

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

**Die Wirkung ionisierender Strahlen auf
die Metacestoden des
Echinococcus multilocularis
- eine Untersuchung an in-vitro-Kulturen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sebastian Pohle

2009

Als Inauguraldissertation gedruckt
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: apl. Prof. Dr. med. Stephan Gripp
Koreferent: Prof. Dr. med. Colin MacKenzie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Glossar	3
1. Einleitung	4
1.1. Überblick	4
1.2. Biologie	4
Lebenszyklus.....	4
Infektion des Menschen	5
Aufbau der Leberläsionen	6
1.3. Epidemiologie	7
Verbreitung	7
Inzidenz / Prävalenz	8
1.4. Klinische Befunde	8
1.5. Diagnose	9
1.6. Therapie	10
1.7 Strahlentherapie.....	10
Strahlenbiologische Effekte	11
Fragestellung.....	12
2. Material und Methoden	13
2.1. Versuchsablauf	13
2.2. Kulturverfahren	14
2.3. Gewinnung freier Vesikel und Bestrahlung.....	14
2.4. Untersuchung der Viabilität.....	15
EmAP-Assay	15
Makroskopische Beobachtung	16
Lichtmikroskopie.....	17
Elektronenmikroskopie	17
Untersuchung radiogener Veränderungen der Proteinsynthese	17
Zymographie.....	18
Silbergelektrophorese zur Bestimmung des Proteasensmusters	18

3. Ergebnisse	19
3.1. Untersuchung mit EmAP-Assay (Kurzzeitbeobachtung)	19
3.2. Versuch ohne EmAP-Assay (Langzeitbeobachtung).....	24
4. Diskussion	27
5. Anhang	34
5.1. Übersicht Materialien	34
Parasitenmaterial	34
Mediumkomponenten	34
Sonstige Materialien	34
Chemikalien	34
Verbrauchsmittel	35
5.2 Übersicht Geräte	35
6. Literatur	37
7. Lebenslauf	44
8. Danksagung	45
9. Eidesstattliche Erklärung	46
10. Zusammenfassung	47

Glossar

AE	Alveoläre Echinokokkose
DMSO	Dimethylsulfoxid (Lösungsmittel)
ELISA	Enzyme linked immunoabsorbent assay
E.m.	Echinococcus multilocularis
Em2+	Echinococcus multilocularis-Protein
Emc	Echinococcus multilocularis-Protein
EmAP	Echinococcus multilocularis-spezifische alkalische Phosphatase
FCS	Fetales Kalbserum
Gy	Gray
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Media (Kulturmedium)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid
NTZ	Nitazoxanide
PBS	Phosphate Buffered Saline (Pufferlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RPMI	Royal Park Memorial Institute (Kulturmedium)
SDS-PAGE	Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
SEM	Rasterelektronenmikroskopie
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
% v/v	Volumenprozent
% w/w	Gewichtsprozent

1. Einleitung

1.1. Überblick

Die Alveoläre Echinokokkose (AE) stellt für den Menschen eine lebensbedrohliche Parasitose dar. Vor allem Mitte der 90-er Jahre des letzten Jahrhunderts ist diese seltene Erkrankung in die öffentliche Aufmerksamkeit gerückt [KEY 94]. Durchschlagende Erfolge in der antimikrobiellen Therapie haben sich bei der Bekämpfung der AE bislang nicht eingestellt. Auch heute ist nur eine lebenslange parasitostatische Therapie möglich. Unter diesen Bedingungen beträgt die Rate für Rezidivfreiheit lediglich zwischen 70 und 80% [REU 00]. Die notwendige Einnahme von Antihelminthika der Bezimidazolgruppe ist außerdem mit Nebenwirkungen und Unverträglichkeiten verbunden. In der vorliegenden Arbeit haben wir untersucht, ob die Anwendung ionisierender Strahlen eine Alternative in dieser unbefriedigenden Situation bietet.

1.2. Biologie

Lebenszyklus

Der Fuchsbandwurm *Echinococcus multilocularis* gehört zur Familie der Cestoden. Er ist ein enger Verwandter des Hundebandwurms *E. granulosus*. Der nur wenige Millimeter lange adulte Wurm kommt im Dünndarm von Füchsen (*Vulpes vulpes*), gelegentlich jedoch auch bei Hund und Katze vor. Der infizierte Endwirt scheidet mit seinem Kot Proglottiden aus, die Bandwurmeier enthalten. Diese sind sowohl für die natürlichen Zwischenwirte – Nagetiere, v.a. aus der Familie der Kurzschwanzmäuse wie z.B. Feld- (*Microtus agrestis*) und Schermaus (*Arvicola terrestris*) – als auch für den Menschen nach peroraler Aufnahme infektiös. Im Darm des Zwischenwirtes schlüpfen aus den Eiern die so genannten Oncosphären, die in die Darmwand eindringen und über die Lymphgefäße und die Pfortader zunächst in die Leber gelangen. Hier bilden sich – im Unterschied zu einer Infektion mit *E. granulosus*, welche mit der Bildung von großen, meist solitären Zysten einhergeht – verzweigte, schlauchförmige Strukturen mit bis zu zwei Zentimeter großen Zysten aus, die ein tumorähnliches Wachstum zeigen. Diese

Strukturen bilden eine große Menge von Kopfanlagen (Protoscolices) aus. Wird die Maus vom Endwirt gefressen, kann die infizierte Leber im Darm neue adulte Bandwürmer bilden. Nach etwa vier Wochen ist der Wurm in der Lage, neue Eier zu produzieren [GOT 00] (siehe Abb. 1.1).

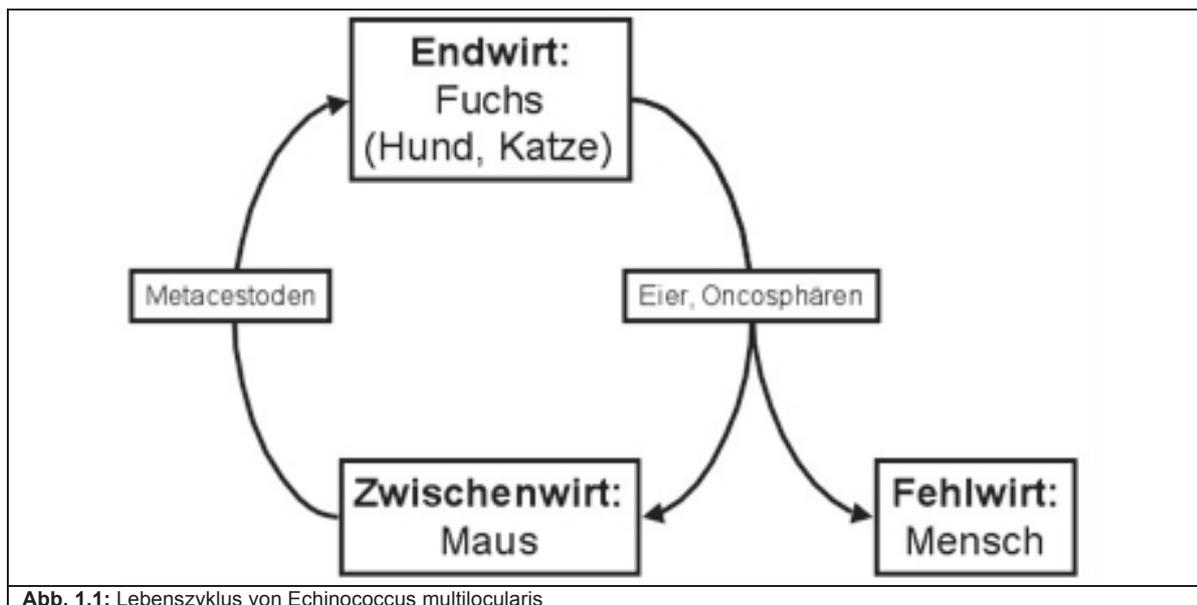


Abb. 1.1: Lebenszyklus von *Echinococcus multilocularis*

Infektion des Menschen

Die Infektion des Menschen erfolgt mittels oraler Aufnahme der Bandwurmeier bei Kontakt mit einem infizierten Endwirt oder mit dessen Kot, beispielsweise durch den Verzehr kontaminierter Waldfrüchte [ECK 00].

Wie in der Maus können im Darm des Menschen die Onkosphären schlüpfen und in die Leber einwandern. Der Mensch stellt für die Entwicklung des Wurmes eine Sackgasse dar. Die entstehende Läsion führt zum Krankheitsbild der so genannten alveolären Echinokokkose (AE). Im Gegensatz zur Entwicklung der Leberläsionen in der Maus werden in den Tubuli und Vesikeln der Finne jedoch praktisch niemals Protoscolices gebildet [GOT 00]. Die tumorähnlich infiltrativ wachsenden Parasiten durchsetzen das Leberparenchym und verdrängen Gallenwege und Blutgefäße, was sich im klinischen Bild und in den Komplikationen der AE zeigt. Außer in der Leber können sich Absiedelungen des Parasitenmaterials in anderen Organen, wie z.B. Lunge, Niere, ZNS oder Knochen bilden und hier ebenfalls zu Komplikationen führen. Diese Form des Befalls ist jedoch äußerst selten [BUT 01].

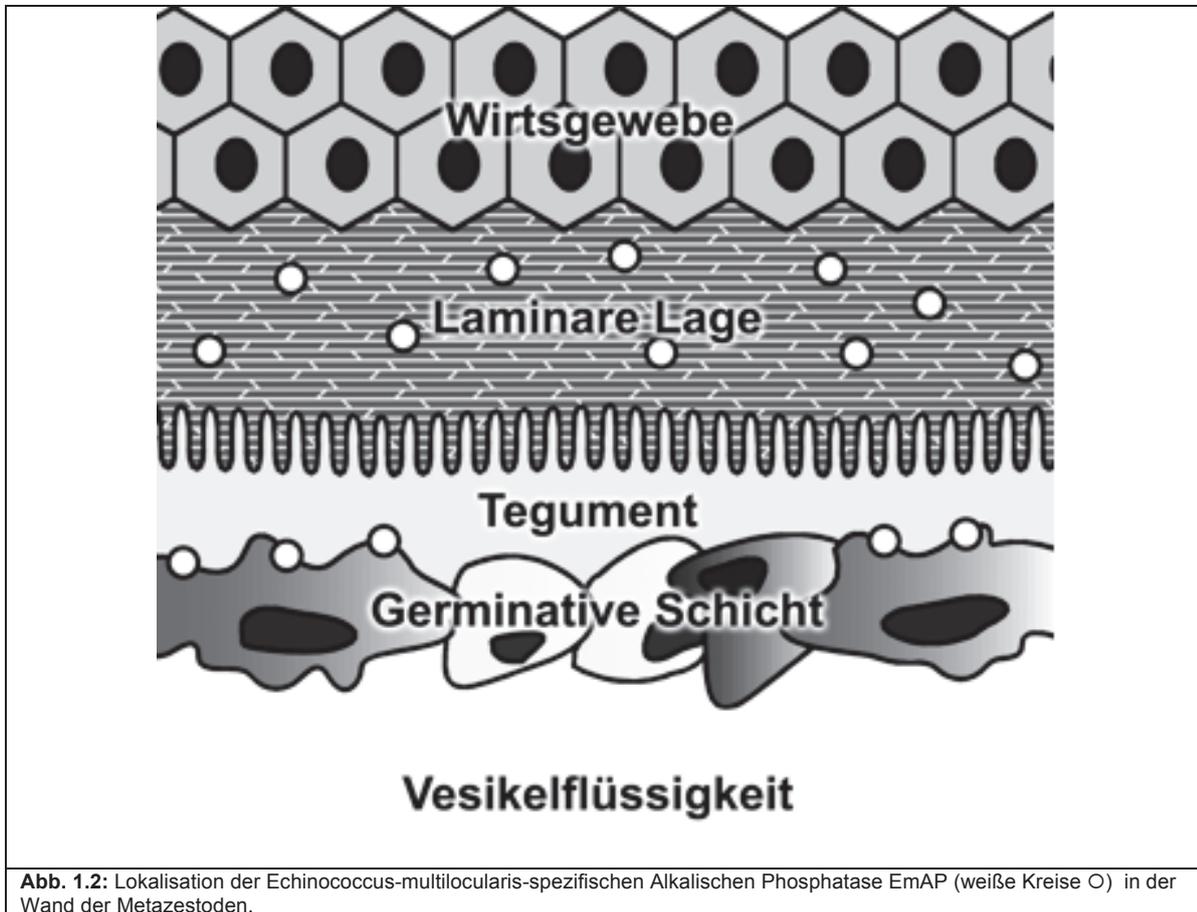
Aufbau der Leberläsionen

Die Parasitenläsionen, die in über 99% nur in der Leber der an AE erkrankten Menschen auftreten [BUT 01], sind makroskopisch als bis zu 2 cm große Konglomerate von Zysten zu erkennen. 1983 wurde der mikroskopische Aufbau der Läsionen erstmalig bei der Mongolischen Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*) beschrieben [MEH 83]. Der Parasit grenzt sich zum Gewebe seines Wirtes durch eine azelluläre Schicht, die Laminare Lage, ab. Größtenteils besteht sie aus N-Acetyl-Galaktosamin-Verbindungen, welche auch als Barriere zum Immunsystem des Wirtsorganismus dient. Darunter befindet sich die aus verschiedenen Zelltypen bestehende germinative Schicht (Abb. 1.2). In dieser Arbeit konnte mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Verfahren die Existenz von Protrusionen mit undifferenzierten Zellen nachgewiesen werden, die für die Proliferation und somit für das invasive Wachstum des Parasiten im Zwischenwirt eine Rolle spielen. Damit erklärt sich die Entstehung der metastasenähnlichen Folgeläsionen in anderen Organen durch Abschwemmen dieser undifferenzierten Zellen in die Blut- und Lymphbahn.

Zwischen germinativer Schicht und laminarer Lage befindet sich das Tegument des Parasiten, welches zur laminaren Lage hin Mikrotriches aufweist. Diese Mikrotriches sind mikrovilli-ähnliche Ausstülpungen des Teguments, die Tubuli enthalten. Durch diesen Tubulusapparat werden Stoffe zum Aufbau der Laminaren Lage sezerniert. Die molekulare Zusammensetzung der Laminaren Lage ist Gegenstand der aktuellen Forschung [GOT 08].

Eine besondere Rolle nimmt in dieser Arbeit die *Echinococcus-multilocularis*-spezifische Alkalische Phosphatase (EmAP) ein. Sie wurde 1987 entdeckt und später biochemisch charakterisiert [AUD 87], [SAR 91]. Lokalisiert in der Zellmembran der undifferenzierten Zellen der germinativen Schicht und in der Laminarschicht (s. Abb. 1.2) hydrolysiert sie, analog zur humanen Alkalischen Phosphatase, Phosphorsäureester [LAW 97]. Die EmAP ist in vivo außerhalb des Parasitenmaterials nicht nachweisbar. Beim Zugrundegehen von Parasitenmaterial wird diese jedoch in die Umgebung des Parasiten freigesetzt. Dieser Effekt lässt sich diagnostisch nutzen: durch Zugabe eines entsprechenden Substrats, welches von der alkalischen Phosphatase umgesetzt wird,

wird ein Farbumschlag erzeugt, der mit der Menge der freigesetzten EmAP direkt korreliert.



1.3. Epidemiologie

Verbreitung

Echinococcus multilocularis kommt als Parasit auf der gesamten nördlichen Hemisphäre, v.a. in Mitteleuropa, im östlichen Asien und in Nordamerika vor. Die AE beim Menschen wird vor allem aus Bereichen Frankreichs, der Nordschweiz, Süddeutschlands und Österreichs gemeldet [GOT 00]. Neu aufgetretene Fälle der AE wurden in den letzten Jahren auch aus Ländern wie Niederlande, Belgien, Dänemark und Polen gemeldet, aus denen bisher keine Daten bekannt waren. [BRE 07], [ECK 00].

Inzidenz / Prävalenz

Die jährliche Inzidenz der AE variiert in Japan und Mitteleuropa je nach Region zwischen 0,03 und 1,2 pro 100 000 Einwohner [ECK 00], jedoch werden auch Inzidenzen von bis zu 170 pro 100 000 Einwohner in Hochendemiegebieten in Alaska, Sibirien und China angegeben. In vielen Regionen fehlt allerdings eine genaue Dokumentation der jährlichen Inzidenz der AE, und zum anderen lassen sich aus den Daten für kleine Gruppen oder Regionen keine Schlüsse auf die Prävalenz und Inzidenz in größeren Gebieten ziehen, da die regionale Durchseuchung starke Schwankungen aufweist. Die neu aufgetretenen Fälle in Polen und Belgien, wo die AE bisher nicht beschrieben war, können aber als ein Indikator für ein steigendes Infektionsrisiko für den Menschen angesehen werden [ECK 00].

Die steigende Prävalenz der AE in Mitteleuropa wird mit mehreren Veränderungen erklärt:

1. ein Ansteigen der Fuchspopulationen
2. die Invasion von Dörfern und Städten durch Füchse
3. die Rolle von Haushunden und Hauskatzen bei der Übertragung des Parasiten auf den Menschen

Eine spezielle Risikogruppe (Beruf, Freizeittätigkeiten) konnte bisher nicht identifiziert werden. Eine besondere Rolle für die Infektion scheint jedoch die Arbeit mit Erde - z.B. Landwirtschaft oder Gartenarbeit - zu spielen [KER 03].

1.4. Klinische Befunde

Klinische Zeichen einer Alveolären Echinokokkose treten auf Grund des hohen regenerativen bzw. kompensatorischen Potentials der Leber im Allgemeinen erst spät auf. Als erstes klinisches Zeichen der AE tritt bei einem Drittel der Patienten ein Ikterus und/oder anhaltende Oberbauchschmerzen auf, bei einem weiteren Drittel waren pathologische Laborbefunde der Anlass für eine Untersuchung und die AE somit ein Zufallsbefund. Ein weiteres Drittel der Patienten ist beschwerdefrei oder hat unspezifische Symptome. Typische Komplikationen wie Cholestase, Ikterus, Cholangitis, portale Hypertension und Obstruktion der Vena cava inferior können im weiteren Verlauf der Erkrankung hinzutreten. Ein Auftreten einer sekundären biliären Zirrhose ist möglich [HEY 00], [AMM 99].

1.5. Diagnose

Die AE wird meist primär klinisch erkannt. Die spezifische Diagnostik basiert im Wesentlichen auf der Kombination von serologischen Testmethoden und bildgebenden Verfahren. Unter den bildgebenden Untersuchungsverfahren bieten sich drei verschiedene Techniken an: Die Sonographie, die Magnetresonanztomographie und die Computertomographie. Hierbei ist die Sonographie der Leber am ehesten als Screening-Verfahren einzusetzen. Für genaueren Aufschluß über Lage und vor allem den sekundären Befall anderer Organe ist die Computertomographie das geeignete Verfahren [REU 01]. Vor allem die geringe Größe der Läsionen im Frühstadium stellt bei der Detektion mit den gängigen bildgebenden Verfahren den limitierenden Faktor dar.

Laparoskopisch kann die AE in situ vom erfahrenen Chirurgen unschwer erkannt werden. Makroskopisch unterscheidet man die pseudometastatische multinoduläre Form, die durch mehrere isolierte weiße harte Knoten auf der Leberoberfläche gekennzeichnet ist, denen jedoch die für Lebermetastasen typischen zentralen Einziehungen fehlen, von der häufigeren konfluierenden Form mit weiß-gelblichen Plaques auf der Leberoberfläche.

Differenzialdiagnostisch ist die AE von Lebermetastasen, hepatozellulären Karzinomen, Leberabszessen und der zystischen Form der Echinokokkose, hervorgerufen durch *E. cysticus*, abzugrenzen [HEY 00].

Serologische Testmethoden sind zum einen für die Früherkennung der AE bei Patienten ohne Leberläsionen bzw. für Screening-Verfahren und zum anderen als Verlaufskontrolle der Therapie geeignet. Zum immunologischen Nachweis werden heutzutage hauptsächlich 2 Oberflächenproteine genutzt (Emc und Em2+), die mittels ELISA nachgewiesen werden können [BRE 94].

Eine Seropositivität auch ohne detektierbare Leberläsionen kann ein noch nicht erkennbares Frühstadium, eine Immunität gegen *E. multilocularis* oder eine unspezifische serologische Reaktion bedeuten [JEN 01]. Ein positives serologisches Ergebnis lässt somit nicht sicher auf eine AE schließen. Bestätigungstests können mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [10.1] erfolgen.

1.6. Therapie

Ohne adäquate Therapie verläuft die Alveoläre Echinokokkose in der überwiegenden Zahl der Fälle letal (Mortalität bis zu 98%). Prinzipiell kann man zwischen operativen und konservativen Therapieansätzen unterscheiden:

Die angestrebte Therapie der AE ist eine vollständige chirurgische Resektion des befallenen Organmaterials unter tumorchirurgischen Kriterien. Dies kann jedoch häufig nicht durchgeführt werden, da in einem späten Stadium, in dem bereits Folgekomplikationen aufgetreten sind (die dann überhaupt erst zu klinischen Symptomen führen) durch die lokale Ausdehnung eine vollständige Resektion nicht mehr möglich ist [AMM 00]. In der Literatur werden zwischen der Infektion und dem Auftreten erster Symptome Zeiträume von 5 bis 15 Jahren genannt [ECK 99]. Die Operabilität hängt vom Krankheitsstadium ab, das sich aus Menge des Parasitenmaterials (P), Infiltration von Organen (I) und Vorkommen von Metastasen (M) ergibt. Diese „PIM“-Klassifikation kann einen Anhalt für die therapeutische Vorgehensweise bieten [GOT 00].

Nach der chirurgischen Intervention ist eine lebenslange Rezidivprophylaxe mit Antihelminthika notwendig. Eine Lebertransplantation ist wegen der häufig auftretenden Rezidive bzw. dem Auftreten von Pseudometastasen unter Immunsuppression umstritten.

Ist die Läsion inoperabel, was bei etwa 70% der Patienten der Fall ist [AMM 00], so ist eine parasitostatische Therapie mit den Antihelminthika Mebendazol oder Albendazol indiziert. Die medikamentöse Therapie muss lebenslang fortgeführt werden. Diese Medikamente unterliegen einer geringen intestinalen Absorption (<10%) und einem hohen first-pass-Effekt. Unter den insgesamt seltenen Nebenwirkungen stellt die Agranulozytose die schwerwiegendste dar [AMM 00]. Parasitostatische Effekte wurden auch für Amphotericin B [REU 03] sowie von dem gegen Anaerobier wirksamen Nitazoxanide in vitro nachgewiesen [STE 03].

1.7 Strahlentherapie

Seit der Entdeckung durch Röntgen 1895 werden ionisierende Strahlen in der Therapie verschiedener gutartiger und bösartiger Erkrankungen beim Menschen erfolgreich eingesetzt [FRE 97]. Die erforderlichen Dosen bewegen sich im Bereich von wenigen

Gray bei einigen gutartigen Erkrankungen (z.B. Fersensporn) bis über 90 Gy (z.B. Prostatakarzinom). Eine wesentliche dosislimitierende Rolle spielt dabei die Strahlentoleranz der umliegenden Organe. Grundsätzlich ist die Toleranzdosis bei einer nicht vollständigen Erfassung höher als bei Bestrahlung des gesamten Organs. Die Toleranzdosis der Leber beträgt etwa 30 Gy in konventioneller Fraktionierung (2 Gy Einzeldosis). Nach höheren Dosen tritt eine radiogene Hepatitis auf, während eine Teilbestrahlung der Leber bis ca. 60 Gy durchgeführt werden kann [PER 98]. Bei der Lebensmittelsterilisation werden Strahlendosen im Kilogray-Bereich benötigt, um Mikroorganismen abzutöten. Das an einen malignen Tumor erinnernde Wachstumsmuster der Metacestoden bei der Alveolären Echinokokkose wirft die Frage auf, ob die AE sich mit ionisierenden Strahlen behandeln lässt. Jedoch liegen über dieses Thema bisher kaum Untersuchungen vor. Markell und Beal haben 1974 lediglich zeigen können, dass bei einer Bestrahlung der Eier mit Röntgenstrahlen die Infektiösität der Eier ab einer Dosis von 40 kr (entspricht ca. 400 Gy) abnimmt [MAR 74].

Strahlenbiologische Effekte

Die strahlenbiologischen Effekte ionisierender Strahlung wie in den Experimenten der vorliegenden Arbeit beruhen im Wesentlichen auf indirekten Wirkungen. Hierbei wird die Energie der ionisierenden Strahlung von Wasser in der Umgebung des bestrahlten Materials absorbiert, was zur Bildung von Primärradikalen ($\text{OH}\cdot$, $\text{H}\cdot$, e-aq) und Peroxiden führt, welche dann wiederum Bioradikale bilden. Über Veränderungen am Biomolekül – insbesondere der DNA, aber auch an Membranen u.a. – können dann DNA-Schäden und Stoffwechselveränderungen entstehen, die dann letztendlich über den Zelltod zum Tod des Organismus führen können. Als Schäden am Biomolekül sind in erster Linie Anlagerungen der $\text{OH}\cdot$ -Radikale an die Doppelbindung der Basen zu nennen, was zur Oxidation der DNA führt. Im Einzelnen führt dies zu Doppel- und Einzelstrangbrüchen, Basen- und Zuckerschäden, Basenverlusten, Brüchen von Wasserstoffbrücken und DNA-Vernetzungen sowie den so genannten „bulky lesions“, worunter man Kombinationen der verschiedenen Schäden versteht. Dennoch lässt sich nicht das gesamte Ausmaß der Schäden mit den beschriebenen Mechanismen erklären und ein Teil der Ursachen ist ungeklärt.

Die Zelle ist nicht zu jeder Zeit des Zellzyklus gleich strahlensensibel; in der M-Phase und G2-Phase ist die höchste Radiosensibilität erreicht, während in der S-Phase relative Radioresistenz herrscht. Die G1-Phase zeigt zunächst eine Strahlenresistenz, die am Übergang zwischen G1- und S-Phase dann sensibler wird [SAU 01]. Dies bedeutet, dass proliferierendes Gewebe (z.B. Tumorgewebe) innerhalb eines mitotisch weniger aktiven Gewebes eine statistisch höhere Radiosensibilität aufweist. Ionisierende Strahlen ausreichender Energie durchdringen praktisch verlustfrei Zellmembran oder mögliche Kapselstrukturen und sind somit im Gegensatz zur medikamentösen Therapie nicht von der Permeabilität des Gewebes abhängig. Beim expansiv wachsenden Parasiten handelt es sich um ein mitotisch aktives Gewebe, dessen Zellen durch die entsprechenden Schädigungen durch ionisierende Strahlen zu Zelltod oder Mitosehemmung gebracht werden könnten.

Fragestellung

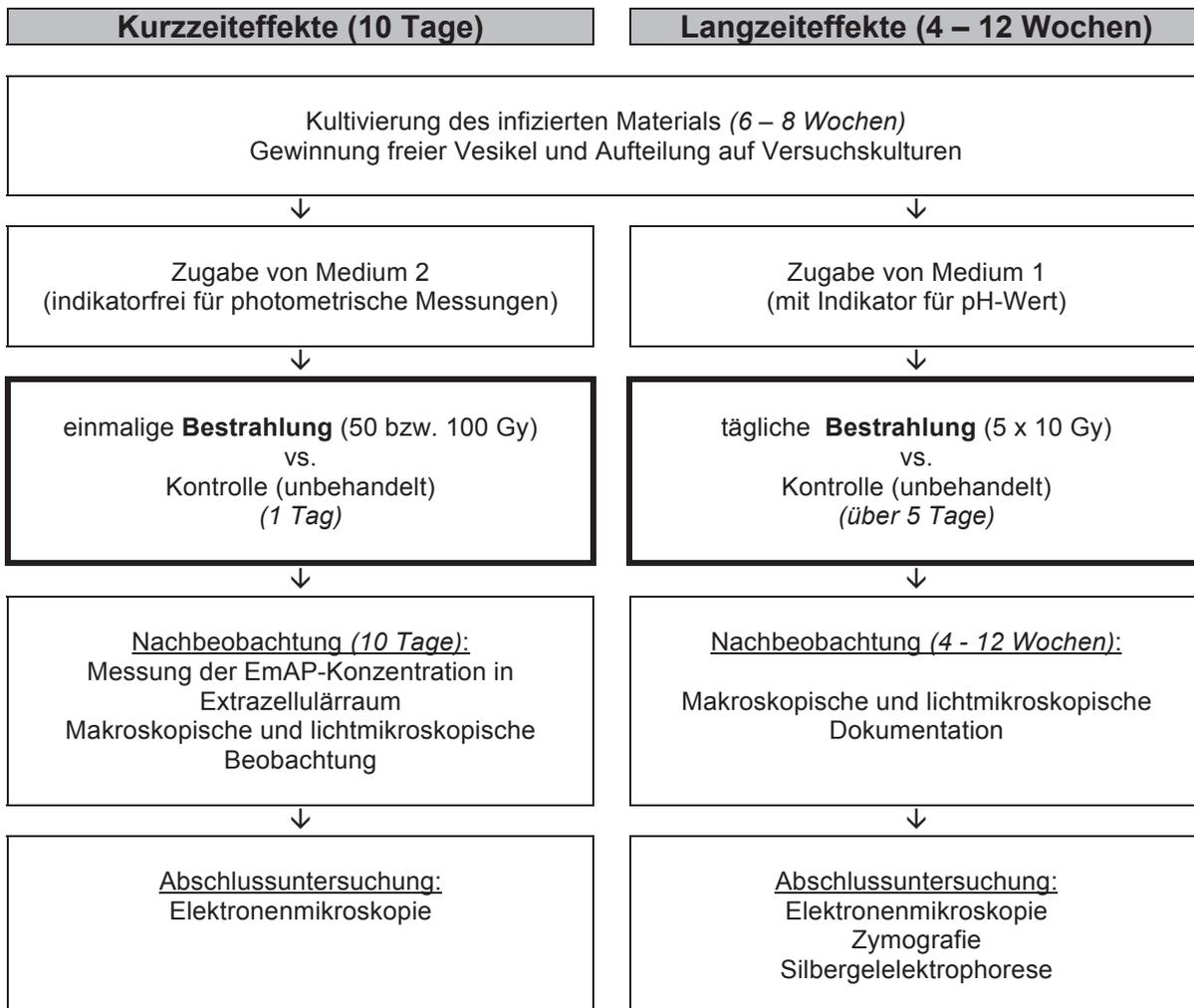
Die Therapie der fortgeschrittenen alveolären Echinokokkose ist unbefriedigend. Erfahrungen in der Tumorthherapie werfen die Frage auf, ob sich lokalisierte Manifestationen ähnlich wie Metastasen eines malignen Tumors mit ionisierenden Strahlen behandeln lassen.

2. Material und Methoden

Die radiogenen Veränderungen am EM wurden in kultivierten Stämmen aus der Maus studiert. Zum einen wurden quantitative Veränderungen des Parasiten-Wachstums in zeitlicher Abfolge gemessen, zum anderen makro- und mikroskopische Veränderungen der Parasitenvesikel. Die Viabilität des Parasiten wurde indirekt durch den Nachweis typischer vom Parasiten in den Extrazellulärraum abgegebener Proteine untersucht.

2.1. Versuchsablauf

Eine Übersicht über den Ablauf der Versuche gibt die Schema 1:



Schema 1: Versuchsablauf

Alle Versuche wurden im doppelten Ansatz durchgeführt.

2.2. Kulturverfahren

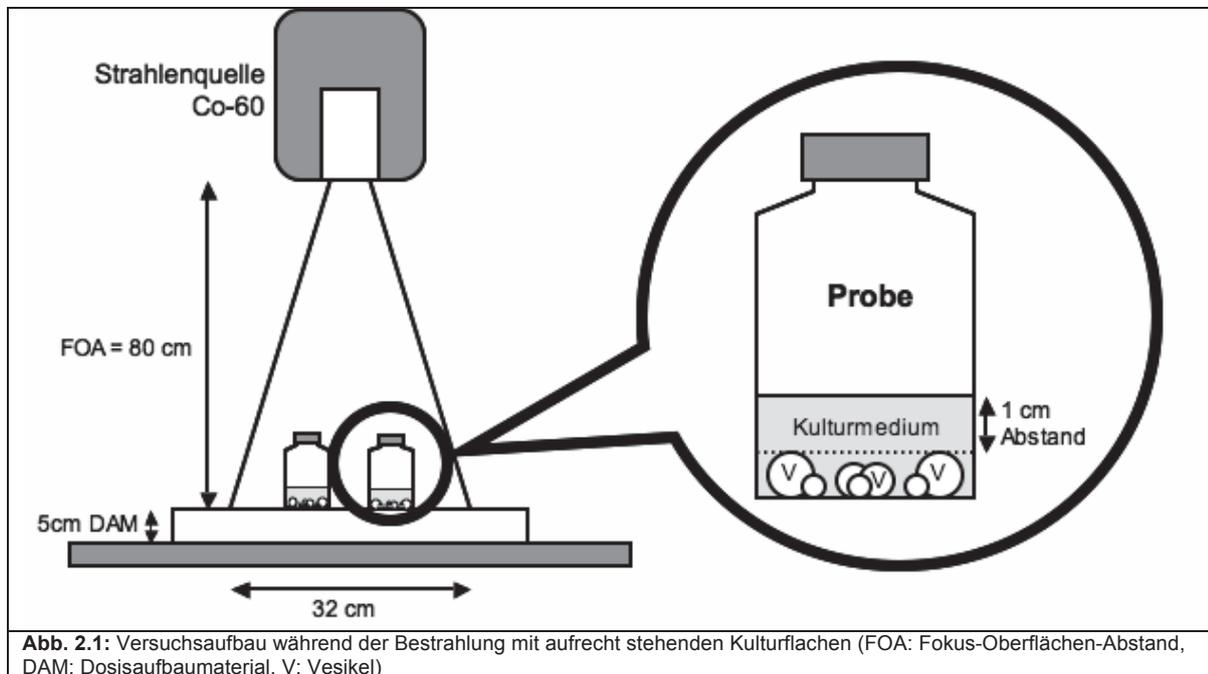
Die Kultivierung von *E. multilocularis* wurde nach der vorbeschriebenen Methode von Hemphill et al. durchgeführt [MAR 74], [HEM 95]. Mongolische Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*) bzw. Feldmäuse (*Microtus agrestis*) wurden mit *E. multilocularis* infiziert. Nach einer Zeit von 1 bis 2 Monaten wurden die Mäuse euthanasiert und Gewebe unter aseptischen Bedingungen entnommen. Nach Zerteilung des Gewebes in Blöcke von ca. 0,5 cm³ wurden diese zweimal in Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen.

Die infizierten Leberstücke wurden zu mehreren in 50 ml eines Kulturmediums, bestehend aus Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM), inkl. 25 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) als Puffersubstanz, 10% Fetalem Kalbserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 200 U Penicillin/ml und 200 µg Streptomycin/ml (im Folgenden bezeichnet als Medium 1), kultiviert, in der frei schwimmende Vesikel gebildet wurden. Die Gewebelöcke wurden in Kulturflaschen (75 cm²) in aufrechter Position, mit einem Filterdeckel verschlossen, in einem Inkubator bei 37°C, 10% CO₂ aufbewahrt. Alle 2 bis 4 Tage wurde das Kulturmedium gewechselt, indem 50% bis 80% des Mediums erneuert wurden. Für die Übersicht über alle verwendeten Materialien sei auf die Übersicht 5.1 im Anhang verwiesen.

2.3. Gewinnung freier Vesikel und Bestrahlung

Nach 6 bis 8 Wochen Kultivierungszeit wurden freie Vesikel aus den Kulturen gewonnen, fünf Mal mit sterilem Wasser gewaschen und gepoolt. Die Vesikel wurden zu je 30 auf 75 cm² Zellkulturflaschen verteilt und mit 50 ml Medium 1 versetzt. Anschließend wurden die Proben in 5 Fraktionen von 10 Gy im Abstand von 24h bis zu einer Gesamtdosis von 50 Gy bestrahlt. Bei den Versuchen mit Durchführung des EmAP-Assay haben wir eine Einzeldosis von 50 Gy bzw. 100 Gy appliziert. Die Bestrahlung erfolgte mit einem Co-60-Gerät, Focus-Oberflächenabstand 80 cm, bei maximaler Feldgröße (32 cm x 32 cm). Der Flüssigkeitsspiegel des Kulturmediums überragte die Vesikel um mindestens 1 cm, so dass in der Probe ein

Sekundärelektronengleichgewicht herrschte und damit eine homogene Dosisverteilung gewährleistet war (siehe Abb. 2.1).



2.4. Untersuchung der Viabilität

Zur Untersuchung der Viabilität des Parasiten wurden neben morphologischen Kriterien auch enzymatische Nachweisverfahren angewendet, welche bereits in Untersuchungen von bekannten Antihelminthika verwendet wurden. Diese werden im Folgenden chronologisch dargestellt: Mit dem EmAP-Assay wurden kurzzeitige Veränderungen innerhalb eines Zeitraums von 10 Tagen erfasst, die makroskopische und lichtmikroskopische Beobachtung erfolgte kontinuierlich und die Elektronenmikroskopie sowie der Nachweis radiogener Veränderungen der Proteinsynthese waren Abschlussuntersuchungen.

EmAP-Assay

Zur Untersuchung der Viabilität des Parasitenmaterials wurde der Nachweis von freier *Echinococcus-multilocularis*-spezifischer Alkalischer Phosphatase (EmAP) nach der Methode von Stettler et al. [STE 01] verwendet. Da es sich bei der EmAP um ein Protein handelt, welches beim lebenden E.m. nur gebunden an

Zellmembranen oder Laminarschicht vorkommt und nur bei Untergang von Parasitenmaterial im Mediumüberstand nachweisbar ist, eignet sich dieses Verfahren als indirekter Nachweis der Viabilität.

Nach Entnahme und Aufteilung der freien Vesikel wurde als Nährmedium Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 inkl. 2 mM L-Glutamin, 200 U Penicillin/ml und 200 µg Streptomycin/ml, ohne FCS und Phenolrot (im Folgenden bezeichnet als Medium 2) zugegeben. Diese Vorgehensweise ist notwendig, da eine photometrische Auswertung nur im farblosen Medium erfolgen kann.

Nach der einzeitigen Bestrahlung wurden die Kulturen für 10 Tage nachbeobachtet. In dieser Zeit erfolgte kein Wechsel des Kulturmediums.

Die im Beobachtungszeitraum täglich abgenommenen und bei -80°C tiefgefrorenen 300 µl Mediumüberstände wurden gleichzeitig aufgetaut, 10 min bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert und 30 µl des jeweiligen Überstandes in ein Well einer 96-Well-ELISA-Reader-Platte pipettiert. Nach Zugabe von je 170 µl Substratpuffer (1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in 0,5 M Ethanolamin, 0,5 mM MgCl₂ [pH 9,8]) wurde die Platte 30 min bei 37°C inkubiert. Es erfolgte eine Umsetzung von p-Nitrophenylphosphat und Wasser zu p-Nitrophenolat und Phosphat unter einem Farbumschlag ins Gelbe. Dieser verhält sich proportional zur Aktivität der EmAP. Im Anschluss daran wurde der Farbumschlag mit einem ELISA-Reader (Tecan Rainbow) bei einer Wellenlänge von 405 nm quantifiziert.

Makroskopische Beobachtung

Die Kulturen wurden täglich (Versuch mit EmAP-Assay) bzw. wöchentlich (Versuch ohne EmAP-Assay) makroskopisch beobachtet und fotodokumentiert, um eine Beurteilung in Zahl und Größe der Vesikel zu ermöglichen.

Da das Medium 2 nicht gewechselt wird und in diesem Medium kein FCS als Nährstofflieferant enthalten ist, kommt es, wie aus vorhergehenden Versuchen mit dem EmAP-Assay bekannt [STE 03], [STE 01], nach etwa 14 Tagen zu einem Untergang des Parasitenmaterials. Eine sinnvolle Beobachtungszeit ist somit auf 10 Tage nach Überführung der Vesikel in das Medium 2 und Bestrahlung limitiert.

Um das Verhalten des Parasiten nach Bestrahlung über einen Zeitraum länger als 10 Tage nach Radiatio zu beobachten, wurde parallel zu den Versuchen mit abschließendem EmAP-Assay auch eine Versuchsreihe ohne diese Untersuchung durchgeführt. Hierbei wurde das Medium 1 alle 2 bis 4 Tage ausgetauscht, um eine weitere Nährstoffzufuhr und damit ein weiteres Überleben des Parasitenmaterials zu gewährleisten. Dabei zeigte ein Farbumschlag des Indikators von rot nach gelb ein Absinken des pH-Wertes und somit die Notwendigkeit zur Erneuerung des Nährmediums an.

Lichtmikroskopie

Zu den Zeitpunkten der makroskopischen Fotodokumentation wurden die Kulturen lichtmikroskopisch untersucht und fotodokumentiert.

Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden im Parasitologischen Institut der Universität Bern durchgeführt. Nach Abschluss der jeweiligen Versuche wurden die Vesikel aus den Kulturflaschen separiert und in dicht verschließbare Gefäße (5 ml Inhalt) gegeben. Nach Entfernung des Kulturmediums und Zugabe von 5 ml 2,5% Glutaraldehyd in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) wurden die Vesikel vorbehandelt und anschließend elektronenmikroskopisch untersucht [HEM 97].

Untersuchung radiogener Veränderungen der Proteinsynthese

Die Untersuchung der im Extrazellulärraum nachweisbaren Proteine ist ein etabliertes Verfahren in der Untersuchung von Echinokokken [NAG 06]. Wir untersuchten den Mediumüberstand und die Vesikelflüssigkeit bei bestrahlten und nicht bestrahlten Proben. Dafür haben wir zwei verschiedene Nachweisverfahren für Proteinase in den jeweiligen Flüssigkeiten gewählt, wobei die Zymographie die Proteinase über gelatinolytische Aktivität und die Silbergelelektrophorese Proteinase nach Präzipitation mit Methanol-Chloroform nachweist.

Zymographie

Mediumüberstände und Vesikelflüssigkeiten wurden mit 80% kaltem Aceton präzipitiert und die Zymographie wurde mit 0,1% Gelatine-Substrat mittels Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Die Gele wurden zwei Mal für 30 Minuten mit 2,5% Triton X100 gewaschen, um SDS zu entfernen und die Proteine zu renaturieren. Nach kurzem Abspülen mit Wasser wurden die Gele bei 37°C in einem Inkubationspuffer (50mM Tris, pH 7,6, inkl. 50mM NaCl und 10 mM CaCl₂) unter vorsichtigem Schütteln über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurde die gelatinolytische Aktivität mit Coomassie brilliant blue G250 Färbung als farblose Banden vor blauem Hintergrund sichtbar gemacht.

Silbergelelektrophorese zur Bestimmung des Proteasenmusters

Die Proteine der Mediumüberstände wurden in Methanol-Chloroform präzipitiert und Anteile in Abhängigkeit von der Zahl der Metacestoden wurden mittels Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) unter Reduktionsbedingungen separiert [WES 84].

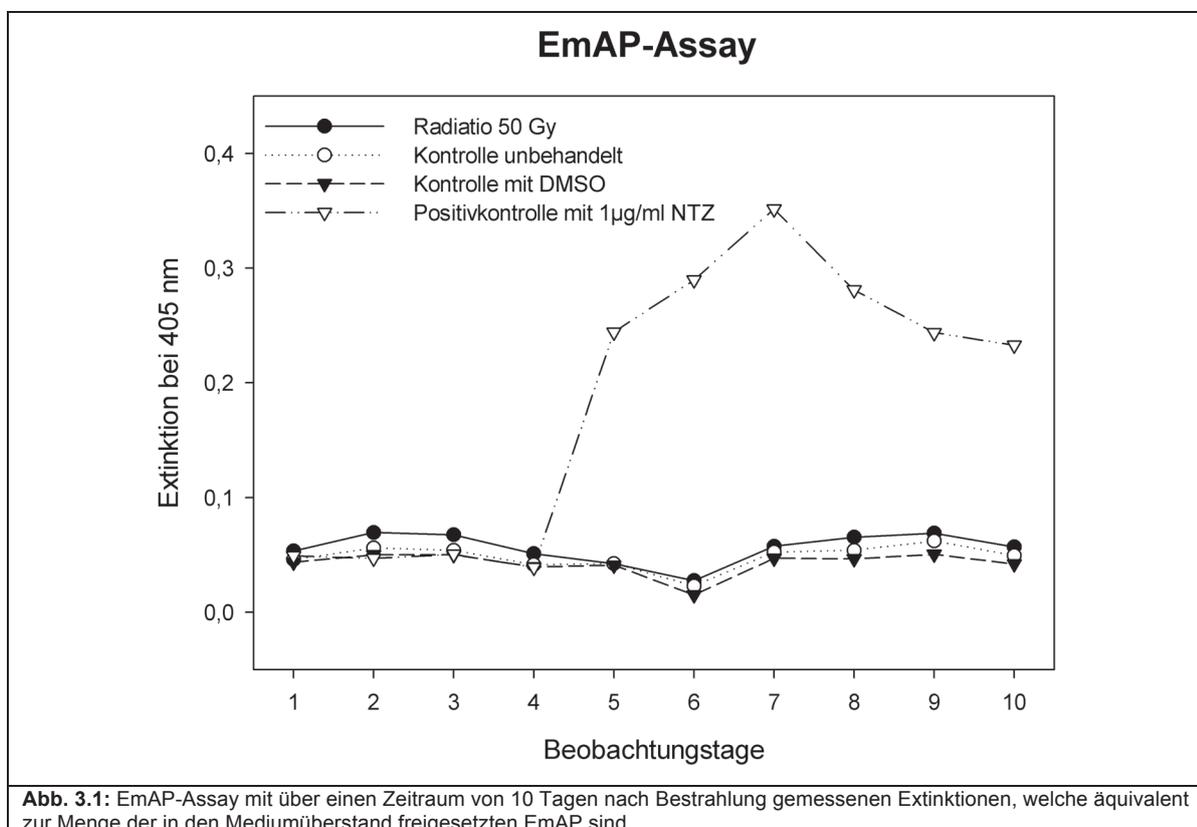
Silberfärbung: Die Gele wurden in 50 ml Fixierlösung für 30 Minuten fixiert, in 50 ml 0,01% (w/w) Thiosulfatpuffer reduziert, für 5 x 2 Minuten in destilliertem Wasser rehydriert, anschließend für 30 Minuten in 50 ml einer 0,1% Silbernitratlösung mit 0,025% (v/v) Formaldehyd gegeben und schließlich mit 2,5% Natriumbicarbonat mit 0,05% (v/v) Formaldehyd versetzt. Die Reaktion wurde aufgezeichnet und durch die Zugabe von Eisessig bis zum Erreichen einer Konzentration von 1% (v/v) gestoppt. Die Gele wurden in H₂O gewaschen und aufbewahrt.

3. Ergebnisse

Die Betrachtung der Ergebnisse erfolgt im Folgenden getrennt nach den zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen für Kurz- und Langzeitbeobachtung.

3.1. Untersuchung mit EmAP-Assay (Kurzzeitbeobachtung)

Die in der Beobachtungszeit von 10 Tagen gemessenen Extinktionen (siehe Abb. 3.1) der mit 50 Gy bestrahlten Vesikel (●) nach Umsatz des p-Nitrophenylphosphat bewegten sich im Rahmen der unbehandelten Negativkontrolle (○). Eine Kontrolle mit äquivalenter Menge DMSO (▼) als Lösungsmittel des Antihelmetikums Nitazoxanide (NTZ) zeigte ebenfalls keinen Anstieg der Extinktion. Diese Kontrolle wurde gewählt, um zu zeigen, dass DMSO allein keinen Einfluss auf die Extinktion zeigt. Der durch Zugabe von 1 µg/ml NTZ (▽) verursachte Anstieg der EmAP-Aktivität beweist die Sensitivität des Assay.



Makroskopisch und lichtmikroskopisch zeigten sich bei den Vesikeln der bestrahlten Kulturen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine Unterschiede. Bei einzelnen Vesikeln beobachteten wir einen Tonusverlust, welche danach keine symmetrische Rundung mehr zeigten (siehe Abb. 3.2). Diese Beobachtungen traten nicht in allen Proben auf, jedoch sowohl bei bestrahlten als auch bei nicht bestrahlten Proben.

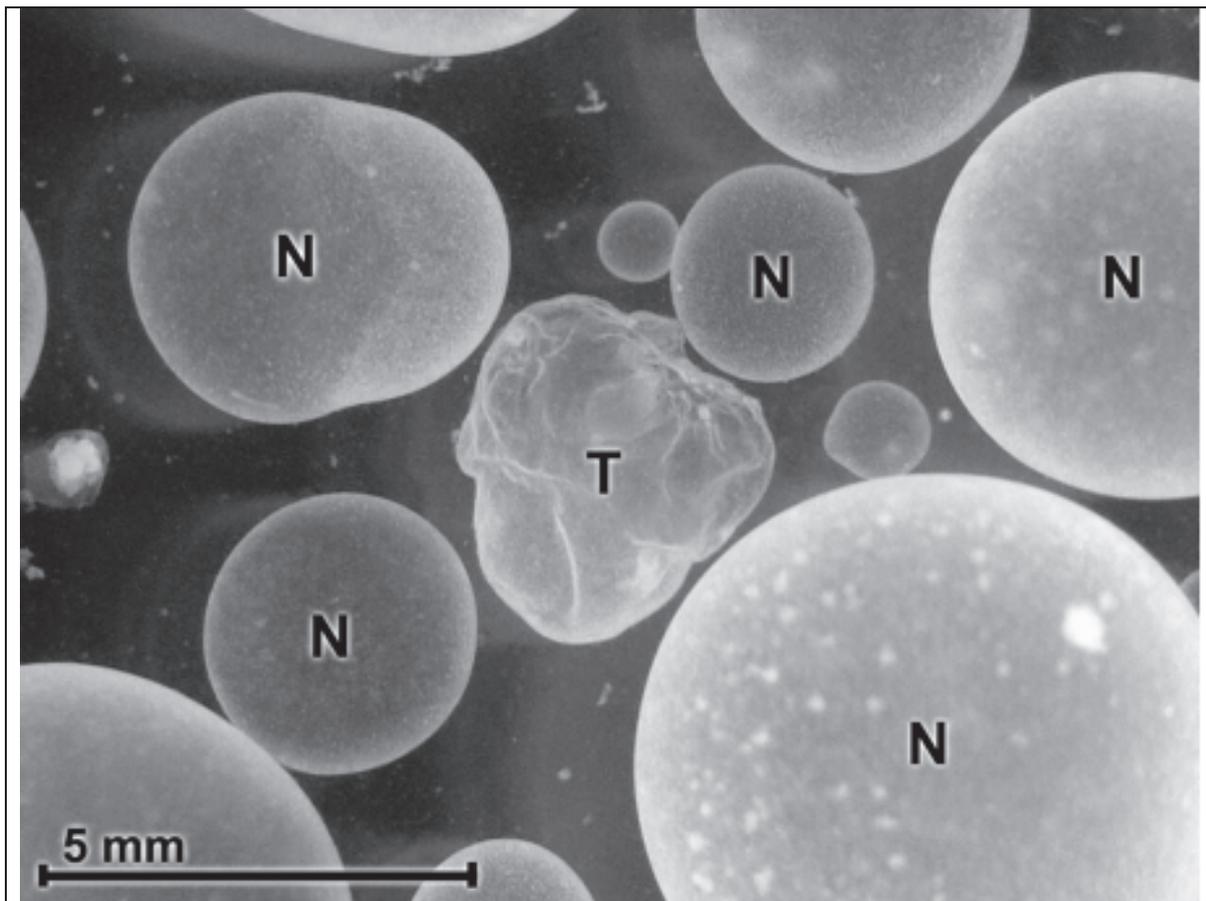


Abb. 3.2: Gegenüberstellung Vesikel mit Tonusverlust (T) versus normal entwickelte Vesikel (N)

In der Rasterelektronenmikroskopie ließen sich diskrete Veränderungen nachweisen. In den bestrahlten Vesikeln stellten sich im Bereich der germinativen Schicht fokal destruierte Areale dar, die bei Vesikeln der Kontrollgruppe nicht gezeigt werden konnten (siehe Abb. 3.3). Die destruierten Areale zeigten nicht mehr intakte Zellkörper, bei denen die Zellmembran sich wie aufgebrochen präsentierte. Die normale Struktur der germinativen Schicht war jedoch nicht vollständig aufgehoben, so dass sich in direkter Nachbarschaft zu den zerstörten Bereichen morphologisch völlig normale Strukturen zeigten, welche keine Unterschiede zur unbehandelten Kontrollgruppe aufwiesen.

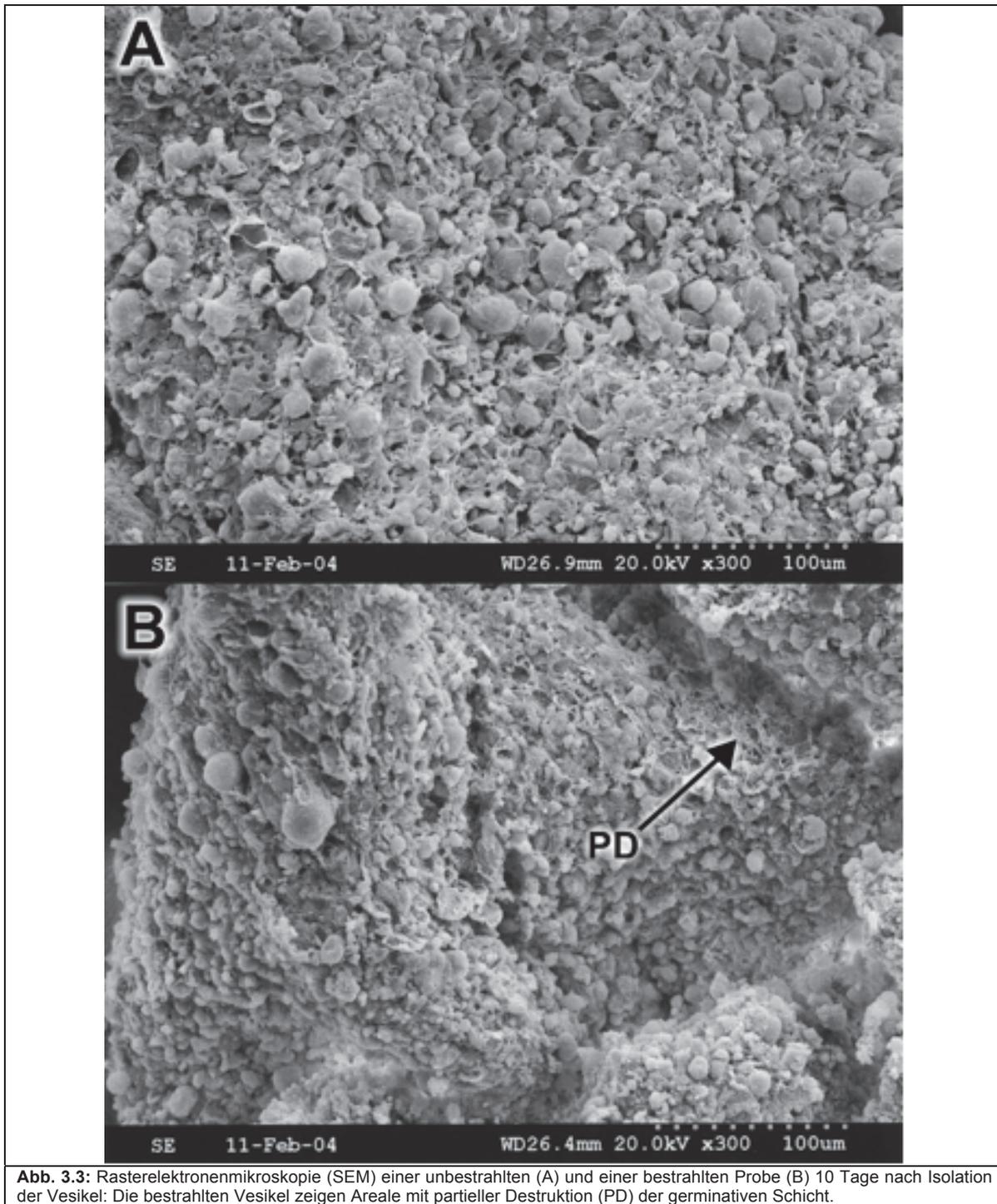


Abb. 3.3: Rasterelektronenmikroskopie (SEM) einer unbestrahlten (A) und einer bestrahlten Probe (B) 10 Tage nach Isolation der Vesikel: Die bestrahlten Vesikel zeigen Areale mit partieller Destruktion (PD) der germinativen Schicht.

Die Transmissionselektronenmikroskopie (Abb. 3.4 bis 3.7) zeigte nach Abschluss des Beobachtungszeitraums von 10 Tagen bei den bestrahlten Vesikeln im Gegensatz zu den Vesikeln ohne Behandlung vesikulierendes Zytoplasma mit Ausbildung von

intrazytoplasmatischen Vakuolen (V), Abrundung der Mitochondrien (R), Auftreten von Lipidtröpfchen (LD) und Entleerung der Speicher der glykogenspeichernden Zellen (eGSC). Die zytoplasmatische Vesikelbildung mit Vakuolen betraf in erster Linie die undifferenzierten Zellen. Der Zellkern blieb dabei morphologisch intakt (siehe Abb. 3.4 und Abb. 3.6). Die Mitochondrien zeigten bei den bestrahlten Kulturen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle atypische Formen im Sinne eines abgerundeten bzw. kugeligen Äußeren (siehe Abb 3.5). Vereinzelt traten intrazytoplasmatische Lipidtröpfchen auf, die sich als elektronendichte kugelförmige Veränderungen präsentierten (siehe Abb. 3.4).

Eine weitere Veränderung betraf die zellulären Glykogenspeicher: Während in den unbehandelten Proben die Glykogenspeicher mit dem typischen, an Schneeflocken erinnernden Muster des Glykogens gefüllt waren, zeigten alle behandelten Proben eine vollständige Entleerung dieser Speicher, was sich in einem Fehlen des charakteristischen Musters äußerte (siehe Abb 3.7). Zeichen für eine Destruktion der Zellen zeigten sich nicht, die Zellstrukturen blieben intakt.

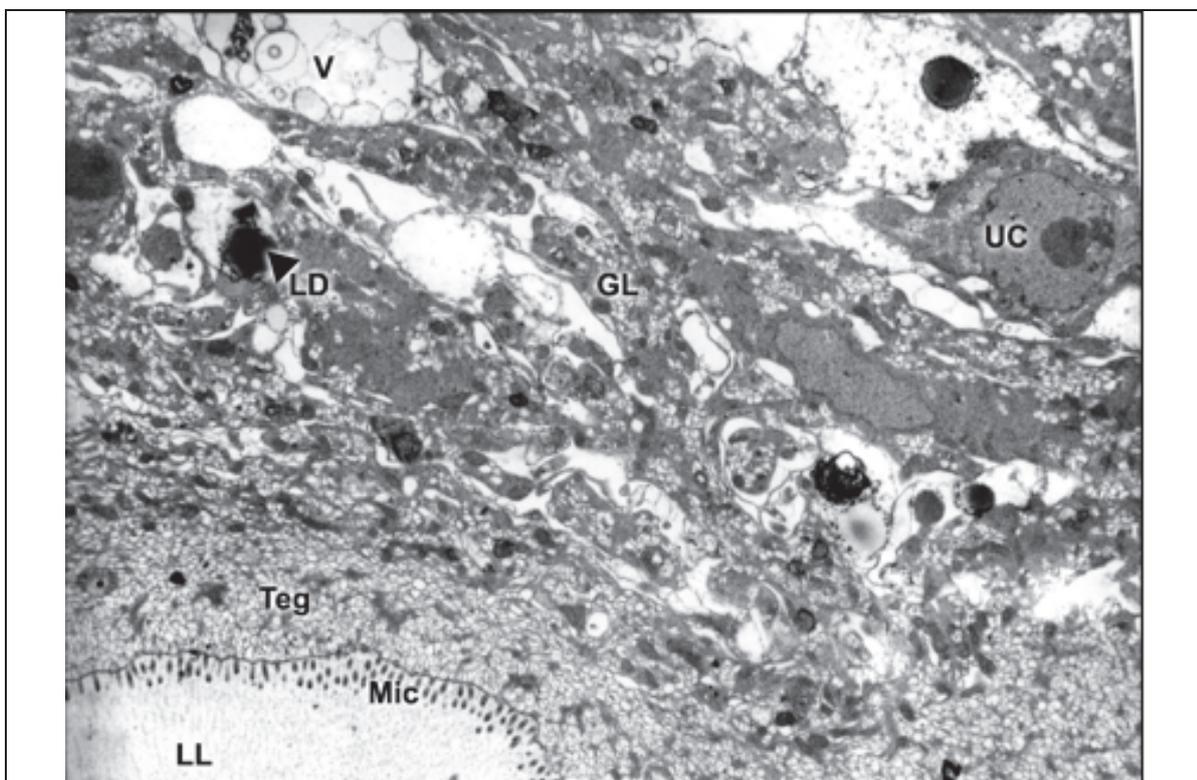


Abb. 3.4: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) einer bestrahlten Probe 10 Tage nach Isolation und Behandlung der Vesikel: Die Vesikel zeigen Vakuolenbildung des Zytoplasmas (V) und Bildung von Lipidtröpfchen (LD). Undifferenzierte Zellen (UC) und Mikrotriches (Mic) als Verbindung zwischen germinativer (GL) und laminarer Lage (LL) bleiben intakt.

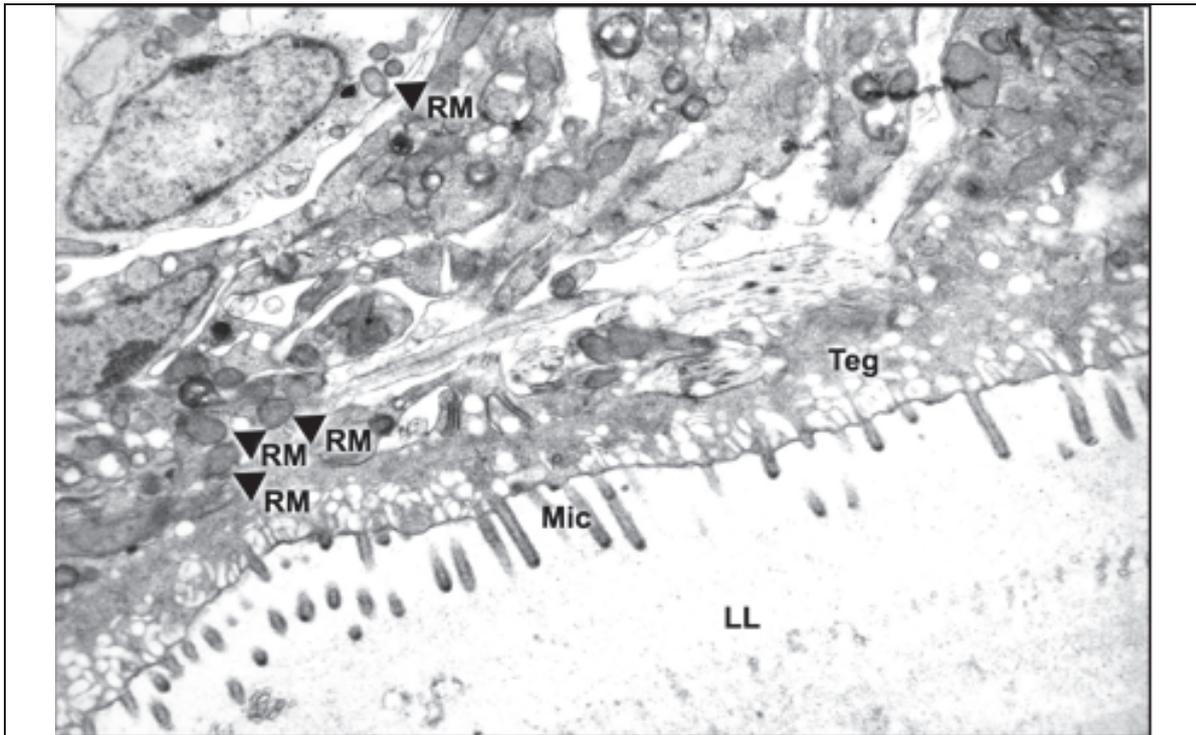


Abb. 3.5: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) einer bestrahlten Probe 10 Tage nach Isolation und Behandlung der Vesikel: Ausbildung von atypischen Mitochondrienformen im Sinne einer Abrundung.

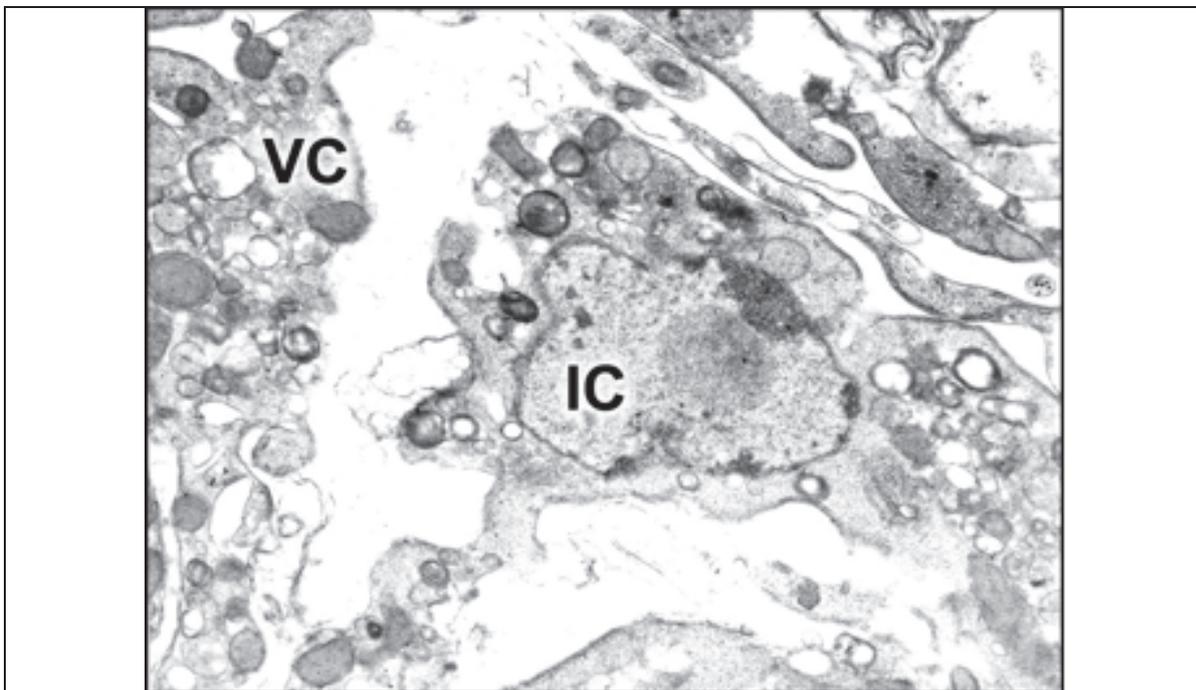
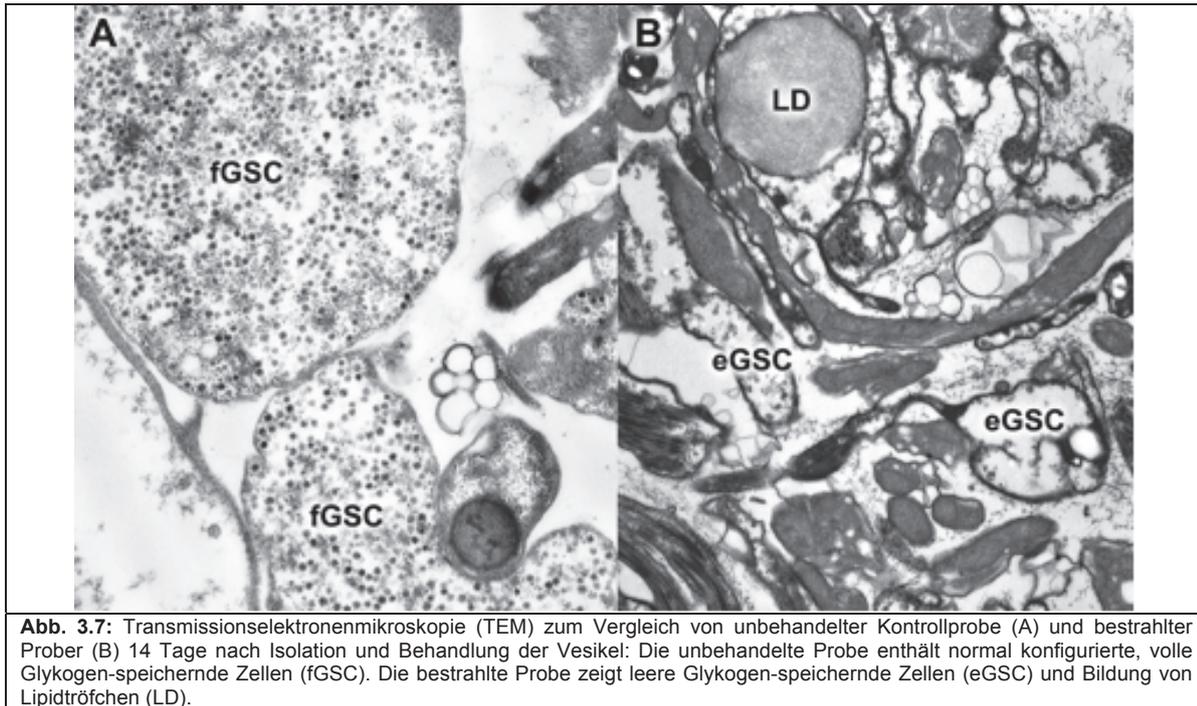
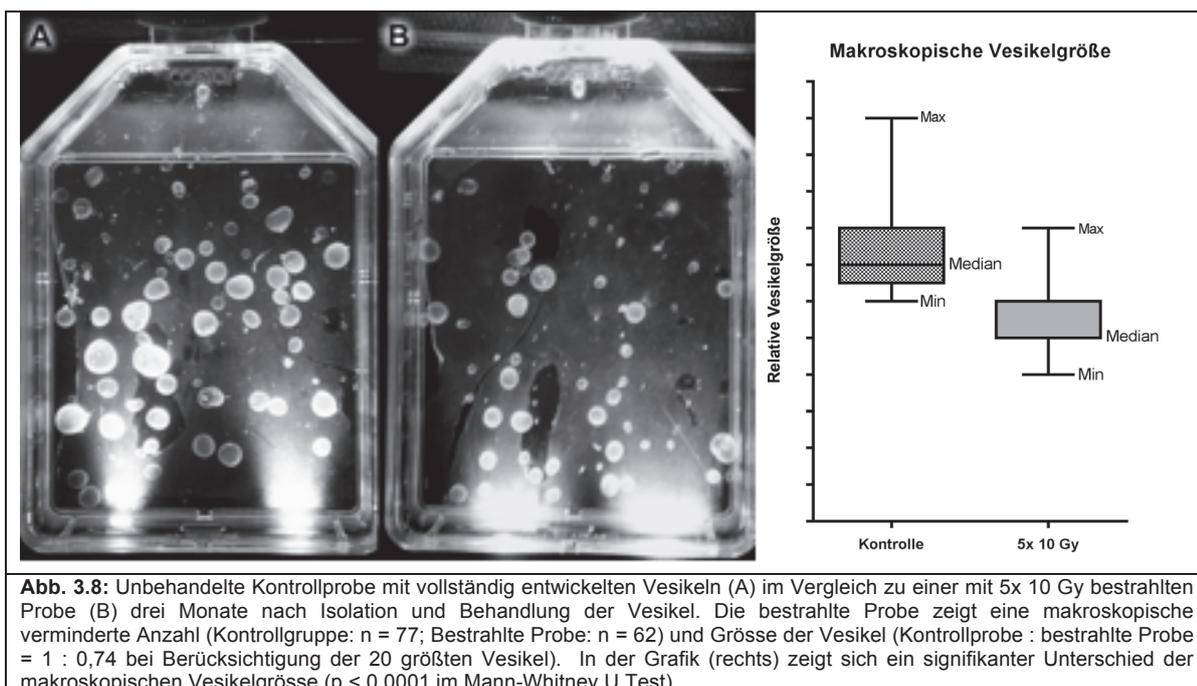


Abb. 3.6: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) einer bestrahlten Probe 10 Tage nach Isolation und Behandlung der Vesikel: Vesikulierendes Zytoplasma (VC) einer undifferenzierten Zelle mit intaktem Zellkern (IC).



3.2. Versuch ohne EmAP-Assay (Langzeitbeobachtung)

In der makroskopischen Beobachtung zeigte sich bei den bestrahlten Kulturen nach einem Zeitraum von 3 Monaten eine in Größe und Anzahl geringere Proliferation der Vesikel als in der Kontrollgruppe (siehe Abb. 3.8).



Lichtmikroskopisch zeigten freie Kopfanlagen in der Bestrahlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine fehlende oder stark verlangsamte Motilität und teilweise einen sichtbaren Verlust der normalen Form (siehe Abb. 3.9). Anstelle der normal konfigurierten Kopfanlagen zeigten sich in den bestrahlten Proben sanduhrförmige Exemplare, welche unterhalb des eigentlichen Kopfes eine Einschnürung zeigten. Diese Effekte wurden am 14. Tag nach Radiatio beobachtet.

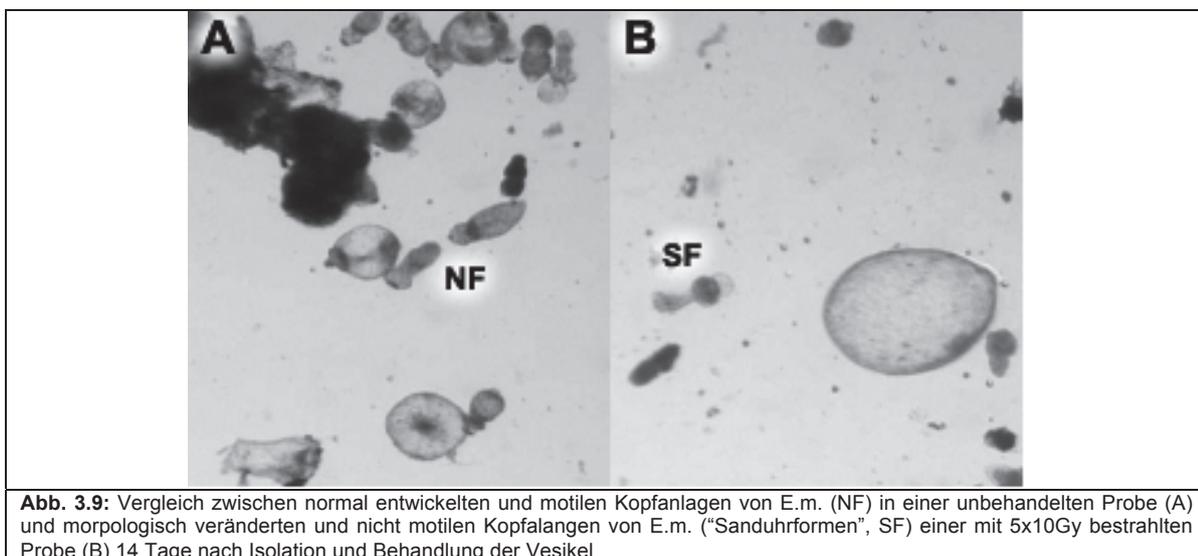


Abb. 3.9: Vergleich zwischen normal entwickelten und motilen Kopfanlagen von E.m. (NF) in einer unbehandelten Probe (A) und morphologisch veränderten und nicht motilen Kopfalangen von E.m. ("Sanduhrformen", SF) einer mit 5x10Gy bestrahlten Probe (B) 14 Tage nach Isolation und Behandlung der Vesikel

In den abschließenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen nach Bestrahlung und mehrmonatiger Kultivierung zeigte sich wie schon nach 14 Tagen eine Entleerung der Glykogenspeicher.

Zur Untersuchung der sekretorischen Komponenten wurden eine Zymographie von Mediumüberständen und Vesikelflüssigkeiten sowie eine Bestimmung der Proteaseaktivität in Mediumüberständen und Vesikelflüssigkeit mittels Silbergelelektrophorese 4 Wochen nach der ersten Bestrahlung durchgeführt. In den Untersuchungen zeigten sich bezüglich Zusammensetzung und Proteaseaktivität keine signifikanten Unterschiede zwischen den bestrahlten Kulturen und der unbehandelten Kontrollgruppe. Die Bandenmuster zeigten sowohl in der Zymografie (siehe Abb. 3.10) als auch in der Silbergelelektrophorese (siehe Abb. 3.11) ein identisches Bild bei den Proben mit und ohne Bestrahlung.

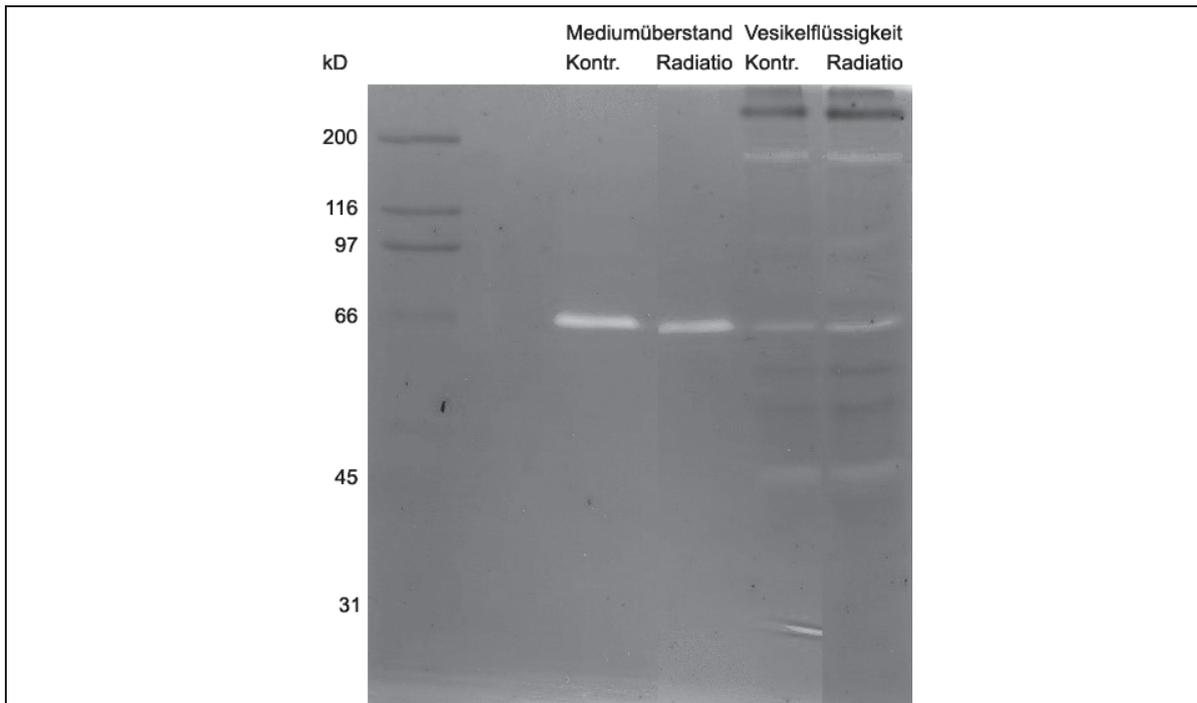


Abb. 3.10: Zymographie des Mediumüberstandes (2. und 3. Spalte) sowie der Vesikelflüssigkeit (4. und 5. Spalte). Die Abbildung zeigt die jeweilige Gegenüberstellung von Kontrollkulturen ohne Behandlung (2. und 4. Spalte) und mit 50 Gy bestrahlten Kulturen (3. und 5. Spalte)

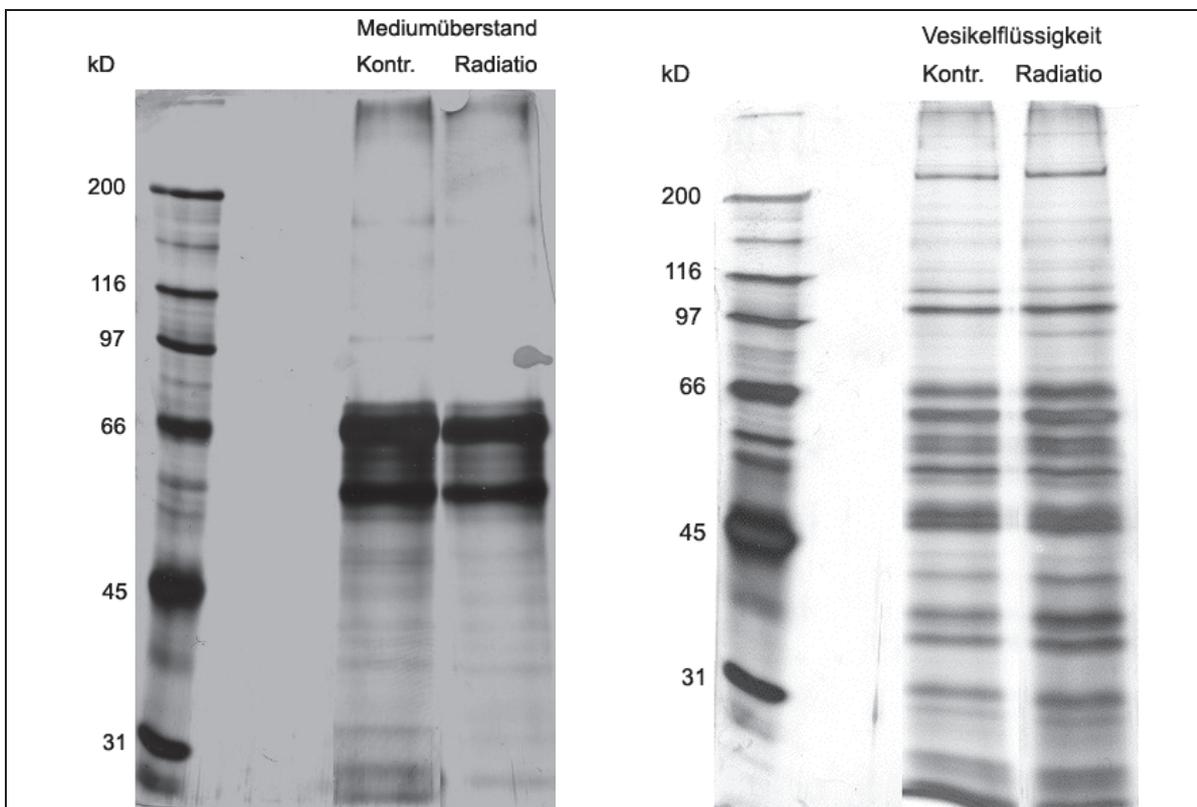


Abb. 3.11: Silbergelelektrophorese des Medienüberstandes (links) sowie der Vesikel-flüssigkeiten (rechts) zur Bestimmung des Proteasensmusters. Die Abbildung zeigt die jeweilige Gegenüberstellung von unbehandelter Kontrollkultur (jeweils mittlere Spalte) und mit 50 Gy bestrahlter Kultur (jeweils rechte Spalte).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals systematisch die Wirkung ionisierender Strahlen auf Metacestoden von *Echinococcus multilocularis* untersucht. Bisher liegt zur Anwendung von ionisierender Strahlung bei alveolärer Echinokokkose am Menschen nur eine Einzelfallbeschreibung vor [SCH 98]. Der parasitozide Effekt von ionisierender Strahlung (im Kilogray-Bereich) wird - vor allem außerhalb Europas - außerdem zur Abtötung von Parasiten in der Lebensmittelsterilisation eingesetzt [BFS 07], wobei bereits 1974 ein Einfluss durch Bestrahlung auf die Infektiosität von E.m.-Eiern gezeigt werden konnte [MAR 74].

Lange Zeit war man auf Tiermodelle zur Untersuchung des E.m. angewiesen, was aufwändig und kostenintensiv ist. Die etablierten Versuchstiere sind Nagetiere, welche aufgrund ihrer geringen Grösse für Bestrahlungsexperimente mit den zur Verfügung stehenden Geräten nicht geeignet sind: Nimmt man Leber oder Abdominalhöhle des Wirtstieres als Lokalisation an, läge der größte Teil des Tieres im Bestrahlungsfeld. Die Dosis von 10 bis 50 Gy als Ganzkörperdosis führt bei den meisten Säugetieren unbehandelt zu einem Knochenmarksversagen und damit zum Tod des Tieres [BON 64]. Eine Infektion eines größeren Tieres (z.B. des Schweins) ist zwar experimentell möglich [DEP 05], jedoch nicht praktikabel. Seit einigen Jahren steht ein Kulturverfahren zur Verfügung, welches die Untersuchung praktisch reiner Parasitenkulturen ermöglicht [HEM 95]. Dabei können Interaktionen zwischen Parasit und Wirtsgewebe, welche Gegenstand der aktuellen Forschung sind [JUR 96], [KON 03], [SPI 03], [ZAV 03], ausgeschlossen werden. Die Methode bietet darüber hinaus die Möglichkeit, den Parasiten nach einer Bestrahlung kontinuierlich zu beobachten, und die Veränderungen zu jedem beliebigen Zeitpunkt zu dokumentieren. Die Anzahl an Versuchstieren kann damit minimiert werden, und das Parasitenmaterial muss nicht nach der Behandlung operativ gewonnen werden. Die Kultivierung von E.m. *in vitro* erlaubt außerdem eine Durchführung von biochemischen Untersuchungsverfahren: Der Nachweis der E.m.-spezifischen alkalischen Phosphatase (EmAP-Assay) erfolgt mittels einer enzymatischen Reaktion, die auch auf eine alkalische Phosphatase des Wirtes sensibel

reagieren, und somit das Untersuchungsergebnis verfälschen würde. Die Gewinnung der sezernierten Proteasen aus dem Mediumüberstand und der Vesikelflüssigkeit ist ebenfalls nur in einem Modell einer Reinkultur sicher ohne Verunreinigung durch Wirtsmaterial möglich. Aus diesen Gründen haben wir für unsere Versuche ein in vitro-Verfahren gewählt.

In früheren Untersuchungen zur Wirkung ionisierender Strahlen war die Infektiösität nicht signifikant verringert [GRI 98], so dass wir in unseren Versuchen auf eine Reinfektion mit bestrahltem Parasitenmaterial verzichtet haben.

Die Bestrahlungsdosen wurden so gewählt, dass eine Anwendung am Menschen möglich wäre [TSE 08], [KAT 07]. In diesem Dosisbereich von etwa 50 bis 100 Gy fanden sich charakteristische, reproduzierbare Veränderungen:

1. Die Proliferationsrate des Parasiten war vermindert.
2. Die Kopfanlagen des Parasiten zeigten abweichende Morphologie.
3. Die Mikrostruktur des Parasiten zeigte Veränderungen, die auf eine Schädigung hindeuten.

Die beobachteten Unterschiede in Vesikelgröße und Proliferation (Anzahl der Vesikel) nach Beobachtungszeiten von drei Monaten deuten auf eine eingeschränkte Fähigkeit zum Wachstum von bestrahltem Parasitenmaterial hin. Wachstum und Proliferation werden allgemein durch ionisierende Strahlen gehemmt. Benzimidazole wie Mebendazol bewirken ähnliche Veränderungen [JUR 98]. In dieser Arbeit wurde die Eigenschaft von Mebendazol als Parasitostatikum und dosisabhängig als Parasitizidum beschrieben und makroskopische Veränderungen in Zahl und Größe der Vesikel in vitro beobachtet. Genomschäden, die eine Ursache für verminderte Proliferation sein können, wurden in unseren Versuchen nicht untersucht.

Die makroskopischen Veränderungen in Form des Tonusverlustes von einzelnen Vesikeln sind aufgrund des sporadischen (weniger als 5% aller Vesikel in unseren Versuchen) und gleich häufigen Auftretens in sämtlichen behandelten sowie

unbehandelten Kulturen nicht als Folge der Bestrahlung zu werten. Der Tonusverlust kann vor allem auf eine defekte Vesikelmembran hindeuten, was auch mechanische Ursachen haben kann. Frühere Experimente haben den Tonus der Vesikel bei *Echinococcus granulosus* als Kriterium für die Viabilität herangezogen [CAS 96], [HEA 75]. Ein genereller Tonusverlust in 30 bis 40% der Vesikel wurde bei der Behandlung von E.m.-Metacestoden mit Albendazol in vitro nach fünf Tagen beschrieben, nach zehn Tagen zeigten 90% der behandelten Vesikel einen Tonusverlust [ING 99]. Die kleine Anzahl und das Auftreten in sämtlichen Kulturen in unseren Versuchen lassen derartige Rückschlüsse jedoch nicht zu.

Die eingeschränkte Motilität der freien Kopfanlagen sowie "Sanduhrformen" der Protoskolizes lassen sich als Schädigungen dieser im Vergleich zu den Vesikeln, die nur Larvenstadien mit wenigen unterschiedlichen Zelltypen darstellen, erheblich komplexer aufgebauten mehrzelligen Organismen interpretieren. Die verminderte Motilität der Kopfanlagen und morphologische Veränderungen der Protoskolizes gelten als Zeichen eines Viabilitätsverlustes [OHN 84]. Da diese Beobachtung nur bei bestrahlten Kulturen auftrat, beurteilen wir diese als Effekt der ionisierenden Strahlen.

Auf elektronenmikroskopischer Ebene bewirken ionisierende Strahlen reproduzierbare Veränderungen in der germinativen Schicht: Dies sind im Einzelnen die Ausbildung von zytoplasmatischen Vesikeln, das Auftreten von intrazytoplasmatischen Lipidtröpfchen, die Abrundung von Mitochondrien und die Entleerung der zellulären Glykogenspeicher. Als Zelltod wird bei differenzierten Zellen der Verlust der spezifischen Funktion und bei undifferenzierten Zellen der Verlust der ununterbrochenen Teilungsfähigkeit bezeichnet [HAL 94]. Die letale Dosis beträgt bei differenzierten Zellen etwa 100 Gy und bei undifferenzierten Zellen etwa 2 Gy. Insbesondere im Bezug auf die undifferenzierten Zellen erwarten wir somit Veränderungen an den Zellstrukturen, die auf eine Zellinaktivierung hindeuten.

Die intrazytoplasmatische Ausbildung von Vesikeln bei den bestrahlten Kulturen konnten wir ausschließlich bei den undifferenzierten Zellen beobachten. Dabei betraf die Vesikelbildung nur das Zytoplasma, während die Zellkerne morphologisch intakt blieben. Diese Vesikelbildung ist aus Versuchen mit Albendazol und Nitazoxanide bekannt. In der Anwendung von Nitazoxanide wird sie als Frühzeichen beschrieben und

als beginnende Schädigung der germinativen Schicht interpretiert [STE 01]. Im Gegensatz zur Anwendung von Nitazoxanide konnten wir jedoch keine Schädigung der Mikrotriches des Teguments beobachten.

Das Auftreten von intrazytoplasmatischen Lipidtröpfchen, welche als elektronendichte, kugelförmige Strukturen imponieren, beobachteten wir im Zytoplasma verschiedener Zelltypen. Auch hier zeigen sich Parallelen zu den elektronenmikroskopischen Veränderungen durch Albendazol und Nitazoxanide, wo es zum Auftreten solcher Lipidtröpfchen ab dem 4. Behandlungstag kam. Diese gingen mit dem Verlust von Zell-Zell-Kontakten einher [STE 03].

Einzelne Zellen zeigten nach Bestrahlung abgerundete Mitochondrien. Ähnliche Veränderungen sind unter Nitazoxanide und Clarithromycin beschrieben worden [STE 03], [MAT 05]. Man nimmt an, dass im Falle des Clarithromycins die mitochondriale Translation beeinflusst wird, die Ursache bei Nitazoxanide ist unbekannt. Auch Benzimidazole führen über Störung der Tubulinbildung zur Ausbildung von abgerundeten Mitochondrien [ING 99]. Wir interpretieren die mitochondrialen Veränderungen als Effekt der Bestrahlung, wobei sowohl ein direkter oder - über die Genexpression - indirekter Einfluss auf die Tubulinbildung denkbar ist.

Die Entleerung der zellulären Glykogenspeicher in der germinativen Schicht durch ionisierende Strahlen beruht auf einem erhöhten Glykogenabbau oder einer verminderten Glykogensynthese. Eine Verminderung des Glykogengehaltes in Parasitengewebe wurde unter dem Einfluss von Mebendazol und Isatin beschrieben [XIA 90], [DEL 89]. Die Entleerung der Glykogenspeicher könnte auf dem oxidativen Stress, welcher durch Bestrahlung ausgelöst wird, beruhen. Details der Glykogen-Depletion sind aber auch bei den ungleich besser untersuchten Benzimidazolen nicht bekannt. Entsprechende Untersuchungen für ionisierende Strahlen liegen nicht vor.

Ein großes Problem bei Nachbeobachtungszeiten von mehr als 8 Wochen stellten Infektionen mit Schimmelpilzen (v.a. Aspergillus-Spezies) dar. Auf den Zusatz eines Mykostatikums wie Amphotericin B haben wir dennoch verzichtet, da gezeigt werden konnte, dass eine Langzeittherapie mit Amphotericin B ein Parasitenwachstum verhindert und nach Beendigung der Therapie mit Amphotericin B ein erneutes Wachstum auftritt, was einem parasitostatischen Effekt entspricht [REU 03]. Kulturen mit

Schimmelpilzinfektionen wurden aus unseren Experimenten unmittelbar nach deren makro- oder mikroskopischer Detektion ausgeschlossen.

Die von uns gewählten enzymatischen Nachweisverfahren zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben.

In aktuellen Screening-Untersuchungen zur Wirkung von Medikamenten auf Metazestoden von *Echinococcus multilocularis* hat sich der EmAP-Assay als Viabilitätstest geeignet gezeigt [STE 03], [STE 01]. Sowohl bei dem bekanntem Antihelminthikum Albendazol und dessen aktiven Metaboliten als auch bei Nitazoxanide, einem neueren Medikament, welches im Tierversuch parasitozide Eigenschaften gegen *Echinococcus multilocularis* aufweist, hat sich der EmAP-Assay als eine einfach durchzuführende, kostengünstige und zeitsparende Methode des Nachweises eines parasitenspezifischen Markers herausgestellt. In diesen Versuchen konnte elektronenmikroskopisch gezeigt werden, dass die Freisetzung von EmAP in den Mediumüberstand der Kultur mit der Destruktion und Desintegration der germinativen Schicht einhergeht. Da die Wirkung ionisierender Strahlen über Schädigung der DNA und Apoptose zum Zelltod führt, ist ein ähnlicher Effekt auf die germinative Schicht des Parasiten, welche aus Zellen aufgebaut ist, durch Bestrahlung theoretisch denkbar. Die gemessenen Extinktionen, welche mit der Menge der freigesetzten EmAP und damit dem Grad der Destruktion korrelieren, lagen bei den behandelten Kulturen im Bereich der Negativkontrolle. Somit kann aus diesem Verfahren der Schluss gezogen werden, dass eine Bestrahlung nicht zu einer Freisetzung von EmAP führt. Dies ist so zu werten, dass das Design dieses Experiments einerseits nur kurzfristige Wirkungen (innerhalb des Beobachtungszeitraumes von zehn Tagen) erfasst und somit die vermuteten kumulativen Effekte einer Bestrahlung nach mehreren Zellteilungen nicht berücksichtigt werden oder andererseits eine Radiatio im Gegensatz zu den nachgewiesenen Effekten der Antihelminthika [STE 03], [STE 01] keinen Effekt auf die Freisetzung von EmAP hat, was mit der morphologischen Beobachtung von intakten Mikrotriches in den bestrahlten Proben übereinstimmt. Ein systematischer Fehler konnte durch den Einsatz einer Positiv- und Negativkontrolle ausgeschlossen werden.

Der Nachweis von Proteaseaktivitäten in der Vesikelflüssigkeit und im Mediumüberstand ist eine Möglichkeit der Visualisierung von genetischen Schäden [NAG 06], welche

einen Einfluss auf die Genexpression haben. Der Einfluss von ionisierender Strahlung auf die Genexpression beim Menschen ist nachgewiesen [AMU 08]. Die enzymatischen Untersuchungen mittels Zymographie und Silbergelelektrophorese zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Proben nach einem Zeitraum von 4 Wochen nach der Bestrahlung. Somit kann davon ausgegangen werden, dass ionisierende Strahlen die Expression von Metalloproteasen des Parasiten in dem von uns untersuchten Zeitraum nicht beeinflussen. Dabei bleibt fraglich, ob grundsätzlich kein Einfluss auf die Genexpression besteht oder der Zeitraum zu kurz war, um signifikante Veränderungen nachzuweisen.

In der Literatur findet sich bezüglich des Einsatzes von ionisierenden Strahlen bei Befall von E.m. lediglich eine Einzelfallbeschreibung. Eine 28-jährige Patientin mit Leber- und Lungenechinokokkose sowie zerebraler Echinokokkose wurde zunächst mit Mebendazol und im Verlauf mit Interferon-gamma zusätzlich behandelt. Bei Stabilisierung der Lungen- und Leberbefunde kam es zu einem progredienten Wachstum der cerebralen Veränderungen. Bei Auftretenden neurologischen Symptomen wurde die Entscheidung zur Bestrahlung an Stelle einer offenen Exzision getroffen. Innerhalb von 3 Monaten wurde zweimalig eine Dosis von 26,7 Gy appliziert, in Kombination mit einer Gabe von Albendazol, welches eine verbesserte Penetration durch die Blut-Hirn-Schranke aufweist. Im Verlauf kam es zu einer Regression der zerebralen Echinokokkose (Nachweis mittels MRI) und zu einer Besserung der neurologischen Symptome. Im follow-up von 3 Jahren nach der ersten Bestrahlung zeigte sich die Patientin stabil, minimal neurologisch symptomatisch und deutlich in der Lebensqualität gebessert. Der cerebrale Befund hatte sich im Vergleich zur Voruntersuchung nicht vergrößert [SCH 98]. Diese Fallbeschreibung zeigt einen erfolgreichen Einsatz von ionisierender Strahlung zur Therapie der alveolären Echinokokkose in einem relativ strahlenresistenten Wirtsgewebe. Dabei entspricht die Gesamtdosis etwa der applizierten Dosis in unseren Versuchen. Jedoch lässt sich die Regredienz des Befundes nicht zweifelsfrei auf die Bestrahlung zurückführen, da gleichzeitig Antihelminthika eingesetzt wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wirkung von ionisierenden Strahlen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit zu einer Schädigung des Parasiten führt, jedoch diesen nicht abtötet. Die Schäden zeigen sich vor allem in morphologischen Veränderungen, welche sich elektronenmikroskopisch nachweisen lassen. Einer therapeutischen Anwendung müssten noch weitere Untersuchungen vorausgehen, vor allem im Bereich der Interaktion von Wirts- und Parasitengewebe unter dem Einfluss von ionisierenden Strahlen. Aufgrund der beschränkten Strahlentoleranz des Leberparenchyms muss jedoch hauptsächlich über einen Einsatz bei extrahepatischem Befall von strahlenresistenterem Gewebe, wie z.B. Nervengewebe, bei Inoperabilität oder Unverträglichkeit der bewährten Antihelminthika nachgedacht werden. Gerade in Geweben, wo die üblichen Medikamente nur unzureichend angereichert werden, könnte die Radiatio eine sinnvolle Therapieergänzung darstellen.

5. Anhang

5.1. Übersicht Materialien

Parasitenmaterial

E. multilocularis Dr. Thomas Romig, Parasitologie, Universität Hohenheim: Leber- und Peritonealmaterial von per os infizierten Feldmäusen (*Microtus agrestis*)

Prof. Dr. Andrew Hemphill, Parasitologie, Universität Bern: Leber- und Peritonealmaterial von intraperitoneal infizierten Mongolischen Rennmäusen (*Meriones unguiculatus*)

Mediumkomponenten

IMDM (Iscoves Modified Dulbecco's Media)	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
RPMI 1640 (Royal Park Memorial Institute) farblos	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
FCS (Fetales Kalbserum)	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis (Missouri), USA

Sonstige Materialien

Chemikalien

PBS pH 7,3 (Phosphate-Buffered Saline)	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Test-Kit Alkalische Phosphatase Ecoline 25	Diagnostica Merck, Darmstadt, Deutschland
NTZ (Nitazoxanide)	Romark Industries, Kalamazoo (Michigan), USA

Zymographie-Chemikalien (Aceton, 0,1% Gelatine-Substrat für Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel- Elektrophorese (SDS-PAGE), Triton X100, Inkubationspuffer (50mM Tris, pH 7,6, inkl. 50mM NaCl und 10 mM CaCl ₂), Coomassie brilliant blue G250)	Sigma-Aldrich, St. Louis (Missouri), USA
Silbergelelektrophorese-Chemikalien (Methanol-Chlorophorm, 0,1% Gelatine- Substrat für Natrium-Dodecyl-Sulfat- Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE), Fixierlösung für Silberfärbung, 0,1% Silbernitratlösung, 2,5% Natrium- bicarbonat, Eisessig)	Sigma-Aldrich, St. Louis (Missouri), USA

Verbrauchsmittel

50 ml Tubes Falcon	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
15 ml Tubes Falcon	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Sterile 96-well Platten	Costar, Corning, New York, USA
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	Costar, Corning, New York, USA
Pipetten	Costar, Corning, New York, USA

5.2 Übersicht Geräte

CO ₂ -Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Sterilbank	Gelaire, Sydney, Australien
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Lichtmikroskope	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Photometer	Tecan Rainbow, Männedorf/Zürich; Schweiz

Kobalt-Gerät (Co-60)	Co-60-Bestrahlungsgerät für den klinischen Einsatz in der Klinik für Strahlentherapie der Universitätsklinik Düsseldorf
Elektronenmikroskop Joel 840	Joel Australasia Ltd., Sydney, Australien
Zentrifuge EBA 20 (Drehzahl: 6000 min ⁻¹)	Andreas Hettich GmbH & Co. KG Tuttlingen, Deutschland

6. Literatur

[AMM 00] Ammann RW (2000) Neo- und adjuvante Therapie bei Echinokokkose. *Der Chirurg* 71: 9-15

[AMM 99] Amman RW, Fleiner Hoffmann A, Eckert J (1999) Schweizerische Studie für Chemotherapie der alveolären Echinokokkose – Rückblick auf ein 20-jähriges klinisches Forschungsprojekt. *Schweizer Medizinische Wochenschrift* 129: 323-332

[AMU 08] Amundson SA. Functional genomics in radiation biology: a gateway to cellular systems-level studies (2008) *Radiation and Environmental Biophysics* 47:25–31

[AUD 87] Audin P, Sarciron E, Paris J, Petavy, AF (1987) In vivo inhibition by ethyloxanilates of alkaline phosphatases of the cestode *Echinococcus multilocularis* *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie* 305: 251-253

[BFS 07] Bundesamt für Strahlenschutz, persönliche Kommunikation

[BON 64] Bond VP, Fliedner TM, Archambeau JO (1965) *Mammalian Radiation Lethality: a Disturbance of Cellular Kinetics*. Academic Press Inc., New York.

[BRE 07] Bresson-Hadni S, Kern P, Romig T, Vuitton D (2007) European Network for Concerted Surveillance of Alveolar Echinococcosis. www.eurechinoreg.org

[BRE 94] Bresson-Hadni S, Laplante JJ, Lenys D, Rohmer P, Gottstein B, Jacquier P, Mercet P, Meyer JP, Miguet JP, Vuitton DA (1994) Seroepidemiologic screening of *Echinococcus multilocularis* infection in a European area endemic for alveolar echinococcosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51(6): 837-846

[BUT 01] Buttenschoen K, Schorcht P, Reuter S, Carli Buttenschoen D, Kern P, Beger HG (2001) Die chirurgische Therapie der alveolären Echinokokkose und deren Langzeitergebnisse. *Der Chirurg* 72: 566-572

[CAS 96] Casado N, Perrez-Serrano J, Denegri G, Rodriguez-Caabeiro F (1996) Development of a Chemotherapeutic Model for the In Vitro Screening of Drugs against *Echinococcus Granulosus* Cysts: The Effects of an Albendazolesulphoxide Combination. *International Journal for Parasitology* 26: 59-65

[DEL 89] Delabre-Defayolle I, Sarciron ME, Audin P, Gabrion C, Duriez T, Paris J, Petavy AF (1989) *Echinococcus multilocularis* metacestodes: biochemical and ultrastructural investigations on the effect of isatin (2-3 indoline dione) in vivo. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 23: 237-245.

[DEP 05] Deplazes P, Grimm F, Sydler T, Tanner I, Kapel CM (2005) Experimental alveolar echinococcosis in pigs, lesion development and serological follow up. *Veterinary Parasitology* 130(3-4): 213-222

[DIL 08] Dilling TJ, Hoffe SE (2008) Stereotactic body radiation therapy: transcending the conventional to improve outcomes. *Cancer Control* 15(2): 104-11.

[ECK 00] Eckert J, Conraths FJ, Tackmann K (2000) Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *International Journal for Parasitology* 30: 1283-1294

[ECK 99] Eckert J, Deplazes P (1999) Alveolar Echinococcosis in Humans: The Current Situation in Central Europe and the Need for Countermeasures. *Parasitol Today* 15(8):315-319

[EME 94] Emery I, Bories C, Liance M, Houin R (1994) In Vitro Quantitative Assessment of *Echinococcus Multilocularis* Metacestode Viability after In Vivo and In Vitro Maintenance. *International Journal for Parasitology* 25: 275-278

[FRE 37] Freund L (1937) 40 Jahre Röntgentherapie. Wiener Klinische Wochenschrift 147: 147-153

[FRE 97] Freund L (1897) Ein mit Röntgenstrahlen behandelter Fall von Naevus pigmentosus piliferus. Wiener Medizinische Wochenschrift. 47: 428-434.

[GOT 00] Gottstein B (2000) Epidemiologie und Systematik der cystischen und alveolären Echinokokkose. Der Chirurg 7: 1-8

[GOT 08] Gottstein B, Hemphill A (2008) Echinococcus multilocularis: the parasite-host interplay. Experimental Parasitology 119(4): 447-452

[GRI 98] Gripp S, Hilger B, Romig T (1998) Strahlentherapie von Echinococcus multilocularis. Strahlentherapie und Onkologie Supplement 174: 111, P30

[HAL 94] Hall EJ (1994) Molecular biology in radiation therapy: the potential impact of recombinant technology on clinical practice. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 30(5): 1019-1028

[HEA 75] Heath DD, Christie MJ, Chevis RAF (1975) The Lethal Effect of Mebendazole on Secondary Echinococcus Granulosus Cysticerci and Taenia Pisiformis and Tetrahydia of Mesocestoides Corti. Parasitology 70: 273-285

[HEM 02] 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: 445-451

[HEM 95] Hemphill A, Gottstein B (1995) Immunology and morphology studies on the proliferation of in vitro cultivated Echinococcus multilocularis metacestodes. Parasitology Research 81: 605-614

[HEM 97] Hemphill A, Croft SL (1997) Electron microscopy in parasitology, in Rogan M (Hrsg.), Analytical parasitology, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany 227-268

[HEY 00] Heyd B, Weise L, Bettschart V, Gillet M (2000) Chirurgische Therapie beim Echinococcus alveolaris der Leber. Der Chirurg 71: 16-20

[ING 99] 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 Metacestodes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43: 1052-1061

[JEN 01] Jensen B, Reuter S, Kratzer W, Naser K, Kächele V, Kimmig P, Kern P (2001) Long-Term Seropositivity against Echinococcus multilocularis in an Epidemical Follow-up Study in Southwestern Germany (Römerstein). Infection 29: 310-314

[JUR 96] Jura H, Bader A, Hartmann M, Maschek H, Frosch M (1996) Hepatic Tissue Culture Model for Study of Host-Parasite Interactions in Alveolar Echinococcosis. Infection and Immunity 64: 3484-3490

[JUR 98] Jura H, Bader A, Frosch M (1998) In Vitro Activities of Benzimidazoles against Echinococcus multilocularis Metacestodes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42: 1052-1056

[KAT 07] Katz AW, Carey-Sampson M, Muhs AG, Milano MT, Schell MC, Okunieff P. Hypofractionated stereotactic body radiation therapy (SBRT) for limited hepatic metastases (2008) International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 67(3):793-8

[KER 03] Kern P, Bardonnnet K, Renner E, Auer H, Pawlowski Z, Ammann RW, Vuitton DA, Kern P; European Echinococcosis Registry (2003) European echinococcosis registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982-2000. Emerging Infectious Diseases 9(3):343-9.

[KEY 94] Keyserlingk M, Thoms B, Körfer KH (1994) Der kleine Fuchsbandwurm. Wild und Hund 19: 36-41

[KON 03] Konrad C, Kroner A, Spiliotis, M, Zavala-Góngora R, Brehm K (2003) Identification and molecular characterisation of a gene encoding a member of the insulin receptor family in *Echinococcus multilocularis*. International Journal for Parasitology 33: 301-312

[LAW 97] Lawton P, Hemphill A, Deplazes P, Gottstein B, Sarciron ME (1997) *Echinococcus multilocularis* metacestodes: immunological and immunocytochemical analysis of the relationships between alkaline phosphatase and the Em2 antigen. Experimental Parasitology 87: 142-149

[MAR 74] Markell EK, Beal CB (1974) Resistance of *Echinococcus multilocularis* to X-ray. The Journal of Parasitology 60: 729-730

[MAT 05] Mathis A, Wild P, Boettger EC, Kapel CMO, Deplazes P (2005) Mitochondrial Ribosome as the Target for the Macrolide Antibiotic Clarithromycin in the Helminth *Echinococcus multilocularis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49: 3251–3255

[MEH 83] Mehlhorn H, Eckert J, Thompson RCA (1983) Proliferation and Metastases Formation of Larval *Echinococcus multilocularis*. II. Ultrastructural Investigations. Zeitschrift für Parasitenkunde 69: 749-763

[NAG 06] Naguleswaran A, Spicher M, Vonlaufen N, Ortega-Mora LM, 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 Chemotherapy 50: 3770-3778

[OHN 84] Ohnishi K, Nakao M, Inaoka T (1984) Viability and Infectivity of Protoscolices of *Echinococcus Multilocularis* Stored at Different Temperatures. *International Journal for Parasitology* 14: 577-580

[PER 98] Perez CA, Braddy LW (1998) Principle and practice in radiation oncology, Chapter 53, Lippincott Raven Publishers, Wickford, USA

[REU 00] Reuter S, Jensen B, Buttenschoen K, Kratzer W, Kern P (2000) Benzimidazoles in the treatment of alveolar echinococcosis: a comparative study and review of the literature. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46(3): 451-456

[REU 01] Reuter S, Nüssle 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

[REU 03] Reuter S, Merkle M, Brehm K, Kern P, Manfras B (2003) Effect of amphotericin B on larval growth of *Echinococcus multilocularis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(2): 620-625.

[SAR 91] Sarciron ME, Hamoud W, Azzar G, Petavy AF (1991) Alkaline phosphatase from *Echinococcus multilocularis*: purification and characterization. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry* 100: 253-258

[SAU 01] Sauer R (2001) Strahlenbiologie und Strahlentherapie und Radioonkologie, in Kaufmann GW, Moser E, Sauer R, Radiologie, Urban und Fischer Verlag, München, Germany 31-57 und 253-291

[SCH 98] Schmid M, Pendl G, Samonigg H, Ranner G, Eustacchio S, Reisinger E C (1998) Gamma Knife Radiosurgery and Albendazole for Cerebral Alveolar Hydatid Disease. *Clinical Infectious Diseases* 26: 1379-82

[SPI 03] 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

[STE 01] 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 Chemotherapy* 45: 2256-2262

[STE 03] Stettler M, Fink R, Walker M, Gottstein B, Geary TG, Rossignol JF, Hemphill A (2003) In Vitro Parasitocidal Effect of Nitazoxanide against *Echinococcus multilocularis* Metacestodes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 467-474

[TSE 08] Tse RV, Hawkins M, Lockwood G, Kim JJ, Cummings B, Knox J, Sherman M, Dawson LA. Phase I study of individualized stereotactic body radiotherapy for hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma (2008) *Journal of Clinical Oncology* 26(4): 657-64.

[WES 84] Wessel D, Flügge UI (1984) A method for quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergent. *Analytical Biochemistry* 138: 141-143

[XIA 90] Xiao SH, Yang YQ, Guo HF, Zhang CW, Jiao PY, You JQ, Jiao W. (1990) Effect of mebendazole, albendazole and albendazole sulfoxide on glycogen contents of *Echinococcus granulosus* cysts in infected mice. *Zhongguo Yao Li Xue Bao (Acta Pharmacologica Sinica)* 11:546-549.

[ZAV 03] Zavala-Góngora R, Kroner A, Wittek B, Knaus P, Brehm K (2003) Identification and characterisation of two distinct Smad proteins from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *International Journal for Parasitology* 33: 1665-1677

7. Lebenslauf

Sebastian Pohle

Pilgerstrasse 65
CH-5405 Baden-Dättwi
Tel. +41 56 5341778
pohle@hispeed.ch



Persönliche Angaben	<ul style="list-style-type: none"> Familienstand: ledig Geburtsdatum: 08.01.1979 Geburtsort: Moers (D) Eltern: Erich Pohle (Rektor einer Grundschule), Doris Pohle (Hausfrau) Geschwister: ein Bruder, Alexander Pohle (Arzt)
Ausbildung	1985 – 1989 Grundschole Alpen (D) 1989 – 1998 Friedrich-Spee-Gymnasium Geldern (D) 1998 Abitur
Ersatzdienst	1998 – 1999 Krankenhaus Bethanien Moers (D), Internistische Intensivstation
Studium	1999 – 2005 Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (D) 2001 Ärztliche Vorprüfung 2002 1. Staatsexamen 2004 2. Staatsexamen Okt 2005 3. Staatsexamen
Famulaturen	<ul style="list-style-type: none"> Ultraschallambulanz St. Josef-Krh. Haan (D) Anästhesie, Intensiv- und Palliativmedizin St. Josef-Krh. Moers (D) Pädiatrische Praxis Rheinberg (D) Strahlentherapie Universität Düsseldorf (D)
Praktisches Jahr	1. Tertial Kardiologie und Internistische Notaufnahme Universität Düsseldorf (D) 2. Tertial Gynäkologie und Geburtshilfe Kantonsspital Baden 3. Tertial Chirurgie Kantonsspital Baden
Beruflicher Werdegang	Okt 2005 – Mai 2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter Institut für Anatomie sowie AG Medizindidaktik an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (D) Jun 2006 – Jan 2008 Assistenzarzt Klinik für Chirurgie, Kantonsspital Baden Feb 2008 – Jan 2009 Assistenzarzt Klinik für Unfallchirurgie, Universitätsspital Zürich Feb 2009 – Jan 2010 Assistenzarzt/Stv. Oberarzt Klinik für Chirurgie, Kreisspital Muri Seit Feb 2009 Stv. Oberarzt Klinik für Chirurgie, Kantonsspital Baden
Tätigkeiten neben dem Studium	seit 2001 Mitarbeit im Medizindidaktischen Pilotprojekt der HHU Düsseldorf (Ultraschallausbildung)
Ehrenamtliche Tätigkeiten	<ul style="list-style-type: none"> Jugendarbeit in der Ev. Kirchengemeinde Alpen (1991 – 1998) Betreuung von Jugendfreizeiten (1995 – 1998) Mitgliedschaft im Jugendausschuss (1996 – 2000) Mitgliedschaft im Ausschuss für Theologie und Gottesdienst (1996 – 2000)
Sprachkenntnisse	<ul style="list-style-type: none"> Latein (Latinum) Englisch (Schulkenntnisse) Französisch (Schulkenntnisse) Spanisch (Grundkenntnisse)
Hobbies	<ul style="list-style-type: none"> Wandern Lesen Skifahren

8. Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn PD Dr. S. Gripp für die Bereitstellung des interessanten Themas und die umfassende Betreuung meiner Arbeit.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. C. MacKenzie stellvertretend für das gesamte Team der Medizinischen Mikrobiologie der Universitätsklinik Düsseldorf für die freundliche Aufnahme in die mikrobiologische Arbeitsgruppe und die kompetente fachliche Unterstützung in allen Phasen meiner Arbeit.

Herzlichen Dank an Prof. Dr. A. Hemphill und sein Team vom Institut für Parasitologie der Universität Bern für die exzellente Beratung und Hilfe bei der Durchführung der Echinokokkenkultivierung, elektronenmikroskopischen Untersuchungen und biochemischen Nachweisverfahren.

Für die Bereitstellung von Parasitenmaterial gilt mein Dank Herrn Dr. T. Romig von der Universität Hohenheim.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Partnerin Sabrina van der Schoot und meiner ganzen Familie für die stetige Unterstützung und insbesondere bei meinem Vater Herrn E. Pohle für das Lektorat und die sorgfältige Korrektur meines Manuskriptes bedanken.

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich – Sebastian Pohle – die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ich habe die vorliegende Dissertation weder in der vorliegenden noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen Institution eingereicht.

Baden, im Dezember 2010

Sebastian Pohle

10. Zusammenfassung

Einleitung: Die Alveoläre Echinokokkose (AE) stellt für den Menschen eine lebensbedrohliche Parasitose dar. Die antimikrobielle Therapie besteht neben der operativen Behandlung zurzeit aus einer lebenslangen parasitostatischen Therapie. In der vorliegenden Arbeit haben wir untersucht, ob die Anwendung ionisierender Strahlen eine Alternative in dieser unbefriedigenden Situation bietet.

Material und Methoden: Aus den Lebern infizierter Mäuse isoliertes Parasitengewebe (Metazestoden) wurde nach einer von Hemphill und Gottstein entwickelten Methode in vitro kultiviert. Die Kulturen wurden mit 50-100 Gy (Co-60) in verschiedenen Fraktionierungen bestrahlt und das Wachstumsverhalten makroskopisch, mikroskopisch sowie elektronenmikroskopisch untersucht. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden nach einer etablierten Methode für die Untersuchung von Parasitenmaterial durchgeführt. Die Viabilität wurde zusätzlich mit dem EmAP-Assay und dem Nachweis von sekretorischen Komponenten geprüft, welche bei antiparasitären Chemotherapeutika etablierte indirekte Viabilitätstests darstellen.

Ergebnisse: Makroskopisch fand sich nach 3 Monaten bei den bestrahlten Kulturen eine geringere Vesikelproliferation (Größe, Anzahl) als in der Kontrollgruppe. Lichtmikroskopisch zeigte sich eine veränderte Morphologie der Kopfanlagen. Transmissionselektronenmikroskopische Veränderungen, die sich nach Strahlentherapie zeigten, bestehen in Bildung von intrazytoplasmatischen Vesikeln, Abrundung der Mitochondrien, Bildung von Lipidtröpfchen und Entleerung der zellulären Glykogenspeicher. Ein Einfluß auf die Viabilität durch Bestrahlungen 50-100 Gy konnte im EmAP-Assay nach einer Beobachtung über 10 Tage nicht gezeigt werden, ebenso konnten bezüglich der sekretorischen Komponenten keine signifikanten Unterschiede zwischen den bestrahlten und unbehandelten Proben nachgewiesen werden.

Diskussion: Durch Bestrahlung von Metazestoden von *Echinococcus multilocularis* zeigen sich typische reproduzierbare Veränderungen, die auf eine Schädigung des Parasiten hindeuten und aus der Untersuchung der bekannten Chemotherapeutika bekannt sind. Ein Absterben des Parasiten ist unter den von uns untersuchten Umständen nicht zu erwarten, wie die indirekten Viabilitätstests zeigen. In der Literatur existiert eine Einzelfallbeschreibung, die einen erfolgreichen Einsatz von ionisierenden Strahlen in Kombination mit medikamentöser antimikrobieller Therapie bei zerebraler AE beschreibt. Aufgrund der von uns nachgewiesenen Veränderungen wäre eine therapeutische Nutzung von ionisierenden Strahlen bei der AE somit vor allem in strahlenresistentem Wirtsgewebe denkbar.

apl. Prof. Dr. med. S. Gripp