließenden zweijährigen anthelminthischen Therapie mit einem der derzeit zugelassenen zwei Benzimidazolderivaten (Mebendazol oder Albendazol). Nach einer inkompletten Entfernung muss eine lebenslange anthelminthische Therapie durchgeführt werden. [WHO01] Die Indikation zu einer Lebertransplantation unter Immunsuppression muss wegen häufiger postoperativer Rezidive und dem Auftreten von Absiedelungen in anderen Organen streng gestellt werden [AMM99]. Bei 70% der AE Patienten kann eine radikal chirurgische Sanierung nicht durchgeführt werden. Diese Patienten müssen einer Langzeittherapie mit Benzimidazolderivaten unterzogen werden. [AMM00] Benzimidazole wie Mebendazol und Albendazol werden nach oraler Aufnahme intestinal schlecht resorbiert (<10%) und unterliegen einem First-Pass-Mechanismus, in dem sie in die ebenfalls parasitostatisch wirksamen Metabolite Albendazol-/ Mebendazolsulfoxid und Albendazol-/ Mebendazolsulfon überführt werden. Mit einer anthelminthischen Therapie mit diesen Medikamenten steigt die 10 Jahresüberlebensrate (JÜR) auf 80% und die 15 JÜR auf 50 – 80%. [AMM99] An schwerwiegenden Nebenwirkungen müssen die seltene in den ersten beiden Monaten der Therapie auftretende passagere Agranulozytose sowie die medikamentöse ikterische Hepathopathie unter beiden Präparaten erwähnt werden. Unter der Therapie kann es zu einem leichten Anstieg der Transaminasen, zu einer leichtgradigen Proteinurie sowie zu gastrointestinalen Beschwerden kommen. [AMM00]

Ein neues vielversprechendes Präparat stellt das Nitazoxanide (NTZ) dar. Das aus der Veterinärmedizin stammende Präparat, welches zur Zeit zur Behandlung von chronischen Diarrhöen, hervorgerufen durch intestinale Parasiten wie *Giardia intestinalis* bei HIV-positiven Patienten zugelassen ist, zeigte in Bezug auf die AE in einer in vitro Dosierung von 10 µg/ml einen parasitoziden Effekt. [AMA02] [STE03]



1.6 Wirkung der ionisierenden Strahlung

Der Einsatz ionisierender Strahlung zur Behandlung verschiedener benignen sowie malignen Erkrankungen des Menschen ist seit Jahren in der Medizin etabliert. Zwei Arten von ionisierender Strahlung sind bezüglich der biologischen Effekte von Bedeutung. Die elektromagnetische Strahlung und die Teilchenstrahlung. Bei der elektromagnetischen Strahlung handelt es sich um Photonen, deren Ursprung entweder im Atomkern (Gammastrahlung) oder in den Elektronenschalen eines Atoms (Röntgenstrahlung) liegt. Die Teilchenstrahlung zur therapeutischen Anwendung nutzt Elektronen, Photonen, Alpha-Teilchen, Neutronen und schwere Ionen.

Die ionisierende Strahlung kann in ihrer Wirkung in direkte und indirekte Ionisierung unterteilt werden. Bei der direkten Ionisierung wird die Energie der geladenen Teilchen auf die Elektronen im Orbital eines Atoms übertragen. Diese Atome sind unter anderem Bestandteil von DNA, RNA, Enzymen oder Komponenten der Zellmembran. Auch Wassermoleküle, die in Geweben in hoher Anzahl vorhanden sind, bestehen aus Atomen, auf deren Elektronen diese Energie übertragen wird. In der Folge entstehen reaktive Atome, welche dann mit zellulären Molekülen interagieren können. Indirekt ionisierende Strahlung resultiert aus Kollisionen von Neutronen mit dem Atomkern. In der Folge können direkt ionisierend geladene Teilchen, Gammastrahlung und auch Röntgenstrahlung entstehen.

Die ionisierende Bestrahlung von biologischem Material kann zu verschiedensten Effekten führen, wobei möglicherweise vier Stadien durchlaufen werden.

1. Physikalisches Stadium mit einer Dauer von 10^{-18} Sekunden: Interaktion mit Molekülen durch anheben der Elektronen auf eine höhere Orbitalschale führt zur Bildung von reaktionsfreudigen Atomen. Bei Verlust von Elektronen durch Ionisierung entstehen Radikale und es kommt zur Aufhebung von chemischen Bindungen.
2. Physikochemisches Stadium mit einer Dauer von 10^{-13} Sekunden: Metastabile Zustände und Energietransfers erzeugen reaktive Spezies aus der Vielzahl von Wassermolekülen im Gewebe.
3. Chemisches Stadium mit einer Dauer von 10^{-6} Sekunden: Reaktive Spezies reagieren mit drei wichtigen zellulären Molekülen.
 - A.) Nukleinsäuren: Brüche in Wasserstoffbrückenbindungen, Einzel-/Doppelstrangbrüche, Konformationsänderungen sowie Quervernetzungen zwischen DNA und chromosomalen Proteinen.
 - B.) Proteine: Beschädigung von Seitenkettengruppen, Konformationsänderungen in Sekundär- und Tertiärstruktur.
 - C.) Lipide: Bildung von Peroxiden aus ungesättigten Fettsäuren.
4. Biologisches Stadium mit einer Dauer von 10^{-6} Sekunden bis zu Jahren: Zelltod nach Bestrahlung, wobei die Strahlenempfindlichkeit abhängig vom Zellzyklus ist. Hohe Empfindlichkeit in abnehmenden Maße herrscht in der *G2-/ > späte G1-/ > frühe S-/ > M-Phase*. Eine mögliche Strahlenresistenz liegt in zunehmenden Maße in der frühen *G1-/ < späten S-Phase* vor. Des Weiteren unterscheidet man den Interphase-Tod vom Reproduktions-Tod. Der Interphase-Tod tritt möglicherweise nach hohen Dosen in Geweben mit geringen Reproduktionsraten auf. Der Reproduktions-Tod tritt bei sich in der Teilung befindlichen Zellen, durch fehlerhafte Mitose auf. Vor dem Zelltod können einige Zellen noch viele Teilungen durchlaufen, andere verlieren ihre Teilungsfähigkeit und Funktionalität und überleben. [MAR87]

In einigen Fällen konnte die Kombination einer Bestrahlungstherapie mit einer Verabreichung von Medikamenten, welche die biologische Wirkung ionisierender Strahlung verstärken, zu einer Verbesserung der therapeutischen Ergebnisse führen. [WAR07] Bei einigen dieser Medikamente die als Radiosensitizer bezeichnet werden, handelt es sich um Nitroimidazole. Die Wirkung dieser wichtigen Gruppe von

Radiosensitizern beruht auf einem Effekt, der sich analog dem Sauerstoffeffekt bei einer Bestrahlung in gut oxygenierten Geweben verhält. Dabei werden unter ionisierender Bestrahlung NO-Primärradikale freigesetzt, welche dann weitere Sekundärradikale erzeugen. Zusätzlich zu den durch die Wasserradiolyse im bestrahlten Gewebe erzeugten Primärradikalen ($\text{H}\cdot$, $\text{OH}\cdot$, e_{aq}^-) und Peroxiden, kommt es zu einer Bildung von Bioradikalen. Durch Oxidation von Doppelbindungen werden, wie oben beschrieben, Schäden an der DNA induziert. Die Bestrahlung der Substanz im Gewebe führt zu indirekten Schäden, welche sich meistens auf den Einzelstrang der DNA beschränken. Diese sind schneller und effektiver reparabel als Schäden, die den Doppelstrang der DNA betreffen. Doppelstrangbrüche und komplexere Schäden an der DNA können bei hohen Strahlendosen durch Synergie der indirekten Strahlenwirkungen auftreten. [WAS97] [WAR07]

Die Menge einer Strahlung, die in ein definiertes Areal abgegeben wird ist die Strahlungsdosis. Die Dosis pro Zeit definiert dabei die Dosisrate. Die Einheit der Energiedosis ist das Gray (Gy), wobei 1Gy die Absorbierte Dosismenge pro Kilogramm Materie/ Gewebe ($1\text{Gy} = 1\text{J/kg}$) ist. [MAR87]

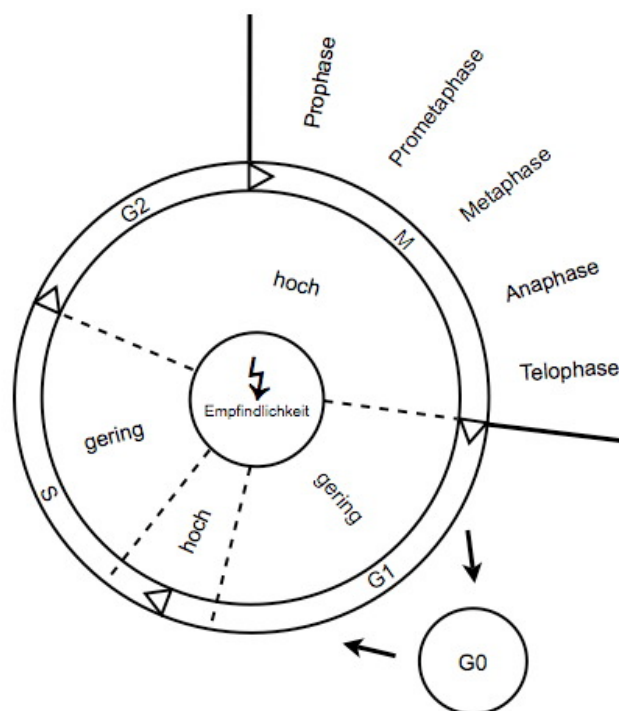


Abb. 4 Zellzyklus.

2 Material und Methoden

2.1 In vitro Kultivierung der Echinococcus multilocularis Metacestoden

Die in vitro Kultivierung erfolgte mit Echinococcus multilocularis Metacestoden aus peritoneal infizierten Feldmäusen (*Arvicola terrestris*) sowie oral infizierten Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*). Die Tiere wurden nach 1 bis 2 Monaten post infectionem euthanasiert. Das Parasitengewebe wurde unter aseptischen Bedingungen aus der Peritonealhöhle entfernt. Die Gewebeprobeen wurden in kleine Blöcke (Volumen 0,5cm³) geschnitten und diese dann mehrfach in Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen. Fünf Gewebelöcke wurden zusammen mit 75ml Medium A (*Iscoe's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) plus Zusatz von 25mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny) Ethansulfonsäure (HEPES), 10% Fetal Calf Serum (FCS), 2mM L-Glutamin, 200U Penicillin/ml sowie 200µg Streptomycin/ml*) in Kulturflaschen gegeben, welche mit einem Filterdeckel fest verschlossen in aufrechter Position unter mikroaerophilen Bedingungen (37°C, 10% CO₂), in einem Brutschrank aufbewahrt wurden. Zweimal wöchentllich wurden mindestens 80% des Mediums gegen frisches Medium A ausgetauscht.

2.2 Separierung der Vesikel und Bestrahlung

Nach 4 Wochen Kultivierung zeigten sich die ersten freien Vesikel in der Kulturlösung. Der Zeitpunkt der Separation wurde nach zwei Monaten gewählt, um eine hohe Vesikelausbeute zu erreichen. Die Vesikel wurden separiert und vier mal in sterilem Wasser gewaschen, um sie dann auf Kulturflaschen je 20 Vesikel in 40ml Medium B (*Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640-Medium plus Zusatz von 2 mM L-Glutamine, 200U Penicillin/ml, 200µg Streptomycin/ml, ohne FCS und Phenolrot*) für den Echinococcus multilocularis Alkalische Phosphatase (EmAP) Assay beziehungsweise in 40ml Medium A für die übrigen Versuche zu separieren.

Den Kulturflaschen zur Bestrahlung mit 50 und 100Gy wurde jeweils 1µg/ml Nitazoxanide (NTZ) zugefügt. Es wurde eine Kontrolle ohne Behandlung sowie eine Kontrolle von 1µg/ml NTZ ohne Bestrahlung durchgeführt. Durch eine weitere

Kontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO) dem Lösungsmittel des NTZ, sollte eine Wirkung durch DMSO auf das Metacestodengewebe ausgeschlossen werden.

Die zu bestrahlenden Kulturflaschen wurden nebeneinander aufrecht unter ein Telekobaltgerät positioniert. Die Feldgröße des Strahlenbündels wurde mit 32 x 32cm gewählt. Der Fokus-Oberfläche-Abstand betrug 80cm. Die Dosis wurde auf 1cm Gewebetiefe bezogen. Da die Dosis zwischen der Oberfläche und fünf Millimeter Tiefe erheblich variiert, befand sich 1cm Flüssigkeit (Medium A) über den Vesikeln. Unter den Kulturflaschen befanden sich 5cm Dosis-Aufbau-Material.

Durch diesen Aufbau konnte eine Dosishomogenität von $\pm 5\%$ erreicht werden. Die Vesikel wurden einzzeitig mit 100 und 50Gy bestrahlt. Die nicht bestrahlten Kulturflaschen wurden während der Bestrahlung im Kontrollraum aufbewahrt um einheitliche Bedingungen zu gewährleisten. Die Versuche wurden im doppelten Ansatz durchgeführt.

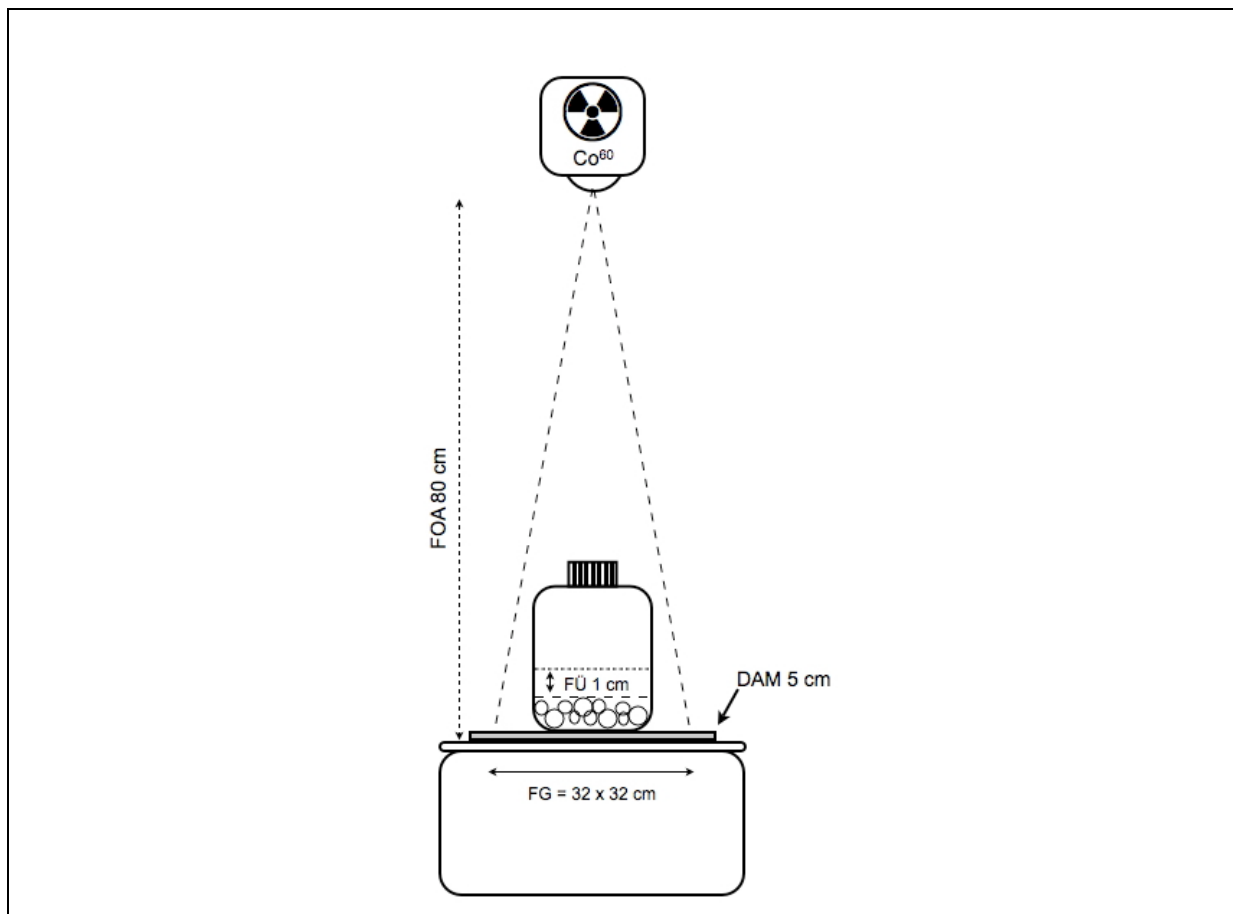


Abb. 5 Versuchsaufbau der Bestrahlung am Telekobaltgerät. Bestrahlung mit einem Fokus-Oberflächenabstand (FOA) von 80cm, einer Feldgröße (FG) von 32 x 32cm. Die Aufrecht positionierten Kulturflaschen stehen auf 5cm Dosis-Aufbau-Material (DAM), der Flüssigkeitsüberstand (FÜ) über den Vesikeln beträgt 1cm.

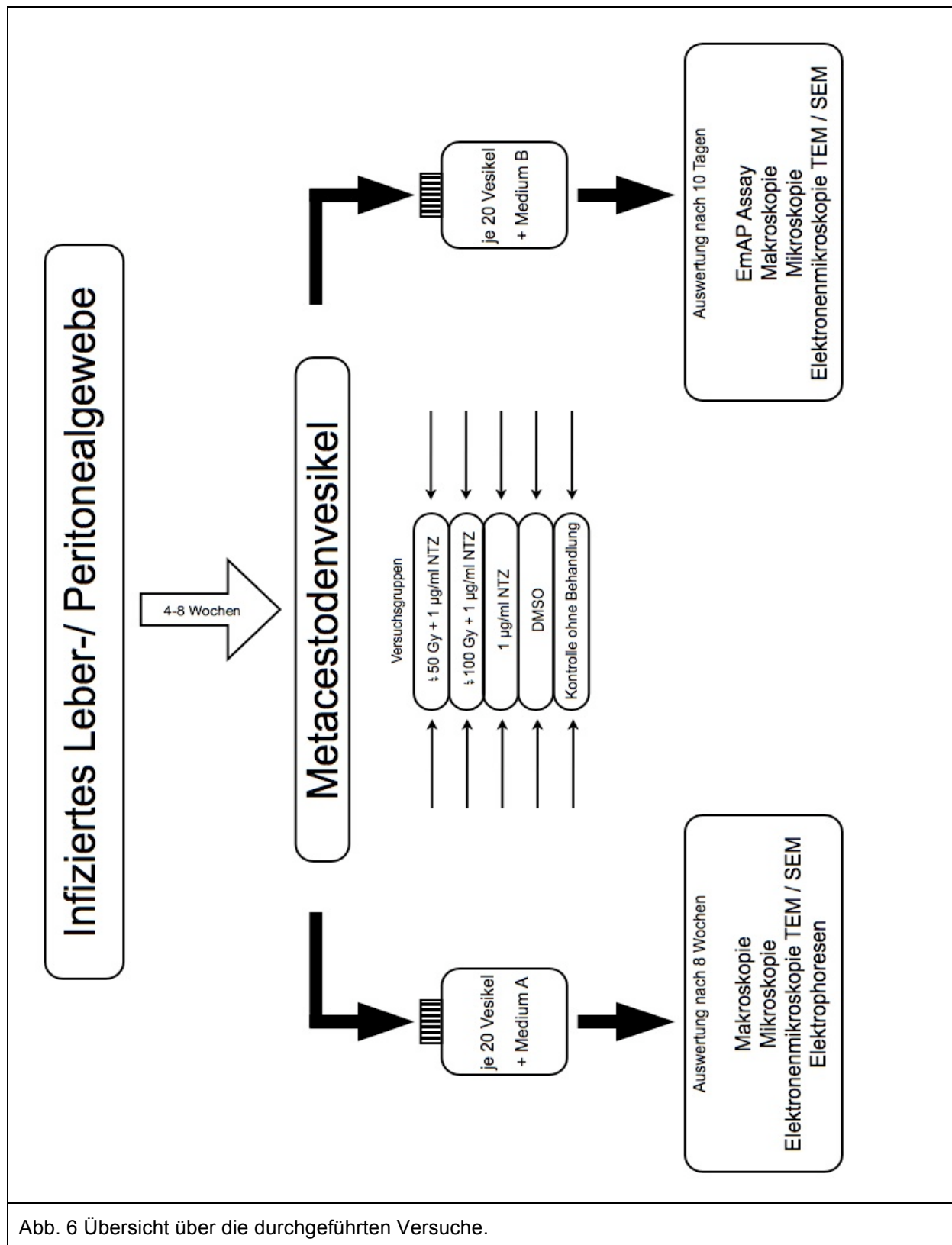


Abb. 6 Übersicht über die durchgeführten Versuche.

2.3 Echinococcus multilocularis Alkalische Phosphatase Assay

Zur Untersuchung der Viabilität wurde unter anderem die quantitative Bestimmung der EmAP Aktivität angewendet. [STE01] Die Kulturen welche für den EmAP Assay vorgesehen waren erhielten im Vorfeld, um eine photometrische Beurteilung zu ermöglichen, das Kulturmedium B (ohne den Zusatz von FCS und Phenolrot). Über einen Zeitraum von zehn Tagen wurden täglich 300µl des Kulturmediums abpipettiert und bei minus 80°C aufbewahrt. An Tag 11 wurden alle Proben gemeinsam aufgetaut und in einer Zentrifuge 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Vom Mediumüberstand wurden 30µl zusammen mit 170µl alkalische Phosphatase Substrat (P-Nitrophenyl-Phosphat) in eine 96 Loch Mikrotiterplatte pipettiert. Der Ansatz wurde 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die Extinktionen wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 405nm ausgelesen, um somit quantitativ auf die EmAP Konzentration schließen zu können.

Der Untersuchungszeitraum von 10 Tagen wurde aufgrund der Tatsache gewählt, da es nach ca. 12 – 14 Tagen bei Verwendung des Kulturmedium B, auch bei den nicht behandelten E.m. Metacestoden zu einer nutritiv bedingt vermehrten Destruktion des Parasitengewebes mit einer starken Freisetzung der EmAP kommt.

2.4 Makroskopische Beobachtung und Lichtmikroskopie

Die makroskopische Beobachtung erfolgte sowohl während der 10 Beobachtungstage des EmAP Assay als auch bei den übrigen Kulturen aus der Gruppe mit Kulturmedium A über einen weiteren Zeitraum von 8 Wochen. Die makroskopischen und lichtmikroskopischen Beobachtungen wurden einmal wöchentlich fotodokumentiert.

2.5 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden sowohl in Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) als auch in Raster-Elektronenmikroskopie (SEM) durchgeführt. Dazu wurden die Vesikel vorsichtig aus den Versuchskulturen extrahiert und in fest verschließbare Reagenzgefäße (5ml) gegeben. Nachdem das

mitextrahierte Kulturmedium vorsichtig abgesaugt wurde, wurden die Vesikel mit Glutaraldehyd (2,5%) in 100mM Phosphatpuffer fixiert. Anschließend wurden die Vesikel zur Elektronenmikroskopie aufbereitet. [HEM97] Die Vesikel wurden intensiv in destilliertem Wasser gewaschen und in Ethanol entwässert. Für die SEM Analyse wurden die Vesikel per Sublimation getrocknet, dann auf Glas-Coverslips gegeben, mit Goldpartikeln bedampft und in einem JEOL 840 Elektronenmikroskop bei 25kV betrachtet. Für die TEM Analyse wurden die Vesikel wie oben beschrieben fixiert, anschließend in destilliertem Wasser gewaschen und in Uranylacetat (1%) über 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Vesikel wurden anschließend mehrmals in Wasser gewaschen und schließlich in einer Alkoholverdünnungsreihe entwässert und in Epon 812 eingebettet. Die Polymerisation des Harzes wurde über Nacht bei 65°C durchgeführt. Schließlich wurden mit einem Ultramikrotom Schnitte angefertigt und betrachtet.

2.6 Elektrophorese und Zymographie

Die Vesikelflüssigkeit und die Mediumüberstände der Versuchskulturen wurden mittels Silbergelelektrophorese sowie Zymographie [WES84] auf ihre Proteinmuster untersucht. Die Proteine der Mediumüberstände und der Vesikelflüssigkeit wurden nach Abschluss des Beobachtungszeitraumes von acht Wochen in Methanol-Chloroform präzipitiert und dann unter reduzierenden Bedingungen per Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) separiert. Die Gele wurden dann in 50ml Fixierung für 30 Minuten fixiert und in 50 ml Thiosulfat-Puffer (0,01%) reduziert. Dann erfolgte die Rehydrierung in destilliertem Wasser. Der Ansatz wurde in 50 ml Silbernitrat Lösung (0,1%) mit Formaldehyd (0,025%) für 30 Minuten gefärbt und schließlich in Sodium Bicarbonat (2,5%) mit Formaldehyd (0,05%) entwickelt. Die Reaktion wurde mittels Zugabe von Eisessig bis zu einer Zielkonzentration von 1% gekühlt und gesteuert. Die Gele wurden in Wasser gewaschen und gelagert.

Zur Zymographie wurden die Mediumüberstände und Vesikelflüssigkeiten mittels Aceton (80%) ausgefällt. Es wurde ein Gelatinsubstrat (0,1%) zur SDS-PAGE genutzt. Die Gele wurden zweimalig 30 Minuten in Triton X-100-Puffer (2,5%) zur Entfernung des SDS und zur Renaturierung der Proteine gewaschen. Nach einer kurzen

Wasserspülung wurden die Gele über Nacht bei 37°C zusammen mit einem Inkubationspuffer (50mM Tris, pH 7,2, 50mM NaCl und 10mM CaCl₂) im Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Färbung mittels einer Coomasie-brilliantblau-Färbelösung. Nach Anwendung des Entfärbers (45% Methanol und 10% Essigsäure) konnten an den Stellen wo Proteasen aktiv waren, deutlich helle Banden vor blauem Hintergrund dargestellt werden.

Eine Übersicht über die verwendeten Reagenzien, Nährmedien sowie Geräte befindet sich im Anhang unter Punkt 6.2

3 Ergebnisse

3.1 Echinococcus multilocularis Alkalische Phosphatase Assay (EmAP)

In der Untersuchung zur Freisetzung einer Echinococcus spezifischen Alkalischen Phosphatase konnte in den Mediumüberständen der untersuchten Kulturen ab dem 4. Beobachtungstag ein Aktivitätsanstieg der EmAP in Form einer stärkeren Extinktion sowohl in der 50Gy + 1µg/ml NTZ, der 100Gy + 1µg/ml NTZ als auch in der 1µg/ml NTZ Gruppe ohne Bestrahlung gemessen werden. Die Extinktionen in der 100Gy + 1µg/ml NTZ sowie in der 1µg/ml NTZ Gruppe lagen um 0,4. Die Extinktionen der 50 Gy + 1µg/ml NTZ Gruppe lagen um 0,2. Bei der Kontrolle ohne Behandlung und bei der DMSO Kontrolle lagen die Extinktionen im Bereich zwischen 0 und 0,1.

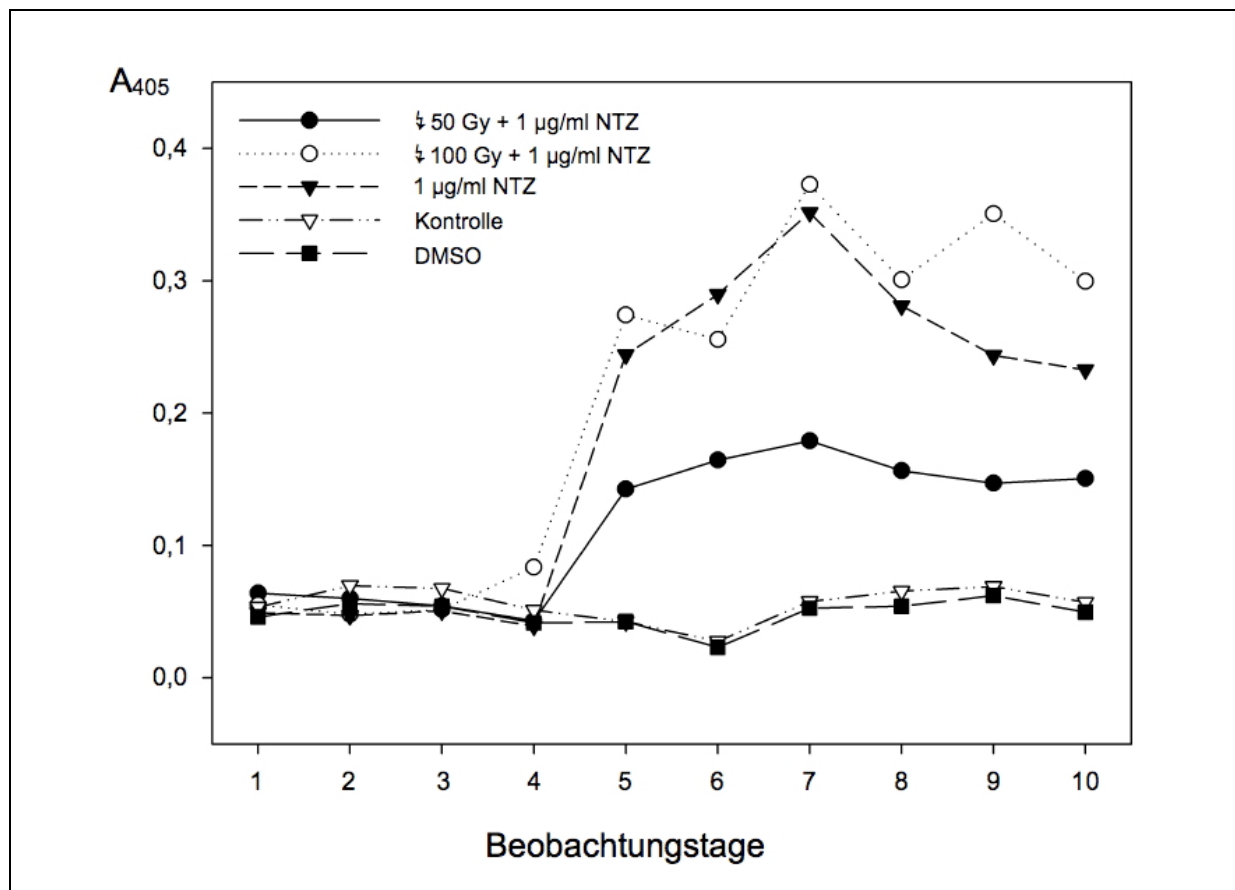


Abb. 7 Ergebnisse des EmAP Assay graphisch dargestellt. Die Aktivität der EmAP wurde photometrisch nach P-Nitro-Phenylphosphat-Umsatz bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt. Kein signifikanter Anstieg der EmAP Aktivität in der Kontrollgruppe sowie in der DMSO Gruppe. Aktivitätsanstieg bei der Behandlung mit 100Gy + 1µg/ml NTZ nahezu identisch mit der Behandlung von 1µg/ml NTZ ohne Bestrahlung.

Es konnte im Vergleich zur Anwendung von 1µg/ml NTZ durch eine zusätzliche Bestrahlung weder mit 50 noch mit 100Gy ein weiterer Anstieg der EmAP Aktivität in den Mediumüberständen der Kulturen gemessen werden.

Bei der DMSO-Kontrolle (dem Lösungsmittel des NTZ) sowie auch in der Kontrollgruppe ohne Behandlung konnte kein signifikanter Aktivitätsanstieg der alkalischen Phosphatase im Mediumüberstand gemessen werden.

3.2 Makroskopische Beobachtung und Lichtmikroskopie

Nach den 10 Tagen des EmAP Assay konnten weder makroskopisch noch lichtmikroskopisch morphologischen Veränderungen bei den Metacestodenvesikeln der verschiedenen Gruppen beobachtet werden.

Nach einer Beobachtungszeit von 8 Wochen, konnten in den mit 1µg/ml NTZ bestrahlten (50 und 100Gy) Kulturen im Vergleich zur Kontrollgruppe deutliche Unterschiede beobachtet werden. Die Vesikel der mit NTZ bestrahlten Kulturen waren in der Vielzahl kleiner im Durchmesser. Die Anzahl der Vesikel war im Vergleich zu den übrigen Gruppen verringert. Bei den mit 1µg/ml NTZ behandelten Metacestodenvesikeln, die keine Bestrahlung erhielten, konnten keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Auch die Vesikel der DMSO Gruppe zeigten keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. In allen Gruppen in denen NTZ verwendet wurde, konnten sporadisch eine Dissoziation der laminaren Lage von der germinativen Zellschicht sowie ein Turgorverlust mit der Folge der Vesikelschrumpfung beobachtet werden. Bei den in den Kulturen ausgebildeten Kopfanlagen des E.m., konnten in der Kontrollgruppe nach einiger Beobachtungszeit eine deutliche Motilität, bei morphologisch intakten Kopfanlagen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten die mit 1µg/ml NTZ bestrahlten Gruppen (50 und 100Gy) keine Beweglichkeit. Morphologisch waren die Kopfanlagen deutlich verplumpt und somit nicht regelrecht ausgebildet.

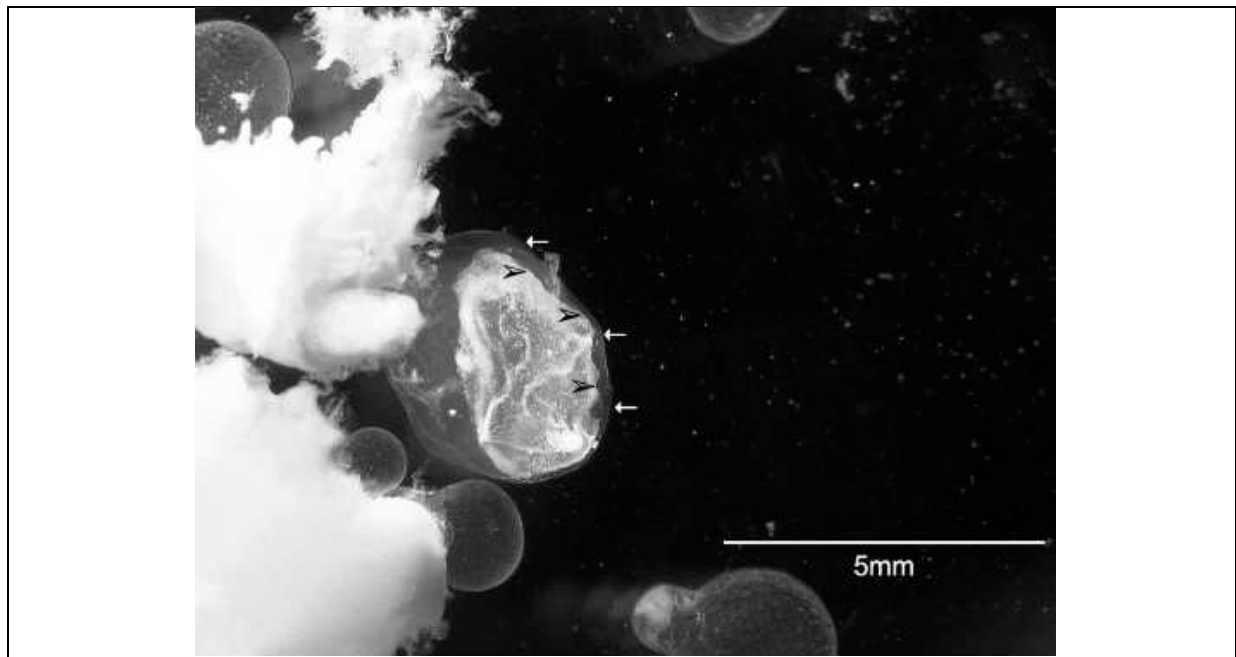


Abb. 8 Mikroskopie der Metacystodenvesikel: Dissoziation der Laminarschicht ($\leftarrow$) von der germinativen Schicht ($\blacktriangleright$). Eine typische Wirkung von 10 μ g/ml NTZ. In den Versuchskulturen mit 1 μ g/ml NTZ jedoch nur sporadisch beobachtet.

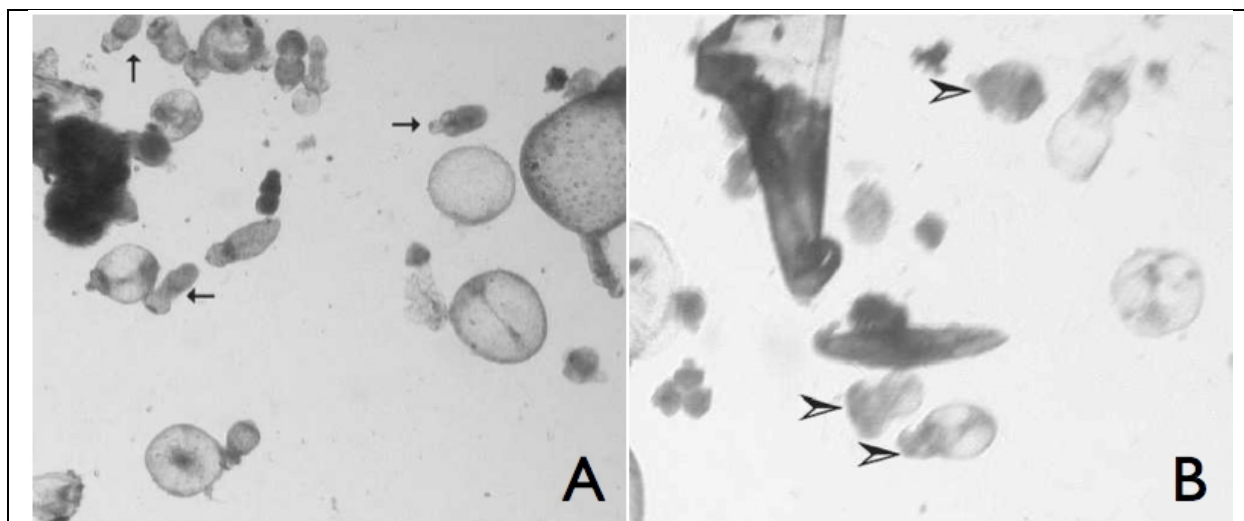


Abb. 9 Mikroskopie von Kopfanlagen des *Echinococcus multilocularis*: A Kontrollgruppe mit morphologisch intakten motilen Kopfanlagen ($\rightarrow$); B Kopfanlagen nach Bestrahlung mit 50Gy + 1 μ g/ml NTZ. Die morphologisch deutlich verplumpten Kopfanlagen ($\blacktriangleright$) zeigten auch nach längerer Beobachtung keine Motilität.

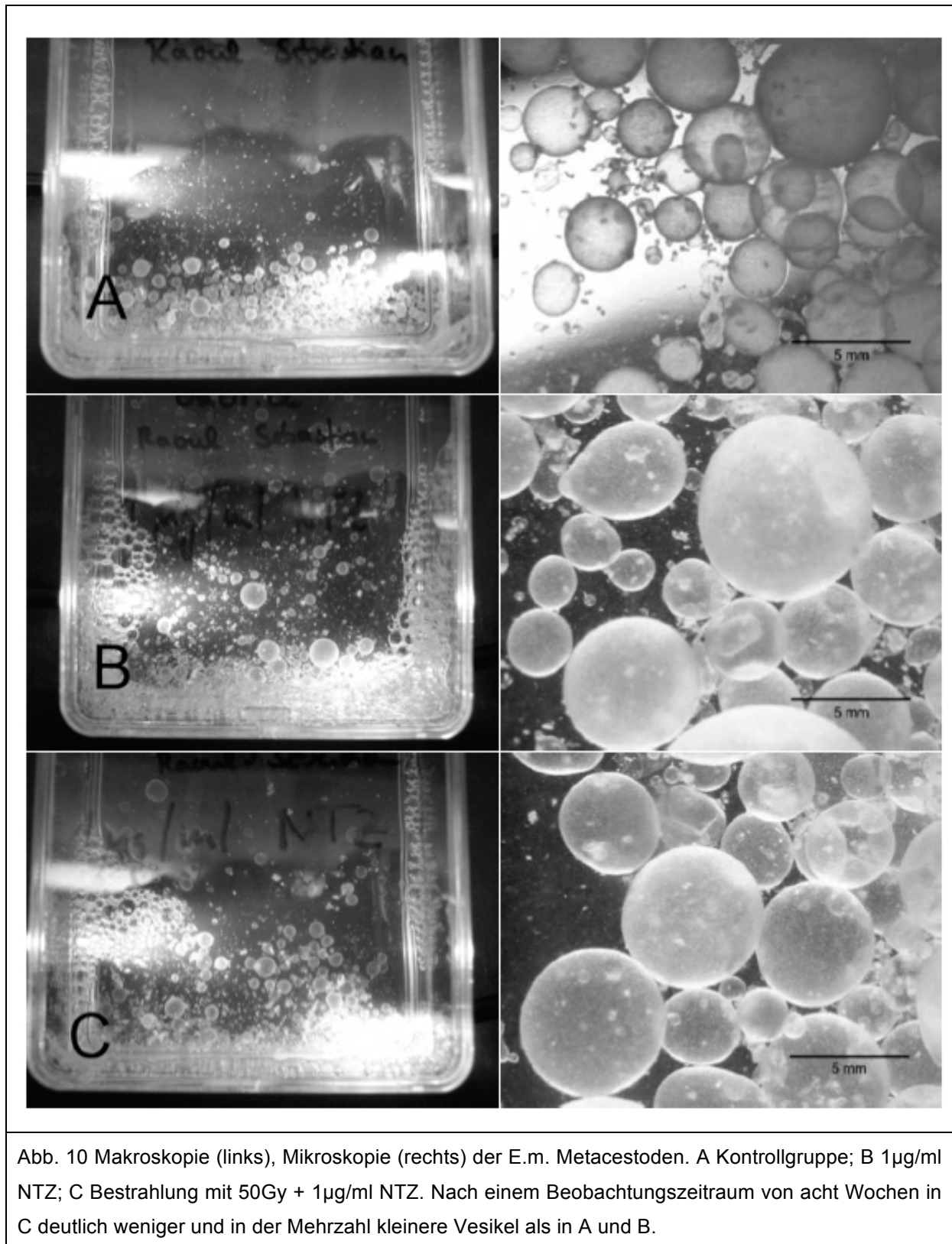
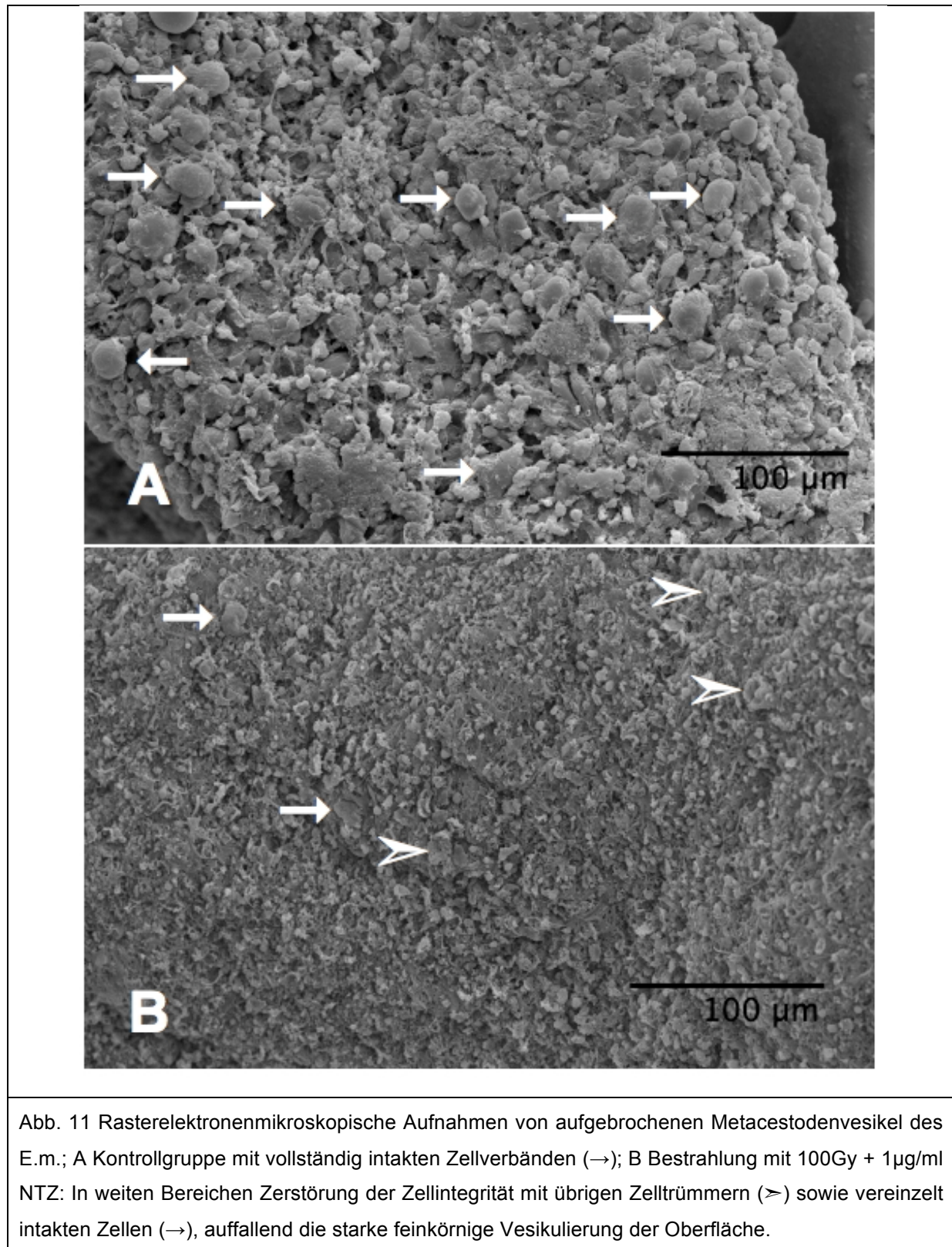


Abb. 10 Makroskopie (links), Mikroskopie (rechts) der E.m. Metacystodens. A Kontrollgruppe; B 1 µg/ml NTZ; C Bestrahlung mit 50Gy + 1 µg/ml NTZ. Nach einem Beobachtungszeitraum von acht Wochen in C deutlich weniger und in der Mehrzahl kleinere Vesikel als in A und B.

3.3 Elektronenmikroskopie

In der Rasterelektronenmikroskopie konnten bei den Metacestoden sowohl in den mit 50 als auch 100Gy + 1µg/ml NTZ behandelten Gruppen deutliche Veränderungen beobachtet werden. In den mit 1µg/ml NTZ bestrahlten Gruppen zeigte eine nahezu vollständige Aufhebung der Integrität der germinativen Zellschicht. Die charakteristische multizelluläre Struktur mit undifferenzierten Zellen, Muskelzellen sowie Glycogenspeicherzellen war weitestgehend aufgehoben. Es lagen Zelltrümmer aller Zelltypen der germinativen Zellschicht vor. Eine für NTZ typische Dissoziation der germinativen Zellschicht von der Laminarschicht konnte jedoch nicht beobachtet werden. Im Vergleich zwischen 50 und 100Gy + 1µg/ml NTZ konnten rasterelektronenmikroskopisch keine signifikanten morphologischen Unterschiede im Metacestodengewebe beobachtet werden. In der Kontrollgruppe lag eine intakte germinative Zellschicht vor. Die Integrität der Zellverbände war vollständig erhalten.

Die in der Rasterelektronenmikroskopie beobachteten Veränderungen konnten dann mittels Transmissionselektronenmikroskopie weiter differenziert werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe fanden sich in den mit 1µg/ml NTZ bestrahlten Gruppen (sowohl 50 als auch 100Gy) eine Anhäufung von Vesikeln im Zytoplasma der germinativen Zellen. Es konnte auch eine Häufung von intrazytoplasmatischen Lipidtröpfchen beobachtet werden. Die Mitochondrien der mit NTZ bestrahlten Gruppen wiesen im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe eine Schwellung auf und waren deutlich abgerundet. Auch im Tegument der Metacestoden konnte eine deutliche Vacuolisierung beobachtet werden. Die Glycogenspeicherzellen waren im Gegensatz zur Kontrollgruppe alle entleert. An der azellulären Laminarschicht, welche den Parasiten nach außen zum umgebenden Wirtsgewebe abkapselt sowie an den Mikrotubuli konnten keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden.



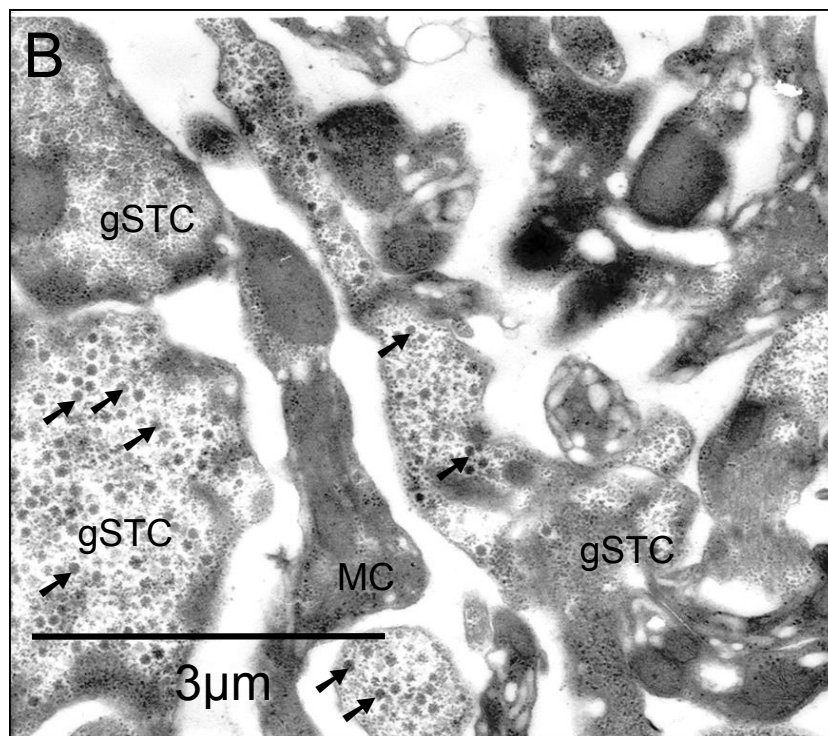
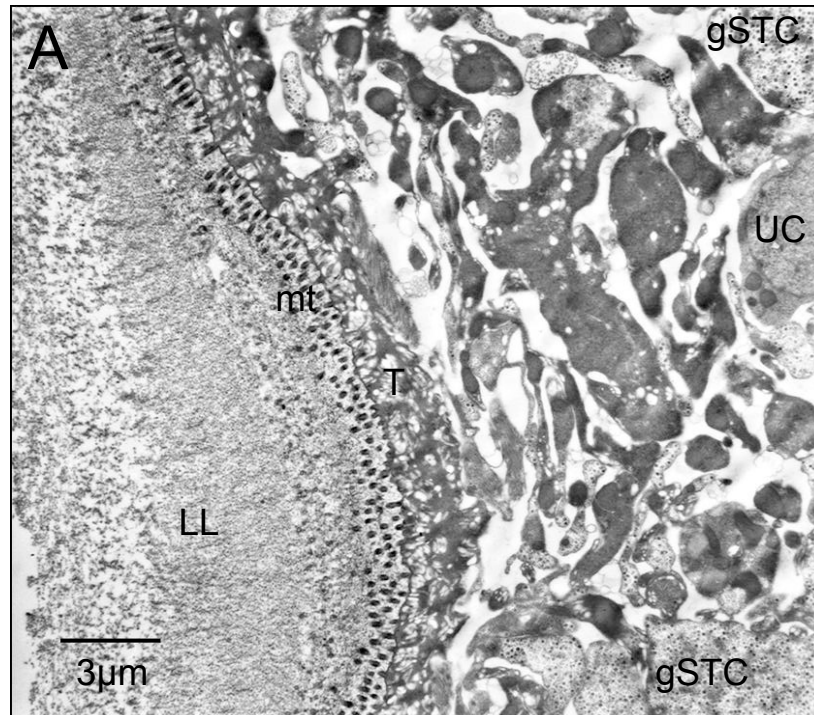


Abb. 12 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Kontrollgruppe; A intakten undifferenzierten Zellen (UC) sowie vollen Glycogenspeicherzellen (gSTC), Tegument (T) ist intakt und Mikrotubuli (mt) ragen regelrecht in die Laminarschicht (LL); B Volle Glycogenspeicherzellen mit Glycogenkristallen den sog. Snowflakes (↗), Anschnitt einer Muskelzelle (MC)

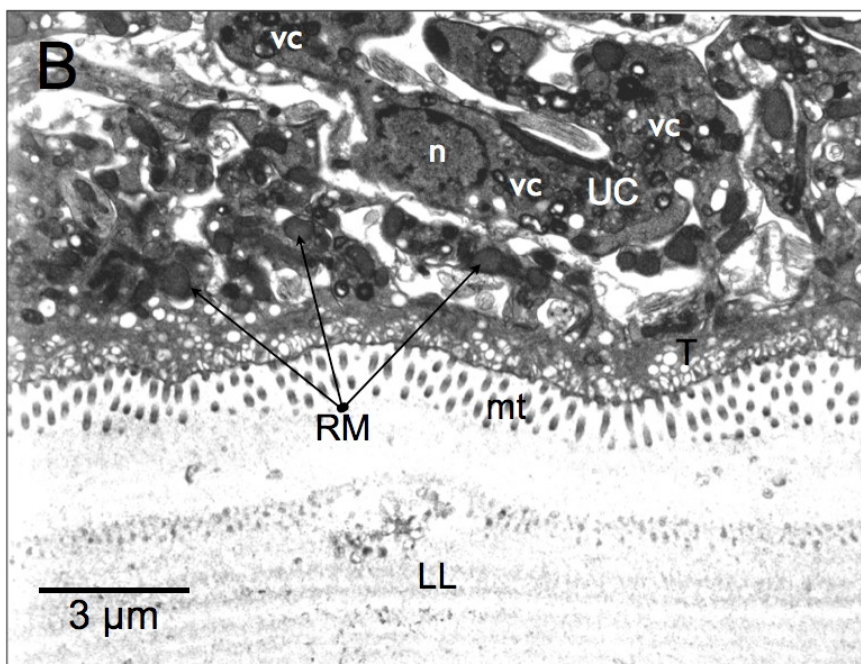
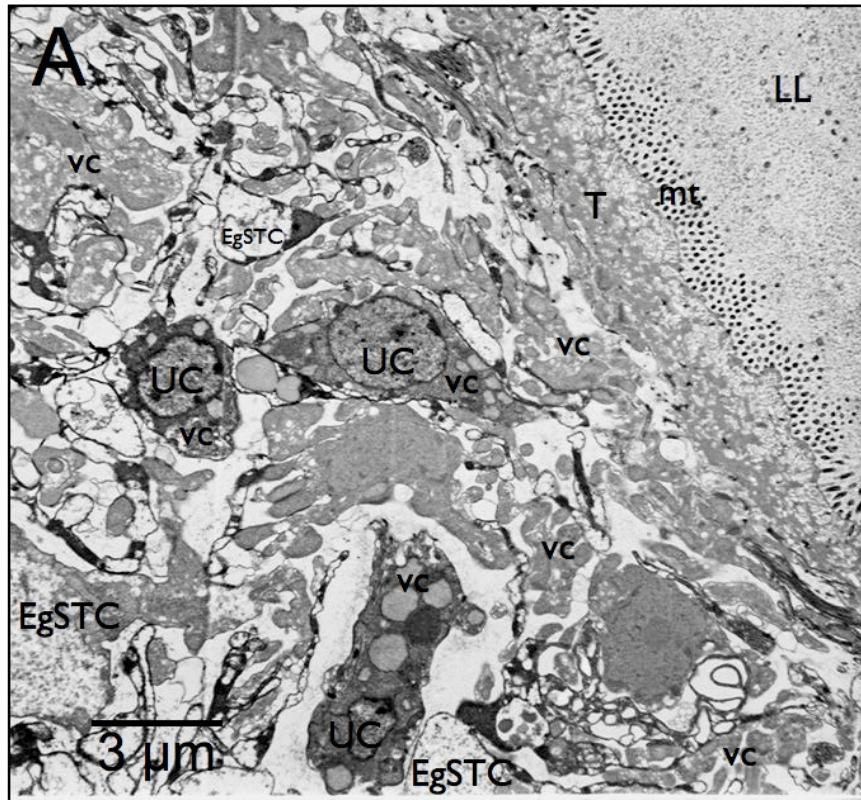


Abb. 13 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen des mit NTZ bestrahlten Metacystodengewebes: A 50Gy + 1µg/ml NTZ, deutliche Vesikulierung des Cytoplasmas (vc) der undifferenzierten Zellen (UC) sowie leere Glycogenspeicher (EgSTC). Mikrotubuli (mt) und Laminarschicht (LL) intakt; B 100Gy + 1µg/ml NTZ. Veränderungen wie in A, zusätzlich abgerundeten Mitochondrien (RM), Zellkern (n) der undifferenzierten Zell intakt.

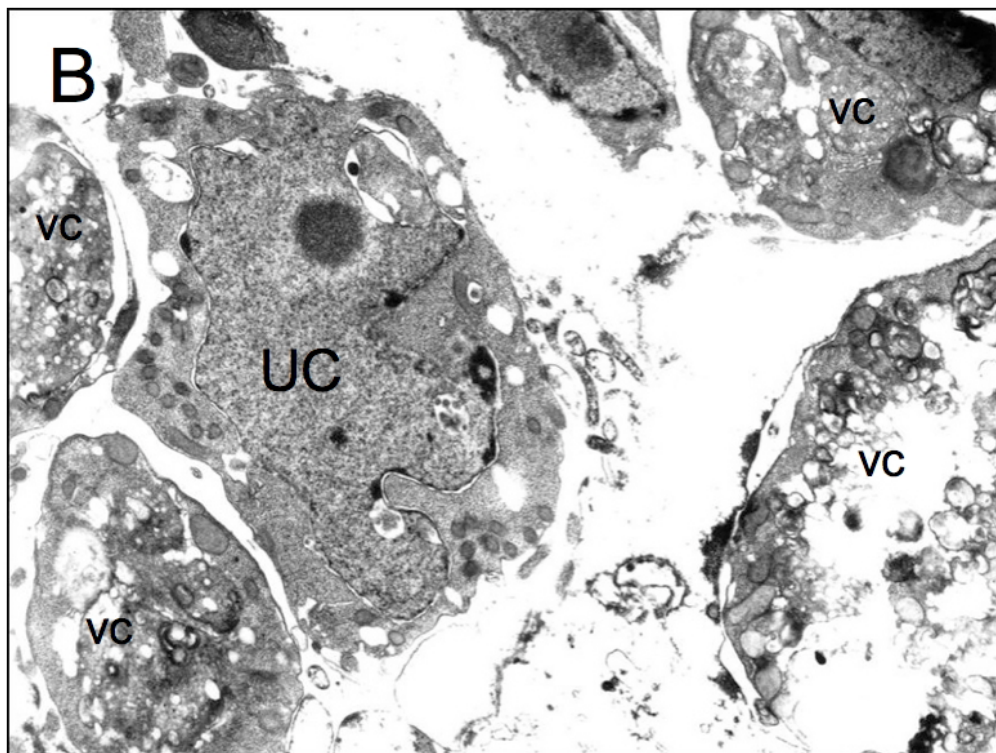
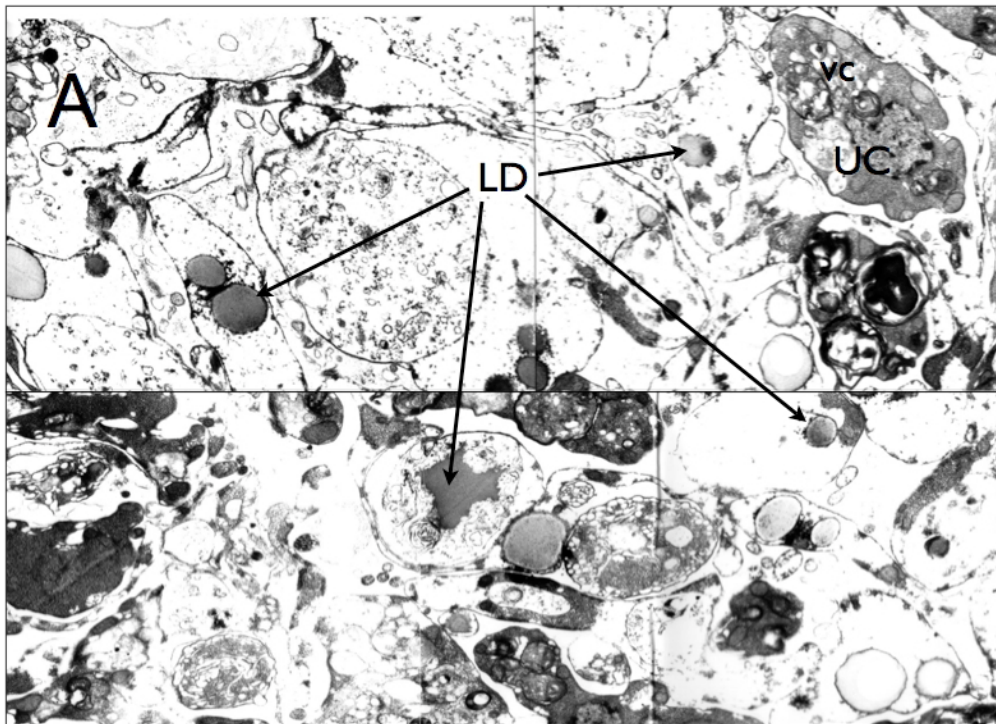


Abb. 14 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen des Metacystodengewebes behandelt mit 100Gy + 1µg/ml NTZ: A Undifferenzierte Zelle (UC) mit vesikulierendem Zytoplasma (vc), vermehrtes Auftreten von Lipidkörperchen (LD). B zentral intakte Zelle (UC), stark geschädigten Zellen mit Vesikelbildung im Zytoplasma (vc)

3.4 Elektrophorese der sekretorischen Komponenten

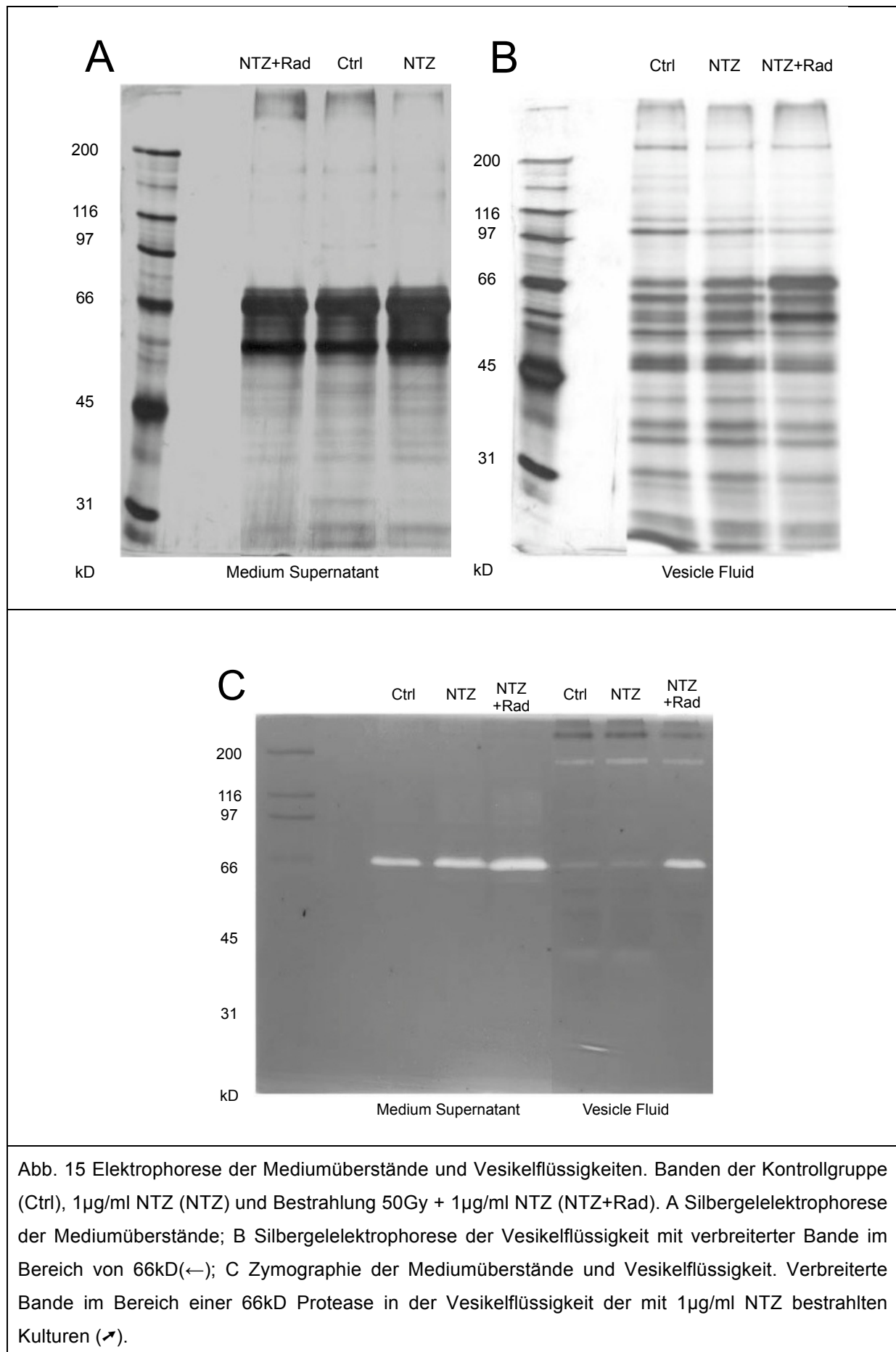
Um mögliche Veränderungen bei den in der Vesikelflüssigkeit und in den Mediumüberständen befindlichen Proteinen nachzuweisen, kamen die Silbergelelektrophorese (SDS-PAGE) sowie die Zymographie zur Anwendung.

Bei der Silbergelelektrophorese der Mediumüberstände und der Vesikelflüssigkeit der Metacestoden, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen Bestrahlung (100 und 50Gy) + 1µg/ml NTZ, 1µg/ml NTZ ohne Bestrahlung sowie der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. In den Mediumüberständen konnten bei allen Gruppen in gleicher Menge Proteine im Größenbereich von 50 bis 70 Kilodalton (kD) nachgewiesen werden.

In der Vesikelflüssigkeit fanden sich in allen Gruppen ähnliche Proteinbanden im Bereich zwischen 20 und 200kD. In den mit 1µg/ml NTZ bestrahlten Gruppen zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle ohne Behandlung sowie 1µg/ml NTZ ohne Bestrahlung eine breitere Bande im Bereich eines 66 kD Proteins.

Die Zymographie der Mediumüberstände konnte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Proteasen in den Versuchsgruppen liefern. Bei der Bestrahlung mit 50 bzw. 100Gy + 1µg/ml NTZ, in der Kontrollgruppe ohne Behandlung sowie in der 1µg/ml NTZ Gruppe ohne Bestrahlung konnte eine ähnlich starke Expression einer 66kD Proteinase gesehen werden.

In der Zymographie der Vesikelflüssigkeiten zeigte sich bei allen untersuchten Gruppen eine Expression von Proteasen im Größenbereich von 66kD sowie im Bereich von 200kD und weitere darüber. In der mit 1µg/ml NTZ bestrahlten Gruppe konnte im Vergleich zur Kontrolle ohne Behandlung sowie der Anwendung von 1µg/ml NTZ ohne Bestrahlung eine stärkere Expression der 66kD Protease beobachtet werden.



4 Diskussion

Die alveoläre Echinokokkose (AE), hervorgerufen durch eine Infektion mit Metacestoden des *Echinococcus multilocularis* (E.m.), stellt auf Grund der hohen Letalität im Falle einer unbehandelten Erkrankung beim Menschen, immer noch eine große Gefahr dar. Bei einem Befall von Organen, deren chirurgische Therapie auf Grund eines infiltrativen Wachstums, ähnlich wie bei den bösartigen Neubildungen, eine Resektion im Gesunden oft unmöglich macht, ist eine lebenslange Therapie mit Benzimidazolpräparaten (Albendazol, Mebendazol) notwendig. [WHO01] [AMM00] Ein weiteres Problem stellt ein metastatisches Potential mit Absiedelungen in andere Organe ausgehend vom primär infiziertem Organ dar. Hinzu kommt noch die späte Diagnose auf Grund des langsamen Wachstums des Parasiten, welche eine Intervention in einem frühem Stadium unwahrscheinlich macht. [GOT00] [MEH83]

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kombination eines in vitro parasitoziden Medikamentes mit einer Anwendung von ionisierender Strahlung an *Echinococcus multilocularis* Metacestoden untersucht.

Die Untersuchung einer kombinierten Anwendung wurde auf Grund der guten parasitoziden in vitro Wirksamkeit von Nitazoxanide (NTZ) gegen *Echinococcus multilocularis* Metacestoden sowie dessen chemisch ähnlichen Struktur mit einigen Radiosensitizern wie zum Beispiel Metronidazol durchgeführt. [URT75] [STE03] [WAS97] Um einen möglichen Effekt deutlich zu differenzieren, wurde die Dosis von $1\mu\text{g/ml}$ NTZ gewählt, bei der in einer Anwendung ohne ionisierende Bestrahlung keine signifikanten Veränderungen bei E.m. Metacestoden zu erwarten sind. [STE03] In Bakterien und Cryptosporidien konnte der Wirkmechanismus des NTZ über einen Eingriff in den anaeroben Energiemetabolismus erklärt werden. Die Pyruvat Ferredoxin Oxidoreductase (PFOR) reduziert NTZ zu einem Radikal durch eine Reaktion der 5-Nitrogruppe am nitroheterocyclischen Ring. Zur genaueren Wirkung des NTZ bei Bandwürmern gibt es derzeit jedoch keinen Anhalt. [SIS02] [GIL02] Die für eine mögliche Wirkung als Radiosensitizer am Imidazolring substituierte Nitrogruppe, ist beim NTZ an einem heterocyclischen Ring substituiert. Auf Grund dieser Tatsache könnte NTZ eine Bestrahlung in hypoxischen Geweben effektiver machen. Die lipophilen Radiosensitizer werden nach Aufnahme in hypoxischen Gewebe kovalent

an zytoplasmatische Proteine gebunden. Durch die Reduzierung zu Radikalanionen durch ubiquitär vorhandene Nitroreduktasen kann das Molekül die Zelle nicht mehr verlassen. Eine Rückdiffusion wäre nur nach Reoxidierung in Gegenwart von Sauerstoff möglich. [ADA73] Durch die Bildung von Nitroradikalen sowie Sekundärradikalen nach Bestrahlung der Substanzen, könnten somit Schäden an Biomolekülen hervorgerufen werden.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit richtete sich an mögliche morphologische Veränderungen beim Metacestodengewebe des E.m. durch eine mit NTZ kombinierte ionisierende Bestrahlung. Des Weiteren sollte geklärt werden wie sich die Anwendung dieser Kombinationsbehandlung auf die Viabilität der Metacestoden verhält.

Zur Klärung der Fragestellung wurde zunächst ein geeignetes Versuchsmodell gesucht. Die Wahl eines in vitro Versuchsaufbau erschien in mehrer Hinsicht von Vorteil. Besonders eine Bestrahlung, der in vitro Kultur von Metacestoden in Kombination mit NTZ, gestaltet sich einfacher als die Bestrahlung eines infizierten Wirtes. Untersuchungen zur Anwendung verschiedenster Pharmaka bei E.m. Metacestoden sind in dem in dieser Untersuchung verwendeten in vitro Versuchsaufbau mehrfach etabliert. [HEM02] [STE03] Die verwendeten Bestrahlungsdosen sollten in einem Bereich jener liegen, die bei einer Teilbestrahlung einer Menschenleber angewendet werden. Eine derart hohe Dosis auf das Zielvolumen einer Mäuseleber zu applizieren, würde jedoch einen hohen Aufwand erfordern. Das Versuchstier müsste für die Bestrahlung anästhesiert werden um nur die Bestrahlung des Zielvolumens sicher zu stellen. Eine Ganzkörperbestrahlung einer Maus, mit einer Dosis von beispielsweise 50Gy würde zu ausgeprägten Schäden an den schnellproliferierenden Wechselgeweben führen, welche innerhalb kurzer Zeit den Tod des Versuchstieres zur Folge hätten. Die Letaldosen, bei denen 50% der Tiere nach 30 Tagen (LD 50/30) Sterben, betragen nur 5Gy. [BON65] [WAS97]

Da die untersuchten Grundlagen eine therapeutische Option für die Anwendung beim Menschen zum Ziel haben, wurden die Dosen mit 50 und 100Gy in Kombination mit 1µg/ml NTZ im Bereich einer therapeutisch möglichen fraktionierten Leber-

Teilbestrahlung beim Menschen gewählt. Aus früheren Arbeiten zur Anwendung von Gammabestrahlung an *Echinococcus granulosus* (E.g.) Metacestoden war bereits bekannt dass eine signifikant verminderte Infektiösität ab einer Dosis von 300Gy zu erwarten war. Eine Kombination mit einem parasitoziden Medikament erfolgte jedoch nicht. [SIN88] [CHA90]

Zur Auswertung der Fragestellung wurden die morphologischen Veränderungen makroskopisch, lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch dokumentiert. Zum Nachweis der Viabilität der Metacestoden des *Echinococcus multilocularis* kamen verschiedene etablierte Verfahren zur Anwendung.

Die Untersuchung einer *Echinococcus* spezifischen alkalischen Phosphatase (EmAP) im Kulturmedium der Versuchskulturen gestaltet sich als einfaches Verfahren um eine Zellschädigung des Parasiten nachzuweisen. Ein quantitativer Nachweis der Freisetzung der in der germinativen Schicht zellwandständigen alkalischen Phosphatase ins Kulturmedium korreliert direkt mit einer Zellschädigung durch parasitozide Substanzen der dort ansässigen Zellen. [STE01] [STE03] Ein signifikanter Anstieg der alkalischen Phosphatase im Vergleich der unterschiedlichen Versuchsgruppen konnte in unserem Ansatz allein auf die Verwendung von NTZ zurückgeführt werden. Bei der Untersuchung der alkalischen Phosphatase konnte durch eine Kombination von Bestrahlung mit 1 μ g/ml NTZ keine stärkere Extinktion, als Korrelat zur Schädigung des Metacestodengewebes, beobachtet werden. Unsere gemessenen Extinktionen lagen in den Bereichen, die in der Untersuchung zur Anwendung der EmAP als Marker zur in vitro Untersuchung von Medikamenten und denen einer Untersuchung zur Anwendung von NTZ bei Metacestoden des *Echinococcus multilocularis* bereits bekannt waren. [STE01] [STE03]

In den zehn Beobachtungstagen des EmAP Assay ließen sich weder makroskopische noch lichtmikroskopische Veränderungen als Marker der Viabilität in den Versuchskulturen beobachten. Die nach 8 Wochen in den mit 1 μ g/ml NTZ bestrahlten Gruppen (50 und 100Gy) beobachtete Veränderung in Bezug auf Größe und Anzahl der Vesikel, können im Vergleich zur Kontrollgruppe als Merkmal verminderter Viabilität gedeutet werden.

Diese morphologischen Kriterien wurden so auch in Verschiedenen Untersuchungen zur in vitro Anwendung von verschiedenen Pharmaka auf E.m. Metacestoden als Viabilitätsmarker gewertet. [JUR98] [REU03] [ING99] Ein Turgorverlust der Vesikel als Nachweis einer verminderten Viabilität konnte nicht festgestellt werden. Die makroskopische sowie lichtmikroskopische Dissoziation der Laminarschicht von der germinativen Schicht, wie sie bei wenigen Vesikeln beobachtet wurde, konnte wie auch bei anderen Untersuchern, auf die Anwendung von NTZ in einer Dosis von $1\mu\text{g/ml}$ zurückgeführt werden. [STE03] Die Veränderungen in den mit $1\mu\text{g/ml}$ NTZ bestrahlten Gruppen lassen somit makroskopisch und lichtmikroskopisch eine Parasitostase erkennen. Das Absterben des Metacestodengewebes mit deutlichem Turgorverlust bei einer Vielzahl der Vesikel blieb jedoch aus.

Eine Parasitostase ließe sich durch eine strahlenbedingte Zellzyklus-Verzögerung erklären. In Säugerzellen kann eine bestrahlungsinduzierte Steigerung des intrazellulären Protein p53, welches eine Expression von Protein p21 bewirkt, zu einem Zellzyklus-Arrest führen. [ROS99] Nach irreparablen bestrahlungsinduzierten Schäden könnte sich in der Folge auch ein permanenter Arrest gefolgt von Differenzierung und Alterung versus apoptotischen Zelltod ausbilden. [ROS99] Ob die Steuerung des Zellzyklus beim E.m. auch mit diesen Regulationsmechnismen erfolgt, bleibt derzeit jedoch unbeantwortet.

Eine fehlende Beweglichkeit sowie die verplumpte Form von Kopfanlagen, wie sie in den mit NTZ bestrahlten (50 und 100Gy) Gruppen beobachtet wurde, sind als Viabilitätsmerkmal bei der Untersuchung verschiedener Pharmaka bei E.m. Metacestoden etabliert. [OHN84] [ARU06] [SMY80] Die beobachteten Veränderungen konnten somit ein Absterben der Kopfanlagen nach einer Bestrahlung (50 oder 100Gy) in Kombination mit $1\mu\text{g/ml}$ NTZ nachweisen.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten als Endpunktuntersuchungen nach 10 Tagen und nach 8 Wochen, wobei kein signifikanter Unterschied bezüglich der verschiedenen Zeitpunkte beobachtet werden konnte. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Kombination von 50 versus 100Gy mit $1\mu\text{g/ml}$ NTZ konnte weder in der Rasterelektronenmikroskopie noch in der Transmissionselektronenmikroskopie erbracht werden.

Die Rasterelektronenmikroskopie zeigte eine nahezu vollständige Zerstörung der Zellintegrität der germinativen Zellschicht in den mit $1\mu\text{g/ml}$ NTZ bestrahlten Metacestoden. Diese Beobachtung konnte in ähnlicher Ausprägung durch eine alleinige Anwendung von NTZ in einer Dosis von $10\mu\text{g/ml}$, nach längerer in vitro Anwendung von Albendzol-Sulfoxide sowie nach der in vitro Anwendung von Genistein nachgewiesen werden. [STE03] [ING99] [STE01] [ARU06]

Im Transmissionsverfahren konnten die zuvor beschriebenen Veränderungen weiter differenziert werden. Die Vacuolisierung des Zytoplasmas in den mit $1\mu\text{g/ml}$ NTZ bestrahlten Gruppen (50 und 100Gy), das Auftreten von elektronendichten Körperchen in den Zellen der germinativen Schicht, die Anhäufung von vielen kleinen Vesikeln im Tegument sowie im Zytoplasma und die Abrundung der Mitochondrien sowie das Auftreten von Lipidkörperchen konnten analog der Ergebnisse der Untersuchungen verschiedener parasitostatischer und parasitozider Substanzen und deren Metabolite als nekroseartige Veränderungen gedeutet werden. [ING99] [STE03] Auch die Desintegration der Zellverbände mit der Auflösung von Zell-Zell-Kontakten, wie sie in der Rasterelektronenmikroskopie gesehen wurde und im Transmissionsverfahren verifiziert werden konnte, wurde auch bei der Anwendung anderer Pharmaka als Veränderungen im Rahmen einer Nekrose gedeutet. [ING99] [STE03] [ARU06] Die Entleerung von Glycogenspeicherzellen konnte bereits bei der in vitro Anwendung von $10\mu\text{g/ml}$ NTZ bei E.m. Metacestoden beobachtet werden. Die für NTZ typische Verkürzung der Mikrotubuli, welche als Vermittler zwischen germinativer und laminarer Schicht zu deren Dissoziation führt, blieb sowohl bei der Anwendung von 50Gy plus $1\mu\text{g/ml}$ NTZ als auch bei einer Dosis von 100Gy plus $1\mu\text{g/ml}$ NTZ aus. [STE03]

Zusammenfassend lassen sich die elektronenmikroskopischen Veränderungen nach einer kombinierten Anwendung einer Bestrahlung (sowohl mit 50 als auch mit 100Gy) mit $1\mu\text{g/ml}$ NTZ in weiten Bereichen des Metacestodengewebes mit dem Bild einer Nekrose beschreiben. Die Ausbildung von Radionekrosen ist auch bei der Bestrahlung von humanen Geweben bekannt. Die Effekte die bei der Bestrahlung von Geweben auftreten werden in frühe und Späte Effekte unterteilt. Besonders in schnellproliferierenden Geweben prägen sich Schäden durch ionisierende Bestrahlung an zellulären Komponenten wie der DNA aus. In der Folge stellt sich nach einer oder mehrfacher Zellteilung der Zelltod ein. Auch Zelluntergang durch

Apoptose kommt besonders bei proliferativ tätigen Zellen in der Interphase vor. Andere akute Veränderungen durch ionisierende Bestrahlung lassen sich auf die Aktivierung von verschiedenen zellulären Signalwegen zurückführen. Es kommt in der Folge zu einer Freisetzung von Cytokinen, diese sind in den meisten Fällen jedoch gewebespezifisch. [STO03] Die Erkenntnisse aus der Bestrahlung von humanen Geweben lassen sich wahrscheinlich auf die Metacestoden des E.m. übertragen. Signaltransduktionswege über den EGF-Rezeptor sowie eine ERK-MAP Kinase konnten in *Echinococcus multilocularis* Metacestoden bereits nachgewiesen werden. [BRE06][SPI03][SPI06]

Die Untersuchung der Vesikelflüssigkeiten und Mediumüberstände auf sekretorische Komponenten in Form von Proteinen und Proteasen erfolgte durch die Silbergelelektrophorese und die Zymographie. Die Bestrahlung (50 und 100 Gy) mit 1µg/ml NTZ führte im Vergleich zur Kontrolle ohne Behandlung sowie zur 1µg/ml NTZ Kontrolle zu keinen signifikanten Veränderungen der Proteinmuster in den Mediumüberständen. In den Vesikelflüssigkeiten konnte mittels der Silbergelelektrophorese in den mit 1µg/ml NTZ bestrahlten Gruppen im Vergleich zur Kontrolle sowie der Anwendung von 1µg/ml NTZ ohne Bestrahlung, eine größere Menge eines 66kD Proteins nachgewiesen werden. Analog konnte durch die Zymographie dieses als Protease identifiziert werden. Der Übertritt von intrazellulären Proteasen in die Vesikelflüssigkeit scheint durch die Veränderungen der Nekrose, mit Aufhebung von Zell-Zell-Kontakten sowie Zerstörung der Zell-Membran plausibel. Da die Protein-/ Proteasenmuster in den Vesikelflüssigkeiten sowie in den Mediumüberständen in allen Gruppen in weiten Bereichen eine hohe Ähnlichkeit aufwiesen, konnte eine Korrelation zu den ausgeprägten elektronenmikroskopisch morphologischen Veränderungen nicht eindeutig erfolgen.

Bei der Untersuchung von NTZ unter simultan ionisierender Bestrahlung konnten in vitro reproduzierbare ultrastrukturelle Veränderungen gezeigt werden. Die Veränderungen ließen sich in weiten Bereichen als Nekrosen des Metacestodengewebes des E.m. interpretieren. Bezüglich der Viabilität ließen sich die angewendeten Verfahren jedoch nicht eindeutig miteinander korrelieren. Besonders die in der Rasterelektronenmikroskopie gesehenen Veränderungen der germinativen Zellschicht, sowie die mikroskopischen Beobachtungen bei den

Kopfanlagen führten zu der Erwartung einer vollständigen Zerstörung des Parasiten. Makroskopisch imponierte eine verminderte Proliferation bei den mit $1\mu\text{g/ml}$ NTZ bestrahlten Metacestoden, welche sich möglicherweise auf bestrahlungsinduzierte Schäden in der Folge eines Zellzyklusarrestes zurückführen lässt.

Die Kombination eines parasitoziden Medikamentes, welches eine chemisch ähnliche Struktur zu den Radiosensitizern aufweist, mit der Anwendung einer ionisierenden Bestrahlung, könnte somit als therapeutische Option bei einer Infektion des Menschen mit *Echinococcus multilocularis* in Frage kommen. In einem Casereport aus dem Jahr 1998 konnte bereits über einen positiven Verlauf eines Hirnbefalls beim Menschen mit Metacestoden des E.m. nach Anwendung einer Gammaknife-Therapie in Kombination mit Albendazol und Interferon γ berichtet werden. Die 28 Jährigen Patientin litt unter einem Befall von Lunge, Leber und Hirn. Besonders der Hirnbefall zeigte unter laufender Therapie mittels Mebendazol eine deutliche Progression, so dass es zu einer rechtsseitigen Hemiparese sowie starken Kopfschmerzen bei der Patientin kam. Die Therapie wurde daraufhin mittels Interferon γ und einer stereotaktischen Hirnbestrahlung eskaliert. In der anschließend dreijährigen Nachuntersuchungszeit konnte über eine deutliche Regression der intracerebralen cystischen Läsionen sowie über eine deutliche Besserung der neurologischen Symptomatik berichtet werden.[SCH98]

Besonders bei progredienten Verläufen könnte die Kombination von ionisierender Strahlung und der Anwendung von NTZ in der Dosierung von $10\mu\text{g/ml}$ im Rahmen eines Heilversuchs erfolgen.

Eine parasitozide Wirkung der Bestrahlung mit 50 oder 100Gy mit $1\mu\text{g/ml}$ NTZ konnte in der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig belegt werden. Die Beantwortung der Frage nach der Infektiosität des mit NTZ bestrahlten Metacestodengewebes müsste in weiteren Versuchen durch Reinfektionen von Versuchstieren erfolgen. In einer Untersuchung zur Strahlentherapie von *Echinococcus multilocularis* konnten nach einer Anwendung von 45 Gy in Bezug auf die Infektiosität keine signifikanten Aussagen getroffen werden. Fünfzig Prozent der mit bestrahlten Metacestodengewebe reinfizierten Tiere, bildete eine AE aus. Morphologische Untersuchungen der bestrahlten Metacestoden erfolgten jedoch nicht [GRI98]

Die Untersuchungen der Grundlagen eines möglich neuen Therapieansatzes, bei der Kombination von Nitazoxanide mit einer ionisierenden Bestrahlung an Metacestoden des *Echinococcus multilocularis*, konnten somit neue Erkenntnisse liefern. Die auf dem Weg zur klinischen Anwendung noch offen stehende Fragestellungen konnten hierbei nicht allumfassend beantwortet werden.

5 Literaturverzeichnis

- [ADA73] Adams GE (1973) Chemical radiosensitization of hypoxic cells. British Medical Bulletin 29: 48 - 53
- [AMA02] Amadi B, Mwiya M, Musuku J et al. (2002) Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomised controlled trial. Lancet 360: 1375 - 1380
- [AMM99] Amman R W, Fleiner Hoffmann A, Eckert J, Schweizerische Echinokokkose-Studiengruppe (1999) Schweizerische Studie für Chemotherapie der alveolären Echinokokkose – Rückblick auf ein 20-jähriges klinisches Forschungsprojekt. Schweizer Medizinische Wochenschrift 129: 323
- [AMM00] Amman R W (2000) Neo- und Adjuvante Therapie bei Echinokokkose. Der Chirurg 71: 9 – 15
- [ARU06] Arunasalam N, Spicher M, Vonlaufen N, Ortega-Mora L M, Torgerson P, Gottstein B, Hemphill A (2006) In Vitro Metacestodicidal Activities of Genistein and Other Isoflavones against Echinococcus multilocularis and Echinococcus granulosus. Antimicrobial Agents and Chemotherapie 50 (11): 3770 - 3778
- [BON65] Bond VP, Fliedner TM, Archambeau JO (1965) Mammalian Radiation Lethality: a Disturbance of Cellular Kinetics. Academic Press Inc., New York
- [BRE06] Brehm K, Siliotis M, Zavala-Gongora R, Konrad C, Frosch M (2006) The molecular mechanisms of larval cestode development: first Steps into an unknown world. Parasitology International 55 Suppl.(1): 55 – 21

- [CHA90] Charmy R A, el-Gindy H, Mansour M, Gad H S (1990) Effect of gamma irradiation on the rate of cyst development of *E. granulosus* larvae in Swiss albino mice. *Journal of the Egypt Society of Parasitology* 20 (1): 297 – 306
- [DAY05] Dayes S, Abuzallouf S (2005) Local tumour control in women with carcinoma of the cervix treated with the addition of nitroimidazole agents to radiotherapy: a meta-analysis. *British Journal of Radiology* 78: 777 - 782
- [ECK00] Eckert J, Conraths F J, Tackmann K (2000) Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *International Journal for Parasitology* 30: 1283 – 1294
- [WHO01] Eckert J, Gemmell M A, Meslin F X, Pawlowski Z S (2001) WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern. World Organization for Animal Health & World Health Organization, Paris, France
- [GIL02] Gilles HM, Hoffman PS (2002) Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanide. *Trends in Parasitology* 18: 95 - 97
- [GOT00] Gottstein B (2000) Epidemiologie und Systematik der cystischen und alveolären Echinokokkose. *Der Chirurg* 71: 1 – 8
- [GRI98] Gripp S, Hilger B, Romig T (1998) Strahlentherapie von Echinokokkus multilokularis. Poster zur DEGRO
- [HAR03] Harman M, Arslan M, Kotan C, Etlik O, Kayan M, Deveci A (2003) MRI findings of hepatic alveolar echinococcosis. *Clinical Imaging* 27 (6): 411 - 416

- [HEM02] Hemphill A, Stettler M, Walker M, Siles-Lucas M, Fink R, Gottstein B (2002) Culture of *Echinococcus multilocularis* metacestodes: an alternative to animal use. *Trends in Parasitology* 18 (10): 445 – 451
- [HEM97] Hemphill A, Croft S L (1997) Electron microscopy in parasitology. In: Rogan M, editor. *Analytical parasitology*. Heidelberg, Germany Springer Verlag. 227 – 268.
- [ING99] Ingold K, Bigler P, Thormann W, Cavaliero T, Gottstein B, Hemphill A (1999) Efficacies of Albendazole Sulfoxide and Albendazole Sulfone against In Vitro-Cultivated *Echinococcus multilocularis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapie* 43 (5): 1052 - 1061
- [JEN01] Jensen B, Reuter S, Kratzer W, Naser K, Kaechele V, Kimmig P, Kern P (2001) Long-term seropositivity against *Echinococcus multilocularis* in an epidemiological follow-up study in southwestern Germany (Romerstein). *Infection* 29 (6): 310 – 314
- [JUR98] Jura H, Bader A, Frosch M (1998) In Vitro Activities of Benzimidazoles against *Echinococcus multilocularis* Metacestodes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapie* 42 (5): 1052 - 1056
- [MAR74] Markell EK, Beal CB (1974) Resistance of *Echinococcus multilocularis* to X-ray. *Journal of Parasitology* 60 (4): 729 – 730
- [MAR87] Marx R E, Johnson R P (1987) Studies in the radiobiology of osteoradionecrosis and their clinical significance. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 64 (4): 379 – 390
- [MEH83] Mehlhorn H, Eckert J, Thompson R C A (1983) Proliferation and Metastases Formation of Larval *Echinococcus multilocularis*. *Zeitschr f Parasitenkunde* 69: 749 – 763

- [OHN84] Ohnishi K, Nakao M, Inaoka T (1984) Viability and infectivity of protoscolices of *Echinococcus multilocularis* stored at different temperatures. *International Journal for Parasitology* 14 (6): 577 – 580
- [REU03] Reuter S, Merkle M, Brehm K, Kern P, Manfras B (2003) Effect of Amphotericin B on Larval Growth of *Echinococcus multilocularis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapie* 47 (2): 620 – 625
- [REU01] Reuter S, Nüsse K, Kolokythas O, Haug U, Rieber A, Kern P, Kratzer W (2001) Alveolar Liver Echinococcosis: A Comparative Study of Three Imaging Techniques. *Infection* 29: 119 – 125
- [ROM99] Romig T, Bilger B, Dinkel A, Merli M, Mackenstedt U (1999) *Echinococcus multilocularis* in animal hosts: new data from western europe. *Helminthologia* 36 (3): 185 – 191
- [ROS99] Ross M (1999) Induction of cell death by radiotherapy. *Endocrine-Related Cancer* 6: 41 - 44
- [SCH98] Schmid M, Pendl G, Samonigg H, Ranner G, Eustacchio S, Reisinger EC (1998) Gamma Knife Radiosurgery and Albendazol for Cerebral Alveolar Hydatid Disease. *Clinical Infectious Diseases* 26: 1379 – 82
- [SHI97] Shibamoto Y, Ohshio G, Hosotani R, Nishimura Y, Manabe T, Imamura M, Abe M (1997) A phase I/II study of a hypoxic cell radiosensitizer KU-2285 in combination with intraoperative radiotherapy. *British Journal of Cancer* 76 (11): 1474 – 1479
- [SIN88] Singh B P, Dhar D N (1988) Effect of gamma irradiation on the Protoscolices of *Echinococcus granulosus* of sheep origin. *International Journal for Parasitology* 18 (4): 557 – 560

- [SIS02] Sisson G, Goodwin A, Raudonikiene A, Hughes NJ, Mukhopadhyay AK, Berg DE, Hoffman PS (2002) Enzyme associated with reductive activation and action of nitazoxanide, nitrofurans and metronidazol in helicobacter pylori. *Antimicrobial Agents and Chemotherapie* 46: 2116 - 2123
- [SMI84] Smith PJ, Anderson CO (1984) Modification of the radiation sensitivity of human tumor cells by a bis-benzimidazole derivate. *International Journal of Radiation Biology* 46 (4): 331 - 344
- [SMY80] Smyth J D, Barrett N J (1980) Procedures for testing the viability of human haydatid cysts following surgical removal, especially after chemotherapie. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74 (5): 649 – 652
- [SPI03] Spiliotis M, Kroner A, Brehm K (2003) Identification, molecular characterization and expression of the gene encoding the epidermal growth factor receptor orthologue from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Gene* 323: 57 – 65
- [SPI06] Spiliotis , Konrad C, Gelmedin V, Tappe D, Bruckener S, Mosch H U (2006) Characterization of EmMPK1, an ERK-like MAP kinase from *Echinococcus multilocularis* which is activated in response to human epidermal growth factor. *International Journal for Parasitology* 36 (10 – 11): 1097 – 1112
- [STE03] Stettler M, Fink R, Walker M, Gottstein B, Geary T G, Rossignol J F, Hemphill A (2003) In Vitro Parasitocidal Effect of Nitazoxanide against *Echinococcus multilocularis* Metacestodes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapie* 47 (2): 467 – 474

- [STE01] Stettler M, Siles-Lucas M, Sarciron E, Lawton P, Gottstein B, Hemphill A (2001) Echinococcus multilocularis Alkaline Phosphatase as a Marker for Metacestode Damage Induced by In Vitro Drug Treatment with Albendazole Sulfoxide and Albendazole Sulfone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapie* 45 (8): 2256 – 2262
- [STO03] Stone H B, Coleman C N, Anscher M S, McBride W H (2003) Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *The Lancet Oncology* 4 (9): 529 – 536
- [SUG05] Sugie C, Shibamoto Y, Ito M, Ogino H, Suzuki H, Nagasawa H, Hori H (2005) Reevaluation of the Radiosensitizing Effects of Sanazole and Nimorazole In Vitro and In Vivo. *Journal of Radiation Research* 46: 453 – 459
- [URT75] Urtasun R C, Chapman J D, Band P, Rabin H R, Fryer C G, Sturmwind J (1975) Phase 1 Study of High-Dose Metronidazole: A specific In Vivo and In Vitro Radiosensitizer of Hypoxic Cells. *Radiology* 117: 129 – 133
- [WAR07] Wardman P (2007) Chemical Radiosensitizers for Use in Radiotherapie, *Clinical Oncology* 19 (6):397 - 417
- [WAS97] Wassermann T, Chapman JD, Coleman CN, Kligerman MM (1997) Principles & Practice of Radiation Oncology, Third Edition; edited by C. A. Perez and L. W. Brady. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia Copyright. Chapter 25, pp 685-704.
- [WES84] Wessel D, Flügge U I (1984) A method for quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergent. *Analytical Biochemistry* 138:141-143

6 Anhang

6.1 Glossar

<i>AE</i>	<i>Alveoläre Echinokokkose</i>
<i>CE</i>	<i>Cystische Echinokokkose</i>
<i>CT</i>	<i>Computertomographie</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimethylsulfoxid (Lösungsmittel des NTZ)</i>
<i>DNA</i>	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
<i>E.g.</i>	<i>Echinokokkus granulosus</i>
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay</i>
<i>E.m.</i>	<i>Echinococcus multilocularis</i>
<i>Em2+</i>	<i>Echinococcus multilocularis-2+ Protein</i>
<i>Emc</i>	<i>Echinococcus multilocularis- c-Protein</i>
<i>EmAP</i>	<i>Echinococcus multilocularis spezifische alkalische Phosphatase</i>
<i>FCS</i>	<i>Fetales Kalbserum</i>
<i>Gy</i>	<i>Gray</i>
<i>HEPES</i>	<i>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) Ethansulfonsäure</i>
<i>HIV</i>	<i>Humanes Immundefizienz Virus</i>
<i>IMDM</i>	<i>Iscoe's Modified Dulbecco's Medium (Kulturmedium)</i>
<i>JÜR</i>	<i>Jahres-Überlebens-Rate</i>
<i>kD</i>	<i>Kilodalton</i>
<i>MRT</i>	<i>Magnetresonanztomographie</i>
<i>NTZ</i>	<i>Nitazoxanide</i>
<i>PAS</i>	<i>Perjod-Schiff-Säure</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate Buffered Saline (Pufferlösung)</i>
<i>PFOR</i>	<i>Pyruvat Ferredoxin Oxidoreduktase</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
<i>RNA</i>	<i>Ribonukleinsäure</i>
<i>RPMI</i>	<i>Roswell Park Memorial Institute (Kulturmedium)</i>
<i>SDS-PAGE</i>	<i>Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese</i>
<i>SEM</i>	<i>Rasterelektronenmikroskopie</i>
<i>TEM</i>	<i>Transmissionselektronenmikroskopie</i>
<i>WHO</i>	<i>World Health Organisation</i>
<i>ZNS</i>	<i>Zentrales Nervensystem</i>

6.2 Übersicht über verwendete Materialien

E.m. Metacestodengewebe

*Prof. Dr. Andrew Hemphill, Institut für Parasitologie der Vetsuisse Fakultät und der Medizinischen Fakultät Universität Bern: Leber-/ Peritonealmaterial von peritoneal infizierten Mongolischen Rennmäusen (*Meriones unguiculatus*)*

*Dr. Thomas Romig Institut für Zoologie FG Parasitologie der Universität Hohenheim: Leber-/ Peritonealmaterial von peroral infizierten Felmäusen (*Microtus agrestis*)*

Medien

<i>IMDM</i>	<i>Cambrex Bio Science, Verviers (B)</i>
<i>RPMI 1640 (farblos)</i>	<i>Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)</i>
<i>FCS</i>	<i>Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)</i>
<i>Penicillin/ Streptomycin</i>	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis MO (USA)</i>

Chemikalien

<i>PBS pH 7,3</i>	<i>Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)</i>
<i>Alkalische Phosphatase - Ecoline 25 Test-Kit</i>	<i>Merck Diagnostica, Darmstadt (D)</i>
<i>Nitazoxanide</i>	<i>Romark Industries, Kalamazoo MI (USA)</i>
<i>Gold-Partikel</i>	<i>Amersham, Zürich (CH)</i>
<i>Epon 812</i>	<i>Gibco BRL, Zürich (CH)</i>
<i>Thiosulfatpuffer</i>	<i>Gibco BRL, Zürich (CH)</i>
<i>Silbernitratlösung</i>	<i>Gibco BRL, Zürich (CH)</i>
<i>Formaldehyd</i>	<i>Gibco BRL, Zürich (CH)</i>
<i>Sodium Bicarbonat</i>	<i>Gibco BRL, Zürich (CH)</i>
<i>Eisessig</i>	<i>Gibco BRL, Zürich (CH)</i>
<i>Aceton</i>	<i>Gibco BRL, Zürich (CH)</i>
<i>Triton X 100</i>	<i>Gibco BRL, Zürich (CH)</i>
<i>Methanol</i>	<i>Gibco BRL, Zürich (CH)</i>
<i>Ethanol</i>	<i>Gibco BRL, Zürich (CH)</i>

<i>Coomassie brilliant Blau</i>	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis MO (USA)</i>
<i>Essigsäure</i>	<i>Gibco BRL, Zürich (CH)</i>
<i>Glutaraldehyd</i>	<i>Gibco BRL, Zürich (CH)</i>
<i>Phosphatpuffer</i>	<i>Gibco BRL, Zürich (CH)</i>
<i>Aqua destilata</i>	<i>Gibco BRL, Zürich (CH)</i>
<i>Uranylacetat</i>	<i>Gibco BRL, Zürich (CH)</i>
<i>Gelatinsubstrat</i>	<i>Gibco BRL, Zürich (CH)</i>

Verbrauchsmaterial

<i>Tubes 50 ml; 15 ml</i>	<i>Falcon BD Biosciences, Heidelberg (D)</i>
<i>96-Well-Platten (steril)</i>	<i>Costar, Corning NY (USA)</i>
<i>Kulturflaschen 75 cm²</i>	<i>Costar, Corning NY (USA)</i>
<i>Pipetten</i>	<i>Costar, Corning NY (USA)</i>
<i>Glas Coverslips</i>	<i>Plano GmbH, Marburg (D)</i>

Geräte

<i>CO₂ Brutschrank</i>	<i>Heraeus, Hanau (D)</i>
<i>Sterilbank</i>	<i>Gelaire, Sydney (AU)</i>
<i>Wasserbad</i>	<i>Köttermann Labortechnik Uetze/ Häsingen (D)</i>
<i>Lichtmikroskop</i>	<i>Carl Zeiss, Jena (D)</i>
<i>Photometer</i>	<i>Tecan Rainbow, Zürich (CH)</i>
<i>Telecobalt-Gerät</i>	
<i>Elektronenmikroskop Jeol 840</i>	<i>Jeol Ltd., Tokyo (JP)</i>
<i>Ultramikrotom</i>	<i>Reichert & Jung, Heidelberg (D)</i>
<i>Peldri II</i>	<i>Plano GmbH, Marburg (D)</i>

Danksagung

Besonderer Dank gilt allen Personen die diese Dissertation ermöglicht haben.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater PD Dr. Stephan Gripp für das interessante Thema sowie die gute Betreuung.

Besonders möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Colin MacKenzie bedanken, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und allzeit gut betreut hat und somit die technische Durchführung dieser Arbeit in großem Maße ermöglichte.

Auch Prof. Dr. Andrew Hemphill möchte ich danken, dass er mich wie einen Mitarbeiter seiner eigenen Arbeitsgruppe aufgenommen und in die Thematik eingeführt hat.

Weiterer Dank geht an Dr. Thomas Romig der zu einem großen Teil das Parasitenmaterial uneigennützig bereitstellte.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen möchte ich Frau Silke Stuhlsatz (MTA) danken.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die Unterstützung bei der Absolvierung des langjährigen Medizinstudiums und der Vollendung dieser Dissertation.

Düsseldorf im Januar 2009

Raoul Ernst

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: *Raoul Ernst*
Geburtsdatum/ -ort: *26.07.1978, Duisburg*
Staatsangehörigkeit: *deutsch*
Familienstand: *ledig*
Konfession: *evangelisch*

Schulbildung

1984 – 1986 *Grundschule, Maasbree NL*
1986 – 1989 *Gemeinschaftsgrundschule Markt,*
Duisburg/ Homberg
1989 – 1991 *Gesamtschule Ehrenstraße,*
Duisburg/ Homberg
1991 – 1998 *Gesamtschule Anne Frank, Moers*
Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1998 – 1999 *Interdisziplinäre Intensivstation, Städtische*
Kliniken Duisburg,

Studium

1999 – 2005 *Universität Düsseldorf*
Ärztliche Vorprüfung 08/2001
1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 08/2002
2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 08/2004
2004 – 2005 *Praktisches Jahr*
Anästhesiologie, Innere Medizin 10/2004 – 05/2005
KH Benrath, Düsseldorf
Chirurgie, Kantonsspital Baden, CH 05/2005 – 09/2005
3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 11/2005
12/2005 *Approbation als Arzt*

Promotion

2003 – 2009

*Untersuchung der Wirkung von Nitazoxanide
unter simultan ionisierender Bestrahlung auf
Echinococcus multilocularis Metacestoden,
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und
Radiologische Onkologie,
Universitätsklinikum Düsseldorf*

Berufstätigkeit

10/1999 – 12/2004

*Studentische Aushilfe auf der
interdisziplinären Intensivstation, Klinikum
Duisburg*

01/2006 – 03/2006

*Assistenzarzt der Klinik für Anästhesie und
Intensivmedizin, Knappschafts Krankenhaus
Bottrop*

Seit dem 01.04.2006

*Assistenzarzt der Klinik für Anästhesie und
Operative Intensivmedizin, KH Benrath, jetzt
Sana Kliniken Düsseldorf*

Düsseldorf, den 17.01.2009