

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne))

Die Infektion von TNF-Rp55-Knockout-Mäusen mit *Schistosoma mansoni*

Vergleichende Untersuchungen an mit *Schistosoma mansoni* infizierten NMRI-, BL/6- und TNF-Rp55-Knockout-Mäusen bezüglich Granulomzahl und -ausprägung zum Nachweis einer möglichen TNF-Abhängigkeit der parasitären granulomatösen Reaktion

Philipp Wagner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. R. Disko
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne)

Die Dissertation wurde am 22.10.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.02.2002 angenommen.

Inhalt

1.	Einleitung	1
2.	Problemstellung	6
2.1.	Grundlegende Fakten	6
2.2.	Problemstellung	8
2.3.	Versuchsplanung	8
2.4.	Auswertungsplanung	9
3.	Materialien und Methodik	11
3.1.	Versuchstiere	11
3.1.1.	Schistosomen	11
3.1.2.	Schnecken	11
3.1.3.	Mäuse	14
3.1.3.1.	NMRI-Mäuse	15
3.1.3.2.	BL/6-Mäuse	15
3.1.3.3.	K.O.-Mäuse	15
3.2.	Immunologische Darstellungen	17
3.2.1.	Eosinophile Granulozyten	19
3.2.2.	Neutrophile Granulozyten	19
3.2.3.	Blut-Monozyten	19
3.2.4.	Gewebsständige Makrophagen	20
4.	Versuchsanordnung und –ablauf	21
4.1.	Inokulationsphase	23
4.1.1.	Gewinnung der Cercarien	23
4.1.2.	Inokulationstechnik	24
4.2.	Entwicklungsphase	26
4.3.	Gewinnung des Untersuchungsmaterials	26
4.3.1.	Gewinnung der Schistosomen	27
4.3.2.	Gewinnung der Organe	30
5.	Bearbeitung des Untersuchungsmaterials	32
5.1.	HE-Färbung	32
5.2.	Immunologische Darstellung	32
5.2.1.	Aufbereitung	32
5.2.2.	Färbeschema	32

5.3.	Aufbewahrung der gewonnenen Materialien	38
6.	Auswertung und Ergebnisse	39
6.1.	Festlegung von Auswertungsschemata	39
6.1.1.	Nachweis der Gültigkeit von Prämissen	39
6.1.1.1.	Auswertung des Leberbefalls	40
6.1.1.2.	Wurmzahl als Parameter der Infektionsdichte	43
6.1.1.3.	Vergleich der Mausstämmen NMRI und BL/6	43
6.2.	Auszählung der Granulomdichte	44
6.2.1.	Granulomendichtebestimmung in der Leber	48
6.2.1.1.	Hämatoxilin-Eosin-Färbung	48
6.2.1.2.	Immunhistochemische Granulomauszählung in der Leber	50
6.2.2.	Granulomdichtebestimmung in anderen Organen	52
6.3.	Vergleich zwischen den Mausstämmen	54
6.3.1.	Vergleich von NMRI- und BL/6-Mäusen	54
6.3.2.	Vergleich von BL/6- und K.O.-Mäusen	59
6.3.3.	Vergleich männlicher BL/6- und K.O.-Mäuse	65
6.3.4.	Immunhistochemie	67
6.3.4.1.	Eosinophile Granulozyten	67
6.3.4.2.	Neutrophile Granulozyten	72
6.3.4.3.	Monozyten	75
6.3.4.4.	Gewebsmakrophagen	76
6.3.5.	Evaluierung des Befalls von Milz und Darm	80
6.3.5.1.	Milzbefall	80
6.3.5.2.	Darmbefall	81
6.4.	Weitere Beobachtungen	85
6.4.1.	Pankreas	85
6.4.2.	Aszites	86
7.	Interpretation und Diskussion der Ergebnisse	87
7.1	Zusammenfassende Interpretation	87
7.1.1.	Granulomreaktion im NMRI-Stamm	87
7.1.2.	Granulomreaktion im BL/6-Stamm	88
7.1.3.	Granulomreaktion im K.O.-Stamm	88
7.1.4.	Granulomreaktion bei männlichen Tieren	89
7.1.5.	Gesamtüberblick über die Granulomreaktionen	90
7.2.	Beurteilung des Versuchsablaufs	90
7.2.1.	Untersuchung auf Fehlerquellen	91
7.2.2.	Übertragbarkeit auf den Menschen	92

7.3.	Diskussion der Ergebnisse	92
7.3.1.	Bezug zu anderen Arbeiten zur Immunologie bei Schistosomiasis	93
7.3.1.1.	Mykobakterielle Granulome	95
7.3.1.2.	Parasitäre Granulome	95
7.3.2.	Mögliche Anwendungen	96
7.3.2.1.	Immunmodulation allgemein	96
7.3.2.2.	TNF- α -Hemmung	97
8.	Zusammenfassung	99
9.	Literatur	101
10.	Abbildungen und Tabellen	110
10.1	Abbildungen	110
10.2	Tabellen	112
11.	Dank	114
12.	Lebenslauf	115

Abkürzungen

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Ak	Antikörper
a.i.	ante infectionem
BL/6	Black-6-Mäuse
BSA	Bovines Serum Albumin
F _{ab}	Fragment ab
F _c	Fragment c
F4/80	Oberflächen-Antigen von Kupffer-Stern-Zellen
Gr1	Oberflächen-Antigen Neutrophiler Granulozyten
HE-Färbung	Hämatoxilin-Eosin Färbung
ICAM1	Intercelluläres Adhäsionsmolekül 1
IgG	Immunglobulin Gamma
IL	Interleukin
K.O.	TNFRp55 ^{-/-} Mäuse, Knockout-Mäuse
LT α/β	Lymphotoxin alpha/beta
Mac1 α	Oberflächen-Antigen von Monozyten
NMRI	New England Medical Research Institute - Mäuse
NO	Nitrogenium Oxid
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
p.i.	post infectionem
RES	Retikulo-Endotheliales System
rIL-2	rekombinantes IL-2
rTNF	rekombinanter TNF
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TNFRp55 ^{-/-}	TNF-Rezeptor p55 Knockout

1. Einleitung

Schistosomiasis, die Infektion mit Pärchenegeln der Gattung *Schistosoma*, stellt nach wie vor die bedeutendste Wurminfektion dar und gehört zu den wichtigsten Tropenkrankheiten überhaupt. Angenommen wird eine Gesamtzahl infizierter Menschen von über 200 Millionen. Endemiegebiete befinden sich derzeit in 74 Ländern der Erde, in denen nahezu eine Milliarde Menschen beheimatet sind, von denen etwa die Hälfte aufgrund ihrer Lebensbedingungen gegenüber dem Pärchenegel exponiert ist (LÖSCHER ET AL 2000).

Schistosoma mansoni SAMBON, 1907, ist die geographisch am weitesten verbreitete Art mit Vorkommen in Afrika südlich der Sahara, Ägypten, auf Madagaskar, vereinzelt auf der Arabischen Halbinsel, in der Karibik und an der Ostküste Südamerikas (Brasilien, Surinam, Venezuela). In die Neue Welt wurde der Pärchenegel über Sklaventransporte aus dem afrikanischen Kontinent eingeschleppt. Hier fand sich der passende Zwischenwirt für den Parasiten – *Biomphalaria*-Wasserschnecken – ohne den eine Ansiedlung in Südamerika nicht möglich gewesen wäre.

Hiermit kommen wir auch schon zum extrem spezialisierten Entwicklungszyklus von *Schistosoma mansoni* (s. Abb. 1.1). Wie bei vielen anderen Parasiten wird auch hier ein Wirtswechsel nötig. Die mit einem Seitenstachel versehenen Eier von *S. mansoni* gelangen über menschliche Defäkation ins Wasser. Hier schlüpfen die ersten Larvenstadien, die zilienträgenden Mirazidien. Diese müssen innerhalb von 4 - 8 Stunden in den Zwischenwirt, eine Schnecke der Gattung *Biomphalaria*, eindringen. Dies geschieht durch aktive Penetration. Im Organsystem der Schnecke verliert das Mirazidium seine zilienbesetzte Membran. Die Umwandlung zur primären Sporozyste erfolgt. Es folgt ein ungeschlechtlicher Vermehrungsakt, bis das kugelige Gebilde aufplatzt und zahlreiche sekundäre Sporozysten entläßt. Ein weiterer asexueller Vermehrungsschritt erfolgt dann in Leber und Sexualorganen der Schnecke, wo die Tochttersporozysten zahlreiche Gabelschwanzlarven (Cercarien) produzieren. Dieser Vermehrungsschritt dauert, je nach Temperatur, mindestens 4 Wochen.

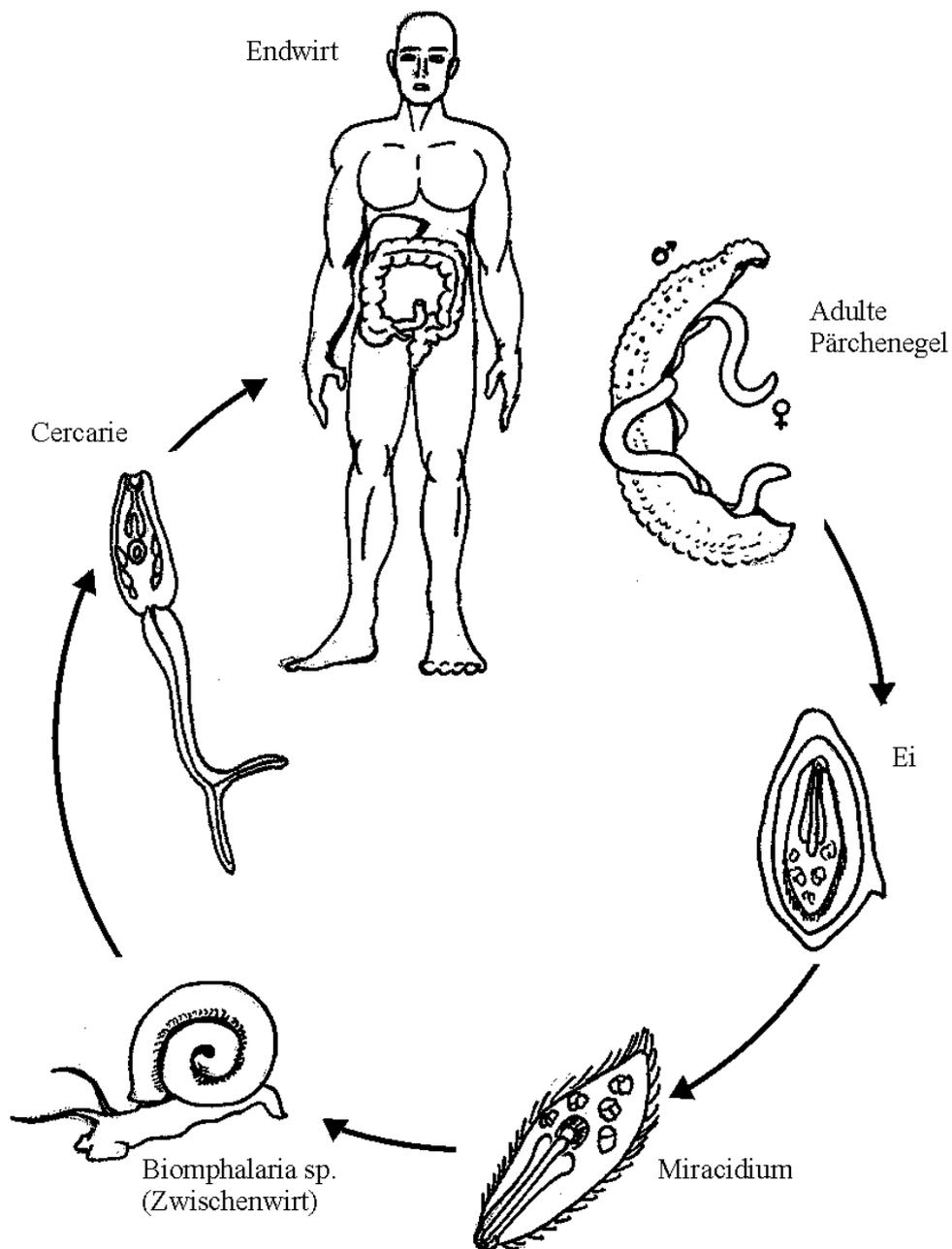


Abbildung 1.1: Der Entwicklungszyklus von *Schistosoma mansoni*. – Die adulten Pärchenegel vermehren sich im Gefäßsystem des Menschen und entlassen hier ihre Eier, welche in das Lumen des Intestinaltraktes vordringen und dort ausgeschieden werden. Bei Ausscheidung in Gewässern erfolgt die Umwandlung zum Miracidium, welches in *Biomphalaria*-Schnecken eindringt. In diesem Zwischenwirt kommt es zur asexuellen Vermehrung, aus welcher Gabelschwanzlarven (Cercarien) hervorgehen. Diese verlassen die Wasserschnecke, um Großsäuger als Endwirte zu besiedeln.

Zu einem bestimmten Zeitpunkt schlüpfen dann die Cercarien aus der Schnecke. Sie können mit Hilfe ihres gegabelten Schwanzfortsatzes schwimmen und heften sich mit ihren beiden Saugnäpfen am potentiellen Wirt fest. Es folgt dann innerhalb von Minuten eine erneute Penetration, diesmal durch die Haut des Endwirtes, also des Menschen.

Während des Eindringens in den Wirt wird der Schwanz abgeworfen, was die Umwandlung in ein sogenanntes Schistosomulum bedeutet. Durch die Haut in den Blutkreislauf gewandert, bilden diese Jugendstadien ihr Tegument aus und gelangen mit dem Blutstrom in die Lunge. Hier wachsen sie, bis sie nach einigen Wochen zur Leber vordringen. Dort reifen die adulten Tiere heran. Weibchen können nur zur Geschlechtsreife gelangen, wenn sie bereits mit einem Männchen verpaart sind. (Dies mag die Beobachtung erklären, warum im folgenden Experiment meist ein Übergewicht an Männchen in den Intestinalgefäßen der Versuchstiere beobachtet wurde.) Die erwachsenen Würmer beginnen nun Eier in das Gefäßsystem zu legen, die langsam mit Hilfe proteolytischer Enzyme Gefäßwände durchdringen und so wieder in das Ausscheidungsorgan, im Falle von *S. mansoni* also den Darm, gelangen können. Die Eier werden mit dem Stuhl ausgeschieden. Geschieht dies in einem Gewässer, in dem man auch *Biomphalaria* findet, so beginnt der Zyklus von neuem.

Während die in Blutgefäßen lebenden Würmer selber kaum Probleme im menschlichen Organismus schaffen, sind ihre Eier umso pathogener. Die adulten Schistosomen sind „immunmaskiert“, d.h. sie exprimieren körpereigene Glycoproteinstrukturen auf ihrer Körperoberfläche. Daher kommt es weder zu einer Gefäßreaktion im Rahmen einer erhöhten Immunaktivierung, noch zu einer mechanischen Gefäßverlagerung, da die Würmer mit ihrer geringen Länge von 6 - 13 mm (Männchen) bzw. 7 - 17 mm (Weibchen) sehr klein sind. Die Eier hingegen sind durch keine Immunmaskierung geschützt, so dass sie eine inflammatorische Reaktion in der Gefäßwand und dem umliegenden Bindegewebe auslösen. Das Ei ist zu groß für eine Phagozytose durch Abwehrzellen, weshalb es zu einer granulomatösen Abgrenzung des Entzündungsherdes durch einwandernde Abwehrzellen kommt. Eine vermehrte Fibroblastenaktivierung ist die Folge. Wenn das pathogene Agens nach wenigen Wochen durch die Enzyme der Abwehrzellen abgetötet wurde, bildet sich der inflammatorische Herd langsam zurück. Durch die überschießende Fibrosierung des umliegenden Gewebes kommt es allerdings zur Narbenbildung (CLASSEN ET AL 1998). Dadurch obliterieren kleine Gefäße, deren Enge ein

Weiterwandern der Eier verhindert. Auch größere Gefäße können durch Granulombildung Schaden nehmen, da die Abwehrreaktion häufig direkt nach Verlassen des Gefäßsystems durch die Eier geschieht. Dabei entstehen Granulome knapp außerhalb der Gefäßtunica. Die reaktiven, narbigen Veränderungen erreichen hierbei Durchmesser von mehr als 1 mm, wodurch das Lumen der Blutgefäße bei Auftreten multipler, nahe beieinander liegender oder zu einem einzigen großen Herd verschmolzener Knoten verlegt werden kann.

Mit fortschreitender Infektionsdauer bei Schistosomiasis entwickeln sich auch außerhalb der Granulome fibrotische Gewebsreaktionen. Diese Fibrosen treten vor allem im Bereich der periportalen Felder auf, welche durch die bindegewebige Veränderung um die zentralen Gefäßstrukturen länglicher und breiter erscheinen. Die Struktur erinnert an einen Pfeifenstiel, weswegen sich der Name Pfeifenstiel-Fibrose eingebürgert hat (STRICKLAND/RAMIREZ 2000).



Abbildung 1.2: Ei des Pärchenegels *Schistosoma mansoni* (1000-fach vergrößert). – Deutlich sichtbar der seitwärts gerichtete Stachel, der sich am caudalen Ende befindet, wie sich an der Ausrichtung der innerhalb der Eikapsel gelegenen Wimpernlarve (*Miracidium*) erkennen lässt.

Jeden Tag werden pro Weibchen 250 bis 400 der 115 - 180 μm langen und 50 - 70 μm im Durchmesser messenden Eier abgegeben (s. Abb.1.2), die zum Großteil im Laufe der Zeit durch ein Granulom eingemauert werden. Da dies kurz nach dem Verlassen des Gefäßlumens geschieht, erfolgt die Granulombildung kurz unter der Gefäßtunica. Hier erreicht der reaktive Abwehrzellknoten bis zu ca. 1000 μm Durchmesser. Dadurch wird das Lumen des Blutgefäßes verlegt, vor allem wenn multiple Knoten nahe beieinander auftreten oder zu einem größeren Herd verschmelzen.

Solche granulomatösen Reaktionen kennen wir auch von einigen anderen bedeutsamen Erkrankungen. Infektiös kommen sie besonders bei bakteriellen Besiedlungen mit Mykobakterien (Tuberkulose, Lepra) vor, aber auch bei Brucellose, Lues, Typhus, Listeriose, Tularämie u. a., sowie einigen Pilzinfektionen (Kryptokokkose, Kokzidiomykose) (RIEDE/SCHÄFER 1995). Außerdem begegnen wir granulomatösen Entzündungen bei Autoimmunerkrankungen oft ungeklärter Genese, wie z. B. beim M. Crohn. Hier gibt es heute auch neue Behandlungsmöglichkeiten im Rahmen der pharmakologischen Therapie: Der TNF- α -Hemmer InfliximabTM wird gezielt zur Behandlung therapierefraktärer Crohn-Fälle eingesetzt und bei der Therapie der rheumatoiden Arthritis, die sich ebenfalls durch Granulombildung auszeichnet.

2. Problemstellung

2.1. Grundlegende Fakten

Schistosoma-Eigranulome sind das Paradebeispiel für nicht-bakterielle, parasitäre Granulome. Sie enthalten laut COOK (1996) Neutrophile und Eosinophile Granulozyten, Monozyten bzw. Histiozyten, daraus entstehende Makrophagen, sowie Lymphozyten verschiedener Genese, einschließlich Plasmazellen. Im Verlauf der Entwicklung des Granuloms kommt es außerdem zu einer Aktivierung fibroblastärer Zelllinien, die durch Fibrosierung des umliegenden Bindegewebes eine Abgrenzung des inflammatorischen Prozesses bewirken. Dieser Eindämmungsprozess präsentiert sich häufig überschießend, so dass großflächige Fibrosen (Narben) entstehen. Die Aktivierung dieser den Organismus schädigenden Reaktion wird durch die Produkte der an der Granulombildung beteiligten Immunzellen getriggert.

Die prozentualen Anteile der einzelnen Zelltypen ändern sich mit dem Reifungsprozess der Granulome, wobei allgemein eine granulozytäre Abgrenzung als Erstreaktion betrachtet wird, eine Eindämmung durch Makrophagen erst später erfolgt, angelockt durch zwischenzeitlich an den spezifischen Parasiten angepasste Lymphozyten, welche über Interleukine vermittelt die Th2-Reaktion in Gang setzen. Zur Reifung der demarkierenden Makrophagen eines Granuloms wurde TNF- α als mitbestimmender Faktor angenommen (OSWALD ET AL 1992). Diese Annahme beruht auf der Beobachtung von Mäusen mit schwerer kombinierter Immunschwäche (severe combined immune deficiency = SCID) und wurde von AMIRI ET AL (1992) nachgewiesen. Sie fanden sogar heraus, dass Schistosomen offenbar zur Eiablage erhöhte, vom Wirt produzierte TNF-Spiegel im Wirtsblut benötigen, um die Eiablage einleiten zu können, wenngleich dieser Mechanismus bis dato nicht geklärt ist.

An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass der Tumor-Nekrose-Faktor im klassischen Sinne heute nicht mehr als ein einziges Cytokin angesehen wird, sondern als eine Gruppe von mindestens drei Faktoren, nämlich Lymphotoxin LT- α , LT- β und TNF. Diese immunologisch wirksamen Substanzen teilen sich jedoch ihre wirkungsvermittelnden Rezeptoren – mit unterschiedlicher Affinität –, sodass zwischen ihnen nur schwer unterschieden werden kann. Der eigentliche Tumor-Nekrose-Faktor alpha ist das LT- α . Dieses teilt sich jedoch den untersuchten TNF-Rezeptor p55 mit TNF und entfaltet hier

auch vergleichbare Wirkung in der Immunomodulation (ALIMZHANOV ET AL 1997), weshalb wir uns entschieden haben, die neue Nomenklatur nicht anzuwenden, da wir nicht zwischen diesen Substanzen unterscheiden können. Wir sprechen daher von TNF im Sinne einer TNF-Familie, die am Rezeptor p55 wirkt. Die meisten immunologischen Untersuchungen bezüglich der Expression dieser Substanzgruppe, die bisher veröffentlicht wurden, sprechen nach wie vor vom Tumor-Nekrose-Faktor α . Wir haben im folgenden Text daher auch weiterhin diese Bezeichnung im Wechsel mit TNF gewählt, da bisher in der gängigen Literatur beide häufig als Synonym gebraucht wurden. Schließlich ist noch hinzuzufügen, dass der im späteren Kontext zur Diskussion herangezogene Arzneistoff InfliximabTM ebenfalls als TNF- α -Antagonist gehandelt wird, was auf die alte Nomenklatur zurückzuführen ist. Wir halten diese Ungenauigkeit für vertretbar, da hier ansonsten kein Bezug auf bereits bestehende Ergebnisse genommen werden kann. Wegen des nachgewiesenen gleichen Angriffsortes bei der Ausbildung lymphozytärer Reaktionen im untersuchten gastrointestinalen Trakt ist die Unterscheidung zumindest bezüglich LT- α , welches den Hauptanteil der bisher als TNF bezeichneten Gesamtfraktion ausmacht, und TNF unnötig.

Um nun die spezifische Beteiligung des TNF-Rezeptors p55 an der Immunreaktion bei Granulomen nachweisen zu können, werden Knockout-Mäuse (K.O.-Mäuse) verwendet, bei denen der den p55-Rezeptor codierende Genort ausgeschaltet wurde. Bezüglich des genauen Ablaufs dieses erbgutverändernden Vorganges verweisen wir auf den Artikel von BRAUN/WILLNOW (1996), um einen ersten Eindruck zur Generierung von K.O.-Mäusen zu erhalten. Diese transgenen Mäuse eignen sich hervorragend zur Durchführung von Versuchen, bei denen ein körpereigener Faktor ausgeschaltet sein muss. Wäre der Faktor nur z. B. pharmakologisch inhibiert, so wäre nicht ausgeschlossen, dass eventuell dem Inhibitor entgangene Moleküle mit dem Körper interagieren. Bei den Knockout-Mäusen mit fehlenden Genen für den TNF-Rezeptor p55 ist eine Wirkung auf die untersuchten Mechanismen über diesen klassischen unmittelbaren Weg der Botenstoff-Rezeptor-Übertragung ausgeschlossen. Sollte trotzdem eine Interaktion zwischen TNF-Rezeptor und dem Faktor existieren, so geschieht dies mittelbar über Verbindungen außerhalb der bisher bekannten Übertragungswege. Im folgenden wird dieser transgene Mausstamm als „K.O.-Maus“ bezeichnet.

Eine kurze Übersicht über die Generierung eines solchen Knockout-Stammes bezüglich des Genortes des TNF-Rezeptors p55 wird in Abschnitt 3.1.3.3 gegeben.

2.2. Problemstellung

Die oben genannten Zusammenhänge zwischen der granulomatösen Reaktion bei Parasitosen und dem freigesetzten Tumor-Nekrose-Faktor-Komplex scheinen seit der Beobachtung gleichbleibender oder gar vermehrter Granulombildung bei Mykobakterien in K.O.-Mäusen zweifelhaft (CHENSUE ET AL 1994, 1995). Deshalb soll im Versuch geklärt werden, ob zum Aufbau und zur Reifung der Granulome die Interaktion von TNF- α mit den verschiedenen beteiligten Abwehrzellen eine Rolle spielt. Hierzu muss herausgefunden werden, ob die Granulomzahl oder der Aufbau der parasitären Läsionen im Körper der transgenen Mäuse gegenüber vergleichbaren „Gen-gesunden“ Stämmen verändert ist.

Die Versuchsgruppen müssen einerseits auf eine Änderung der Granulomdichte in TNF-negativen Mäusen untersucht werden, weiterhin müssen Verschiebungen in den Begleitreaktionen und dem Granulomaufbau bewertet werden. Nach Berücksichtigung dieser Punkte lässt sich schließlich über eine Beteiligung des Tumor-Nekrose-Faktors bei der parasitären Granulombildung und -reifung urteilen. Primäres Ziel dieser Arbeit soll es sein, anhand der Veränderung der Granulomzahl bei gleicher Parasitenbefallsdichte zu klären, ob TNF- α für die Auslösung einer Granulombildungsreaktion bei *Schistosoma mansoni* vonnöten ist.

2.3. Versuchsplanung

Zuerst musste ein geeigneter Vergleichsstamm für die Gegenüberstellung K.O-Maus zu Nicht-K.O.-Maus ausgesucht werden. Da die K.O.-Mäuse, wie unten beschrieben, bereits mehrfach mit Black/6- (BL/6-) Mäusen rückgekreuzt wurden, ist anzunehmen, dass die Physiologie der K.O.-Mäuse weitgehend derjenigen immunsuffizienter BL/6-Tiere entspricht. Um sicherzugehen, wurden entsprechende Vorversuche mit BL/6- und NMRI-Stämmen durchgeführt.

Des weiteren sollten Geschlecht und Alter der Versuchstiere im Voraus festgelegt werden. Damit die Mäuse nur noch geringfügig an Gewicht zunehmen, wurde ein Ausgangsalter von 8 - 12 Wochen für sinnvoll befunden. Um Trächtigkeiten im Käfig einzelner Versuchsgruppen vorzubeugen und gleichzeitig ein friedliches soziales Zusam-

menleben zu garantieren, wurde die ausschließliche Verwendung weiblicher Tiere beschlossen. Ein Vergleich mit einer Versuchsreihe mit männlichen Tieren und deren Kontrollgruppe erbrachte ein unbefriedigendes Ergebnis in Bezug auf den Befall durch Schistosomen bei gleicher Inokulationsmenge von Cercarien: Nur wenige adulte Schistosomen konnten in diesen Mäusen gefunden werden und es zeigte sich eine deutliche Verschiebung des Geschlechterverhältnisses bei den reifen Schistosomen zugunsten der Männchen. Da es im Bereich des Möglichen liegt, dass das Wirtsgeschlecht auf die Entwicklung des Parasitengeschlechts Einfluss nimmt, scheint durch den Versuchsausgang bestätigt, dass sich weibliche Tiere besser für den geplanten Test eignen. Wenn die Granulomzahl als entscheidende Prüfgröße für die Bedeutung des Tumor-Nekrose-Faktors herangezogen wird, muss durch ausreichende Wurmzahl und ein ausgewogenes Männchen/Weibchen-Verhältnis dafür gesorgt sein, dass genügend Granulome im Organismus entstehen können.

Die Inkubationszeit bei der Wurmerkrankung vom Typ *S. mansoni* beträgt 6-8 Wochen, denn so lange dauert es, bis die in den Organismus eingedrungene Cercarie auswächst und – nach Paarung – genügend Eier produziert, um im Organismus eine pathologische Reaktion auszulösen. Solange müssen die Mäuse gehalten werden, bevor eine Versuchsreihe präpariert werden kann. Zu jeder Versuchsgruppe wird eine nicht infizierte Maus über den gleichen Zeitraum und unter gleichen Bedingungen gehalten um Störgrößen auszuschließen, wie z.B. Exposition gegenüber anderen Erkrankungen, die ebenfalls Organveränderungen bewirken können.

Um verschiedene Inokulationsstufen definieren zu können, muss die eingespritzte Cercarienzahl Bescheid wissen. Hierzu wurde ein Versuch durchgeführt, der zeigte, dass sich anhand der aufgenommenen Menge cercarienhaltigen Wassers mit bekannter Larvenzahl/Wassermenge die injizierte Cercarienzahl abschätzen lässt.

2.4. Auswertungsplanung

Zuerst müssen makroskopische Kenngrößen zur Verdeutlichung der Infektionsdichte definiert werden. Hierzu wird versucht, möglichst viele der im Organismus lebenden Schistosomen aus dem Körper auszuschwemmen. Selbstverständlich bleibt zu untersuchen, ob die so bestimmte Wurmzahl mit den Infektionsgraden, welche durch die unten beschriebenen Parameter verifiziert werden, übereinstimmen.

Als Größe für die Abschätzung des Infektionsgrades eignet sich die Leber gut, da die Pfortader bei den Schistosomen der verwendeten Art *S. mansoni* besonders als Aufenthaltsort beliebt ist, und so entsprechend dem Blutfluss die Eier in die Lebersinusoide gespült werden. Weiterhin ist dieses Organ bereits makroskopisch gut beurteilbar und es lassen sich auf einfache Weise repräsentative Schnitte für die mikroskopische Beurteilung gewinnen. Da die Leber gewebständige Monozyten des retikuloendothelialen Systems (Kupffer-Stern-Zellen) enthält, können diese bei Beteiligung als Makrophagen an einer granulomatösen Immunreaktion durch das Oberflächenantigen F4/80 markiert werden, welches auf aktivierten Makrophagen exprimiert wird (SEGURA ET AL, 2001). Das F4/80-Glykoprotein wird in der Maus spezifisch von gewebständigen Makrophagen (SEILER ET AL, 1998) und nicht wie Mac1 α von Blutmonozyten gebildet.

Bei der Auswertung soll die Häufigkeit der Granulome in verschiedenen Mäusestämmen über die mikroskopische Auszählung einzelner Gesichtsfelder festgelegt werden. Hierzu wird eine Folie mit einem Gitternetz hergestellt, dessen quadratische Maschen die Kantenlänge 2500 μm aufweisen. Solch eine Masche wird als "Gesichtsfeld" bezeichnet. Die Auszählung erfolgt bei 50-facher und 400-facher Vergrößerung, je nachdem, wie sicher die ausgezählten Strukturen beurteilbar sind.

Die in dieser Arbeit dargestellten Fotografien sind mit wechselndem technischen Einrichtungen und Einstellungen aufgenommen worden. Vergrößerungsangaben wurden aus einzelnen Zellen definierter Größe, insbesondere Erythrozyten (mittlerer Durchmesser 7 μm), kleine Lymphozyten (mittlerer Durchmesser 10 μm) und Granulozyten (mittlerer Durchmesser 11,5 μm) erst nach Vorabdruck des Bildes in der endgültigen Größe auf DIN-A4-Papier bestimmt. Auf diese Weise wurde der Druckmaßstab berücksichtigt. Bei der Ausmessung der einzelnen Zelltypen wurde das Mittelmaß aus mehreren Einzelzellen genommen, um die Standardabweichung gering zu halten.

3. Materialien und Methodik

3.1. Versuchstiere

Zur Untersuchung der Fragestellung einer Granulomabhängigkeit von TNF- α werden K.O.-Mäuse verwendet, deren Genort für dieses Interleukin gestört ist. Natürlich werden auch Gen-gesunde Mäuse als Kontrollgruppe untersucht. Es werden aber auch die Parasiten selber, also die Schistosomen, sowie ihre Zwischenwirte, die Wasserschnecken benötigt.

3.1.1. Schistosomen

Der *Schistosoma mansoni* - Stamm (Abb. 3.1 und 3.2) wird im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München gehalten. Dieser Stamm wurde vor ca. 40 Jahren aus einem brasilianischen Patienten von der Firma Hoechst isoliert. Seitdem wird der Parasit in den unten erwähnten Schnecken der Art *Biomphalaria glabrata* und anschließend in seinem zweiten Larvenstadium in NMRI-Mäusen vermehrt.

Schistosoma mansoni eignet sich für den Versuch besonders gut, da sich diese Pärchenegel entlang des Pfortaderversorgungsgebietes bevorzugt aufhalten, so dass man sie hervorragend ausspülen kann, um eine makroskopische Größe der Wurmlast zu erhalten. Weiterhin werden die Eier so vorwiegend in die lebernahen Organe geschwemmt, was die weißlich-fibrotischen Granulome auf zwei dem Blick gut zugänglichen, durch ihren Blutreichtum rot gefärbten Organen, nämlich Leber und Milz, erscheinen lässt. Somit ist eine weitere mit bloßem Auge erfassbare Testgröße gegeben, welche die Beurteilung des Leberbefalls bereits bei der Präparation ermöglicht.

3.1.2. Schnecken

Die aus den Pärchenegel-Eiern schlüpfenden Mirazidien müssen in eine Süßwasser-Gehäuseschnecke gelangen, die für ihre weitere Larval-Entwicklung zur Cercarie geeignet ist. Hierzu verwendet man den natürlichen Zwischenwirt, die tropische Posthornschnecken-Gattung *Biomphalaria*, in unserem Fall *B. glabrata* var. *Belo Horizonte* (Brasilien). Wie auf Abb. 3.3 zu erkennen, handelt es sich um eine albinotische Variante dieser Tellerschnecke.



Abbildung 3.1: Adulte Schistosomen, aus dem Portalvenen-System befallener Mäuse ausgeschwemmt (links ♀, rechts ♂, ca. 20-fach vergrößert), nativ-Aufnahme.



Abbildung 3.2: *Schistosoma mansoni* (Färbung mit Karmesinrot, ca. 20-fach vergrößert). – Von links nach rechts: *Schistosoma mansoni* ♂, gepaarte Schistosomen, *Schistosoma mansoni* ♀. - Pfeile markieren die Saugnäpfe des Männchens. Im linken Bild als heller Streifen gut zu erkennen ist die Bauchrinne, in der sich im mittleren Bild das Weibchen befindet.



Abbildung 3.3: *Biomphalaria glabrata* var. *Belo Horizonte*, Albinoform, 3-fach vergrößert. – Diese Schneckenart wird als Zwischenwirt in der Haltung von *Schistosoma mansoni* eingesetzt.



Abbildung 3.4: Cercarie (Gabelschwanzlarve) von *Schistosoma mansoni*, Länge 0,6 mm, 200-fach vergrößert. – In diesem Stadium ist die Infektion des Endwirtes möglich, in unserem Fall also der im Versuch verwendeten Mäuse. Beim Durchdringen der Haut wird das gegabelte Schwanzglied abgeworfen. Lediglich der Saugnapf-bewehrte Kopf (links im Bild) entwickelt sich zum Schistosomulum weiter.

Die Tiere stammen aus einer Zucht der Hoechst AG, die 1964 begonnen wurde. In einer Beckenanlage bei einer Idealtemperatur von 23 - 27°C und Kopfsalat-Fütterung werden diese Schnecken vermehrt und die Becken abwechselnd Eiern aus ausgewaschenen Därmen infizierter Mäuse ausgesetzt. Die Mirazidien dringen in die Schnecken ein und vermehren sich in deren Hepatopankreas (Mitteldarmdrüse), worauf sie Cercarien ins Wasser entlassen. Die Schnecke stirbt häufig infolge des starken Befalls. Die Cercarien (Abb. 3.4) werden während in der Zeitspanne des maximalen Austritts aus der Wirtschnecke gewonnen (10.00-11.00 Uhr vormittags) und Mäusen als Endwirten injiziert. Die nicht verwendeten Cercarien sterben nach einigen Stunden ab. Aus den weiterentwickelten Cercarien können nur in einem passenden Endwirt (Säuger) adulte Würmer entstehen, die wiederum Mirazidien-haltige Eier ablegen.

3.1.3. Mäuse

Zuerst müssen die infektionsbedingten Veränderungen an Gen-gesunden Mäusen untersucht werden. So wird z.B. der Versuchsablauf, die Materialien, sowie die immunologischen Färbemethoden – auch aus Kostengründen – erst an „Standard-Mäusen“ erprobt, bevor K.O.-Mäuse verwendet werden. Hierzu ist es allerdings wichtig festzustellen, welcher Mausstamm den K.O.-Mäusen in seiner Physiologie am stärksten ähnelt. Da die K.O.-Mäuse mit BL/6-Mäusen rückgekreuzt werden und der für den Versuch zur Verfügung stehende TRp55^{-/-} Stamm bereits sechs- bis siebenmal dieser Prozedur unterworfen war (PFEFFER 1997), ist anzunehmen, dass sich die Versuchsgruppe in der Ausprägung ihrer verschiedenen abwehrphysiologischen Merkmale mit Ausnahme der TNF-Rezeptoren nicht allzu sehr von gewöhnlichen BL/6-Stämmen unterscheidet.

Allerdings müssen auch die BL/6-Daten bezüglich der zu untersuchenden Veränderungen erst einmal erfasst und quantifiziert werden, um Streuungen innerhalb einer Versuchsreihe zu erfahren. Hierzu wird dieser Mäuse-Stamm mit der häufig verwendeten NMRI-Maus verglichen. So lassen sich quantifizierbare Größen erkennen und Gemeinsamkeiten bei verschiedenen Stämmen feststellen.

Weiterhin ist es sinnvoll, die Mäuse auf ein Geschlecht festzulegen, da Geschlechtshormone und die mit ihnen gekoppelten Wachstumsvorgänge einen Einfluss auf die Entwicklung der Parasiten ausüben können. Bei Gruppenhaltung von Mäusen werden üblicherweise Weibchen gehalten aus Gründen der Verträglichkeit. Auch in unserem

Versuch wurden weibliche Mäuse verwendet, weil die einzelnen Gruppen aus bis zu 3 gemeinsam gehaltenen Tieren bestanden.

Ebenso ist auch das Wachstum der Mäuse als mögliche Einflussgröße auf die Schistosomenentwicklung anzusehen. Daher werden für die Versuche nur Mäuse einer vergleichbaren Altersspanne betrachtet. Damit die Mäuse in ihrer Infektionsphase nicht zu alt werden, ist ein Alter von 8 - 12 Wochen zum Zeitpunkt der Parasiten-Inokulation als sinnvoll zu erachten. Somit sind die Mäuse noch sehr jung, aber bereits geschlechtsreif, wenn sie mit Cercarien infiziert werden, und sind zum Zeitpunkt der Organentnahme erwachsen.

3.1.3.1. NMRI-Mäuse

Diese verhältnismäßig großen und schweren Mäuse werden bei parasitologischen Versuchen viel verwendet. Sie eignen sich daher besonders für Vorversuche, um beispielsweise abzuklären, wie groß Unterschiede in der Ausprägung der Schistosomiasis bei unterschiedlichen Mausstämmen sind. Ebenso können nur durch Verwendung unterschiedlicher Gen-gesunder Mausstämmen im Vorversuch vergleichsfähige Daten über den „normalen“ Aufbau eines Granuloms im immunkompetenten Organismus gesammelt werden.

3.1.3.2. BL/6-Mäuse

Da die Beobachtungseinheiten der K.O.-Mäuse bereits sechsmal mit BL/6-Mäusen rückgekreuzt wurden, kann dieser Stamm als im Genotyp äußerst ähnlich angesehen werden. Die Reaktionen des Immunsystems sollten in ihrer Ausprägung denen der Versuchsgruppe gleichen, natürlich mit der Einschränkung in Bezug auf TNF- α -bezogene Immunphänomene. Durch Vergleich zu in der selben Versuchsreihe mit derselben Dosis infizierten NMRI-Mäusen kann die Ausprägung der Abwehrreaktionen bei immunsuffizienten Mäusen untersucht werden.

3.1.3.3. K.O.-Mäuse

Der übliche Weg der Immunaktivierung im Rahmen einer *Schistosoma mansoni*-Infektion teilt sich in zwei parallel verlaufende Interleukin-Reaktionen, die unspezifische Th1-Reaktion und die spezifische Th2-Immunantwort.

So werden im Sinne einer Th2-Reaktion IL-4 und IL-10 vermehrt gefunden, was zu einer spezifischen Immunantwort – in diesem Fall Granulombildung – führt (SABIN ET

AL 1995, FALCONE ET AL 1996, RUTH ET AL 1996). Allerdings besteht in den Wirtsorganismen ein Gleichgewicht mit der unspezifisch inflammatorischen Th1-Reaktion, welche zum Krankheitsbeginn überwiegt und zur Immunaktivierung führt. Arbeiten über die Untersuchungsergebnisse zu den unterschiedlichen Immunreaktionen bei Schistosomiasis werden weiter unten im Text zusammenfassend dargestellt.

Beide Immunreaktionen beinhalten im Aktivierungsschema TNF, wie in der Diskussion gezeigt werden wird. Dieser Faktor wird nun in den K.O.-Mäusen in seiner Funktion behindert, da er mangels Bindungsstellen an Abwehrzell-Oberflächen seine Rolle als Signalgeber nicht erfüllen kann.

Die auf diese Weise immunsupprimierten C57BL/6-Mäuse sind den BL/6-Tieren zwar äußerlich sehr ähnlich, ihnen fehlt jedoch der Genort des p55-Rezeptors für den Tumornekrose-Faktor. Somit können ihre Zellen nicht mit vermehrter Expression dieses Interleukin-Rezeptors auf ihrer Oberfläche reagieren, wenn sie durch entsprechende Interleukine hierzu stimuliert werden.

Die verwendeten TNFRp55^{-/-} Mäuse stammen von einer C57BL/6-Linie, die bereits in der 6. Generation mit BL/6-Mäusen rückgekreuzt wurde, so dass die nicht untersuchten bzw. nicht veränderten Anteile ihres Genoms mit denen der BL/6-Linie weitgehend übereinstimmen. Die Knockout-Mäuse wurden ursprünglich in den Jackson Laboratorien, Bar Harbor, ME, U.S.A., erzeugt. Die Aufzucht erfolgte bei Charles River Wiga in Sulzfeld (s. EHLERS ET AL, 2000) .

Der TNFRp55-Targeting-Vektor wurde, wie von PFEFFER ET AL 1993 und ALIMZHANOV ET AL 1997 beschrieben, aus einem 3200 Basen langen DNA-Fragment entwickelt. Die codierende DNA wurde bei Basenpaar 535 (TNFRp55 cDNA) unterbrochen. Eine Genkassette, welche Neomycin-Resistenz verschlüsselt, wurde an der entsprechenden Stelle eingefügt. Die so veränderte DNA wurde in embryonale Stammzellen eingebracht, die daraufhin kultiviert wurden. Stammzellkolonien, die nun aufgrund der integrierten Genkassette Neomycin-Resistenz erlangt hatten, wurden mittels PCR - gesucht wird eine spezifische Thymidinkinase der übertragenen Neomycin-Resistenz - am entsprechenden Genlocus untersucht, ob die künstliche Mutation gelungen ist. Bestätigt werden konnte dies außerdem durch eine homologe Rekombination des DNA-Stranges über Southern-Blot-Analysen, indem eine Gensonde für das eigentliche TNFRp55-Gen verwendet wurde (PFEFFER ET AL 1993).

Zellklone, die eine derartige homologe Rekombination bei gleichzeitig bestehender Genomveränderung besitzen, werden nun in Blastozysten von C57BL/6-Mäusen eingebracht, welche nach Implantation in Mäuse-Uteri zur Ausreifung kommen. Die entstehenden Mäuse besitzen nun nur in einem Teil ihrer Keimbahn-Stammzellen das defekte Gen, genauso wie an einigen anderen Orten ihres Körpers, da die übrigen Stammzellen aus gesunden Blastozysten-Zellen stammen, die nicht durch Transfektion während der Zellteilung das defekte Genmaterial aufgenommen haben. Wegen dieses Mosaik-artigen Zellverteilungsmusters mit verschiedenen Genomen nennt man diese Mäuse nun Chimären.

Ein Teil des Chimären-Nachwuchses wird nun von seinem Gen-veränderten Elternteil ein defektes Chromosom erhalten. Diese Generation enthält also heterozygote Mäuse bezüglich des Genortes für den p55-Rezeptor (TNFRp55^{-/+}). Kreuzt man diese Heterozygoten, kommt nach den bekannten Vererbungsgesetzen ein Prozentsatz homozygoter Defekträger heraus. Diese kann man, ebenso wie die Heterozygoten, über Southern Blot mit entsprechenden Sonden z. B. für das Neomycin-Resistenz-Gen identifizieren. Zellmaterial hierfür wird gewöhnlich aus der Schwanzspitze entnommen.

Da die so entstandenen K.O.-Mäuse über eine ungestörte Fortpflanzungsfähigkeit verfügen, ist eine Weiterzucht problemlos möglich.

3.2. Immunologische Darstellungen

Interessant ist außer der Granulomzahl auch die Zusammensetzung der Granulome. Um hier etwaige Veränderungen feststellen zu können, bietet es sich an, einzelne Immunzellen farbig zu markieren. Hierzu verwendet man spezifische Antikörper mit gekoppelter Peroxidase-Reaktion. Im folgenden werden die einzelnen Zellen und ihre Antikörper beschrieben. Da der größte Teil der granulomatösen Immunreaktion lokal durch Granulozyten und Makrophagen geschehen soll, wollen wir unser Hauptaugenmerk auf diese Zellsorten richten. Für Lymphozyten werden also keine Anfärbungen durchgeführt, weil von deren Unterscheidung keine neuen Erkenntnisse zu erwarten sind.

Zur Herstellung von immunologischen Färbungen werden Gefrierschnitte verwendet, da die Antigene der Zelloberflächen nicht zerstört sein dürfen. Deshalb müssen von jedem Mäuseorgan sofort nach der Entnahme Proben in Gel eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt werden. Später werden die Präparate

geschnitten, für 10 – 20 Sekunden in Aceton fixiert, und bei ca. -20°C bis zur weiteren Behandlung aufgehoben. In diesem Zustand dürfen sie nicht zu lange belassen werden, da sie sonst ihre Oberflächen-Antigen-Struktur verlieren.

Die verschiedenen Zellsorten werden mit Antikörpern vom IgG-Typ in zwei Schritten markiert, welche auf die entsprechenden Präparate in Lösung aufgetragen werden. In der ersten Stufe sollen einzelne Abwehrzellen-Arten im Nativpräparat dargestellt werden. Da Präparat wird zu diesem Zweck mit speziellen Antikörpern gegen ein Oberflächenantigen versetzt, welches nur auf dem entsprechenden Zelltyp vorkommt. Daraufhin binden sich die Immunglobuline mit ihren F_{ab} -Fragmenten spezifisch an die gesuchte Zellsorte. Die ungebundenen F_c -Fragmente sind der Angriffsort für einen zweiten Antikörper, der nach dem Auswaschen der ersten IgG-Proteine auf das Präparat einwirkt. Da die Immunproteine von Rattenzellklonen gewonnen werden, wird ein Anti-Ratten- F_c -Antikörper verwendet. Eventuell vorhandene Maus- F_c -Fragmente werden ignoriert. Bei diesem zweiten IgG-Molekül, das sich bildlich betrachtet einfach mit seinen F_{ab} -Fragmenten auf die Immunglobuline des ersten Schrittes aufsetzt, ist das freie F_c -Fragment mit einer Wasserstoffperoxidase gekoppelt, die bei Zugabe eines Wasserstoffperoxid-Substrates eine rote Farbreaktion katalysiert. Damit nur die gebundenen Antikörper an entsprechender Stelle eine Rotfärbung bewirken, muss vor Substratzugabe erneut gespült werden, um freie IgG-Moleküle zu entfernen.

Die einzige Änderung in diesem Ablauf findet bei den Eosinophilen statt, wie im folgenden Abschnitt beschrieben werden wird. Hierbei wird auf bereits im Gewebe existierende Peroxidase eingegangen. Diese befindet sich in den Granulozyten, welche das Ergebnis der oben beschriebenen Methode stark verfälschen würden.

Um diese Granulozyten-Peroxidase zu binden, muss man eine sogenannte "Blocklösung" hinzugeben, bevor die Antikörper verwendet werden. Diese Mischung enthält Wasserstoffperoxid, jedoch kein Substrat für eine Farbreaktion. Somit wird durch die Blocklösung die im Präparat existierende Peroxidase verbraucht. Die Entfernung überschüssigen Peroxids erfolgt durch anschließende Waschung.

Um nachzuweisen, dass die Peroxidase-Reaktion im so behandelten Nativ-Präparat nicht mehr stattfinden kann, muss es jetzt mit dem Antikörper der zweiten Stufe versetzt werden, der sich nun nicht binden sollte. Schließlich sind durch den Verzicht auf Antikörper erster Ordnung keine Rattenantigene zugefügt worden. Die Auswaschung unge-

bundener Antikörper erfolgt nun wie beschrieben. Danach wird Peroxid-haltiges Substrat zugegeben. Im Idealfall sollte nun keine Farbreaktion stattfinden, da die Peroxidase mit Auswaschen der nicht bindungsfähigen Immunglobuline komplett entfernt wurde. Wir haben also ein Kontroll-Präparat erzeugt, das den "Naturzustand" der Gewebe ohne Anfärbung spezieller Zellen aber nach der üblichen Behandlung mit Blocklösung, Peroxidase-gekoppeltem Antikörper und Substrat zeigt.

3.2.1. Eosinophile Granulozyten

Hier wird im Gegensatz zu allen anderen Färbungen das Peroxid-haltige Farbe-Substrat direkt auf das fixierte Nativpräparat gegeben. Dadurch färben sich alle Granulozyten rot, da sie ja Peroxidase in ihren Granula enthalten. Also bestehen die dargestellten Zellhaufen sowohl aus Eosinophilen als auch aus Neutrophilen Granulozyten. Es wurden zwar keine spezifischen Antikörper hinzugegeben, jedoch sieht man im Vergleich der Ergebnisse bei den mit Gr1 angefärbten Neutrophilen Granulozyten, dass letztere Zellart in den Granulomen nur in geringerer Anzahl vertreten ist, so dass man zu Recht postulieren darf, dass die dargestellten Abwehrzellen vorwiegend Eosinophile zeigen. Dies deckt sich sehr gut mit der bei Wurminfektionen oft beschriebenen und auch bei Schistosomiasis beobachteten Eosinophilie.

3.2.2. Neutrophile Granulozyten

Die Neutrophilen Granulozyten werden über den zellspezifischen Oberflächenmarker Gr1 gekennzeichnet. Es handelt sich hierbei um RB6-8C5-Klon, der an das Mauszell-Oberflächenantigen Ly-6G, ein 21-25 kDa GPI-Protein, bindet, welches gemäß Hersteller-Information (PHARMINGEN 1999, p. 85) in der Peripherie ausschließlich von Neutrophilen exprimiert wird, was auch eigene Beobachtungen unterstützen. Der Antikörper selbst ist vom Ratten-Isotyp Rat IgG_{2b,κ}.

3.2.3. Blut-Monozyten

Da eruiert werden soll, ob die Makrophagen-Vorläufer des Blutes eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von parasitären Granulomen bilden, werden sie mit dem Marker Mac1 α gekennzeichnet. Ein monoklonaler Antikörper dieses Typs wird im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München hergestellt. Es handelt sich hierbei um einen M1/70-Klon, der Antikörper ist vom Isotyp Rat IgG_{2b,κ}. Das Ratten-IgG-Protein bindet spezifisch an die α_M -Untereinheit des

CD11b/CD18, $\alpha_{M\beta 2}$ -Integrins, kurz Mac1. Dieses Oberflächenprotein spielt bei der Adhäsion an ICAM 1 (CD54) und C3bi eine entscheidende Rolle und wird somit von (aktivierten) Granulozyten, Makrophagen, NKCs (Natural Killer Cells) und einigen B-1-Lymphozyten-Stämmen ausgebildet (PHARMINGEN, 1999, p. 20). Somit ist eine sichere Differenzierung zwischen Neutrophilen und Monozyten lediglich durch den Vergleich mit anderen Färbungen möglich. Hier zeigt sich allerdings, dass nur wenige Einzelzellen, vorwiegend in der Blutbahn angefärbt werden, was darauf hinweist, dass bei der vorliegenden Ak-Verdünnung nur die mit wesentlich mehr Integrin α_M ausgestatteten Blutmonozyten ausreichend markiert werden.

3.2.4. Gewebsständige Makrophagen

Diese aktivierten Zellen des RES spielen eine bedeutende Rolle bei der Granulom-Abgrenzung gegenüber dem umliegenden Gewebe, weshalb sie gerade in älteren Granulomen in großer Zahl in Erscheinung treten. Sie phagozytieren den zentral um das Ei entstandenen Zelldetritus, der vor allem Überreste von zerstörten Granulozyten enthält. Ist das Schistosomen-Ei durch die Körperabwehr abgetötet worden, so wird die äußere Hülle langsam durch Anlagerung von Makrophagen aufgelöst, wodurch der im Ei enthaltene Mirazidien-Vorläufer für die Körperabwehr zugänglich wird. Das Granulom bleibt nach der Phagozytose dieser Schistosomen-Larve noch über einige Wochen bestehen, wobei durch Fibroblastenaktivierung ein narbenbildender Prozess einsetzt.

Um die aktiven Makrophagen darzustellen, wird ein spezifischer Marker benötigt. F4/80 wird als hochspezifischer Marker für murine Makrophagen angesehen (LI ET AL 1998), welcher speziell auf aktivierten im Interstitium befindlichen Makrophagen exprimiert wird (LEE ET AL, 1999). Ein monoklonaler Antikörper gegen dieses Oberflächenglykoprotein wird im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene hergestellt und wurde in dieser Arbeit verwendet.

4. Versuchsanordnung und -ablauf

Abb. 4.1 stellt den gesamten Versuchsablauf in seinen einzelnen Schritten schematisch dar. Insbesondere sind Inokulation, Inkubation und Präparation jeder Maus mit anschließender Auswertung der gewonnenen Organpräparate in ihrer zeitlichen Abfolge aufgezeigt. Die Arbeitsgänge und Zwischenschritte sollen in den folgenden Abschnitten genauer erläutert werden.

In jeder Inokulationsstufe werden 3 Mäuse sowohl der Versuchs- als auch der Kontrollgruppe gleichzeitig in der gezeigten Art und Weise behandelt, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Insgesamt wurden für den vergleichenden Vorversuch NMRI und BL/6 je 10 weibliche Tiere verwendet (3 in jeder Inokulationsstufe, 1 Kontrolle). 2 weitere weibliche BL/6-Kontrollen mussten wegen bereits bei Lieferung bestehender Trächtigkeit aus der Wertung genommen werden. Eine Inokulation der Stufe 3 misslang, wodurch in dieser Stufe nur zwei BL/6-Mäuse in die Wertung einbezogen wurden. Der Vergleich zwischen männlichen BL/6- und K.O.-Mäusen wurden je 9 Tiere verwendet, wobei lediglich die geringeren zwei Inokulationsstufen durchgeführt wurden, da im Vorversuch die Lebern der BL/6-Mäuse bereits darunter starken Befall zeigten.

Im Hauptversuch wurden in zwei Versuchsreihen in jeder Gruppe insgesamt 24 K.O.-Maus-Weibchen und 21 BL/6-Weibchen untersucht. Die gesamte Versuchstier-Anzahl ergibt somit 10 NMRI-, 43 BL/6- und 34 K.O.-Mäuse. Die Mäuse wurden sämtlich gespült, egal ob eine Inokulation erfolgt war oder nicht, um bei der Organ-Untersuchung gleiche Voraussetzungen zu schaffen. Aus jedem dieser Tiere wurden, wie geplant, 7 Organe entnommen und sowohl cryotechnisch, als auch in Formalin konserviert. Die histologischen Präparate wurden von allen Versuchstieren erstellt und ausgewertet, die immunhistochemische Anfärbung erfolgte bei allen Tieren des Vorversuches und in sämtlichen Inokulationsstufen der Hauptversuche bei einem zufällig ermittelten Exemplar.

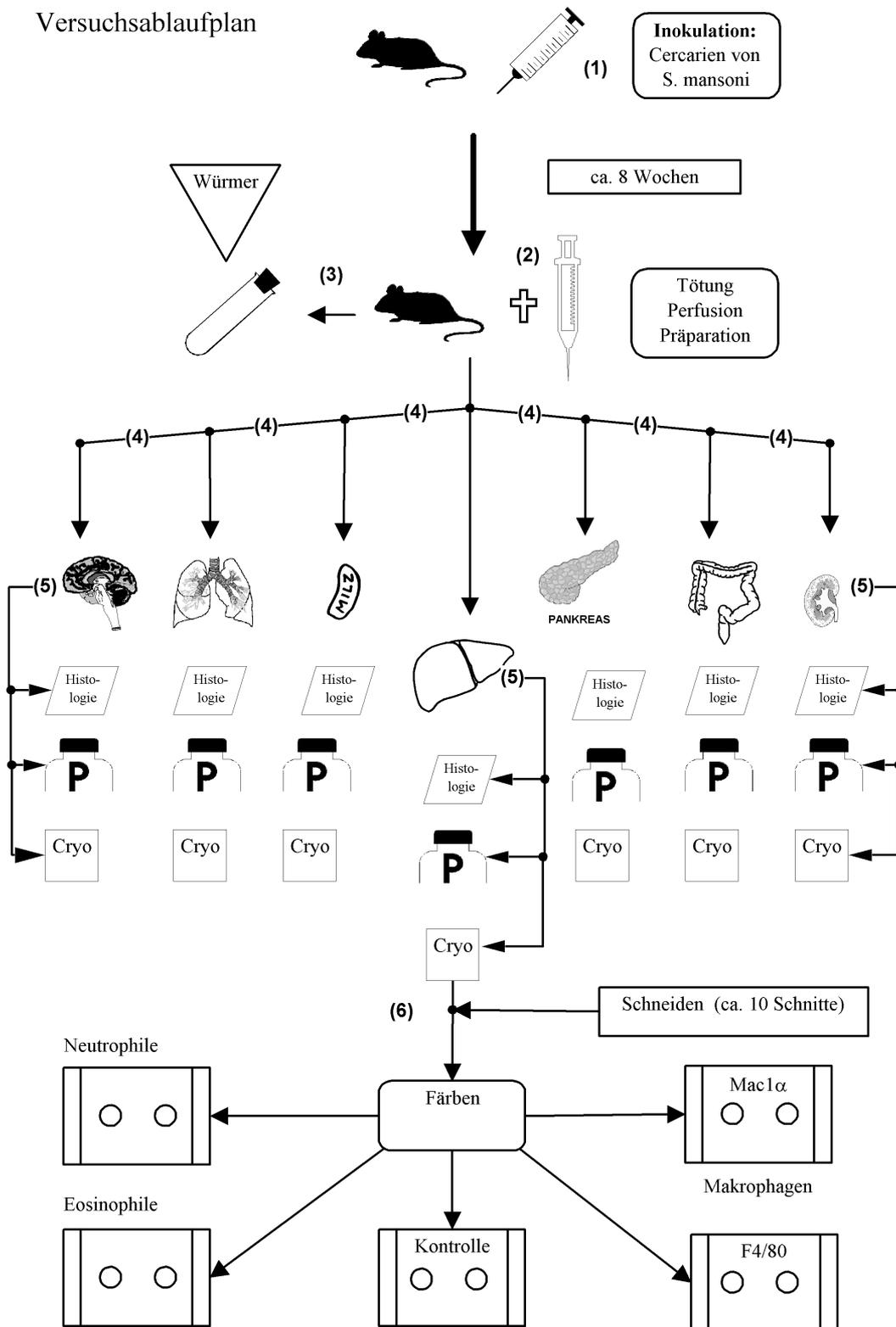


Abbildung 4.1: *Schematischer Aufbau einer Versuchsreihe. – Gezeigt werden die einzelnen Schritte vom Zeitpunkt der Inokulation (1) eines Versuchstieres mit *S. mansoni* bis zu seiner Präparation (2) nach ca. 8 Wochen. Hier werden die Würmer ausgeschwemmt (3) und die für die Granulomentwicklung relevanten Organe entnommen (4). Es folgt eine Aufteilung des Organmaterials (5). Je ein Teil der zu untersuchenden Gewebe wird für histologische und für immunologische (Cryo) Untersuchungen vorbereitet. Das verbleibende Gewebe wird als Formalin-Präparat (P) aufbewahrt. Abschließend sind die einzelnen Färbungen (6) dargestellt; die in diesem Schritt abgebildeten Kästchen stellen die Ergebnisse in Form von Objektträgern mit Schnittpräparaten dar.*

Lediglich die sich in der Strukturidentifizierung als überlegen entpuppende Eosinophilen-Anfärbung wurde an weiteren Tieren durchgeführt. Milzen und Därme wurden von verschiedenen Versuchsreihen und Inokulationsstufen ausgewählt und mit Hämatoxylin- und Eosin-Gegenfärbung histologisch aufbereitet. Die Milz wurde in den verschiedenen Infektionsgraden außerdem immunhistochemisch über die AEC-Substrat-Behandlung zur Eosinophilen-Färbung untersucht.

4.1. Inokulationsphase

Im ersten Schritt werden die Versuchstiere mit Cercarien infiziert. Vorbereitend hierzu muss das zweite Larvenstadium der Schistosomen aus den Schnecken gewonnen werden. Die Versuchsmäuse werden in Gruppen unterteilt, welche unterschiedlich viele Cercarien erhalten sollen. Das gleiche geschieht mit den Gen-gesunden Kontrollmäusen. Sowohl bei BL/6-, als auch bei K.O.-Mäusen wird eine Maus als Kontroll-Individuum nicht mit Cercarien infiziert, damit ein Vergleich mit dem gesunden Zustand der ausgewerteten Organe möglich ist.

4.1.1. Gewinnung der Cercarien

Cercarien sollten im Zeitraum zwischen 10 Uhr und 12 Uhr gewonnen werden, da um diese Zeit ihre Aktivität am höchsten ist. Das heißt, besonders viele Larven verlassen die Schnecken kurz vor Mittag und suchen ihren Endwirt. Schon nach wenigen Stunden lässt die Aktivität der Cercarien nach und sie sterben langsam ab. Daher müssen direkt im Anschluss an ihre Gewinnung die Wurmlarven ihrem Endwirt zugeführt werden. Hierzu wird ein 100 ml-Becherglas mit den seit 4 Wochen befallenen Wasserschnecken gefüllt. Bei der gesamten Handhabung der humanpathogenen Cercarien ist darauf zu

achten, nicht mit der Flüssigkeit in Berührung zu kommen. Am besten werden während dieser Phase Handschuhe getragen. Das beim Herausfischen der Schnecken an deren Oberfläche haftende Wasser genügt, um einen Flüssigkeitsfilm um die Tiere zu erzeugen. Die Cercarien verlassen nun ihre Zwischenwirte und schwimmen auf der Suche nach Warmblütern im Wasser umher. Gegen Mittag wird das Schneckenwasser über ein Teesieb in ein weiteres Becherglas mit etwas Leitungswasser geschüttet. Die im Sieb hängenden Schnecken werden mit etwas lauwarmem Leitungswasser übergossen, um eventuell an ihnen festhängende Cercarien zu lösen. Die nun vom Grobschmutz befreite Cercariensuspension wird im möglichst noch nicht abgekühlten Zustand den Mäusen injiziert. Zuvor müssen jedoch einige Tropfen der Suspension mit der 100 µl-Pipette entnommen werden, um in diesen Tropfen die Cercarien auszuzählen und somit abschätzen zu können, wie viele der Wurmlarven pro Mengeneinheit sich in der Inokulationsflüssigkeit befinden.

4.1.2. Inokulationstechnik

70 – 210 ml einer Cercarien-Suspension werden Versuchsmäusen mittels einer Diabetiker-Spritze (Kanülenstärke G24x1) subkutan in die Nackenregion injiziert, wodurch die Cercarien bereits die erste Hürde, nämlich die Cutis, überwunden haben. Dies bewirkt, dass ein Großteil der Schistosomen seine Entwicklung im Endwirt beenden wird.

Ein Vergleich wurde zwischen den Kanülenstärken G24x1 und G20x1 durchgeführt. Hierzu wurde die Injektionslösung aus Wasser mit ca. 30 Cercarien/100 µl mittels der verschiedenen Kanülen aufgezogen (70, 140 und 210 µl, wie im Hauptversuch benötigt). Die Spritzen wurden in eine Petrischale entleert und dann die Anzahl der so erhaltenen Cercarien verglichen. Das Entleeren wurde mit und ohne aufgesetzte Kanüle durchgeführt. Die relative Streuung unterschied sich nicht signifikant zwischen den verschiedenen Kanülenstärken, wie Abb. 4.2 zeigt.

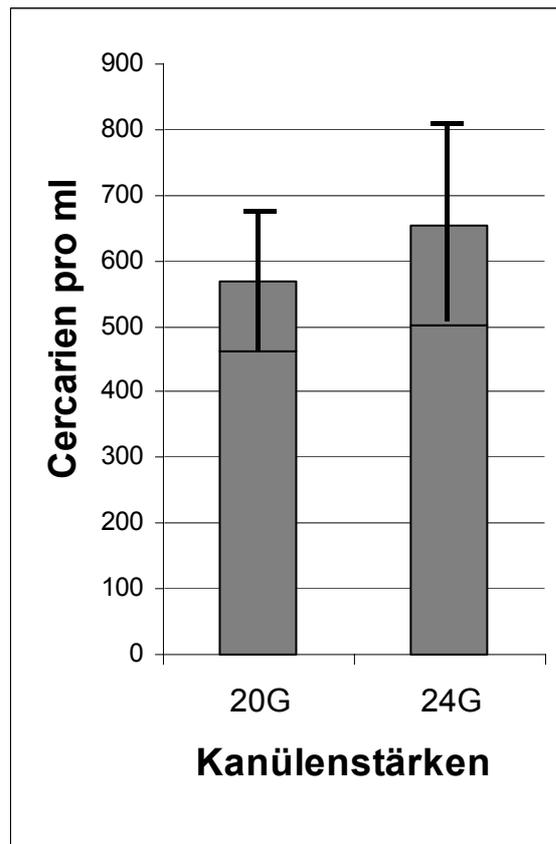


Abbildung 4.2: Mittelwert und Standardabweichung der Cercarienzahl bei verschiedenen Kanülenstärken (Angaben in Cercarien pro ml). – Die Balken stellen die mittlere Cercarienzahl bei entsprechender Kanülenstärke dar. Dünne vertikale Striche kennzeichnen die Standardabweichung. Die Unterschiede zwischen den verwendeten Kanülen sind statistisch nicht signifikant.

Wie sich zeigte, traten bei den Mäusen keine makroskopisch erkennbaren Folgen der Manipulation im Nackenbereich auf. Je nach Gruppenzugehörigkeit und Cercariendichte in der zum Inokulationszeitpunkt verwendeten Suspension wurden Mengen zwischen 70 μ l und 400 μ l gespritzt, jeweils nach leichtem Schütteln der Cercariensuspension. Sowohl bei den Versuchs- als auch bei den Kontrolltieren wurden die Mäuse zufällig unterschiedlichen Infektionsgruppen zugeteilt. Nach der Cercarieneinbringung wurden die mit gleicher Flüssigkeitsmenge behandelten Tiere in einen gemeinsamen Käfig gesetzt, weiterhin getrennt nach BL/6- und K.O.-Mäusen.

4.2. Entwicklungsphase

Erst nach einer Wartezeit von acht Wochen ist die Entwicklung der Schistosomen vollendet und sie produzieren Eier, so dass ein deutlich sichtbares Infektionsbild vorliegt. In dieser Zeit werden die Mäuse lediglich gefüttert. Um die Größenzunahme genau zu dokumentieren, werden die Versuchsmäuse am Tag der Inokulation und am Tag der Präparation gewogen.

4.3. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Die Mäuse werden nach ca. acht Wochen mit dem Barbiturat Nembutal eingeschläfert, welches nach DUVAL und DEWITT (1967) eine zusätzliche vermizide Wirkung besitzt oder zumindest die Aktivität der Schistosomen so stark einschränkt, dass diese besser aus den Organsystemen auszuspülen sind, wie unten beschrieben wird. Das Barbiturat wird pro Maus in einer Dosierung von 300 μ l mit 90 μ l Heparin gemischt. Letzteres wird hinzugegeben, um das Blut der Maus für die Zeit der Präparation, Wurmausspülung und Organgewinnung ungerinnbar zu machen. Injiziert wird die Lösung in die Peritonealhöhle, indem ein Hinterlauf der in Rückenlage gehaltenen Maus fixiert wird, wie in Abb. 4.3 dargestellt. So ist eine Peritonealfalte straff nach caudal gespannt und die Kanüle kann direkt in der Inguinalzone platziert werden, ohne dass die Gefahr besteht, Darmschlingen zu verletzen.

Die Maus schläft nach etwa drei bis fünf Minuten ein, nach 10-15 Minuten ist sie weder erweckbar, noch reagiert sie auf Schmerzreize. Sobald der Herzschlag nicht mehr zu spüren ist, wird der Hautschnitt gesetzt.

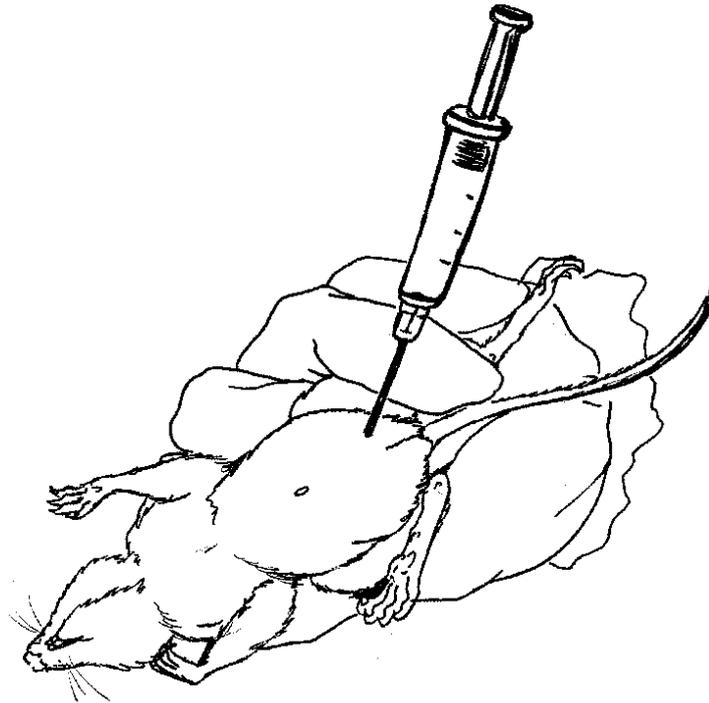


Abbildung 4.3: *Spritztechnik.* – Die Injektion der zum Einschläfern der Maus verwendeten Nembutal/Heparin-Mischung erfolgt in die Peritonealhöhle. Um keine Darmschlingen bei der Injektion zu verletzen, wird die Maus mit dem zwischen Daumen und Zeigefinger im Nackenbereich fixierten Kopf nach unten gehalten, während der Hinterlauf der Einstichseite mit dem 4. Finger in Abduktion fixiert wird. Dadurch fallen die Intestinalschlingen intraperitoneal nach cranial, weg von der Injektionsstelle.

4.3.1. Gewinnung der Schistosomen

Die einzelnen Schritte des Präparationsvorgangs zeigt Abb. 4.4. Nachdem der Maus das Fell mitsamt der Cutis und dem subcutischen Gewebe über den Kopf und zum Schwanz hin bis über die Unterschenkel gezogen wurde, liegt das parietale Peritoneum als flüssigkeitsgefüllter Sack um die Organe vor. Dieser wird vorsichtig eröffnet und bis zum Brustkorb nach cranial gezogen, woraufhin die Bauchorgane frei liegen. Nun wird der Brustkorb samt Zwerchfell entfernt, so dass man Herz und Lunge direkt erreichen kann. Die Pfortader wird unterhalb der Leber eröffnet. Am besten lässt sich dieses Gefäß finden, indem man vom Darm aus den venösen Abflüssen folgt, welche in der Vena portae münden, die wiederum in der Leberunterseite endet. Die Öffnung der Pfortader geschieht als Längsschnitt von größtmöglicher Ausdehnung.

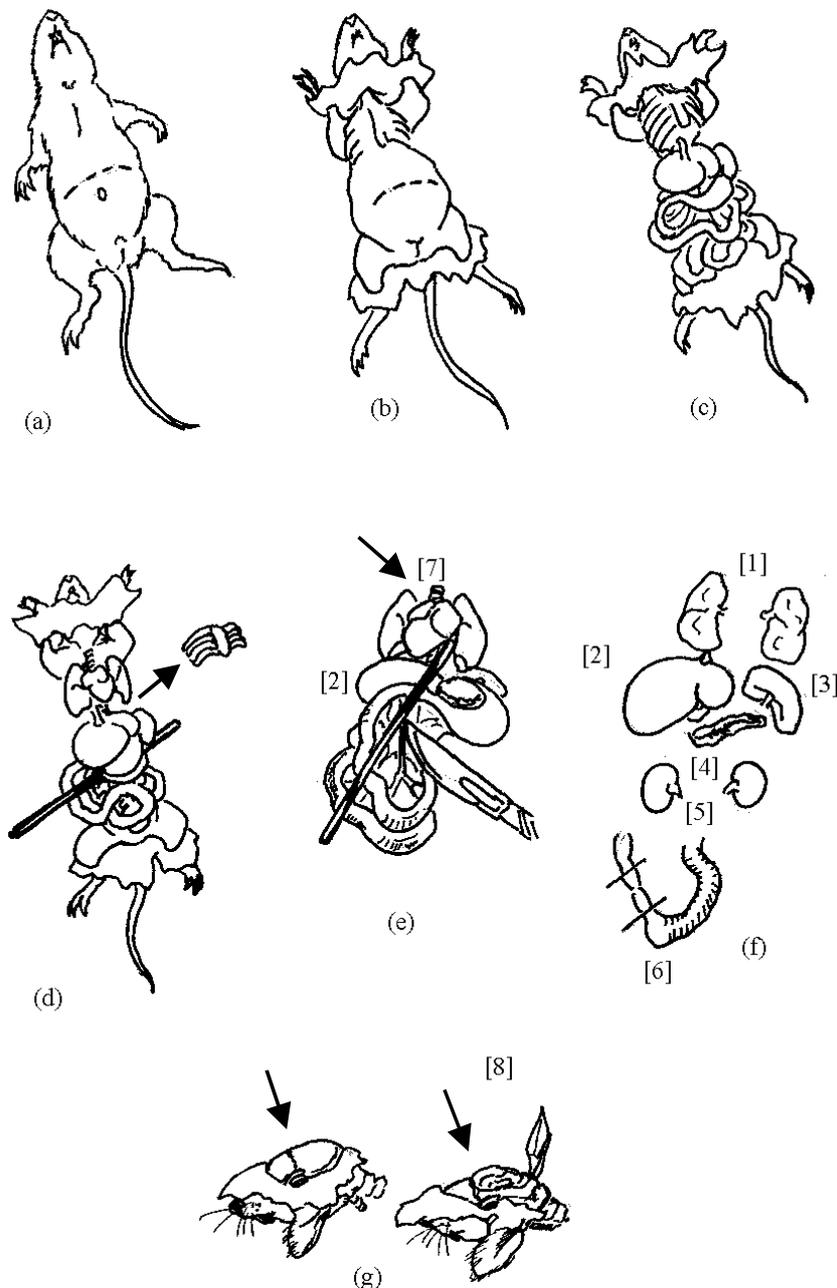


Abbildung 4.4: *Präparationsvorgang:* (a) Bauchschnitt, (b) Öffnung des Peritoneums, (c) freigelegte Bauchorgane, (d) Entfernung des Brustkorbs, (e) Eröffnung der Pfortader - in dieser Phase wird die Natriumcitratpflung über das Herz (Pfeil) appliziert, (f) Entnahme der Organe, (g) Eröffnung des Schädels zur Entnahme des Gehirns (Pfeile).
 – Organbezeichnungen: [1] Lunge, [2] Leber, [3] Milz, [4] Pankreas, [5] Nieren, [6] Colon, [7] Herz, [8] Gehirn.

Danach müssen die Viszeralgefäße der Maus mit Zitratlösung gespült werden, um die Schistosomen aus dem Gefäßsystem zu schwemmen (Abb. 4.5). Hierzu wird eine Kanüle in den rechten Ventrikel des Mäuseherzens eingebracht und diese mit circa 20 ml Zitratlösung durchspült. Dabei wird das venöse Kreislaufsystem retrograd durchspült, wodurch Blut und die in großkalibrigen Leber- und Milzvenen befindlichen Würmer ausgewaschen werden. Dieser Vorgang geschieht über einem Sedimentierglas, welches die Flüssigkeit auffängt.

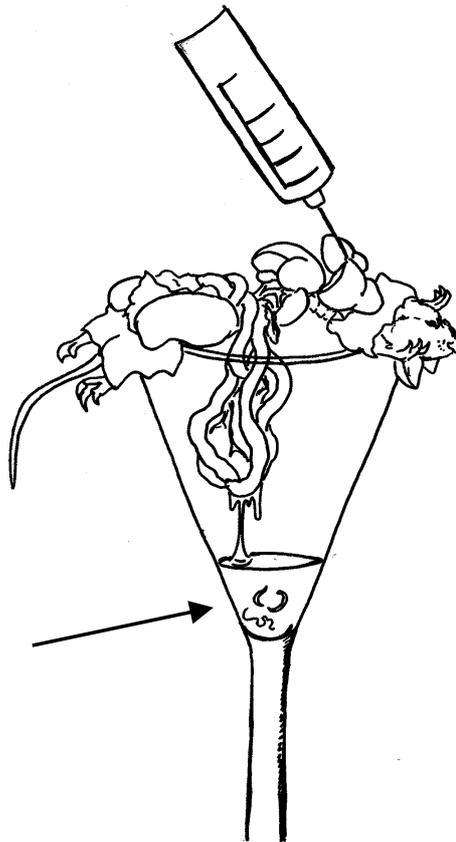


Abbildung 4.5: Ausspülvorgang. – Die mit Zitratlösung gefüllte Spritze wird im rechten Ventrikel des freigelegten Mäuseherzens platziert. Der Flüssigkeitsstrom läuft so primär retrograd über die Hohlvene in die zuführenden Organe. Der geringste Widerstand wird hierbei von der im Rahmen der Präparation eröffneten Pfortader geboten, weshalb ein großer Anteil der Spüllösung durch dieses Gefäß fließt. Im Glas verbleiben die aus dem Mesenterial-Gefäßsystem ausgeschwemmten Schistosomen (Pfeil).

Nachdem das Pfortadersystem auf hepatischer Seite gut mit Zitratlösung gefüllt ist – erkennbar an einer Hellbraun-Färbung der sonst dunkelroten Leber durch den Blutver-

lust – wird der Darm mit weiteren 40 ml der Spüllösung abgespült. Am besten werden die gesamten Eingeweide nach dieser Prozedur noch zur Reinigung in die inzwischen im Glas gesammelte Flüssigkeit getaucht, weil hierdurch eventuell noch am Mesenterialgewebe haftende Schistosomen gelöst werden.

Danach werden die Organe der Maus entnommen, während sich die Würmer im Sedimentierbehälter absetzen. Dieser Bodenbelag wird später abpipettiert und in einer Petrischale begutachtet. Bei dieser Gelegenheit werden die Würmer ausgezählt. Dadurch ergibt sich die relative Wurmbürde der Maus. Das Wurmgeschlecht kann ebenfalls bereits makroskopisch bestimmt werden, da die Weibchen haarfeinen schwarzen Fäden gleichen, während die Männchen dicker, kürzer und weiß sind. Oft finden sich noch vereinte Pärchen von Schistosomen, wobei das Weibchen in der Leibesrinne des Männchens eingebettet ist (Abb. 3.2).

Bei der Auszählung der Würmer in der Petrischale und der Auftrennung nach Geschlechtern sind zwei Besonderheiten zu beachten: Die Weibchen bilden häufig Knäuel, so dass ihre Zahl schwer abzuschätzen ist, und die Männchen tragen oft kleine, zusammengerungelte, kaum sichtbare Weibchen in sich. Insgesamt werden meist mehr Männchen als Weibchen gewonnen, doch liegt dies wahrscheinlich zu einem Teil daran, dass die längeren, dünneren Weibchen sich stärker in den Organen verheddern.

4.3.2. Gewinnung der Organe

Sobald die Würmer ausgespült wurden, müssen die Organe für weitergehende Untersuchungen konserviert werden. Da Granulome vor allem in Leber, Milz und Darm erwartet werden, müssen diese zuerst entnommen werden. Für über das ursprüngliche Ziel dieser Arbeit hinausgehende Untersuchungen über die Veränderungen an anderen Organsystemen, werden weiterhin Niere, Pankreas, Lunge und Gehirn herausgeschnitten und ebenso wie die vorher genannten Organe aufbewahrt.

Das etwas schwerer zu findende Pankreas liegt zwischen Magen und Milz eingebettet und lässt sich am besten anhand seiner Gefäße verfolgen. Wegen der guten Durchblutung erscheint das sonst weißliche Gewebe etwas rötlicher als das umgebende gelbgefärbte Fett. Außerdem stellt es sich als um ein Zentralgefäß gelagertes, dünnes, feinkörniges Gewebe dar, während das Fett aus großen Tropfen besteht und einer geschlängelten Gefäßverteilung folgt.

Da sowohl die Granulomzahl im HE-Schnitt erforscht werden soll, als auch die Granulomzusammensetzung, werden von jedem Organ ein Paraffinschnitt und Cryo-Schnitte angefertigt. Also wird jeweils ein Stück für die immunologischen Färbungen in Tissue Freezing Medium eingefroren, ein weiteres Stück für die Histologie in Formalin aufbewahrt und vor der Einfärbung in Paraffin eingebettet. Das restliche Gewebe wird in Formalin aufbewahrt. Schließlich wird der verbliebene Körper der Maus entsorgt.

5. Bearbeitung des Untersuchungsmaterials

Die zu untersuchenden Materialien müssen nun getrennt weiterbehandelt werden.

5.1. HE-Färbung

Die Paraffinpräparate werden mit einem Mikrotom geschnitten und mit der üblichen Hämatoxylin-Eosin-Färbung versehen. Danach können Zellkerne und Bindegewebe hervorragend voneinander abgegrenzt werden.

5.2. Immunologische Darstellung

Um eine genaue Zuordnung einzelner Immun-Zellarten gewährleisten zu können, müssen diese mit spezifischen Antikörpern markiert werden. Hierzu werden Gefrierschnitte angefertigt.

5.2.1. Aufbereitung

Zuerst werden die im Gefriermedium eingebetteten Organe in flüssigem Stickstoff 10 Sekunden eingefroren. Die Aufbewahrung der Gefrier-Klötze erfolgt dann bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Im nächsten Schritt werden am Cryotom $8\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ angefertigt und auf Objektträger aufgebracht, welche zuvor mit Lysin beschichtet wurden. Sofort nach Schneiden und Aufbringung muss der Schnitt in Aceton fixiert werden (innerhalb 10 - 20 Sekunden). Vor der immunologischen Behandlung muss eine erneute Fixation in Aceton erfolgen, diesmal für insgesamt 10 Minuten. Mit einem Gelstift werden die einzelnen Schnitte umrandet. Durch den Gelkreis wird bei der Färbung auf die Präparate aufgebrauchte Flüssigkeit streng innerhalb dieses Gebiets gehalten, anstatt auf benachbarte Areale abzufließen. Dadurch wird eine ausreichende Exposition gegenüber den Antikörpern und Reagenzien gewährleistet.

5.2.2. Färbeschema

Die folgende Tab. 5.1 fasst die auszuführenden Schritte des immunhistochemischen Anfärbungsvorgangs zusammen. In den einzelnen Zeilen ist die zeitliche Abfolge der durchgeführten Färbungsaktionen zu ersehen. Durch die Kreuze wird dargestellt, bei der Markierung welcher Zelltypen der entsprechende Schritt benötigt wird.

Immunhistochemische Darstellung von speziell ausgewählten Geweben umfasst zwei Teilbereiche: Die Markierung der gewünschten Zellen mittels spezifischer Antikörper mit gekoppelten Enzymen, welche sich im zweiten Vorgang, der eigentlichen Färbung,

eine von diesen Enzymen abhängige Reaktion mit Farbumschlag katalysieren. Hierzu wird häufig eine Peroxidase verwendet, wie auch in unserem Fall.

Färbeschritte	Kontrolle	Eosino- phile	Gr1 Neutro- phile	Mac1 α Blut- mono- zyten	F4/80 Gewebs- makro- phagen
Blocklösung	X	-	X	X	X
Primär-Ak	-	-	X	X	X
Sekundär-Ak	X	-	X	X	X
Substrat	X	X	X	X	X
Gegenfärbung	X	X	X	X	X

Tabelle 5.1: Einzelschritte des immunhistochemischen Färbe-Vorgangs. – In der ersten Zeile sind die zu markierenden Zelllinien eingetragen, wobei die letzten drei Zelltypen über das zugeordnete Oberflächenantigen markiert werden. Die linke Spalte nennt die einzelnen Färbeschritte in chronologischer Reihenfolge. Die Eosinophilen Granulozyten werden in einem abgekürzten Verfahren über ihre natürlich vorkommende Peroxidase angefärbt, weshalb lediglich Zugabe von Peroxid-haltigem Substrat notwendig ist. In den Kontrollschnitten entfällt die Applikation von Antikörpern gegen spezifische Oberflächen-Antigene. Durch X sind die bei den einzelnen Zelltypen zur Anwendung kommenden Färbeschritte gekennzeichnet.

Die Markierung erfolgt in drei Schritten: Erst muss bereits im Gewebe befindliche Peroxidase abgefangen werden. Hierzu wurde die in Tabelle 5.2 in ihrer Zusammensetzung aufgeschlüsselte Blocklösung für circa 20 Minuten verwendet. Im Anschluss werden die Schnitte in Pufferlösung (PBS) gewaschen. Im zweiten Schritt müssen die ersten Antikörper (Primärantikörper) gegen bestimmte Abwehrzell-Oberflächen-Antigene auf die Präparate aufgetragen werden. Nach dreißigminütiger Einwirkzeit wird erneut mit Puffer gewaschen. Es folgt im letzten Schritt die Aufbringung der Sekundär-Antikörper, welche die vorher verwendeten Immunglobuline mit einer Peroxidase koppeln, die am F_c-Fragment jener Zweit-Antikörper angebracht ist.

Nach weiteren 30 Minuten und mehrmaligem Waschvorgang folgt der Immunglobulin-Markierung die eigentliche Färbung und Gegenfärbung. Hierzu werden die nun immunologisch markierten, aber noch ungefärbten Schnitte zuerst in 3-Amino-9-Ethylcarbazol(AEC)-Lösung gegeben, welche als Substrat für die Peroxidase-Reaktion dient. Es folgt erneute Waschung und eine Basis-Gegenfärbung mit Mayers Hämatoxylin, wodurch das ungefärbte Gewebe einen leicht bläulich-violetten Ton erhält.

Abweichungen im Ablauf finden sich bei der Anfärbung der Eosinophilen Granulozyten und bei Kontrollschnitten. Letztere werden gebraucht, um eventuelle, ungewollte Gewebsreaktionen auf den zweiten Färbevorgang zu enthüllen, wie auch um die Spezifität der Zweitantikörper zu testen. Hierzu wird der Schnitt ganz normal mit Blocklösung und Sekundärantikörper behandelt. Ist diese nicht in Ordnung, wird sich im Gewebe nach Substrateinwirkung trotz fehlender Primärantikörper-Markierung eine Rotfärbung zeigen, da die von Natur aus vorhandene Peroxidase nicht geblockt war. Ein ähnliches Ergebnis ist bei mangelnder Selektivität der Sekundärantikörper zu erwarten, wenn Zellbestandteile gebunden werden, obwohl keine Markierung durch Primärantikörper erfolgte. Normalerweise sollte die Kontrolle also keine Rotfärbung aufweisen, nur die bläuliche Gegenfärbung.

Bei der Darstellung der Eosinophilen wird auf Blocklösung und Antikörper verzichtet. Benutzt wird lediglich das Substrat zur Auslösung der Peroxidase-katalysierten Farbreaktion. Dadurch werden alle granulozytären Zelllinien markiert, da sie Peroxidase enthalten. Da jedoch eine spezifische Darstellung der Neutrophilen über das Oberflächenantigen Gr1 im Antikörperverfahren zusätzlich erfolgt, lassen sich die so dargestellten Neutrophilen von den Eosinophilen abziehen. Es zeigt sich jedoch bei dieser Methode, dass Neutrophile Granulozyten lediglich in geringer Zahl und vorwiegend in Gefäßnähe oder in der Abbauzone älterer Granulome zu finden sind. Dadurch muss es sich bei den die Granulome in großer Zahl umgebenden Peroxidase-positiven Zellen um Eosinophile Granulozyten handeln. Auch in der histologischen Färbung bestätigt sich dieses Bild durch die großen, meist eher gelappt als segmentiert wirkenden, plumpen Zellkerne in den Granulozyten, wie sie für die eosinophile Zelllinie typisch sind. Das Zytoplasma färbt sich auch in der Eosin-Färbung schon stark rot, während es bei Neutrophilen Zellen eher farblos erscheinen sollte.

In den folgenden beiden Tabellen 5.2 und 5.3 werden die Rezepte für die benötigten Substanzen vorgestellt. Im Anschluss daran findet sich in Tab. 5.4 ein Plan für den Ablauf des immunologischen Färbevorganges, der strikt eingehalten wurde.

1	0,2 M Acetic Acid (für 1 l) (kühl lagern)	Glacial Acetic Acid H ₂ O	11,49 ml 1000,00 ml
2	0,2 M Sodium Acetate (für 1 l) (kühl lagern)	Na-Acetate-3H ₂ O H ₂ O	27,20 g 1000,00 ml
3	50 mM Acetat-Puffer pH 5,2 (stets frisch) (für 200 ml)	0,2 M Acetic Acid 0,2 M Sodium Acetate H ₂ O	14,80 ml 35,20 ml 150,00 ml
4	AEC-Lösung (für 10 ml) (dunkel und kühl lagern)	3-Amino-9-Ethylcarbazol N,N-Dimethylformamide	50 mg 10 ml
5	AEC-Substrat (stets frisch) (für 200 ml)	H ₂ O ₂ 30% AEC-Lösung 50 mM Acetat-Puffer pH 5,2	30 µl 10 ml 200 ml
6	Mayer's Hämatoxilin-Lösung (für 200 ml)	Mayer's Hämatoxilin H ₂ O	100 ml 100 ml
7	1% ige BSA-Lösung (für 3 ml)	Bovines Serum Albumin (BSA) PBS	30 mg 3 ml
8	Blocklösung (Sterilbank!) (für 1000 µl)	H ₂ O ₂ 30% Normal Goat Serum PBS	2 µl 50 µl 1000 µl

Tabelle 5.2: Für die immunhistochemische Färbung verwendete Lösungen. – Neben den Inhaltsstoffen (Spalte 2) und den benötigten Volumina (Spalte 3) werden in der ersten Spalte Hinweise für die Zubereitung der Lösungen gegeben.

Antikörper:	Verdünnung:
Gr1	1 : 200
Mac1 α	1 : 2
F4/80	1 : 4 oder 1 : 5 (es hat sich bewährt, beide Konzentrationen parallel zu verwenden)
POX-Mouse	1 : 100

Tabelle 5.3: *Antikörper-Verdünnungen für die einzelnen darzustellenden Zelltypen (pro Schnitt werden 100 μ l Flüssigkeit benötigt). – Als Verdünnungsmedium wird 1%-ige BSA-Lösung verwendet. Da die Färbungsintensität der Präparate bei F4/80-Markierung in gleicher Verdünnung des Antikörpers sich als nicht ganz konstant erwies, wurden stets 2 Konzentrationen parallel verwendet und ausgewertet.*

Tabelle 5.4 (nächste Seite): *Ablaufplan der immunologischen Färbung. – Diese Tabelle zeigt in chronologischer Reihenfolge die einzelnen Arbeitsvorgänge der immunhistochemischen Färbung auf. Einige Lösungsansätze müssen direkt vor Anwendung frisch hergestellt werden. Hierfür eignen sich die Wartezeiten zwischen Aufbringung der Antikörper und Waschung der Schnittpräparate. Der Zeitaufwand für die Durchführung aller Arbeitsschritte beträgt 3,5 – 4 Stunden. Um ein Eintrocknen der zugegebenen Antikörper zu verhindern müssen die Präparate rechtzeitig in die feuchte Kammer gebracht werden, weshalb die Anzahl der von einer Person parallel behandelbaren Schnittpräparate auf 30 begrenzt ist. – Die AEC-Lösung darf nur unter dem Abzug verwendet werden, da sie als einzige der benutzten Substanzen eine hohe Toxizität, auch durch Inhalation, aufweist.*

1.	Lösungen vorbereiten: Rezepte 1, 2, 4, 6 und 7 aus Tabelle 5.2.
2.	Antikörper-Verdünnungen (auf Sterilbank) nach obiger Tabelle 5.3, 100 µl der jeweiligen Antikörperverdünnung pro Schnittpräparat.
3.	Blocklösung herstellen (auf Sterilbank; Rezept 8 der Tabelle 5.2), 100 µl pro Schnitt, vor Gebrauch schütteln.
4.	Feuchte Kammer vorbereiten
5.	Präparate, sofern noch nicht geschehen, für 10 min in Aceton fixieren, trocknen und beschriften.
6.	Schnitte mit Gelstift umranden, trocknen.
7.	Blocklösung auf Gr1, Mac1 α , F4/80 und Kontrollpräparat für 20 min in feuchter Kammer.
8.	Waschung in PBS-Küvette für 1 min.
9.	Primärantikörper auf jeweiliges Schnittpräparat für 30 min in feuchter Kammer; währenddessen Herstellung von Puffer nach Rezept 3 aus Tabelle 5.2.
10.	Waschung 3 x 2 min in PBS-Küvette.
11.	Sekundärantikörper auf entsprechende Präparate für 30 min in feuchter Kammer, währenddessen Herstellung des AEC-Substrates (Rezept 5 aus Tabelle 5.2, wegen hoher Giftigkeit nur unter Abzug verwenden).
12.	Waschung 3 x 2 min in PBS-Küvette.
13.	Alle Schnittpräparate in AEC-Substrat für 7 - 10 min.
14.	Waschung in PBS-Küvette für 1 min.
15.	Gegenfärbung aller Schnittpräparate in Mayers Hämatoxilin für 10 - 13 min, Glycerol-Gelatine in Wasserbad (60°C).
16.	Waschung in PBS-Küvette (5 min), trocknen.
17.	Einbettung in Glycerol-Gelatine.

5.3. Aufbewahrung der gewonnenen Materialien

Da in dieser Arbeit nur Milz, Darm und vor allem die Leber betrachtet werden sollen, werden die ebenfalls entnommenen Nieren, die Bauchspeicheldrüse, die Lunge und das Gehirn, ebenso wie das unverarbeitete Restgewebe der untersuchten Organe teils in Formalin, teils als Gefrierblock bei -70°C aufbewahrt. So können weitere Untersuchungen folgen, ohne dass neue Tiere infiziert und eingeschläfert werden müssen. Die bereits für die immunhistochemische Bearbeitung vorbereiteten Präparate werden nach Einbettung in Glycerol-Gelatine mit einem Deckglas versehen.

6. Auswertung und Ergebnisse

Da die Auswertung verschieden gestaltete und zum Teil nicht vergleichbare Größen umfassen wird, ist es wichtig, sich Richtlinien zu erarbeiten, die damit zusammenhängende Fragestellungen im Vorfeld klären.

6.1. Festlegung von Auswertungsschemata

Die Bewertung der Wurmzahl wird durch die Menge der ausspülbaren Tiere bestimmt, was bei ordentlicher Durchführung der Gefäßfreilegung und –eröffnung sicherlich als recht genau einzustufen ist.

Der makroskopische Leberfall wird anhand der sichtbaren Granulomdichte an der Leberoberfläche skaliert. Die Granulome und ihre umgebende Fibrose erscheinen als weißliche Flecken auf dem roten Leberparenchym. Bei der retrograden Spülung mit Citratlösung entfärbt sich die Leber und ist nun von lehmgelber Farbe. Die granulomatös veränderte, feinhöckerige Oberfläche der stark befallenen Lebern zeigt aber auch nach dieser Behandlung noch den pathologischen Befund an. Trotzdem ist es besser, die Beurteilung der Leber vor der Wurmausspülung vorzunehmen, da sich dann mehrere Stufen des Befalls voneinander trennen lassen. Die makroskopischen Schweregrade der Infektion werden unter 6.1.1.1 demonstriert.

Des weiteren werden Aszites und makroskopischer Zustand von Milz und Pankreas beurteilt. Die Ergebnisse werden weiter unten vorgestellt. Beim Milzbefall wird das Vorhandensein beziehungsweise das Fehlen von auf der Oberfläche erkennbaren Granulomen registriert. Die Pankreatitis wird in Form eines ödematös vergrößerten Pankreas festgestellt. Das Vorliegen von Aszites wird spätestens beim Eröffnen des Bauchfells erkannt. Hier wird allerdings keine Messung der genauen Aszitesmenge durchgeführt.

6.1.1. Nachweis der Gültigkeit von Prämissen

Vor Beginn des Versuchs muss gewährleistet sein, dass die Menge an Cercarien, die den Mäusen injiziert werden soll, abgeschätzt werden kann. Weiterhin sollte es Parameter zur makroskopischen Leberbeurteilung geben, die mit der histologischen Begutachtung korrelieren und somit bereits im Vorfeld zur Abschätzung des Infektionsgrades dienen können.

Vor der Verwendung von TNF-Rp55-K.O.-Mäusen muss ein Vergleich von NMRI- und BL/6-Mäusen durchgeführt werden, da an diesen beiden Stämmen Gemeinsamkeiten für immunkompetente Mäuse erkennbar sind, so dass die Aussagen bezüglich des untersuchten Rezeptor-Defekts bei Knockout-Tieren künftig im direkten Vergleich mit diesen beiden Kontrollgruppen getroffen werden können. Gleichzeitig kann auf diese Weise evaluiert werden, welcher der beiden Gen-gesunden Stämme besser als Standard-Kontrolle geeignet ist.

6.1.1.1. Auswertung des Leberbefalls

In diesem Abschnitt sollen die künftig zur Beurteilung der Ausprägung der Infektion verwendeten Parameter gegenübergestellt und in ihrer Präzision beurteilt werden. Unterschieden wird hierbei zwischen Inokulationsstufe, makroskopischem Leberbefallsgrad und mikroskopisch eruiertes Granulomzahl pro Gesichtsfeld (= Auszähleinheit). Während es sich bei der Inokulationsstufe um eine prospektiv festgelegte Injektionsmenge von Cercariensuspension handelt, dienen die retrospektiv erfassten Beurteilungsverfahren der Bestätigung des im Versuch gewünschten Infektionsergebnisses (Leberbefallsgrad, makroskopisch) bzw. der Bestimmung numerischer Unterschiede zwischen einzelnen Versuchsgruppen (Granulomzahl pro Gesichtsfeld). Um eine parallele Anwendung aller 3 Skalen auf die untersuchten Strukturen zulassen zu können, wird im folgenden gezeigt, dass diese Größen miteinander korrelieren.

Die schematische Zeichnung und die Fotografie in Abb. 6.1 verdeutlichen, dass der Zerstörungsgrad der Leber durch Granulome bereits ohne Zuhilfenahme des Mikroskops feststellbar ist. So zeigen sich die in ihrer Marginalzone mit fibrösem Material und Abwehrzellen besetzten, vom Gefäßsystem durch diese Barriere abgeschnittenen Granulome als weißgraue Punkte auf dem ansonsten dunkelroten, gut durchbluteten Leberparenchym. Allerdings verliert sich die Farbe, sobald die Leber retrograd mit der Zitratlösung durchspült wird. Danach sind jedoch weiterhin Knötchen des Parenchyms als morphologisches Korrelat des pathologischen Befundes zu erkennen. Außerdem ist die Leberkonsistenz durch die fibrösen Areale stark verhärtet. Anhand dieser Beobachtungen lässt sich der Leberbefall in fünf Schweregrade einteilen, die künftig als **Infektionsgrade** bezeichnet werden. Sie erstrecken sich von makroskopisch granulomfreiem Befall (0) über leichten (wenige sichtbare Knoten, +) und mittleren Befall (Leber unregelmäßig von Regeneratflächen durchzogen, ++) bis zu schwerem Befall (Leber fast

durchgehend knotig, +++) und extremem Befall (Leber ohne sichtbar gesundes Parenchym, ++++).



Abbildung 6.1: Makroskopischer Leberbefall. – Die Fotos wurden anhand von in Formalin aufbewahrten Lebern aufgenommen. In den Zeichnungen sind die bei den noch nicht mit Zitratlösung gespülten Lebern erkennbaren oberflächennahen Granulome optisch hervorgehoben. Die Bildpaare zeigen von links nach rechts ansteigend die makroskopisch unterscheidbaren Infektionsgrade 0 bis +++ des Granulombefalls. Grad 0 kennzeichnet eine nicht infizierte Leber, Infektionsgrad + zeigt wenige einzelstehende Granulome auf der Oberfläche, Grad ++ lässt konfluierende Herde erkennen, während Lebern mit Infektionsgrad +++ eine vollständig von Granulomen durchsetzte Oberfläche aufweisen. Grad ++++ (nicht abgebildet) wäre eine von Granulomen komplett zerstörte Leber, welche nicht mehr ihre typische Morphologie aufweist. – Die römischen Zahlen I – III bezeichnen die Inokulationsstufen, welche die Mengen injizierter Cercarien kennzeichnen.

Natürlich muss zur genauen Festlegung des Befallsgrades der Leber nach wie vor der mikroskopische Befund zu Rate gezogen werden. Trotz der groben Einteilung des makroskopischen Schemas in nur wenige Stufen, korrelieren diese mit der feiner abgestuften histologischen Granulomazählung mit einem Koeffizienten von 0,7 (vergl.

Granulomzahl pro Gesichtsfeld in Abb. 6.2), weshalb die Beurteilung der frisch präparierten Leber bereits eine gute Einschätzung des Infektionsgrades liefert.

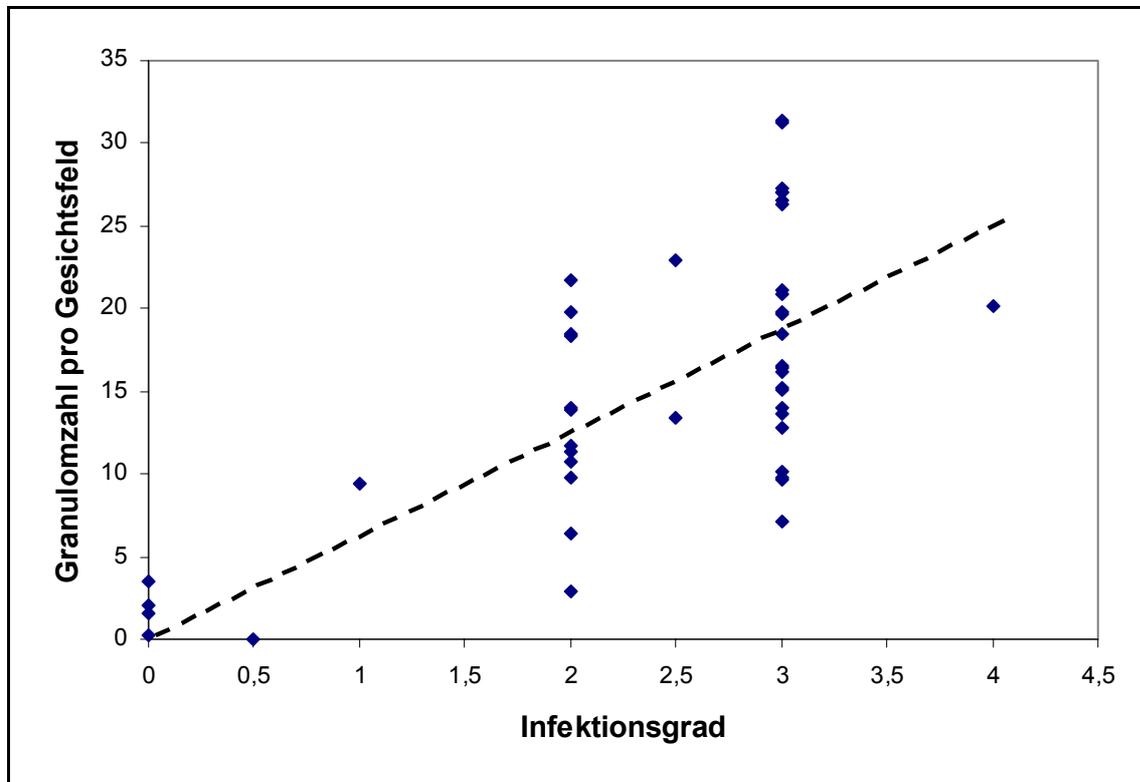


Abbildung 6.2: Korrelation zwischen makroskopischem Leberinfektionsgrad (x-Achse) und Granulomzahl pro Gesichtsfeld (y-Achse). – Jeder Punkt repräsentiert die durchschnittliche Granulomzahl einer Maus und ihre makroskopisch klassifizierte Leberbefallsstufe in den Infektionsgraden + bis ++++ (Skala 1 – 4 der x-Achse). Wie man erkennt, ändert sich auch der makroskopische Eindruck mit steigender Granulomzahl deutlich. Der Korrelationskoeffizient ist 0,7.

Der Leberbefall korreliert ebenfalls mit der injizierten Menge an Cercariensuspension. Bei Untersuchung des Leber- und Wurmbefalls wurden einheitlich folgende **Inokulationsstufen** unterschieden:

I (11-40 Cerc.) **II** (41-70 Cerc.) **III** (71-100 Cerc.) **IV** (101-130 Cerc.).

Aus Abb. 6.1 ist ersichtlich, dass der Leberbefall innerhalb einer Gruppe ziemlich gleichmäßig mit der inokulierten Cercarienmenge zunimmt, wobei hier nur die Stufen I–III dargestellt sind. Es lässt sich eine hervorragende Abstufung des Leberbefalls in „leicht“, „mittel“ und „schwer“ erkennen, was exakt die Stufen der injizierten Cerca-

rienmengen widerspiegelt. Also kann von einem Funktionieren der Inokulations-Methodik ausgegangen werden.

6.1.1.2. Wurmzahl als Parameter der Infektionsdichte

Ähnlich wie mit den eben beschriebenen Leberinfektionsgraden verhält es sich mit den ausgeschwemmten Würmern. Die Gesamtzahl so gewonnener Pärchen steigt mit der Inokulationsmenge. Dies gilt auch für beide Geschlechter des Wurmes getrennt, doch fällt hierbei ein Häufigkeitsunterschied ins Auge. Während die Männchen in relativ großer Zahl gewonnen werden können, gibt es häufig nur wenige Weibchen. Die Ausbeute ließ sich durch gründlicheres manuelles Spülen des Darmes und Baden der Bauchorgane in der Spüllösung verbessern, was darauf hinweist, dass die Weibchen durch den normalen Druck, der bei der Durchspülung aufgebracht wird, sich nicht aus dem Gewebe lösen. Dies ist sicher auf den langen, fadenförmigen Habitus zurückzuführen, der sich verknäuelte und Schlingen bildet, die an kleinen Gewebstücken hängen bleiben.

Eine andere Erklärung ist eine in der verwendeten Literatur nicht beschriebene Mehrentwicklung von Männchen. Diese könnte sogar hormonabhängig sein, da eine Versuchsgruppe männlicher Mäuse fast ausschließlich männliche Würmer in ihrem Intestinum finden ließ und auch nur schwächer befallene Lebern hatte. Dieser Punkt soll in Abschnitt 6.3.3 genauer behandelt werden.

Je länger mit der Durchspülung gewartet wird, desto weniger Pärchen werden in Vereinigung ausgespült, was wohl auf die vermizide Wirkung des Nembutal zurückzuführen ist. Auch bleiben die Weibchen geringfügig länger aktiv, wenn man die Bewegungen der Würmer unter der Lupe betrachtet.

6.1.1.3. Vergleich der Mausstämme NMRI und BL/6

In einem Vorversuch wurden NMRI und BL/6-Mäuse parallel mit Cercarien infiziert und die Tiere nach der Entwicklungszeit von acht Wochen auf makroskopischen und mikroskopischen Leberbefall untersucht. Dies soll zeigen, inwiefern es Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen gesunden Mausstämmen in Bezug auf die Schistosomeninfektion gibt.

Tab. 6.2 (weiter unten) lässt die Steigerung der Wurmzahlen in Abhängigkeit von den Inokulationsstufen erkennen, Abb. 6.10 die Steigerung des Leberbefalls. Es zeigt sich eine weit stärkere Leberschädigung der BL/6-Mäuse bei gleichartiger Granulomausprä-

gung, was auf das geringere Gewicht und die kleinere Leber der Tiere und somit weniger Verteilungsmöglichkeiten für die Granulome zurückzuführen sein dürfte. Dann müsste allerdings bei den noch kleineren K.O.-Mäusen eine noch größere Granulomzahl zu finden sein, was im Hauptversuch untersucht werden wird.

6.2. Auszählung der Granulomdichte

Nun müssen die Granulome mikroskopisch ausgezählt werden. Erkennbar sind die durch Abwehrzellen weiträumig vom gesunden Gewebe abgegrenzten Schistosomen-Eier bereits bei 40- bis 50-facher Vergrößerung. Etwas schwieriger ist die Beurteilung kleinerer Zellnester oder untypischer Anschnitte. Hier geht man bei den unterschiedlichen Färbetechniken in ähnlicher Weise vor.

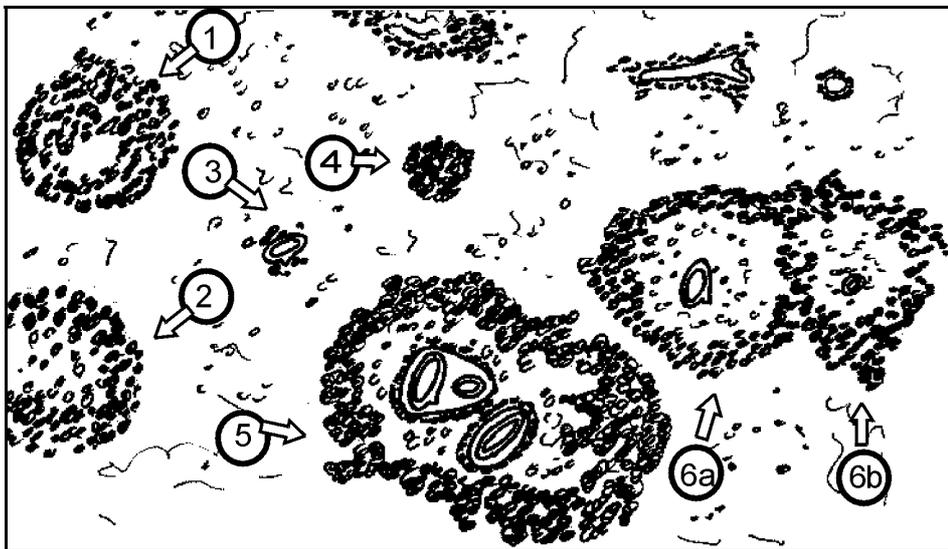


Abbildung 6.3: Skizze zur Zählweise bei der Bestimmung der Granulomdichte in der Leber. – Die Pfeile kennzeichnen Strukturen, die als je ein Granulom gewertet werden. Insgesamt sind im dargestellten Gesichtsfeld 7 unterschiedlich strukturierte Granulome zu erkennen. (1) Typisch strukturierter peripherer Granulomanschnitt, Ei nicht sichtbar. (2) peripherer Granulomanschnitt, der zu mehr als 75% im Gesichtsfeld liegt. (3) Beginnende Granulomentwicklung, wenige Abwehrzellen um ein Ei. (4) Peripherer Granulomanschnitt, im Gegensatz zu Portalfeldanschnitt ohne Gefäße als Binnenstruktur. (5) Großes, konfluierendes Granulom mit multiplen Eiern im Zentrum. (6a+b) Zwei konfluierende Granulome, die beiden Zentren durch Abwehrzellsaum getrennt.

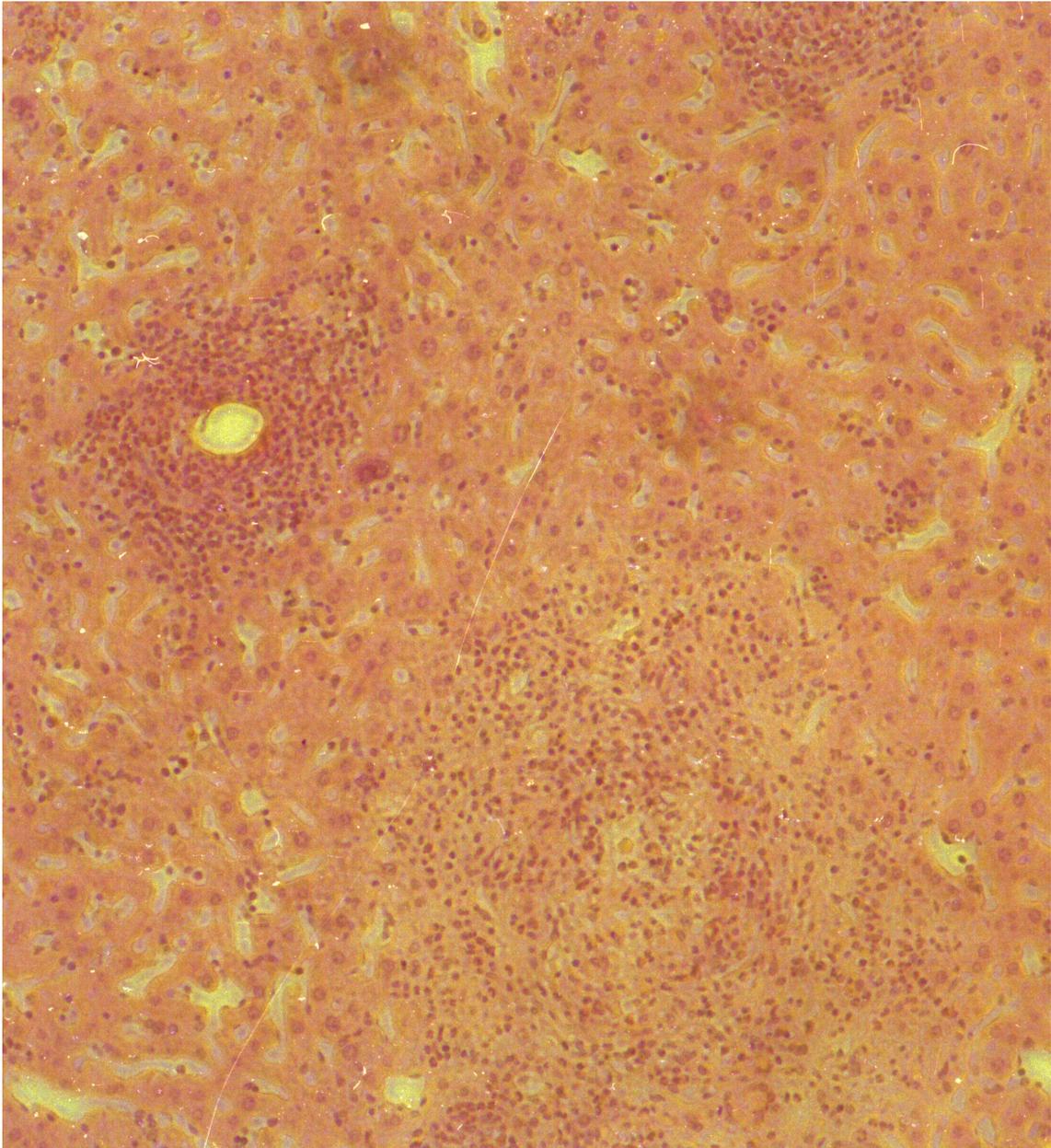


Abbildung 6.4: *Granulome in der Leber (HE-Färbung, Gelbfilteraufnahme 100-fach vergrößert). – Dieses Bild soll die Methodik der Granulomauszählung in der Leber verdeutlichen. Der dargestellte Ausschnitt eines Gesichtsfeldes enthält per definitionem 2 Granulome. Erkennbar im Bild sind zwar insgesamt 3 Ansammlungen von Abwehrzellen, von denen allerdings nur 2 bei der Auszählung eines Gesichtsfeldes berücksichtigt würden und zwar das Granulom in der Bildmitte links (um eine zelleere Nische angeordnet, die vor der Präparation ein Schistosomen-Ei enthielt) sowie das große, etwas aufgelockert wirkende Granulom unten rechts. Da sich das dritte Abwehrzellnest am oberen Bildrand rechts zu mehr als der Hälfte außerhalb des Bildausschnittes befindet, wird es nicht berücksichtigt.*

Jedem Gesichtsfeld von 2,5 x 2,5 mm werden alle diejenigen Granulome zugeordnet, die vollständig innerhalb des Feldes liegen. Hinzugezählt werden diejenigen, deren Fläche sich mehr als zur Hälfte im Gesichtsfeld befindet. Liegt ein Granulom mit seiner Fläche exakt hälftig in zwei aneinandergrenzenden Gesichtsfeldern, so wird es diesen jeweils mit dem Faktor 0,5 zugeordnet. Strukturen, die sich auf mehr als 2 Gesichtsfelder verteilen, werden ignoriert. Beispiele für die Granulombeurteilung zeigen die Abb. 6.3 und 6.4.

Schwierig ist die Differenzierung zwischen stark mit Leukozyten angereicherten Strukturen wie Portalfeldern und ungünstigen Granulomanschnitten. Deshalb wurden folgende Regeln aufgestellt, um eine einheitliche Linie für die Beurteilung der Leberschnitte zu finden:

- Wenn ein oder mehrere Eier innerhalb einer sie vollständig umgebenden Ansammlung von Abwehrzellen liegen, zählen sie als einzelnes Granulom, vergl. Abb. 6.5. Dies gilt auch für Leukozytenansammlungen, die in ihrem Zentrum einen Gewebeausriss enthalten (Schneideartefakt), der eindeutig der Form eines Schistosomen-Eies entspricht.
- Wenn eine basophile Zellansammlung eine zentrale Aufhellung enthält, die der eines Granuloms von der Morphologie her entspricht, so wird sie als Parasiten-Granulom gezählt.
- Wenn sich Abwehrzellen kugelförmig präsentieren, ohne erkennbares zentrales Pathogen, könnte es sich auch um einen randständigen Abschnitt eines Portalfeldes handeln, vergl. Abb. 6.3. Um einheitlich vorzugehen, werden alle jene runden Zellnest-Anschnitte, die mindestens zehn eindeutig voneinander abgrenzbare Leukozyten enthalten, als Ei-Granulom gezählt.
- Wenn sich Leukozyten ring- oder kugelförmig um einen Gefäßanschnitt sammeln, ohne dass nekrotische Zonen oder Wurm-Eier erkennbar sind, so wird davon ausgegangen, dass es sich um Anteile eines Portalfeldes oder ein großes Lebergefäß handelt, durch welches Granulozyten und andere Immunzellen der Leber zugeführt werden.
- Granulome werden unabhängig von den enthaltenen Eiern einfach gezählt. Allerdings zählt jedes erkennbare Korrelat, so dass zwei oder mehr Granulome als

getrennt betrachtet werden, wenn sie sich eindeutig in weniger als der Hälfte ihres Umfanges berühren (vergl. Abb. 6.3 (6a+b)).

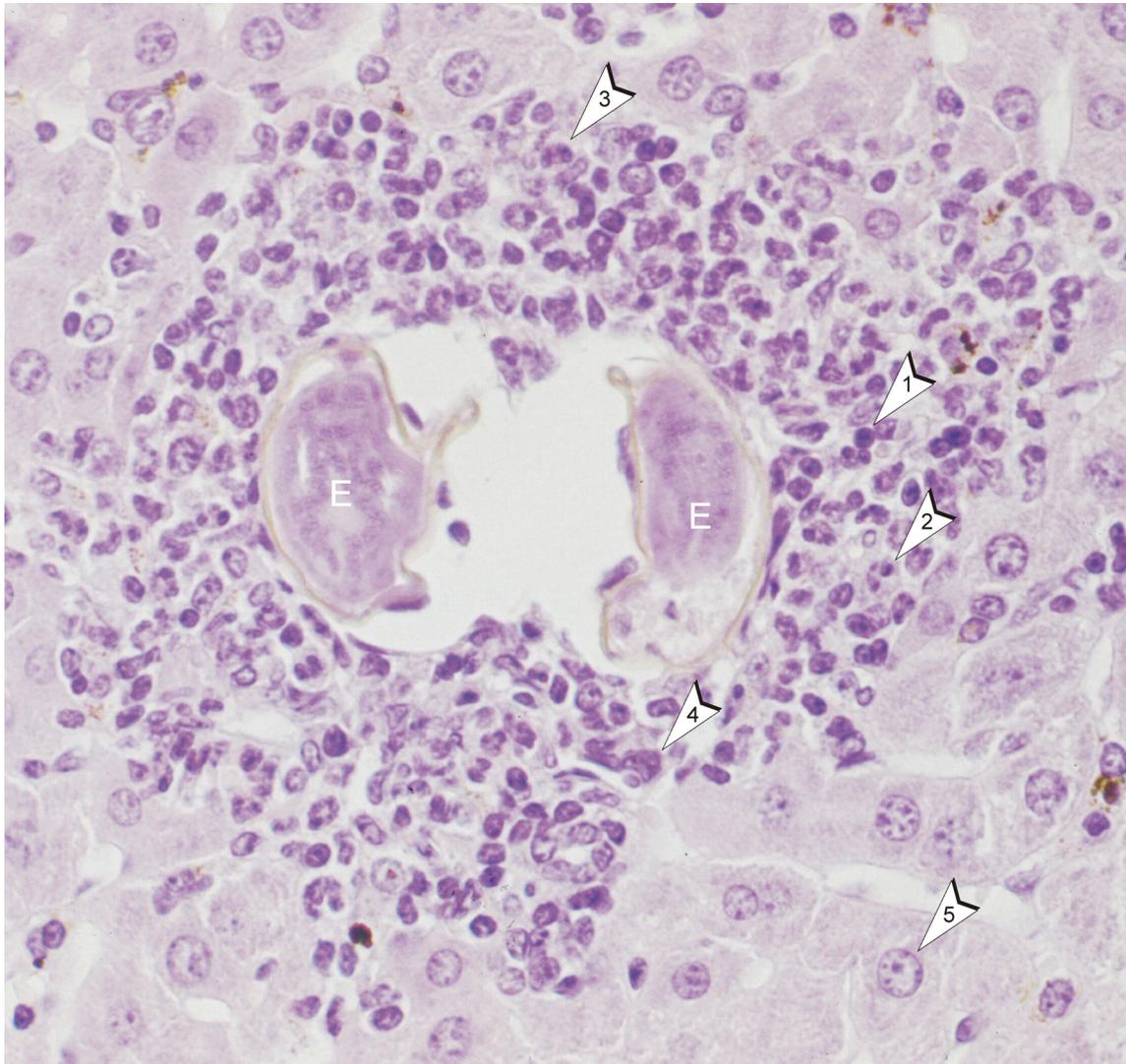


Abbildung 6.5: Zwei Ei-Anschnitte in einem Granulom der Leber (HE-Färbung, 400-fach vergrößert). – Die beiden Wurmeier (E) bilden das Zentrum nur eines Granuloms. Die zentrale Nische wird von Leukozyten umgeben. In diesem Bild zeigen sich Lymphozyten (1), Neutrophile Granulozyten (2), Eosinophile Granulozyten (3) und Makrophagen (4). Die Abwehrzellen sind durch ihre kleineren Kerne und geringere Zytoplasmassäume gut von den Hepatozyten (5) abgrenzbar.

Um Werte für den Vergleich zwischen den Untersuchungsgruppen zu erhalten, wird der Durchschnitt aller in einer Versuchseinheit ausgezählten Beurteilungsfelder gebildet.

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Granulomzählermittlung bei unterschiedlichen Färbetechniken und Untersuchungsmethoden vorgestellt.

6.2.1. Granulomendichtebestimmung in der Leber

Zuerst sollen die mit Hämatoxilin-Eosin und immunhistochemischen Markern behandelten Leberschnitte näher untersucht werden. Zur Untersuchung wurden mit 2,5 x 2,5 mm großen Quadraten versehene Folien angefertigt und so aufgelegt, dass möglichst viele Gesichtsfelder entstehen. Die genauen Auszählungen, in denen jedes einzelne Gesichtsfeld eines jeden Leberschnittes bei den einzelnen Versuchstieren aufgeführt ist, wurden in Tabellen erfasst und mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel ausgewertet. Die so entstandenen Messdaten lassen bei graphischer Darstellung, z.B. in Säulendiagrammen, Tendenzen bei der Granulomverteilung in einzelnen Versuchsgruppen erkennen, so dass anhand des umfangreichen gesammelten Datenmaterials ein einfacher Vergleich zwischen einzelnen Mausstämmen möglich ist.

Die genannte Art der Auszählung wurde auch in den folgenden immunhistochemischen Untersuchungen angewandt.

6.2.1.1. Hämatoxilin-Eosin-Färbung

In dieser Färbung lassen sich vor allem die Granulomzahlen, weniger die Zusammensetzung beurteilen. Dagegen kann die Größe der Granulome wiederum gut abschätzbar, da sich bis in die Randzone des Granuloms dichte Abwehrzellreihen befinden, die sich durch die dunkle Kernfärbung gut vom hellrosa Leberparenchym abheben. Auffällig ist, dass besonders große – also wohl auch als alt anzusehende – Granulome, sich durch einen extrem blassen Innenraum um das Zentrum (Ei) auszeichnen, während ein vielzelliger, dunkelvioletter Randsaum diesen Bereich gleich einer Hülle umgibt. Diese Beobachtung deutet auf eine zentrale Nekrose mit anschließender bindegewebiger Reorganisation des entzündeten Gewebes hin. Außerhalb dieser von wenigen Zellen durchsetzten Zone befindet sich eine Ansammlung resorptiv arbeitender und begrenzender Abweereinheiten. Dieser Saum setzt sich, wie bei höherer Vergrößerung sichtbar wird, bei jenen fortgeschrittenen Granulomen (vergl. Abb. 6.14 rechts) aus weniger Eosinophilen Granulozyten zusammen als bei den kleineren, total von Abwehrzellen durchdrungenen Herden (vergl. Abb. 6.16). Dafür sind wesentlich mehr großkernige Leukozyten zu erkennen, was vor allem auf Lymphozyten und Monozyten hinweist. Bei den verbleibenden Granulozyten hat sich das Verhältnis von Eosinophilen zu

Neutrophilen zugunsten der Neutrophilen verschoben. Dies kann ist daran erkennbar, dass sich das Zytoplasma bei vielen Zellen mit mehrteiligem Kern nun nicht mehr rot anfärbt, und im Vergleich zu stärker Eosinophilen Granulomen mehr segmentierte Kerne vorkommen. Bei Zellnestern, die keine helle Innenzone aufweisen, lassen sich stattdessen die gelappten, meist aus zwei Teilen bestehenden Kerne der Eosinophilen Granulozyten identifizieren, die von einem roten Zytoplasmasaum umgeben sind, vergl. Abb. 6.6.

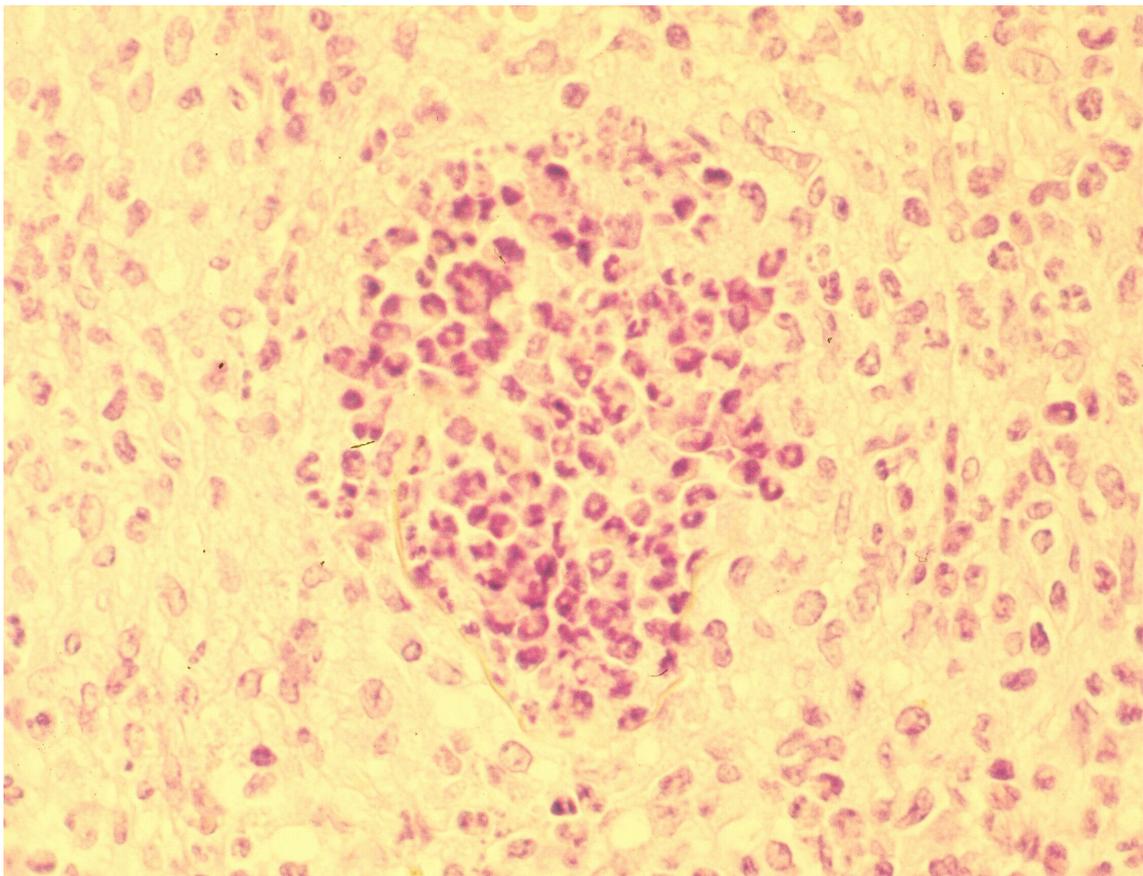


Abbildung 6.6: *Ansammlung Eosinophiler Granulozyten (HE-Färbung, Darstellung in veränderter Farbgebung um die eosinophilen Zellsäume sichtbar zu machen, 400-fache Vergrößerung). – Die Abbildung zeigt ein peripher angeschnittenes Granulom, wobei das Schistosoma-Ei als pathogenes Agens nicht sichtbar ist.*

In Abb. 6.7 folgen Säulendiagramme, die jeweils den Durchschnittswert der Granulome pro Gesichtsfeld innerhalb der einzelnen Inokulationsstufen im Vergleich zwischen der K.O.-Gruppe und der BL/6-Kontrollgruppe darstellen.

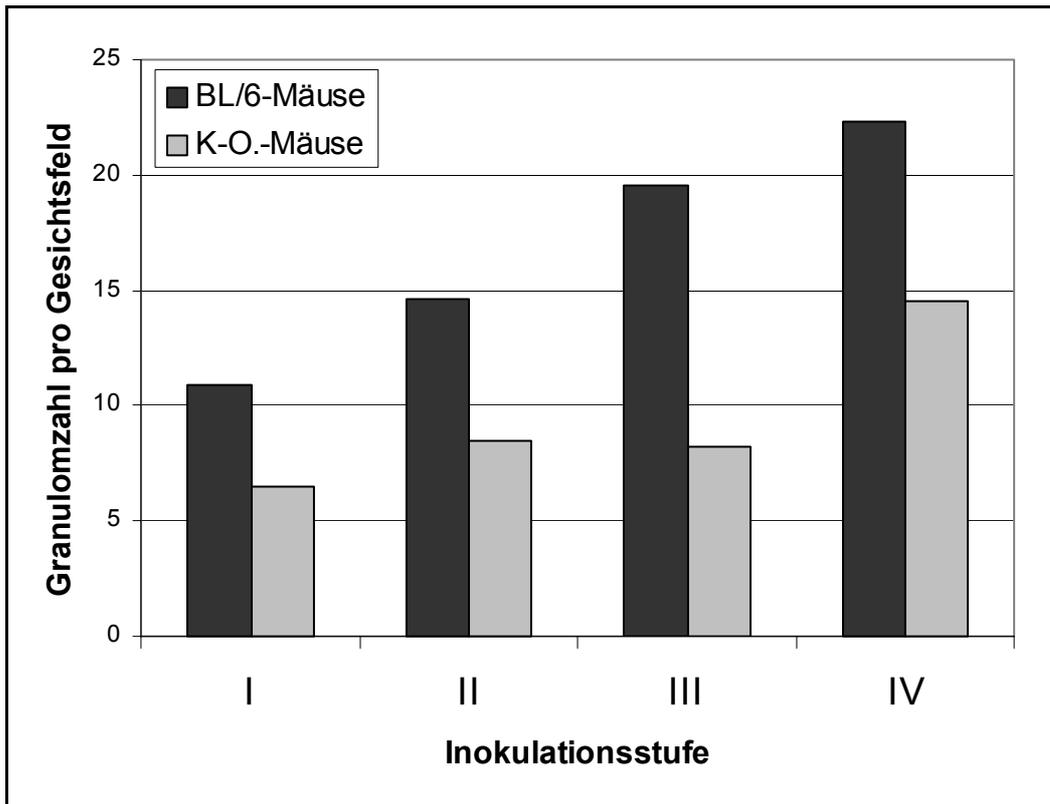


Abbildung 6.7: Unterschiede in der Granulomzahl pro Gesichtsfeld bei K.O.- und BL/6-Mausstämmen. – Verglichen werden K.O.-Mäuse (grau) mit BL/6-Kontrollgruppen (schwarz) bei verschiedenen Inokulationsstufen. Diese sind in 4 Gruppen eingeteilt, die durch steigende Inokulationsmengen von Cercarien charakterisiert sind, Cercarienzahlen: 11-40 (I), 41-70 (II), 71-100 (III), 101-130 (IV). Man erkennt einen linearen Anstieg der Granulomzahl in BL/6-Mäusen und ebenso, wenn auch weniger ausgeprägt, bei K.O.-Mäusen. Die mittlere Zahl von Granulomen pro Gesichtsfeld ist in allen 4 Gruppen der K.O.-Mäuse deutlich niedriger (ca. 70%) als in den entsprechenden Gruppen der BL/6-Mäuse.

6.2.1.2. Immunhistochemische Granulomauszählung in der Leber

Die immunhistochemische Auszählung von Lebergranulomen wird weiter unten in einem eigenen Abschnitt unter Vergleich der Effizienz einzelner Zellanfärbungen beschrieben. Es besteht kein Vorteil in der Auszählung der Granulome bei immunhistochemisch angefärbten Zellen gegenüber der Auszählung der Granulome bei HE-Färbung, die arbeitstechnisch einfacher und kostengünstiger durchzuführen ist.

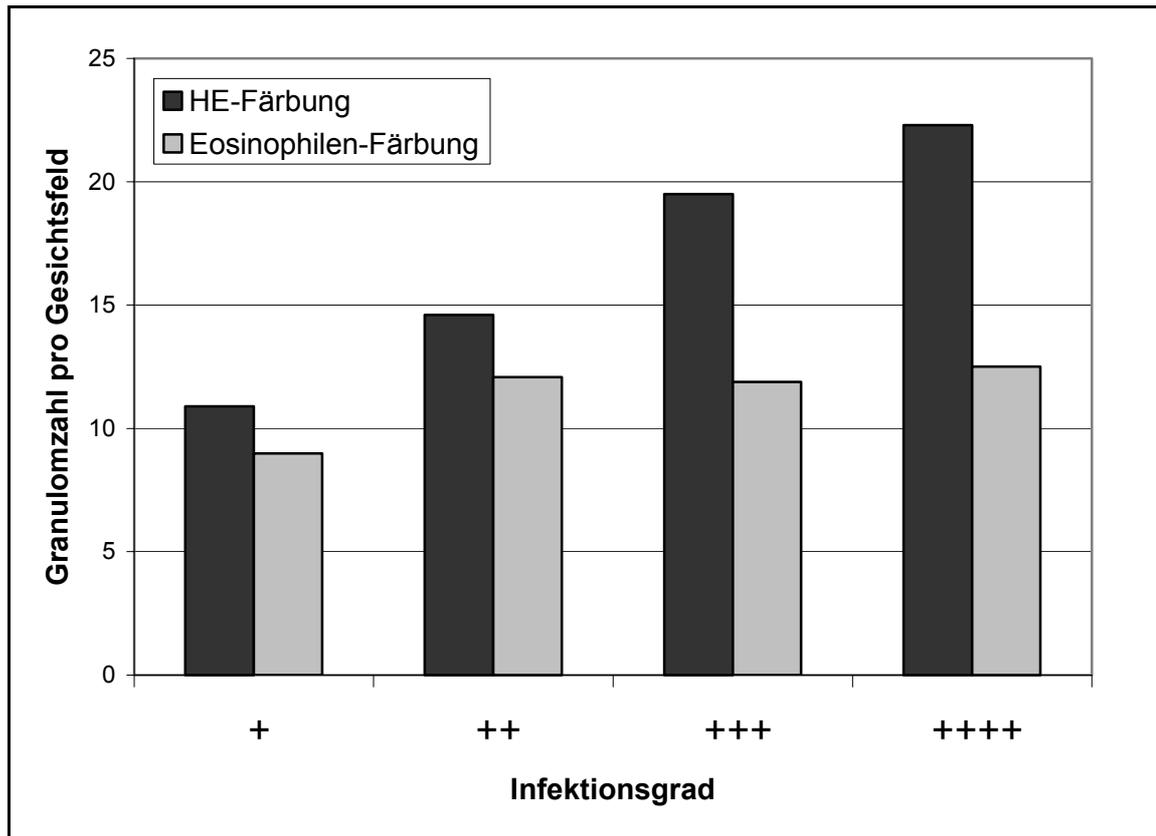


Abbildung 6.8: Unterschiede in der Granulomidentifikation bei verschiedenen Färbemethoden. – An Leberpräparaten von BL/6-Mäusen wurde die Abhängigkeit der Granulomidentifikation von HE-Färbung (schwarz) und Eosinophilen-Färbung (grau) in den 4 unterschiedenen Infektionsgraden + bis +++++ untersucht. Von den angewendeten Färbemethoden erwies sich die klassische HE-Färbung zur Beurteilung der Granulomgesamtzahl als überlegen. Als einzige der zellspezifischen Färbemethoden lässt die Eosinophilen-Färbung ein gleichwertiges Ergebnis erwarten, da Eosinophile Granulozyten in jedem Eigranulom zu finden sein sollten. In der Graphik wird deutlich, dass bei höheren Infektionsgraden mittels Eosinophilen-Färbung keine zusätzlichen Granulome mehr identifiziert werden können, während die Anzahl gefundener Granulome in der HE-Färbung - die Granulome über deren Morphologie identifiziert - einen linearen Anstieg zeigt. Bei Eosinophilen-Färbung wird durch die hohe Sättigung der Lebersinusoiden mit Eosinophilen bei stark infizierten, Granulom-reichen Mäuselebern eine Abgrenzung einzelner Eosinophilenester sehr schwierig und in älteren Knoten sind nur noch wenige dieser Zellen enthalten.

In Abb. 6.8 wird gezeigt, dass die Granulomzahlen bei beiden Techniken schwach korrelieren, wobei der Anstieg in der Eosinophilen-Färbung geringer ausgeprägt ist. Dies ist Folge der verminderten Abgrenzbarkeit einzelner Granulome, da z.B. in Gefäßnähe Eosinophile Granulozyten auch außerhalb der Abwehrzellnester vorkommen.

Die granulomatöse Binnenstruktur ist, wie weiter unten aufgeführt, nur in älteren Granulomen voll ausgeprägt, wodurch es schwierig wird, Abwehrzell-Ansammlungen um pathogene Materialien von Zellansammlungen in den Sinusoiden zu unterscheiden.

Daher haben wir uns für die histologische Gewebe-Anfärbung entschieden. Der Platz der Immunohistochemie ist dagegen in der Differenzierung der einzelnen Abwehrzellen zur Beurteilung des Granulomaufbaus zu suchen, da hier die HE-Färbung nicht zuverlässig genug zwischen den Zelltypen differenzieren kann.

6.2.2. Granulomdichtebestimmung in anderen Organen

Im Gegensatz zu den Leberschnitten erbrachten die Granulom-Auszählungen in anderen untersuchten Organen keine ausreichend große Zahl, um signifikante Ergebnisse daraus ableiten zu können.

Abb. 6.9 zeigt als Beispiel die Granulomzahl im angenommenen Hauptmanifestationsorgan, dem Darm, wobei ein ca. 1,5-2,0 cm langer Abschnitt des proximalen Colons direkt distal der Bauhin'schen Klappe im Längsschnitt mit Hämatoxylin und Eosin-Gegenfärbung aufbereitet wurde. Die wenigen Granulome zeigen sich fast ausschließlich in den Peyer'schen Plaques und dem subserösen Gewebe. Allerdings befinden sich viele Schistosomen-Eier in den Zotten, von wo aus sie ins Darmlumen übertreten. Innerhalb des submukösen Gewebes befindet sich das Pathogen jedoch zu kurz, um eine entsprechende Abwehrreaktion auslösen zu können. Somit sind die sichtbaren Eier in ihrer Anzahl nicht unmittelbar an die Granulombildung im Colon gebunden.

Diese Beobachtungen ergeben, dass die Leber zur Beurteilung der Granulomdichte wesentlich besser geeignet ist als der Darm, in dem die Wurmeier nur kurze Zeit im Bindegewebe und somit in Reichweite des körpereigenen Phagozyten-Systems verbringen.

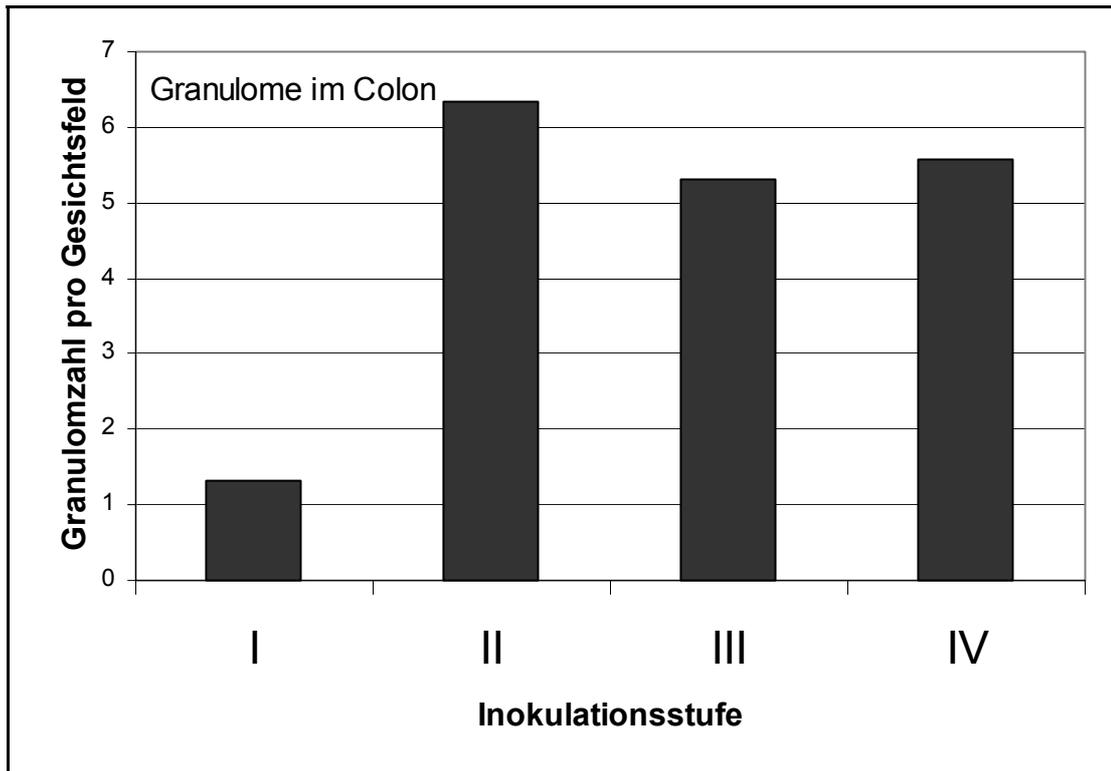


Abbildung 6.9: *Ei-Granulome im proximalen Colon der BL/6-Mäuse als Beispiel für den Colon-Befall.* – Für die 4 unterschiedenen Inokulationsstufen I bis IV ist die mittlere Granulomzahl pro Gesichtsfeld angegeben. Man erkennt die nahezu konstante Granulomzahl in den höheren Inokulationsstufen. Daher eignet sich das Colon nicht zum Vergleich zwischen einzelnen Mausstämmen.

Auch die Milz erweist sich in dieser Hinsicht als unzureichend in der Beurteilbarkeit ihrer Abwehrsituation, da die Milz sämtlicher mit Pärchenegeln infizierter Tiere im Bereich der gesamten Pulpa mit Eosinophilen gefüllt ist und somit eine spezifische Anfärbbarkeit erschwert wird. Obwohl es einige subkapsulär gelegene Ei-Granulome gibt, führt die im Schnittpräparat gefundene Anzahl nicht über das Ergebnis der makroskopisch erhebaren Befunde hinaus. In den Sinusoiden des Milzparenchyms und im Bereich der Follikel finden sich keine Eier, lediglich im bindegewebigen Oberflächenbereich, wohin sie durch direkte Wanderung im Rahmen ihrer zytolytischen Fähigkeiten gelangen können, wenn sie zum Beispiel die Leberkapsel in die Abdominalhöhle durchbrechen.

6.3. Vergleich zwischen den Mausstämmen

Es sollen jetzt die Ergebnisse der Untersuchung oben genannter Parameter bei den im Versuch verwendeten Mausstämmen vorgestellt werden. Dazu werden die einzelnen Versuchsreihen untereinander verglichen, und zwar zuerst NMRI- mit BL/6-Mäusen, anschließend BL/6- mit K.O.-Mäusen, schließlich werden noch einige BL/6-Männchen gleichgeschlechtlichen K.O.-Mäusen gegenübergestellt, um den Ausprägungsgrad eventueller Unterschiede zwischen den Geschlechtern, vor allem was Wurm- und Wirts-Entwicklung betrifft, festzustellen.

Im ersten Abschnitt werden diese Gruppen in Bezug auf die Ausprägung die makroskopisch erhebbaren Parameter und die Anzahl ausgezählter Granulome in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung verglichen. Die einzelnen immunhistochemischen Untersuchungen werden separat beschrieben, wobei ein Gesamtüberblick über die Mausstämme erfolgt. Am Ende dieses Kapitels werden auch die bereits vorher angeführten Nebenbefunde diskutiert.

6.3.1. Vergleich von NMRI- und BL/6-Mäusen

Die beiden Mausstämme unterscheiden sich äußerlich nicht nur durch die Farbe, sondern wiegen auch im gleichen Entwicklungsstadium unterschiedlich viel. So ist die BL/6-Maus oft um 20% leichter als ihre weißen Artverwandten im gleichen Alter. Die Gewichtszunahme in beiden Gruppen während des Zeitraumes zwischen Cercarien-Inokulation und Organgewinnung ist in Tab. 6.1 aufgezeigt.

	NMRI ♀			BL/6 ♀		
	Gewicht a.i. (g)	Gewicht p.i. (g)	Zunahme (g)	Gewicht a.i. (g)	Gewicht p.i. (g)	Zunahme (g)
Mittelwert	26,9	34,9	8,1	18,8	23,6	4,8
Standardabw.	2,3	3,5	2,9	0,9	1,3	1,3

Tabelle 6.1: Gewichtszunahme (in g) von NMRI- und BL/6-Mäusen im Beobachtungszeitraum von 8 Wochen. – Wie man erkennt, werden die NMRI-Mäuse deutlich schwerer als die BL/6-Mäuse. Ähnliche Differenzen zwischen beiden Mausstämmen lassen sich auch in der Körperlänge beobachten (diese Daten wurden nicht erfasst). Das so entstehende unterschiedliche Verteilungsvolumen wird als eine mögliche Ursache für die Unterschiede in der Granulom-Verteilung in den untersuchten Organen zwischen den Mausstämmen erachtet.

Abb. 6.10 zeigt in der linken Spalte den Größenunterschied zwischen den Lebern einer NMRI-Maus (Infektionsgrad leicht) und einer BL/6-Maus (Infektionsgrad mittel) bei gleicher Inokulationsstufe I. In der mittleren Spalte folgt die Gegenüberstellung für die Inokulationsstufe II und in der rechten Spalte die Gegenüberstellung für Inokulationsstufe III. Deutlich sichtbar sind die oberflächlichen Granulome, die im frischen Präparat weiß auf der ansonsten roten Leber imponieren.

Die oberflächlich erkennbaren Granulome lassen sich in gleichem Verhältnis im Inneren des Organs nachweisen. Die Wurmzahlen variieren nicht so ausgeprägt zwischen beiden Versuchsreihen, doch auch hier zeichnet sich die Tendenz eines größeren Gewinnes aus den BL/6-Mäusen ab.

Tab. 6.2 zeigt die mittlere Wurmausbeute unterteilt nach Geschlecht in den beiden verglichenen Mausstämmen.

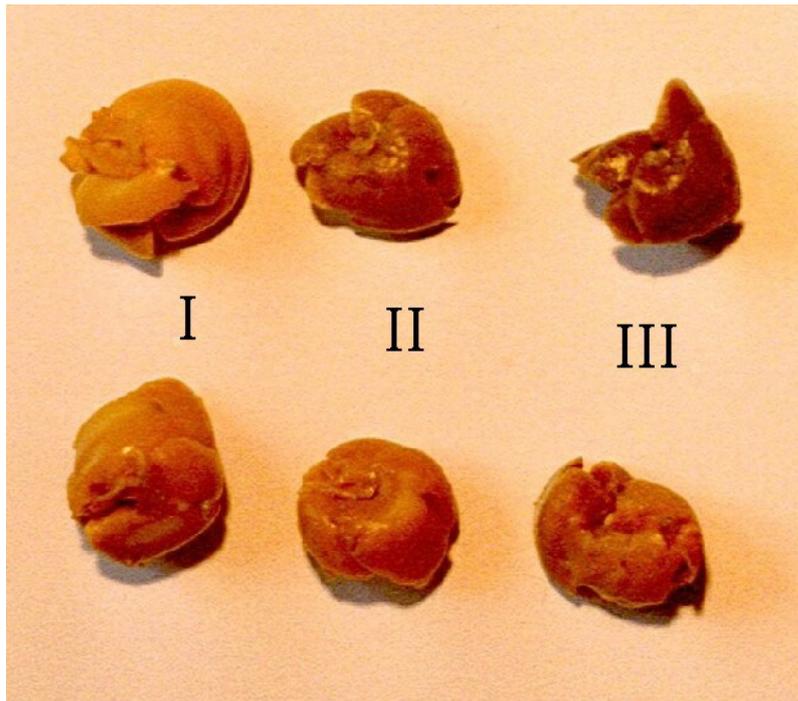


Abbildung 6.10: Makroskopischer Vergleich von Lebern in den Inokulationsstufen I, II und III bei NMRI-Mäusen (untere Reihe) und BL/6-Mäusen (obere Reihe). – Aufnahme von bereits in Formalin konservierten Organen. Durch die retrograde Durchspülung der Lebern mit Zitratlösung sind die Blutgefäße und Sinusoide entfärbt, so dass die Organe beige zur Darstellung kommen. In den stärker befallenen Lebern (rechts) hält sich bei Durchspülung mehr Blut in den kleinen Gefäßen, da diese durch Granulome teilweise okkludiert sind und somit insbesondere bei Umkehrung des Blutstromes zum Verschluss neigen. Diese Lebern sind daher in der Abbildung an der dunkleren Färbung zu erkennen. Das Organ selbst wird durch die fibrösen Veränderungen deutlich steifer, was die BL/6-Stufe-III-Leber (oben rechts) demonstriert, die auch nach Lösung aus der Maus nicht die erschlaffte Haltung der übrigen abgebildeten Lebern eingenommen hat. Man erkennt außerdem die dunklere Färbung der BL/6-Lebern, die stärker ausgeprägt ist als bei NMRI-Lebern gleicher Inokulationsstufe, was den stärkeren Organ-Befall bei den BL/6-Mäusen verdeutlicht.

Inokulationsstufe	NMRI		BL/6	
	Würmer			
	♂	♀	♂	♀
I	0,33	0,33	2,00	1,33
II	4,33	3,00	5,67	5,00
III	13,00	7,50	15,00	14,00

Tabelle 6.2: Anzahl ausgeschwemmter Würmer bei NMRI- und BL/6-Mäusen. – Man erkennt aus der Tabelle eine vermehrte Ausspülbarkeit von Schistosomen aus den BL/6-Mäusen gegenüber den größeren NMRI-Mäusen bei gleicher inokulierter Cercarienmenge. Dadurch zeigt sich umso deutlicher, wie wichtig es ist, genetisch möglichst nahe stehende Mausstämme zum Vergleich zu verwenden (wie BL/6 und K.O.), da offenbar die Wurmentwicklung oder die Wurmverteilung im Organismus bei den genetisch weiter auseinander liegenden Stämmen unterschiedlich sein muss, um die hier dargestellten Ergebnisse zu erzeugen. – Nebenbefundlich zeigt sich, dass in beiden Versuchsgruppen das Geschlechter-Verhältnis der Würmer zugunsten der Männchen verschoben ist. Hierfür kommen u.a. mechanische Probleme bei der Extraktion der verknäuelten Schistosoma-Weibchen in Frage.

In der folgenden Aufstellung wird ein Vergleich der ausgezählten Lebergranulome bei Weibchen beider Stämme vorgenommen. Wie Abb. 6.11 zeigt, sind bei BL/6-Mäusen im direkten Vergleich weitaus mehr Granulome in den einzelnen Gesichtsfeldern zu finden als bei den größeren NMRI-Mäusen. Dies könnte, wie oben bereits angeführt, so gedeutet werden, dass der Abfluss der beim BL/6-Stamm kleineren Lebergefäße durch die Granulome stärker gehindert wird, und so die steckengebliebenen Eier das Agens für neue Granulome bilden, wodurch sich die Situation in einem Circulus vitiosus ständig verschlechtert. Dagegen spricht jedoch, dass Aszites bei den beiden Gruppen nicht mit signifikant unterschiedlicher Häufigkeit auftrat.

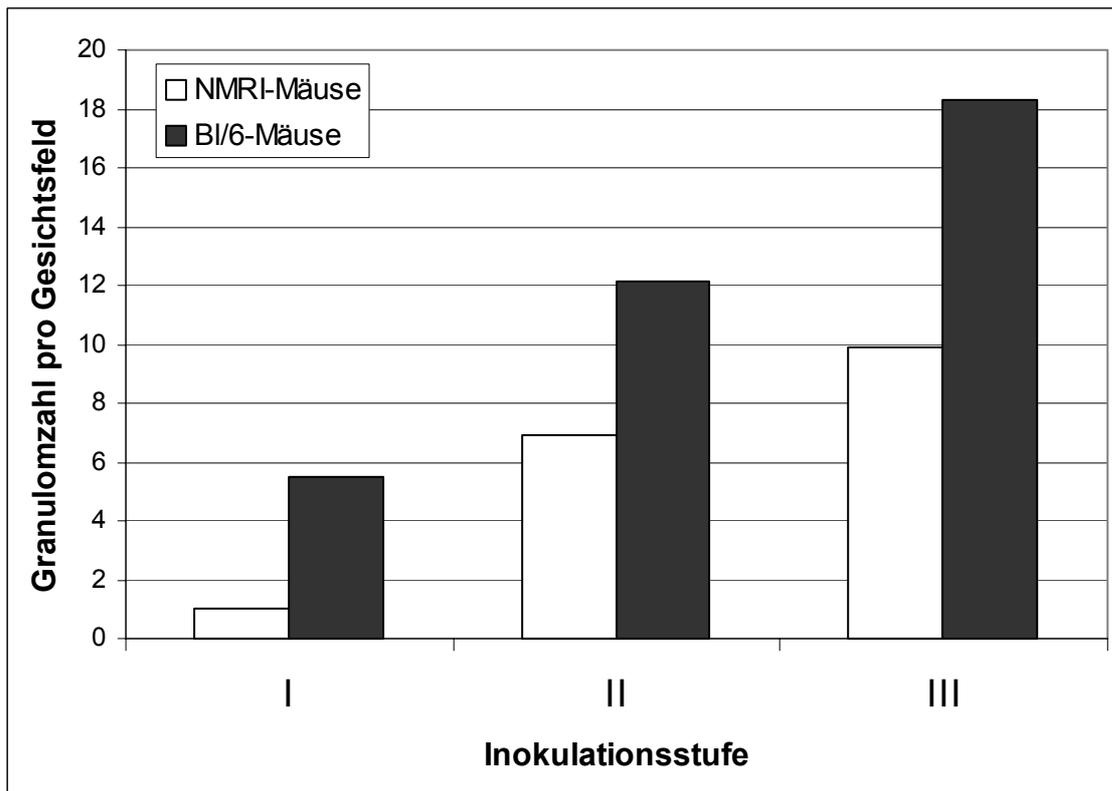


Abbildung 6.11: Vergleich der Leber-Granulomzahlen pro Gesichtsfeld von NMRI-Mäusen (weiß) und BL/6-Mäusen (schwarz). – Die Grafik präsentiert von links nach rechts die Inokulationsstufen I - III. Man kann erkennen, dass die Granulomzahl proportional zur injizierten Cercarienmenge ansteigt. Die BL/6-Mäuse weisen in jeder Inokulationsstufe signifikant höhere Granulomzahlen in der Leber auf, als entsprechende NMRI-Mäuse.

Auch scheint sich im Vergleich der beiden Stämme kein direkter Bezug des Aszites zur Stärke des Leberbefalles beziehungsweise zur Granulomzahl zu ergeben. Dies kann dadurch erklärt werden, dass ganz bestimmte Gefäße verlegt sein müssen, um eine entsprechende klinische Symptomatik hervorzurufen. Dies wird mit steigender Granulomzahl zwar wahrscheinlicher, ist jedoch nicht automatisch erfüllt. Zu einer endgültigen Klärung der Aszitesentstehung wäre eine Überprüfung der gesamten beteiligten Organsysteme notwendig. Vorerst soll an dieser Stelle nur festgestellt werden, dass Flüssigkeitsansammlungen in der Bauchhöhle nicht als Parameter zur Festlegung des durch Granulome befallenen Leberanteils geeignet sind.

Die eben vorgestellten Befunde ergeben, dass BL/6-Mäuse von Natur aus mehr Granulome bilden als ihre weißen Gegenparts. Daher sind sie zum Vergleich mit der Ver-

suchsgruppe der K.O.-Maus besser geeignet als die sonst für Experimente übliche NMRI-Maus. Schließlich sollte bei Rassen-Unterschieden der genetisch am nächsten stehenden Maus-Rasse der Vorzug gegeben werden. Die für diese Arbeit verwendeten K.O.-Mäuse, sind wie oben beschrieben, mehrfach mit BL/6-Stämmen rückgekreuzt, so dass eine hohe Übereinstimmungsrate der Genome beider Rassen angenommen werden darf.

6.3.2. Vergleich von BL/6 und K.O.-Mäusen

Beim Vergleich zwischen den beiden Hauptversuchsgruppen BL/6- und K.O.-Maus sind die Unterschiede in der Gewichtszunahme weniger stark ausgeprägt als beim NMRI-BL/6-Vergleich. Auch hier liegt eine deutliche Tendenz vor, diesmal allerdings zugunsten der BL/6-Mäuse. Der K.O.-Stamm ist zu Versuchsende, also im ausgewachsenen Zustand, leichter, wie Tab. 6.3 zeigt.

	BL/6 ♀			K.O. ♀		
	Gewicht a.i. (g)	Gewicht p.i. (g)	Zunahme (g)	Gewicht a.i. (g)	Gewicht p.i. (g)	Zunahme (g)
Mittelwert	18,8	23,6	4,8	20,0	21,8	1,9
Standardabw.	0,9	1,3	1,3	0,9	1,0	0,9

Tabelle 6.3: Gewichtszunahme (in g) von BL/6- und K.O.-Mäusen im Beobachtungszeitraum von 8 Wochen. – Die Tabelle zeigt eine höhere Gewichtszunahme der BL/6-Mäuse im Vergleich zu den K.O.-Tieren. Der Körperlängenunterschied (Daten nicht erfasst) war etwas geringer ausgeprägt. Die Konstellation führt zu einem größeren Verteilungsvolumen (größere Organe) bei den BL/6-Mäusen. Die Unterschiede sind jedoch weit weniger ausgeprägt als zwischen den im Vorversuch untersuchten NMRI- und BL/6-Mäusen.

Die Mäuselebern sind in beiden Gruppen relativ stark befallen. Durchschnittlich zeigt sich jedoch vor allem bei den niedrigen Inokulationsstufen, dass die Leber der BL/6-Tiere bei makroskopischer Beurteilung stärker befallen ist. Abb. 6.12 belegt diesen Umstand, der auch mikroskopisch nachweisbar ist, wie unten näher aufgeführt wird.

Weiterhin wurde das Auftreten von makroskopisch erkennbaren Milz-Granulomen fast ausschließlich in BL/6-Mäusen beobachtet. Gleiches trifft für die begleitenden ödematösen Veränderungen des Pankreas zu. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Unterschied zwischen den Inzidenzen dieser Phänomene nur als Nebenbefund erhoben, ohne die Ursache näher zu untersuchen. Aszites wurde bei K.O.-Mäusen ähnlich häufig wie in der Kontrollgruppe festgestellt, so dass auch hier die Flüssigkeitsansammlung kein Bestimmungsparameter für den Absolut-Befall der Leber darstellt.



Abbildung 6.12: *Vergleich der Leber zwischen BL/6-Mäusen (obere Reihe) und K.O.-Mäusen (untere Reihe). – Aufnahme von bereits in Formalin fixierten Organen nach Durchspülung. Ganz links sind zum Vergleich gesunde Lebern beider Stämme abgebildet. Man erkennt bei von links nach rechts zunehmender Inokulationsstufe eine stärkere Zunahme des Befalls (Infektionsgrad) bei den BL/6-Mäusen. Wie auch im Leber-Vergleich zwischen BL/6- und NMRI-Mäusen (vergl. Abb. 6.10) kann man auf dem Foto bei bereits durch die Spülung entfärbten Lebern, Granulome nicht mehr gut erkennen, jedoch halten die stärker Granulom-belasteten Lebern (rechts im Bild) mehr Blut in den kleinen Gefäßen zurück – was sich an der dunkler braunen Färbung erkennen lässt – im Gegensatz zu den gesunden Lebern beider Mäusegruppen (links im Bild).*

Die Milzgranulome sind in der Histologie nur oberflächlich unter der Milzkapsel zu erkennen. In der Pulpa sind die Veränderungen sowohl in der HE-Färbung, als auch im immunhistochemischen Nachweis nicht von den organotypischen Follikeln abzugrenzen. Letzterer Nachweis wird durch die natürliche immunmodulatorische Funktion des Or-

gans und seine starke Durchblutung behindert. Da durch den parasitären Befall eine starke Eosinophilie herrscht, sammeln sich entsprechend anfärbbare Granulozyten in großen Mengen in den gefäßangelagerten folliculären Strukturen. Auch in den Sinusoiden der roten Pulpa lassen sich viele Granulozyten erkennen, die zusätzlich zum eben genannten Befund die Ausmachung pathologischer Abwehrzellnester erschweren.

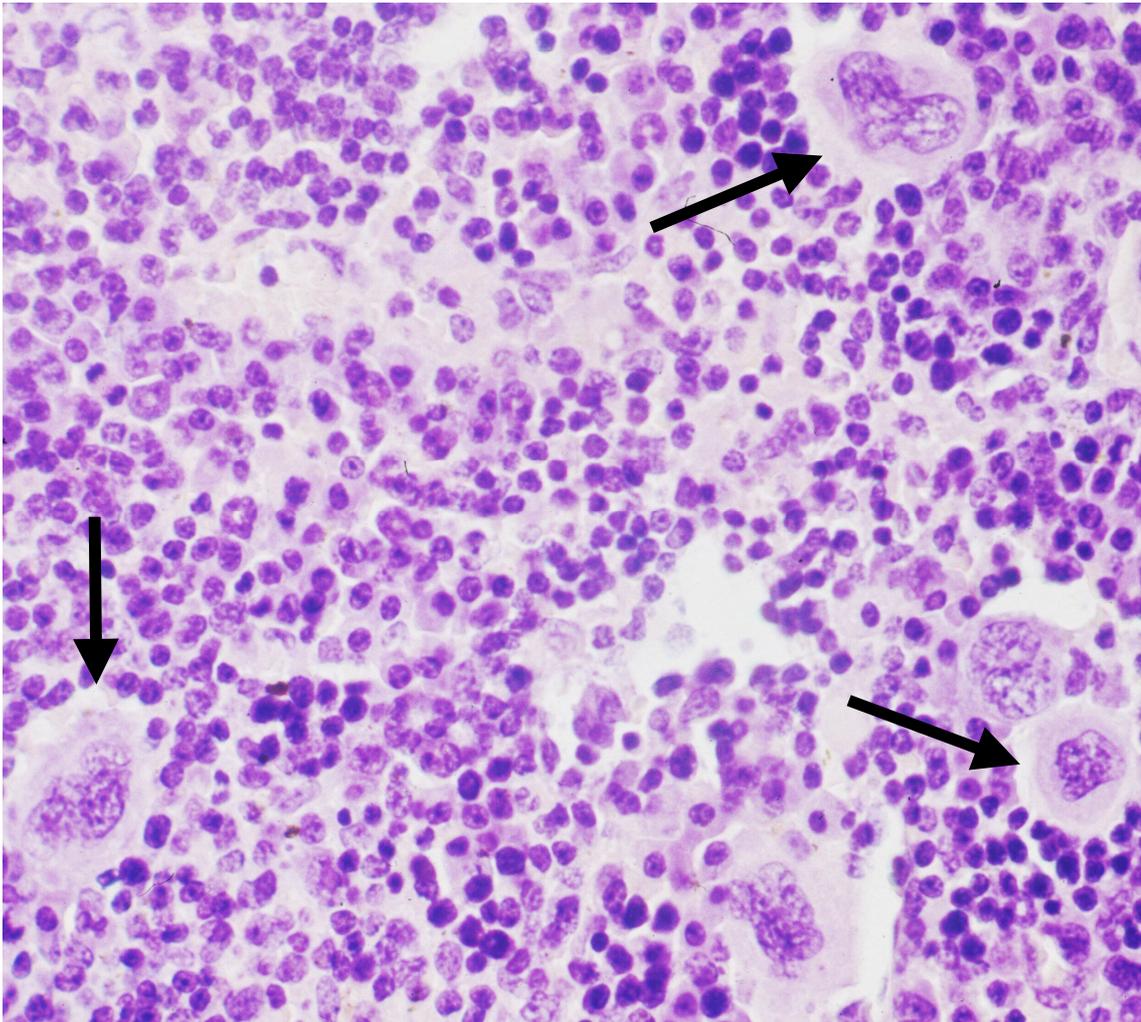


Abbildung. 6.13: Milz mit mehrkernigen Riesenzellen (400-fach vergrößert). – Man erkennt leukozytenreiches Pulpa-Gewebe mit mehrkernigen Riesenzellen (durch Pfeile markiert). Diese Riesenzellen kamen in Mäusen ohne Schistosomen-Infektion nicht zur Darstellung. In immunhistochemischen Färbungen lassen sich in der Milz massenhaft Granulozyten nachweisen, jedoch zeigen sich Granulome nicht in der Pulpa, sondern nur gelegentlich in höheren Infektionsgraden in der Milzkapsel.

Auffällig ist das Vorkommen von Riesenzellen, die große Kerne mit aufgelockelter inhomogener Chromatinstruktur besitzen und zum Teil mehrere Nuclei aufweisen (vergl.

Abb. 6.13). Sie sind ohne festes Muster in der Milz verteilt. Ihre Funktion könnte eine Abwehrreaktion auf das pathogene Agens Schistosoma-Ei sein, doch ist bislang keine derartige Veränderung bei anderen Säugern, einschließlich des Menschen beschrieben.

Die Wurmzahl brachte in diesem Versuch, wie im NMRI-BL/6-Vorvergleich, keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Mausvarianten. Die durchschnittliche Wurmzahl, die in den einzelnen Inokulationsstufen ausgespült werden konnte, wird in Tab. 6.4 demonstriert.

Inokulationsstufe	BL/6 ♀		K.O. ♀	
	Würmer			
	♂	♀	♂	♀
I	2,67	1,83	3,33	1,67
II	8,83	3,67	5,17	3,33
III	12,75	5,00	16,33	4,00
IV	14,50	8,50	10,67	4,00

Tabelle 6.4: *Mittlere Anzahl ausgeschwemmter Würmer bei weiblichen BL/6- und K.O.-Mäusen. – Verglichen werden die ausgeschwemmten männlichen und weiblichen Würmer beider Gruppen in den vier beschriebenen Inokulationsstufen (I bis IV). Man erkennt in beiden Gruppen steigende Wurmzahlen mit steigender Inokulationsstufe. Der Unterschied in den Wurmgesamtzahlen ist nur gering zwischen den beiden Mausstämmen ausgeprägt, mit einer etwas kleineren durchschnittlichen Wurmzahl auf Seiten der K.O.-Mäuse.*

Erkennbar ist eine nur geringfügige Verschiebung zugunsten der BL/6-Mäuse bei hohen Inokulationsstufen. Allerdings kann zusammenfassend festgehalten werden, dass ein gewisser Sättigungswert für Würmer in den Mäusen existiert. Bei sehr hohen Cercariendichten scheinen nicht mehr alle Würmer zur Entwicklung im Wirt zu kommen. Dass sogar ein leichter Rückgang der Parasitenzahl bei der am stärksten mit Cercarien gesättigten Lösung vorkommt, kann mit der Streuung der Methode der Wurmausspülung zusammenhängen. Möglich wäre aber auch, dass die sich am schnellsten entwi-

ckelnden Schistosomen die Reifung ihrer Artgenossen im Wirt behindern, damit die Konkurrenz um das begrenzte Substrat ausgeschaltet wird. So wäre es möglich, dass die Regulation durch Produktion eines entwicklungshemmenden Stoffes entsteht, der sich im Wirtsorganismus verteilt. Je nach Größe des befallenen Tieres erreicht dieser Inhibitor dann verschieden schnell die wirksame Konzentration im Körper. Dadurch würden weniger weit entwickelte Tiere gehemmt. Solch ein Hemmstoff konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden. Allerdings wird diese These auch dadurch unwahrscheinlicher, dass die beteiligten Cercarien am selben Tag aus den Wasserschnecken schlüpfen, so dass ihr Funktionsalter einheitlich sein sollte.

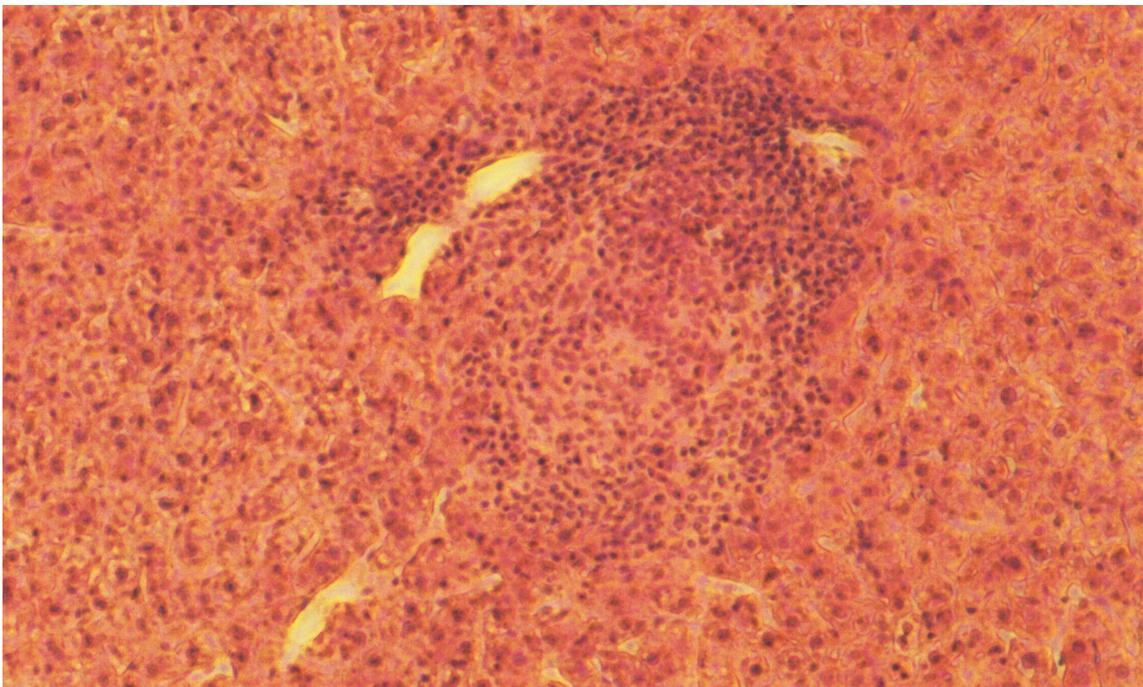


Abbildung 6.14: *Frisches Granulom in Form einer Granulozytenansammlung (100-fach vergrößert). – Man erkennt außerdem im Zentrum größere hellere Zellkerne, die aktivierten Makrophagen zuzuordnen sind. In der Peripherie sind kleinere, dichter wirkende Zellkerne zu sehen, bei denen es sich um Lymphozyten handelt, welche einen Teil der Interleukine zur Makrophagenaktivierung und Einleitung der spezifischen Abwehrreaktion bilden. Das zentrale pathogene Agens, das Schistosoma-Ei, ist auf dieser Abbildung nicht zu sehen, da das kugelförmige Granulom in der Peripherie angeschnitten wurde.*

Der mikroskopische Befund zeigt deutlich mehr Granulome bei den abwehrkompetenten BL/6-Mäuse. Insgesamt weisen die Granulome innerhalb der beiden Versuchsreihen

außer in der Anzahl auch in der Struktur klar erkennbare Unterschiede auf. Häufig wirken die entzündlichen Herde in den TNF- α -Defekt tragenden Mäusen etwas kleiner und ungeordneter (s. Abb. 6.14). Diese Organisationsunterschiede werden in der immun-histochemischen Aufbereitung genauer betrachtet werden.

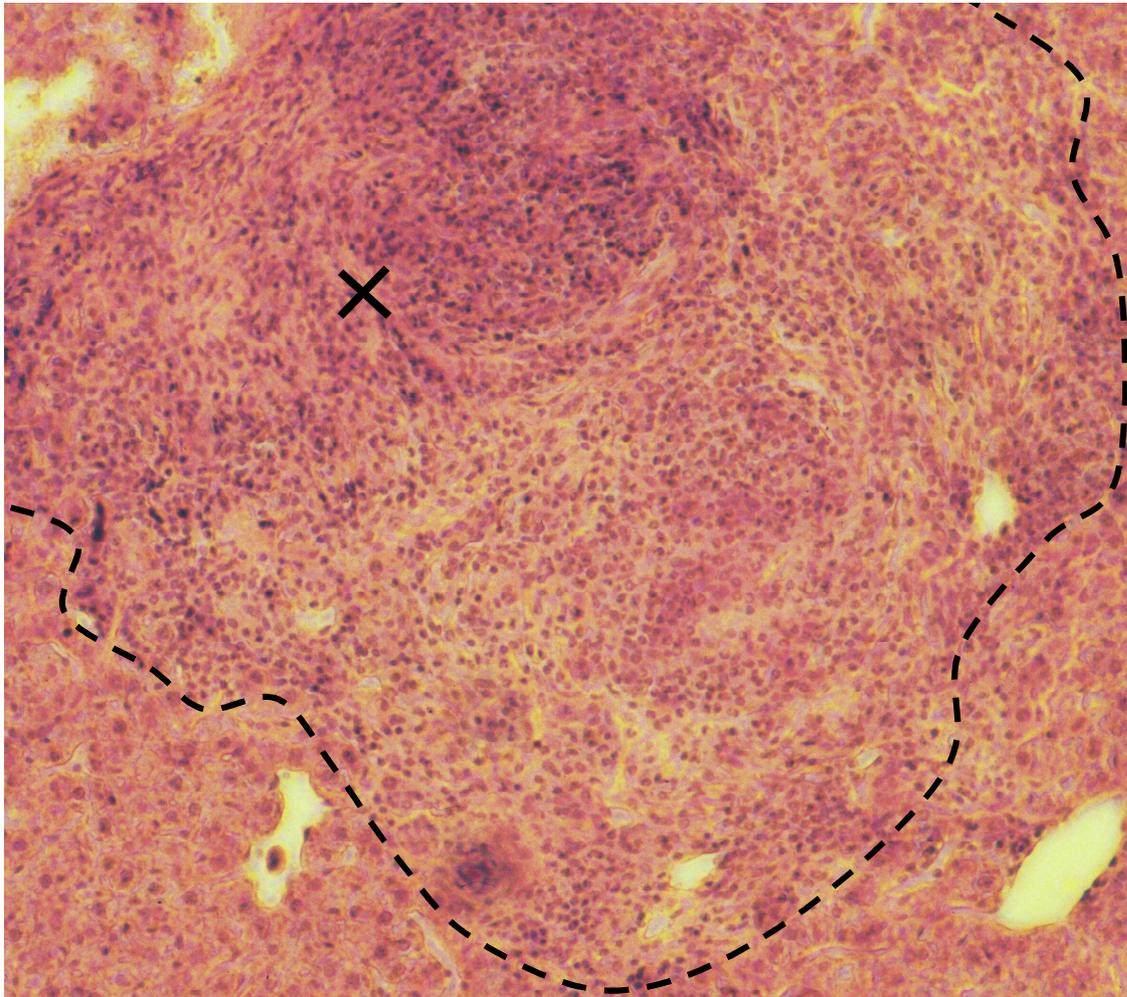


Abbildung 6.15: *Organisiertes Granulom (HE-Färbung, 100-fach vergrößert). – Die Strukturen sind in Auflösung begriffen, es kommt bereits zur bindegewebigen Umwandlung im aufgelockerten zentralen Bereich (x). Hier sind auch noch einige Granulozyten zu finden, während sich in der Peripherie (innerhalb der Linie - - -) verhältnismäßig viele Makrophagen und Fibroblasten darstellen, erkennbar an den größeren und blasseren Zellkernen. Im Rahmen der fortschreitenden Vernarbung wird das Bindegewebe zunehmen und durch die Narbenzüge werden kleine Gefäße komprimiert. Außerhalb der Markierung sind gesunde Leberzellen zu erkennen.*

Deutlich zu sehen sind bei vielen der bereits ausgereifteren Granulome in der TRp55^{-/-} Gruppe zipfelartige Ausziehungen ins umliegende Lebergewebe, wohingegen die Granulome bei der Gen-gesunden Kontrollgruppe glatt gegenüber dem Rest des Organs abgegrenzt sind. Auch sind bei den K.O.-Mäusen wesentlich öfter Schistosomen-Eier zu finden, die noch nicht von Abwehrzellen zu einer isolierten Struktur umschlossen sind. Die selteneren ausgereiften Granulome jedoch enthalten vergleichsweise häufig mehr als ein Ei. Fibröser Umbau der Granulome (s. Abb. 6.15) zeigt sich bei immuninkompetenten Mäusen viel seltener als bei BL/6-Mäusen.

6.3.3. Vergleich männlicher BL/6- und K.O.-Mäuse

Die männlichen BL/6- und K.O.-Mäuse wachsen nach Inokulation der Cercarien im Alter von 8 - 12 Wochen um einiges stärker als weibliche Tiere. Das bedeutet freilich auch, dass sie stärker an Gewicht zunehmen.

Inokulationsstufe	BL/6 ♂		K.O. ♂	
	Würmer			
	♂	♀	♂	♀
I	1,67	0,33	0,67	1,00
II	0,67	1,00	1,67	0,33

Tabelle 6.5: *Mittlere Anzahl ausgeschwemmter Würmer bei männlichen BL/6- und K.O.-Mäusen. – Es handelt sich um einen Versuch mit einheitlicher Cercariensuspension und nur zwei Inokulationsstufen (I - II). Man erkennt weder zwischen den beiden Inokulationsstufen, noch zwischen den beiden Mausstämmen wesentliche Unterschiede in der Anzahl durchschnittlich ausgeschwemmter Würmer. Auffällig ist jedoch die insgesamt geringe Wurmzahl in männlichen Mäusen und das Überwiegen männlicher Schistosomen. Dies erklärt die relativ geringe Granulomzahl in den Lebern männlicher Mäuse, die auch in höheren Inokulationsstufen nicht zunimmt, entsprechend der kaum zunehmenden Wurmbürde.*

Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Unterschiede zu den untersuchten weiblichen Tieren könnten auf anderen Hormonstoffwechsellagen beruhen, da ein an Wachs-

tum orientierter Stoffwechsel vielleicht die Adaption des Wurmes an den Wirtskörper erschwert. Schließlich wird ein viel größerer Anteil an Rohstoffen direkt von den Wirtszellen verwertet.

Die männlichen Mäuse lassen makroskopisch deutlich weniger Würmer ausschwemmen als weibliche Tiere in gleichen Inokulationsstufen. Tab. 6.5 zeigt die in den K.O.- und BL/6-Männchen erfassten Daten.

Morphologisch gleichen sich die Abwehrzellnester in beiden Geschlechtern. Beim Vergleich der Granulomzahlen gibt es jedoch Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Mäusen, wie in Abb. 6.16 am Beispiel des K.O.-Stammes dargestellt wird. Es besteht eine Tendenz zu mehr Granulomen in weiblichen Tieren, was im Konsens zu den geringeren Wurmzahlen bei männlichen Mäusen steht.

Ebenso weisen die BL/6-Männchen neben den geringeren Wurmzahlen auch geringere Granulomzahlen gegenüber den Weibchen auf. Auch hier bestehen histomorphologisch keine Unterschiede. Aufgrund der kleinen Fallzahlen in diesem Nebenversuch lassen sich diese Unterschiede nur als Tendenz feststellen, die nicht näher zu deuten ist.

Zusammenfassend gilt bezüglich des Geschlechtervergleichs, dass bei den TNF-insuffizienten Mäusen keine signifikante Abweichung in der Granulomausbildung zwischen den beiden Geschlechtern besteht, wohl aber in der Granulomzahl, die im Männchen geringer ausfällt. Ebenso findet sich bei den männlichen BL/6-Tieren eine mit der ausgeschwemmten Wurmzahl korrelierende Verringerung der Granulomentwicklung. Diese verminderten Granulomzahlen lassen sich außer auf die geringere Gesamtwurmzahl auch auf das deutliche Übergewicht männlicher Schistosomen in männlichen Mäusen zurückführen.

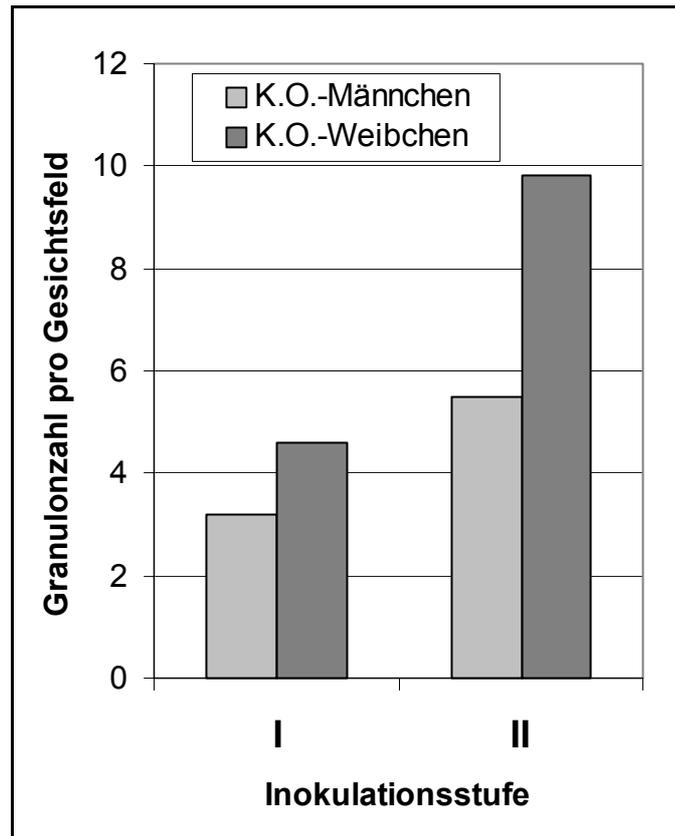


Abbildung 6.16: Vergleich der Granulomzahlen pro Gesichtsfeld bei K.O.-Männchen (hellgrau) und K.O.-Weibchen (dunkelgrau) in den Inokulationsstufen I und II. – Die Granulome wurden in Lebern (HE-Färbung) ausgezählt. Es zeigt sich, dass in den männlichen Tieren deutlich weniger Abwehrzellnester gefunden werden als bei weiblichen Tieren. Dies bestätigt jene Ergebnisse, die bei den ausspülbaren Würmern erhoben wurden, denn es wurden wesentlich weniger Würmer in männlichen Tieren gefunden, was die geringere Granulomzahl erklärt.

6.3.4. Immunhistochemie

Dieser Abschnitt beschreibt die an Gefrierschnitten erhobenen Befunde. Während die Eosinophilen Granulozyten mit der rein histochemischen Methode einer Peroxidase-Reaktion nachgewiesen werden, erfolgte die Untersuchung der anderen unten beschriebenen Abwehrzellen über die bereits aufgeführten Antikörper.

6.3.4.1. Eosinophile Granulozyten

Bei Wurmbefall von Säugern ist häufig eine Eosinophilie nachzuweisen, da die Peroxidase-haltigen Granula von Eosinophilen Granulozyten nach außen abgegeben werden können und dadurch auch Eindringlinge effektiv bekämpft werden, die zu groß für eine

Phagozytose sind. Diese Granulozyten erweisen sich im Experiment auch als beste Marker für die Schistosoma-Granulome. Sie stellen sich in der oben beschriebenen Peroxidasereaktion nach Auftragen des AEC-Substrats dunkelrot dar und weisen nach wie vor die granuläre Struktur auf, im Gegensatz zu antikörpermarkierten Zellen, die rundum auf ihrer Membran Antikörper tragen und daher nach der Färbung mit rotem Randsaum erscheinen (Abb. 6.17).

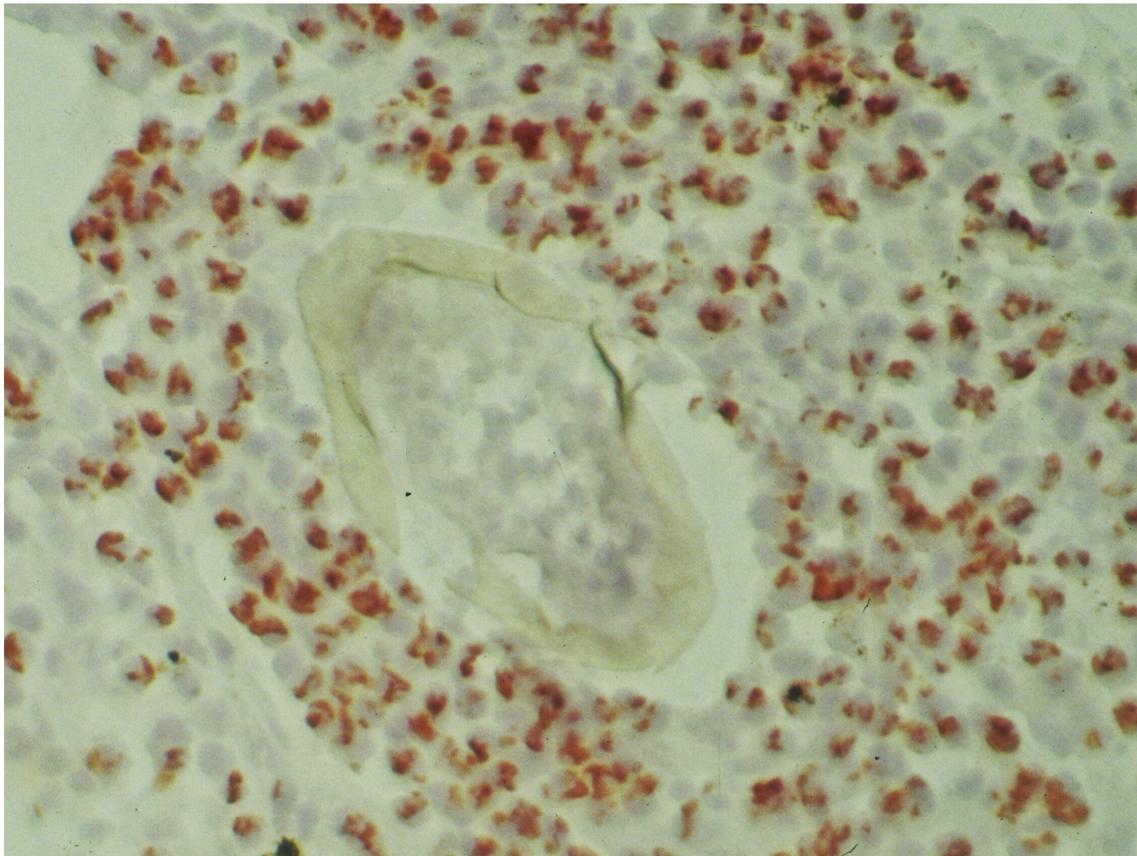


Abbildung 6.17: *Eigranulom mit Eosinophilen und zentralem Schistosoma-Ei (Eosinophilen-Färbung, 400-fach vergrößert). – Ansammlung von Eosinophilen Granulozyten in einem Eigranulom durch Peroxidase-Reaktion sichtbar gemacht. Diese Reaktion färbt zwar auch die Neutrophilen an, jedoch zeigt sich in spezifischer Anfärbung von Oberflächenantigenen dieser Zelllinie, dass Neutrophile Granulozyten nur in sehr geringer Zahl in frischen Eigranulomen vorkommen, so dass es sich in diesem Bild fast ausschließlich um Eosinophile Granulozyten handelt. Der relativ schmale Granulozytensaum um das zentrale Wurmei ist typisch für ein noch frisches Granulom, bei dem es noch zu keiner Makrophagenaktivierung kam.*

Neutrophile Granulozyten werden auf diese Art und Weise zwar auch angefärbt – schließlich enthalten auch sie Peroxidase-Granula – doch ist aus dem Vergleich mit der weiter unten untersuchten spezifischen Neutrophilen-Färbung erkennbar, dass letztere Abwehrzellgruppe keine solch großen Anreicherungen in den Mäuselebern bei Schistosoma-Befall erreicht. Nachgewiesene Granulozyten sind demnach fast ausschließlich eosinophil.

Die Anordnung der Eosinophilen Granulozyten im Granulom kann insgesamt in zwei Ausprägungen beobachtet werden: Entweder sind die rotgefärbten Leukozyten im gesamten Raum um das Ei zu finden oder sie befinden sich vorwiegend als Randsaum um ein bereits mit epitheloidartig umgewandelten Makrophagen ausgekleidetem und fibrös umgewandeltem Granulom (s. Abb. 6.18, rechte Spalte). Diese Form wird als älteres Granulom interpretiert, da sich hier fortgeschrittenere Zellstadien zeigen. Diese organisierten Granulome sind oft groß und um mehrere Eier geschlossen. Manchmal ziehen bindegewebig strukturierte Zipfel in die Umgebung.

Die ganz von Eosinophilen Granulozyten durchsetzten Granulome stellen wohl neuere Abwehrreaktionen dar, die von der ersten Verteidigungswelle, also den Peroxidase-positiven Zellen bearbeitet werden. Sie bestehen oft außer dem Ei als pathogenem Agens nur aus wenigen rot angefärbten Zellen, andere Immunozyten fehlen. Mit wachsender Eosinophilen-Zahl wird das Granulom größer und schließlich auch aufgelockert, weil andere Leukozyten ins Zentrum vordringen, um das Schistosomen-Ei zu ummauern. Diese Zellen werden in den folgenden Antikörperreaktionen spezifiziert werden.

Selten tauchen ganz Eosinophilen-freie, recht kleine Granulome auf, die besonders in direkter Nachbarschaft zu Gefäßwänden vorkommen. Deren Entstehung lässt sich so erklären, dass vielleicht die zuvor über die Granulozyten geschehene Abwehrstimulation bereits genügend spezifisch ausgerichtete Makrophagen angelockt hat, um neu hinzutretende Eier direkt zu umschließen, ohne sie vorher durch Demarkation für das monozytäre System zu kennzeichnen.

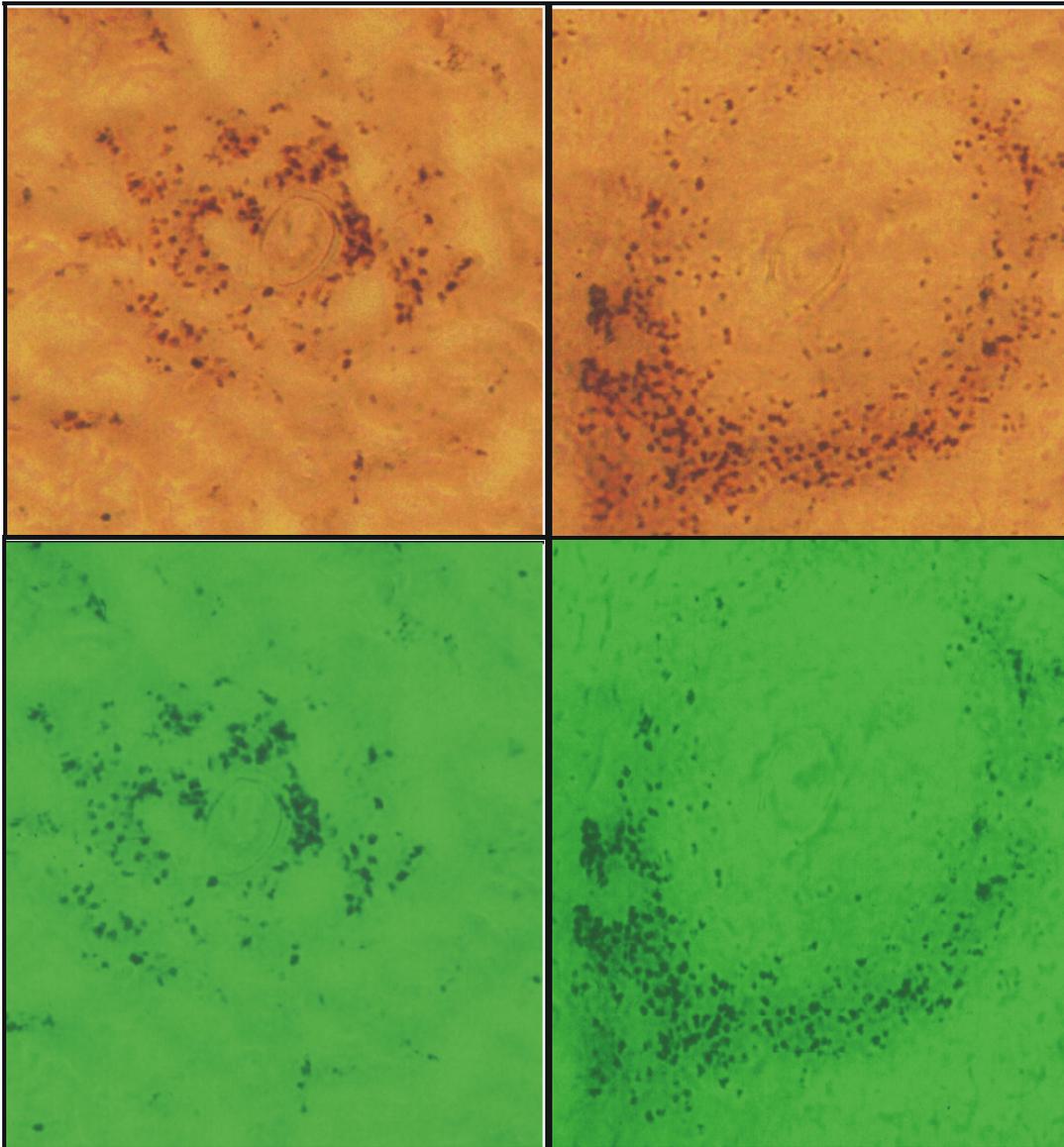


Abbildung 6.18: Vergleich eines Schistosomen-Ei-Granulomes einer K.O.-Maus (linke Spalte) mit einer entsprechenden Reaktion in der BL/6-Kontrollgruppe (rechte Spalte). Das selbe Granulom wurde jeweils mit einem Grünfilter (untere Reihe) und einem Gelbfilter (obere Reihe) aufgenommen (Eosinophilen-Färbung, Vergrößerung 100-fach). – Man erkennt die ausgeprägtere Strukturierung des rechten Granuloms mit einem aufgehellten Zentrum um das Ei und einem deutlichen, ringförmig um das Zentrum angeordneten Saum aus Abwehrzellen. Hingegen stellt sich das Granulom in der K.O.-Maus als unstrukturierte Ansammlung von Eosinophilen um das zentrale Ei dar. Während in den Gelbfilteraufnahmen die markierten Granulozyten gut zu erkennen sind, sieht man in den Grünfilteraufnahmen die gleichmäßige Granulomformation besonders gut gegen die Umgebung abgehoben.

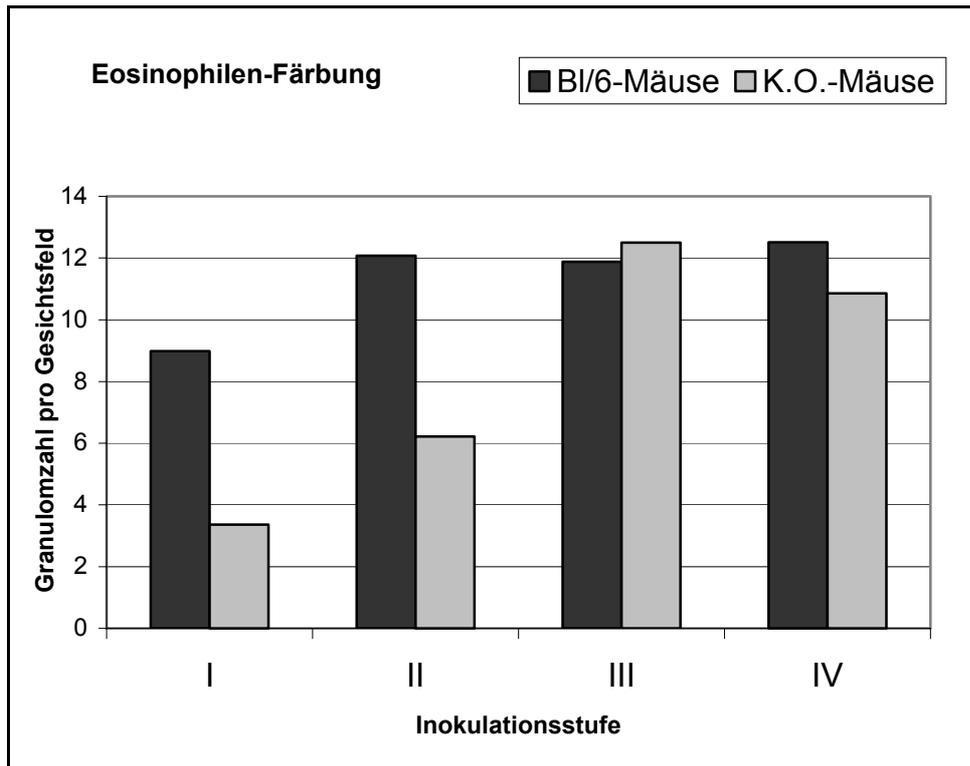


Abbildung 6.19: Vergleich der Auszählungsergebnisse (Granulome pro Gesichtsfeld) in Eosinophilen-Färbung der Leberpräparate von K.O.-Mäusen (grau) und BL/6-Kontrollen (schwarz) in verschiedenen Inokulationsstufen (I bis IV). – Während in niedrigen Infektionsgraden Eosinophilen-Granulome bei K.O.-Mäusen nur in geringer Zahl erfasst werden, zeigen sich in höheren Inokulationsstufen (III und IV) ähnlich hohe Zahlen in beiden Gruppen. Zwischen den beiden Inokulationsstufen erfolgt kein nennenswerter Anstieg. Dies erklärt sich wie folgt. Zum einen müssen die Eosinophilen-Zellnester strenger beurteilt werden, da sich viele Eosinophile in den Lebersinusoiden befinden. Durch die ungeordnete Granulomstruktur bei K.O.-Mäusen erfüllen weniger Zellansammlungen die exakten Voraussetzungen zur Anerkennung im Auszählverfahren, wenn lediglich die Anordnung eines einzelnen Abwehrzelltyps betrachtet wird. Wie bereits zuvor im Vergleich HE- und Eosinophilen-Färbung besprochen, ist bei höheren Infektionsgraden wegen der „Überladung“ der Leber mit Eosinophilen Granulozyten eine Unterscheidung zwischen Granulom und normalem Lebergewebe seltener möglich, so dass prozentual weniger Granulome gesichert werden können. So kommt es zu einem Sättigungseffekt, der beide in dieser Abbildung verglichenen Gruppen gleichermaßen betrifft. Außerdem kommen – wie bereits für HE-Färbung gezeigt – insgesamt weniger Granulome in K.O.-Mäusen zur Ausbildung.

Im Vergleich zwischen K.O.- und Gen-gesunden Mäusen präsentiert sich ein etwas verändertes Bild gegenüber der Histologie. Die Granulomzahlen sind in der reinen Anfärbung über AEC-Substrat-Zugabe in den höheren Inokulationsstufen nahezu gleich zwischen der BL/6- und K.O.-Gruppe, wie Abb.6.19 demonstriert. Mäuse mit geringerer Inokulation zeigen dagegen einen ähnlich starken Unterschied wie in der HE-Färbung. Dies erklärt sich durch die starke Streuung von Granulozyten in den meist nur rudimentär organisierten Granulomen der K.O.-Mäuse (s. Abb. 6.18, linke Spalte), die häufig zipfelartige Ausziehungen aufweisen. Wenn diese in Präparaten angeschnitten sind, werden sie als Granulom aufgefasst und gezählt, obwohl bei glatt begrenzten Granulomen vergleichbarer Größe, wie sie bei den BL/6-Tieren vorkommen solche Ausziehungen nicht vorhanden sind und daher auch nicht in benachbarte Schnittebenen hineinragen. Bei geringeren Granulomzahlen kommen insgesamt weniger dieser unregelmäßigen Granulome vor, da jene häufig durch die beschriebenen Ausläufer mit benachbarten Strukturen in Kontakt stehen. Sind also weniger Granulome vorhanden, sind auch weniger Granulozyten-haltige Ausziehungen zu finden.

In der Gruppe der K.O.-Mäuse werden auch bei der Eosinophilen-Färbung weniger Granulome des oben beschriebenen organisiert wirkenden Typs mit eosinophilem Zellsaum um ein zentrales, mit anderen, nicht angefärbten Leukozyten ausgekleidetes Gebiet sichtbar. Parallel zur oben beschriebenen HE-Färbung findet sich eine Anzahl nicht von Abwehrzellen eingefasster Eier bei den K.O.-Mäusen, was in den BL/6-Kontrollgruppen nicht beobachtet wird.

6.3.4.2. Neutrophile Granulozyten

Diese Granulozyten sind in weitaus kleinerer Zahl im von Schistosomen befallenen Gewebe nachzuweisen als Eosinophile. Sie werden nach Blockierung der in den Granula befindlichen Peroxidase über einen Antikörper gegen das Gr1-Membran-Antigen nachgewiesen. Diese immunologische Bindung ist für die Neutrophile Fraktion der Granulozyten spezifisch und wird durch eine gekoppelte Peroxidase-Reaktion sichtbar gemacht. Die markierten Leukozyten lassen sich nun durch einen roten Randsaum erkennen.

Sowohl in den K.O.- als auch in den Kontrollmäusen finden sich weitaus weniger Neutrophile als Eosinophile Granulozyten. Die ersteren kommen vor allem bei stark befallenen Tieren vor. Hier durchsetzen sie unregelmäßig die organisierteren Granulo-

me, während die Eosinophilen bei dieser Art von Granulomen hauptsächlich in der Randzone auftreten, wie oben beschrieben. Im Gegensatz hierzu finden sich die Neutrophilen auch direkt im Zentrum des Granuloms, in unmittelbarer Nachbarschaft des Wurmeies. Allerdings sind auch dort keine größeren Mengen dieses Zelltyps erkennbar.

Außerdem sind die Neutrophile Granula tragenden Zellen im Gefäßsystem zu erkennen, wohingegen sie interstitiell kaum nachweisbar sind. Doch auch in den Blutgefäßen sind nur gelegentlich ein paar Granulozyten anfärbbar, wie Abb. 6.20 demonstriert.

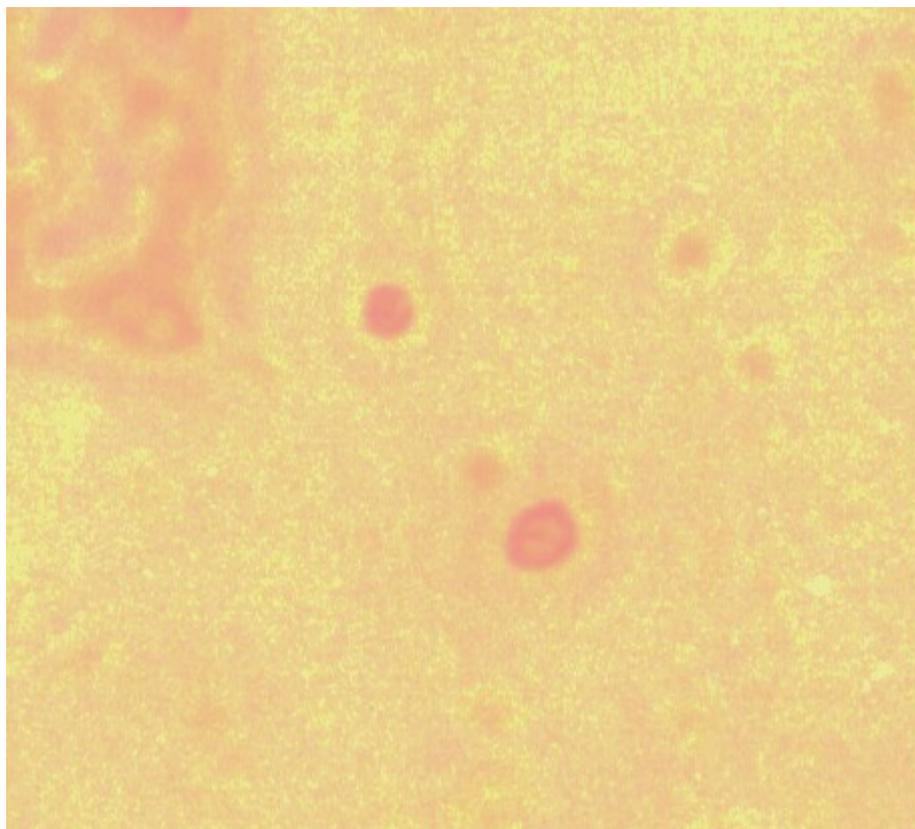


Abbildung 6.20: Neutrophile Granulozyten im Gefäßsystem (*Gr1*-Antikörper-Markierung, 1000-fach vergrößert). – Links oben ragt noch ein Zipfel Lebergewebe (orange) ins Bild, der in dieser Gelb-verstärkten Aufnahme nur undeutlich zu erkennen ist. Der gleichmäßige hellgelbe Hintergrund stellt das Lumen eines größeren Lebergefäßes dar, in dem zwei rot angefärbte, rundliche Zellen schwimmen. Hierbei handelt es sich um Neutrophile Granulozyten.

Dagegen sind Eosinophile Granulozyten beinahe niemals im Gefäßsystem anzufärben. Sie erscheinen erst in den Sinusoiden und somit im parenchymatösen Anteil der Leber.

Die Ergebnisse aus dem Granulozytenvergleich lassen in dieser Hinsicht kein wesentlich unterschiedliches Reaktionsmuster bei den beiden Maustypen erkennen. Es scheint, als würde beim Krankheitsbild der Bilharziose die Einwanderung der Neutrophilen Granulozyten erst nach der Immunaktivierung durch Eosinophile erfolgen, die vornehmlich wohl Monozyten anlockt. Vielleicht alarmiert erst die Makrophagen-Aktivität die Neutrophilen.

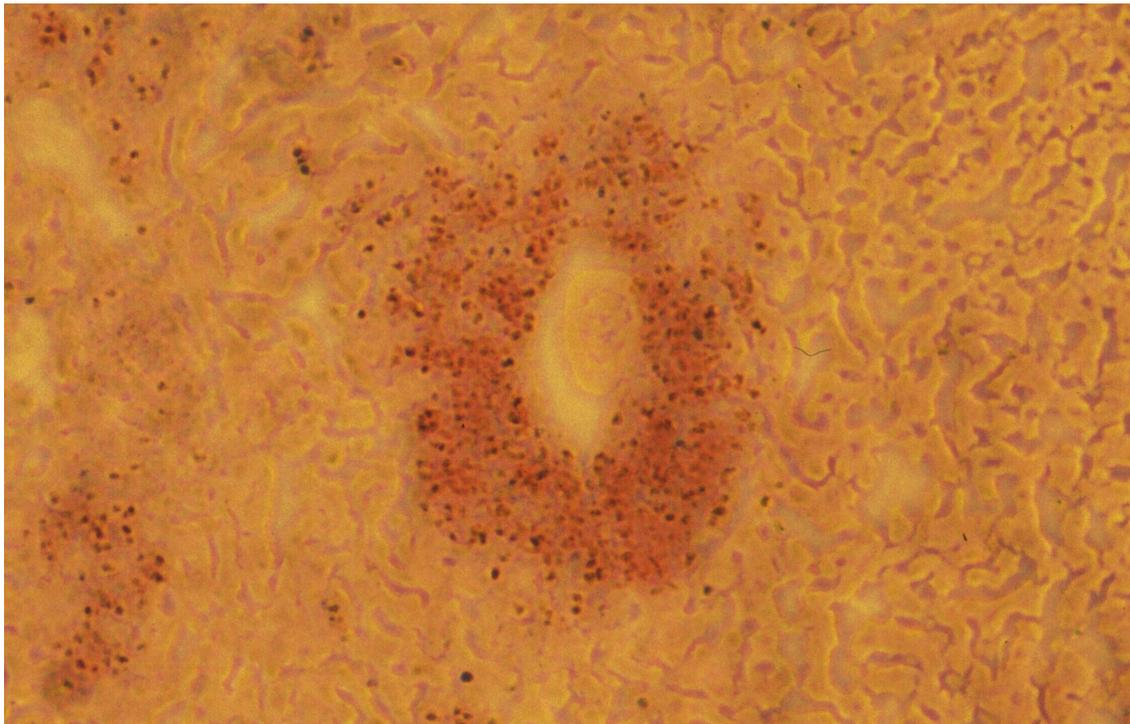


Abbildung 6.21: *Granulom mit angefärbtem Saum aus Eosinophilen um Ei (Eosinophilen-Färbung, 100-fach vergrößert). – In der Peroxidase-Färbung entsteht bei manchen Granulomen ein schmieriger rötlicher Saum um das zentrale Ei, in dem einzelne Zellen deutlich abgrenzbar sind. Diese „Schmierfärbung“ kann evtl. dadurch erklärt werden, dass Enzyme aus den Granulozyten, insbesondere auch aus zerstörten Abwehrzellen dieses Typs, austreten und das Gewebe um das Granulom anfärben. Diese Reaktion wird jedoch nur bei einigen Zellnestern beobachtet, vor allem bei Granulomen, in denen in der Gr1-Färbung auch verhältnismäßig mehr Neutrophile feststellbar sind. Daher ist es möglich, dass es sich hierbei um eine für Neutrophile Granulozyten typische Reaktion handelt, oder zumindest um eine Immunantwort, für die die Anwesenheit von Neutrophilen notwendig ist.*

In manchen der kleineren Granulomen, die keinen Saum von Eosinophilen aufweisen, zeigen sich um das Ei Haufen kleiner Zellen mit teilweise gelapptem Kern. Diese Zellen werden von einer schmierigen roten Schicht umgeben, wenn die Peroxidasereaktion ohne Antikörper und somit auch ohne vorherige Blockung angewandt wird (Abb. 6.21).

Es könnte sich hierbei um zerstörte Granulozyten handeln, deren Granula in das umgebende Gewebe entleert wurden und so jetzt das AEC-Substrat in einer Zone rund um das Schistosomen-Ei umwandeln. Warum dieses Phänomen nur bei einigen Granulomen auftritt ist nicht bekannt. Allerdings wäre eine mögliche Theorie hierzu, dass diese Leukozyten ausschließlich Neutrophile sind, die durch Botenstoffe und chemische Reize, welche von den bereits bestehenden Granulomen produziert werden, angelockt wurden und bei neu hinzutretenden Eiern als erste Welle der Abwehr fungieren, da sie in ihrer Verformbarkeit und Wanderungsbefähigung den anderen Immunozyten überlegen sind. Um diese Zellreste formt sich dann wieder ein Demarkationswall aus monozytären Zellen, angelockt durch die Granulozyten-Aktivität. Es entsteht ein Abwehrzellnest wie im vorigen Abschnitt als dritter, seltenster Typ beschrieben.

6.3.4.3. Monozyten

Eine weitere Anfärbemöglichkeit besteht über den Antikörper gegen das Oberflächen-Antigen Mac1 α , welches nur von im Gefäßsystem zirkulierenden Monozyten exprimiert wird. Diese finden sich bei gesunden Tieren in den Arterien und Venen der Leber. Wenn sie zu Makrophagen werden, so behalten sie dieses Antigen und können somit der hämatogenen Komponente des retikulo-endothelialen Systems zugeordnet werden. Doch im Versuch lassen sich auch bei den mit Schistosomen infizierten Mäusen diese Monozyten (Abb. 6.22) nur im Gefäßsystem nachweisen, obwohl eine große Menge von Makrophagen die Demarkation der Granulome vornimmt. Diese Beobachtung kann in beiden Versuchsgruppen gleichermaßen bestätigt werden und legt somit den Verdacht nahe, dass ein Großteil der aktiven Makrophagen in der mit Schistosomen infizierten Leber einer anderen monozytären Zelllinie entstammen müssen.



Abbildung 6.22: *Monozyt im Gefäßsystem (Mac1 α -Antikörper-Markierung, 400-fach vergrößert). – Durch dieses Oberflächenantigen markierte Monozyten (rot) finden sich nur sehr vereinzelt in den Gefäßen der Leber. Da sie auch in höheren Infektionsgraden nicht häufiger werden, ist anzunehmen, dass es sich bei den Granulom-Makrophagen nicht um Blut-Monozyten, sondern um eine gewebsständige Zelllinie handelt.*

6.3.4.4. Gewebsmakrophagen

Die aktivierten Makrophagen der granulomatösen Reaktion sind um das Pathogen angeordnet. Während – wie in Abschnitt 6.3.4.3 beschrieben – nur wenige Blutmonozyten in den Lebersinusoiden markierbar sind, interessiert nun die Häufigkeit aktivierter Zellen des monozytären Systems. Diese können auch aus gewebsständigen Zelllinien des retikulo-endothelialen Systems (z.B. Kupffer-Stern-Zellen) stammen, und somit in viel höherer Anzahl vorkommen, als es die Blut-Monozyten vermuten lassen.

Ein für Gewebsmakrophagen typisches Antigen, das in Mäusen keine Monozyten-Vorläufer markiert, ist F4/80 (MCKNIGHT/GORDON, 1998). Monoklonale Antikörper gegen dieses Merkmal werden von der Arbeitsgruppe von K. Pfeffer im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München produziert und wurden für die hier beschriebenen Versuche freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

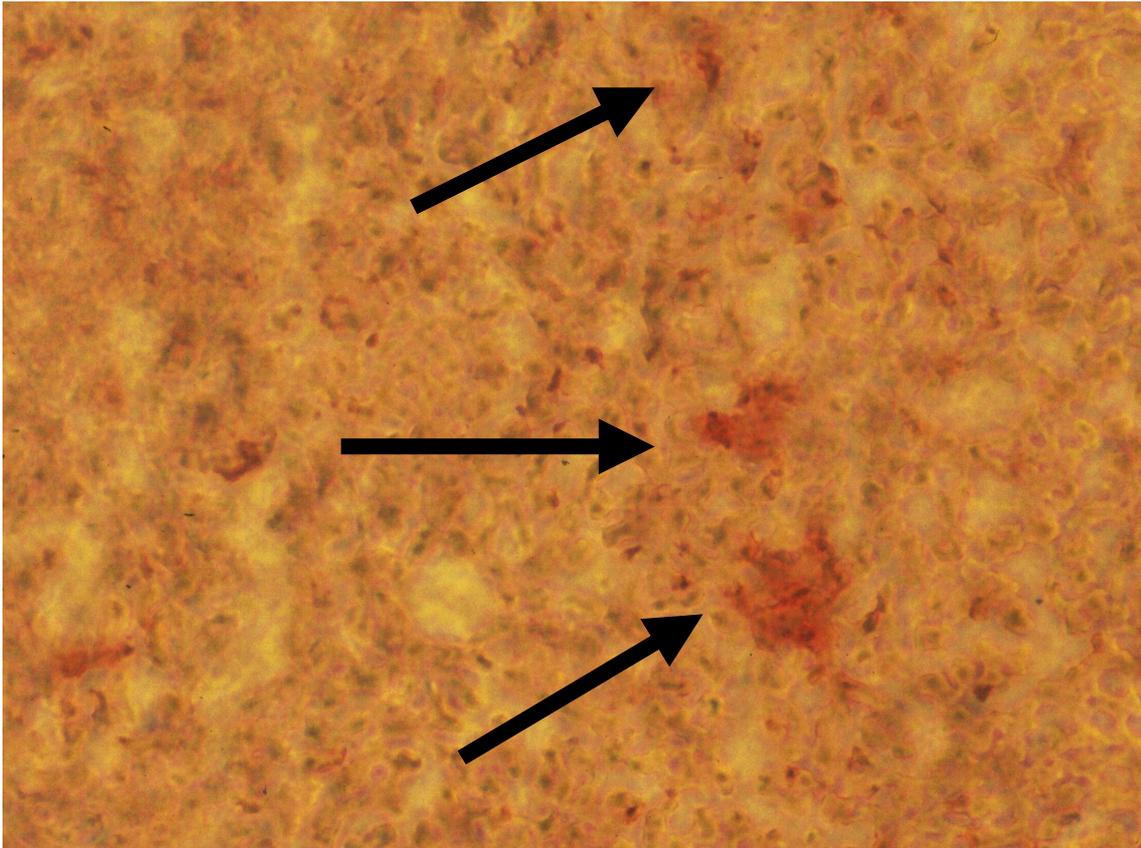


Abbildung 6.23: *F4/80-markierte Zellansammlungen (F4/80-Antikörper-Markierung, 100-fach vergrößert). – Hier sind gewebständige Makrophagen markiert über ein Oberflächenantigen, das in Mäusen spezifisch auf aktivierten monozytären Zellen exprimiert wird. Zwischen den ungefärbten, hier gelblich erscheinenden Zellen der Leber erscheinen einzelne, in kleinen Nestern gruppierte Zellen, die durch diesen Antikörper markierbar sind und sich damit als Gewebs-Monozyten identifizieren lassen. Bei der Abbildung handelt es sich um eine nicht infizierte Leber, in der keine größeren Ansammlungen als die abgebildete vorkommen*

Bei nicht infizierten Mäusen lassen sich durch Anfärbung gewebeständiger Makrophagen kaum Zellen markieren, schließlich sind hier nur zu wenige phagozytierende Partikel vorhanden, s. Abb. 6.23.

Je mehr Granulome jedoch in den Mäusen vorhanden sind, desto mehr Lebermonozyten werden aktiviert. Wie in den Gen-gesunden Mäusen der NMRI- und der BL/6-Gruppe zu erkennen ist (Abb. 6.24), kommt die Ummauerung der Wurmeier mit epitheloiden Abwehrzellen vor allem durch F4/80-exprimierende Zellen zustande. Diese Ummaue-

zung findet auch in den K.O.-Mäusen statt, nur sind hier kleinere Nester der F4/80-markierten Zellen nachweisbar. Außerdem wirken sie weniger geordnet.

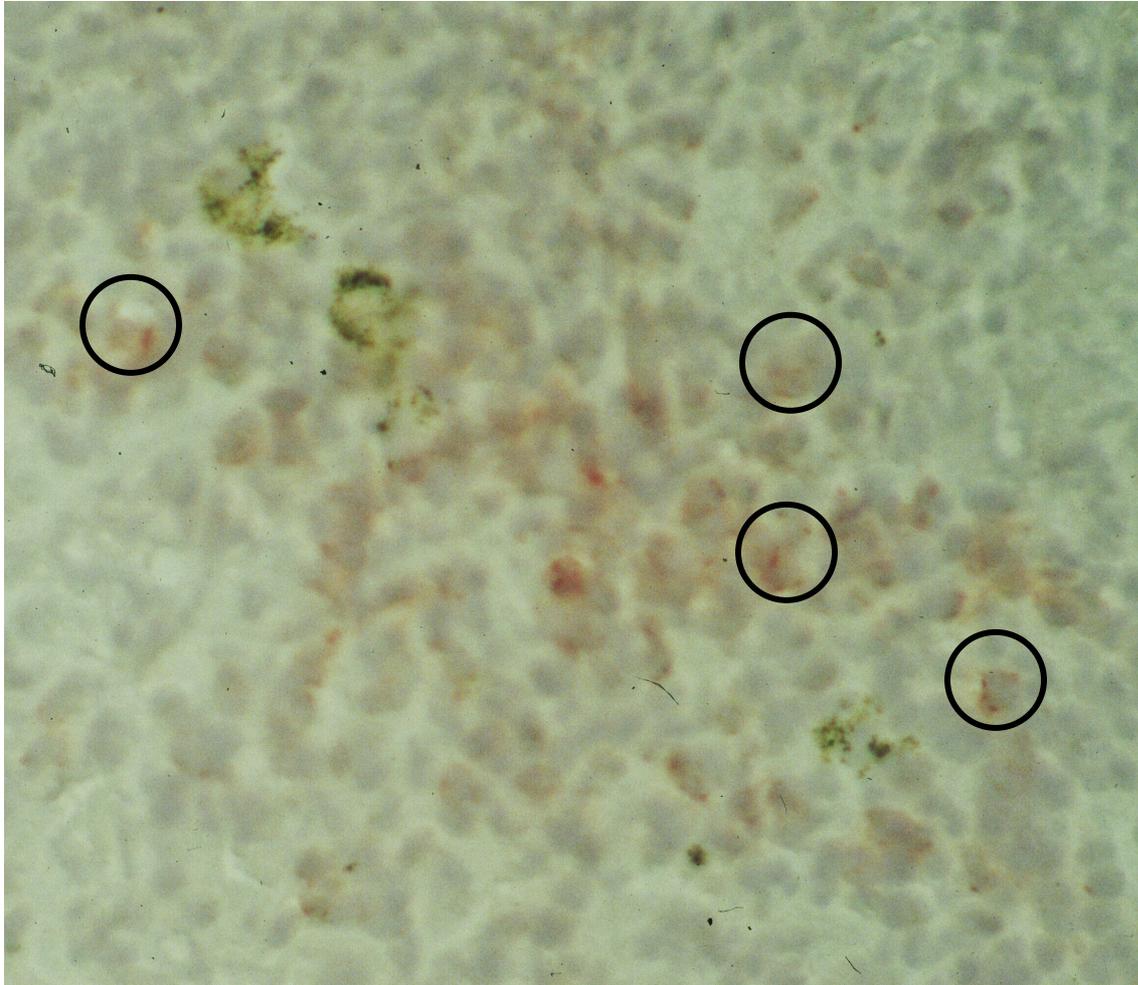


Abbildung 6.24: *F4/80-markiertes Granulom (Ausschnitt, F4/80-Antikörper-Markierung, 400-fach vergrößert). – Ein Großteil der im Bild gezeigten Abwehrzellen ist durch einen roten Randsaum eingefärbt. Einige besonders gut abgrenzbare Einzelzellen sind durch Kreise hervorgehoben, um zu demonstrieren, wie die Markierung mit Antikörpern gegen Oberflächenantigene im Idealfall aussieht. Durch das Beieinanderliegen von Abwehrzellen gleichen Typs in einem Granulom, ist bei der verwendeten Schnittdicke von 8 μm eine teilweise Überlappung nicht zu vermeiden.*

In Tab. 6.6 wird die Anzahl F4/80-markierter Granulome in den verwendeten Versuchsgruppen aufgezeigt, wobei Durchschnittswerte der unterschiedlichen Inokulationsstufen gebildet wurden.

	NMRI	BL/6	K.O.
I	1,20	4,53	0,00
II	3,60	5,41	0,00
III	6,32	9,70	0,00

Tabelle 6.6: *Mittelwerte der Zahl der durch F4/80-Antikörper markierbaren Leber-Granulome in den drei Mausstämmen, bezogen auf die Inokulationsstufen I - III. – Bei den K.O.-Mäusen lassen sich auf diese Weise keine Granulome eindeutig markieren, es kommen nur verstreut einzelne Gewebsmakrophagen vor, wie sie auch in nicht infizierten Mäusen sichtbar werden. Hingegen erkennt man die Anwendbarkeit dieser Färbemethode bei immunkompetenten Tieren der NMRI- und BL/6-Gruppen, da sich hier Granulome mit aktivierten Gewebsmakrophagen eindeutig identifizieren lassen und mit steigender Inokulationsstufe häufiger werden. Dies spricht für eine unzureichende Stimulation des monozytären Systems bei den K.O.-Mäusen, so dass nur wenige Makrophagen in die Eigranulome einwandern.*

In den K.O.-Mäusen finden sich überhaupt keine Granulome, die durch F4/80-positive Zellen ausreichend markiert sind. Die sowieso in geringerer Anzahl in dieser Mausgruppe anfärbbaren Gewebs-Makrophagen liegen verstreut im gesamten Organ und sammeln sich nur gelegentlich in uneinheitlichen Flecken unbestimmbarer Zugehörigkeit. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Aktivierung der Gewebsmakrophagen auch in den K.O.-Mäusen stattfindet. Allerdings ist, wie auch bei den Eosinophilen beobachtet, die Organisation um das Pathogen nicht in gleicher Weise ausgeprägt. Dies weist darauf hin, dass der TNF-Rezeptor p55 sich auf die Modulation der Makrophagen-Abwehr auswirkt, die Triggerung jedoch durch ein anderes System erfolgt. Da dieser phagozytäre Zelltyp letztendlich die granulomatöse Abgrenzung des Schistosomen-Eies innerhalb des körpereigenen Gewebe bestimmt, kann die Abwehr von Parasiten wie Würmern zwar erfolgen, doch ist die Wirksamkeit der Granulombildung unter Umständen weniger effizient. Doch dieser Punkt lässt sich einzig auf Grund der in diesem Versuch vorliegenden Momentaufnahmen nicht endgültig beurteilen. Auffällig ist jedenfalls die kleinere Anzahl abgegrenzter Granulome innerhalb der Rezeptor-negativen Maus und der kleinere durchschnittliche Durchmesser dieser Strukturen. Die bereits oben erwähnte, weniger dichte Struktur der Granulome bezüglich der

Granulozyten und Makrophagen, die in den Knockout-Tieren vorliegt, weist ebenfalls auf eine Granulom-Differenzierungsstörung hin.

6.3.5. Evaluierung des Befalls von Milz und Darm

Die mikroskopische Auswertung der Veränderungen in anderen Organen ist im Rahmen der Maus-Präparation vorbereitet worden. Da makroskopisch diese Manifestationen der Schistosomiasis sich als wenig konstant erwiesen, sollen sie im Rahmen dieser Arbeit lediglich in Form eines kurzen Überblickes erfasst werden. Eine genaue Untersuchung der konservierten Organe hinsichtlich ihrer Veränderungen kann zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen. Da die Leber neben den Darmgefäßen als Hauptmanifestationsort der Schistosomiasis bei *S. mansoni*-Befall angesehen wird, und der Darmbefall nicht so deutliche Unterschiede zwischen den Infektionsgraden aufweist, ist es vertretbar, sich auf die Leber als Untersuchungsorgan zu konzentrieren. Die Ausspülung dieses Organs ist wohl ebenfalls am vollständigsten, da mit dem Kappen der Pfortader das Blut aus den Lebervenen direkt in das Becherglas läuft. Dadurch werden auch alle Würmer, die sich in für das Durchrutschen ausreichend weiten Gefäßen befinden, ausgeschwemmt. Im Darmbereich dagegen können sie in den vom Volumen her engeren Arkaden hängenbleiben und danach noch rein mechanisch im Gewirr der Darmschlingen haften.

In den folgenden Abschnitten werden die Organe Darm und Milz, deren Befall ebenfalls bereits makroskopisch vorbefundet werden kann, mikroskopisch untersucht.

6.3.5.1. Milzbefall

Makroskopisch zeigen sich auf den Milzen einiger Schistosomiasis-infizierter Exemplare weiße Knötchen, die histologisch subkapsulären granulomatösen Strukturen entsprechen. Diese Veränderungen treten jedoch unregelmäßig auf, ohne dass eine eindeutige Zugehörigkeit zur Symptomatik innerhalb eines Stammes oder einer Inokulationsstufe zu erkennen ist.

In der mikroskopischen Untersuchung lassen sich bei Hämatoxylin-Eosin-Färbung die Granulome lediglich im subkapsulären Raum eindeutig identifizieren, wo sie allerdings auch makroskopisch gut erkennbar sind. Im Parenchym des Organs können durch die knotige Anordnung der weißen Pulpa, die selbst aus Leukozytenansammlungen besteht, keine klaren Aussagen bezüglich Granulomen getroffen werden. Die Eier von *S. mansoni* gelangen gewöhnlich nicht in die Milz, da diese nicht auf dem Weg der Blutstrombahn zum Darm liegt. Im Rahmen der zytolytischen Gewebsdurchwanderungen der Eier

kommt es jedoch gelegentlich zum Eindringen in die Organkapsel, wo die Fremdkörper gleich von der Abwehr abgefangen werden. Die rote Pulpa der Milz enthält bei den infizierten Mäusen reichlich Granulozyten. Diese Beobachtung ist in allen drei Versuchsstämmen ersichtlich.

Die immunhistochemische Anfärbung erweist sich in diesem Fall als wenig hilfreich, da das gesamte Bild von Granulozyten überlagert wird, wie die Peroxidase-Reaktion zeigt. Dieser Zelltyp füllt einerseits die sinusoiden Anteile des Milzparenchyms, dringt aber auch tief in die Follikel der weißen Pulpa ein und säumt die Milzgefäße sowohl von außen, als auch vom Lumen her.

Die auffälligen Riesenzellen, welche bereits weiter oben unter der HE-Darstellung beschrieben wurden, lassen sich auch hier nachweisen. In der ungekoppelten Peroxidase-reaktion, die zur Granulozyten-Erkennung angewandt wird, färben sie sich nach Gabe des AEC-Substrates nicht gesondert an, sondern erscheinen wie andere nicht-granulozytäre Abwehrzellen (Lymphozyten, Monozyten), die einen Großteil des Zellbesatzes des lymphatischen Organs ausmachen.

Letztendlich lassen sich aus der Milz wegen des in allen Infektionsgraden vorkommenden starken Abwehrzellbesatzes keine neuen Erkenntnisse gewinnen. Eventuell können weitergehende Untersuchungen bezüglich der immunhistochemischen Anfärbbarkeit anderer Zelltypen z. B. des lymphatischen Systems zusätzliche Aspekte festhalten. Die Milz-Abwehrreaktion ist jedenfalls in sämtlichen Versuchsgruppen vom granulomatösen Aspekt her nicht deutlich unterscheidbar.

6.3.5.2. Darmbefall

Der Darm stellt das Zielorgan der *S. mansoni*-Eier dar. Die Granulome stellen sich hier deutlich in der HE-Färbung dar (Abb. 6.25 und 6.26). Allerdings sind die Granulome eher kleiner als in der Leber angelegt. Beim quer angeschnittenen Ei in Abb. 6.26 ist der Seitenstachel noch zu erkennen. In diesem Bild befinden sich Granulozyten und Lymphozyten vorwiegend in der Peripherie, während um die beiden Eier bereits ausdifferenzierte Makrophagen zu sehen sind, kenntlich an den größeren, länglichen Zellkernen.

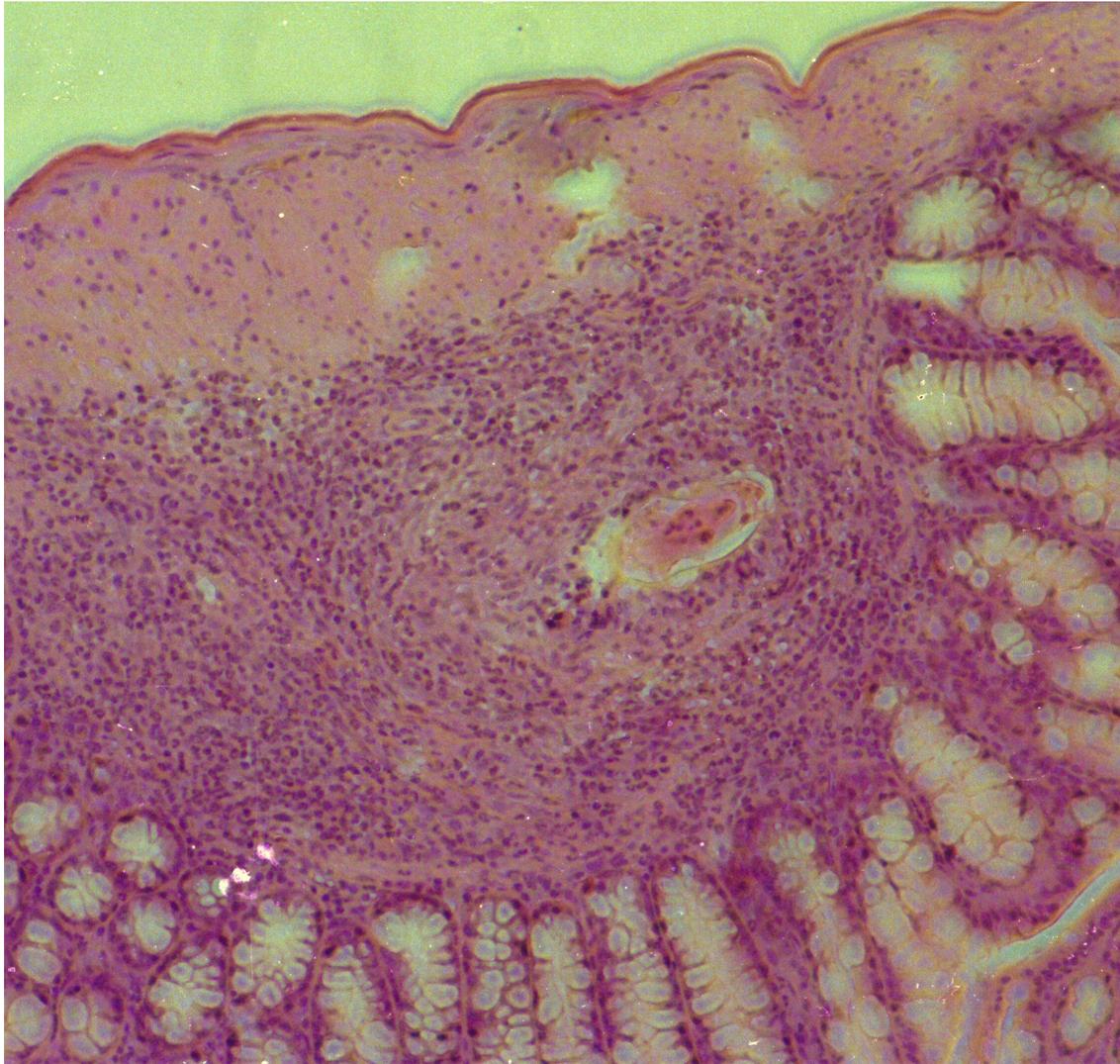


Abbildung 6.25: *Eigranulom von Schistosoma mansoni im proximalen Colon (HE-Färbung, 100-fach vergrößert).* – Das Granulom befindet sich in der Lamina propria und weist den typischen Aufbau auf: Um das zentrale Ei sammeln sich Leukozyten, wobei der äußere breite Zellsaum, der sich aus kleineren dunkelkernigen Zellen zusammensetzt, vorwiegend aus Granulozyten und Lymphozyten besteht. Im Innern des Granuloms findet sich eine Auflockerung des Granulozytensaums. Zwischen den dunklen Zellkernen finden sich größere längliche oder ovale Zellkerne mit hellerem Nukleoplasma. Diese identifizieren aktivierte Makrophagen. Außerdem lassen sich einige eosinophile Bezirke erkennen (im Bild hellrosa), die streifig ins Granulom ragen und auch in der Peripherie um die Abwehrzell-Reaktion erscheinen. Hierbei handelt es sich um fibröse Umwandlung des Gewebes als Zeichen der beginnenden narbigen Organisation des Granuloms.

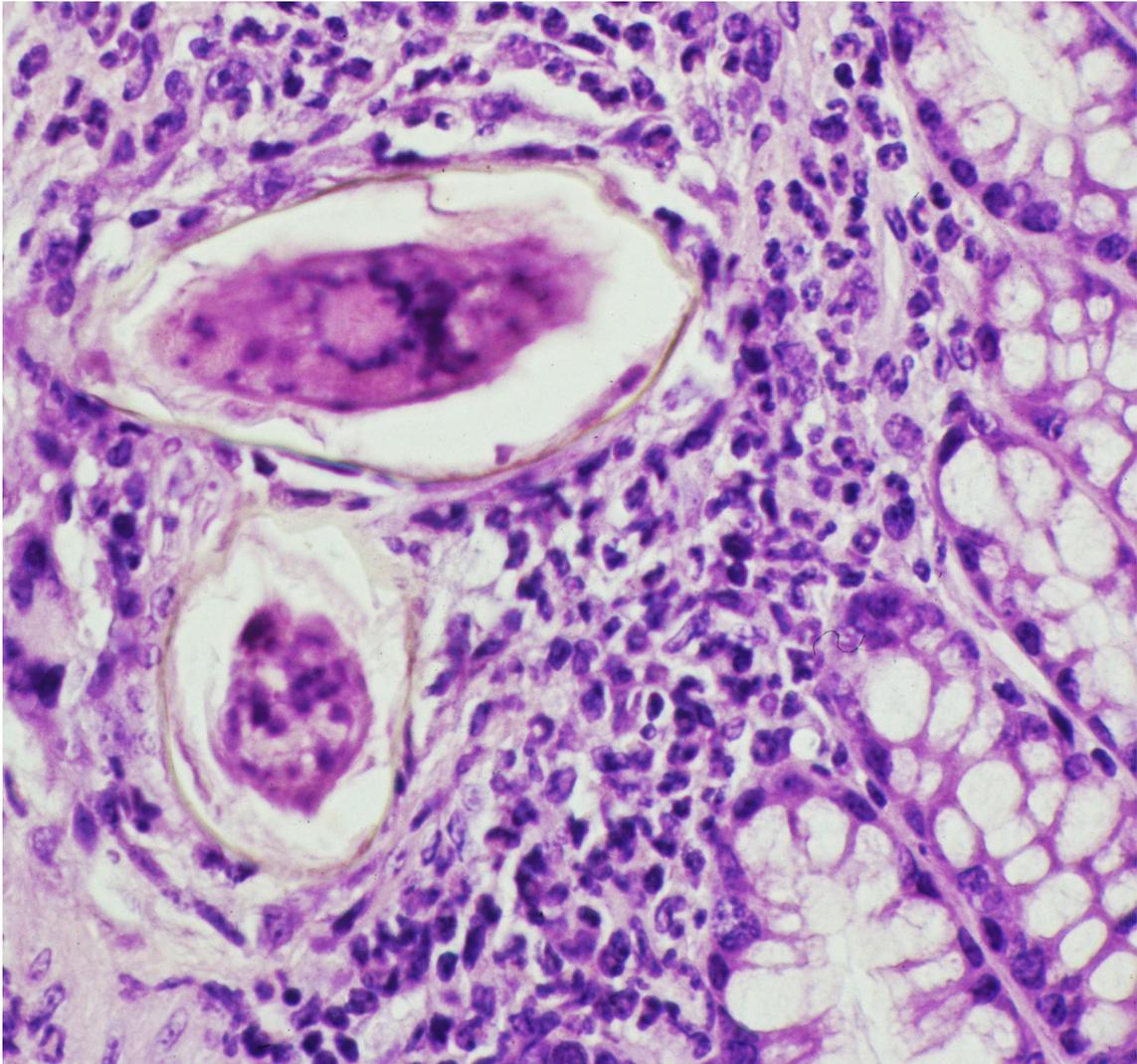


Abbildung 6.26: *Granulom mit 2 Eiern von Schistosoma mansoni in der Darm-Mucosa (HE-Färbung, 400-fach vergrößert). – Am unteren, quer angeschnittenen Ei erkennt man noch den nach rechts ins Gewebe ragenden Seitenstachel der (blassbraun dargestellten) Eihülle. Die beiden Eier zeigen, wie begrenzt der Raum zwischen den Krypten der Colon-Mucosa ist (im Bild sind die schleimproduzierenden Becherzellen der Krypten gut anhand des farblos erscheinenden Zytoplasmas zu erkennen). So können die Eier verhältnismäßig schnell ins Darmlumen gelangen. Organisierte, fibröse Granulome sind daher eher selten in der Darmmucosa zu finden.*

Granulome im Darm weisen häufig einen dünneren Abwehrzell-Saum auf, als es in der Leber der Fall ist. Dies mag daran liegen, dass der Zellumsatz in diesem Organ höher ist. Dort findet eine ständige Verschiebung der basalen Kryptenzellen entlang der Zotten statt, bis sie schließlich an der Zottenspitze abgestoßen werden. Die gesamte Zell-

Turnover dauert nur etwa 4 Tage. Höchstwahrscheinlich wird auch der an die Enterozyten grenzende Teil der Lamina propria mucosae auf diese Weise immer wieder erneuert. Diese ständige Regeneration erlaubt ein noch schnelleres Vordringen der Eier zum Darmlumen, wo sie dann schließlich ausgeschieden werden. Durch die rasche Erneuerung fällt eine Demarkation durch Leukozyten schwer, so dass die Eier bereits in das Lumen übergehen, bevor die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen in ausreichender Menge erfolgen kann. So ließe sich die Beobachtung eines gering ausgeprägten Abwehrzellwalls um die Schistosomeneier erklären.

Abb. 6.27 zeigt die Schwierigkeit einer Abgrenzung einzelner Granulome auf Grund der dicht beieinander liegenden Krypten, deren Lamina propria mit zahlreichen Leukozyten infiltriert ist.

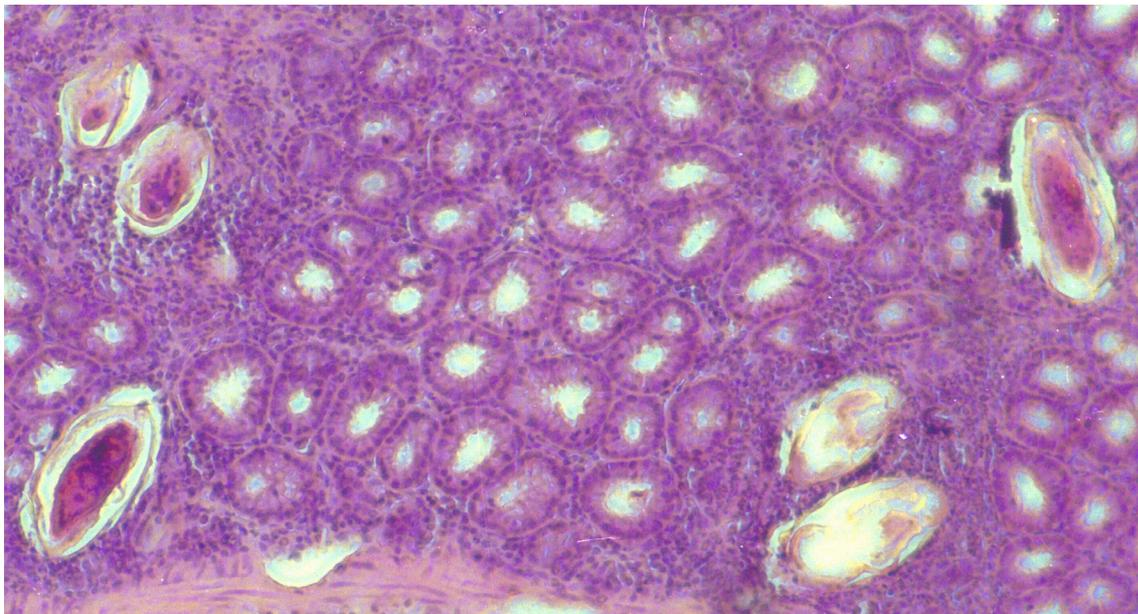


Abbildung 6.27: *Multiple Eier in der Mucosa und Submucosa des Colons (HE-Färbung, 50-fach vergrößert). – Die submucös gelegenen Eier (links oben) sind von eosinophilem Bindegewebe umgeben, während die zwischen den Krypten gelegenen Eier lediglich von wenigen Zellen, insbesondere Leukozyten, umgeben sind. Man erkennt nur unzureichende granulomatöse Reaktion um die Eier, was wahrscheinlich durch die nur kurze Verweildauer im Darm bedingt ist.*

Für die Granulomazählung erwies sich der Darm aus den unter 6.2.2 genannten Gründen als nicht geeignet. Auch ist eine Aussage über die Gesamtsituation im Darm

nicht möglich, da in diesem Versuch nur ein kleines Stück des proximalen Colons verwendet wurde.

Immunhistochemisch wurden keine Untersuchungen vorgenommen, da keine neuen Ergebnisse gegenüber den Lebergranulomen zu erwarten sind. Die Leber wurde gegenüber dem Darm als Untersuchungsorgan bevorzugt, da hier sowohl makro- als auch mikroskopisch die größten Unterschiede zwischen den Inokulationsstufen festgestellt wurden.

6.4. Weitere Beobachtungen

Abschließend sollen Nebenbefunde dokumentiert werden, die im Rahmen der Präparation der einzelnen Organe erhoben wurden. Die Häufigkeit dieser Begleiterscheinungen in den einzelnen Untersuchungsgruppen weist nicht unbedingt auf ein stetiges Merkmal hin. Vielmehr ergibt sich eine Sammlung von Schistosomiasis-Symptomen, welche keine direkte Aussage über die Schwere des Befalls, beziehungsweise Rückschlüsse auf den Infektionsgrad zulassen.

6.4.1. Pankreas

Die Bauchspeicheldrüse ist eines der Organe, die im Rahmen einer Schistosomen-Infektion mitbetroffen sein können. Dies äußert sich in entzündlichen Veränderungen, die wohl teilweise durch die Gesamtsituation der Körperabwehr bedingt sind, zum Teil wohl aber auch durch Verlegung der Portalgefäße durch die Wurmeier und adulte Schistosomen im Sinne eines Abflusstaus entstehen.

Bezüglich dieses Symptoms einer ödematösen Pankreatitis ist eine relative Häufung bei den Gen-gesunden BL/6-Mäusen zu erkennen. Durch ihre kleinere Größe bei stärkerer Granulombildung ist diese Entwicklung gegenüber den größeren, aber vergleichsweise granulomarmen NMRI-Mäusen zu erwarten. Allerdings entwickeln die noch kleineren K.O.-Mäuse ebenfalls seltener eine Pankreatitis als der schwarze Wildtyp-Stamm. Dies ließe sich durch die ebenfalls geringere Anzahl von Granulomen innerhalb der K.O.-Maus-Lebern erklären. Weniger Granulome verursachen entsprechend verminderten Rückstau und somit fehlt das Pankreas-Ödem oder ist nur makroskopisch nicht erfassbar ausgeprägt.

Inwiefern die aufgrund des im frischen Präparat vorliegenden Bildes angenommene inflammatorische Komponente durch die in K.O.-Mäusen anders gestaltete Abwehr verändert ist, lässt sich ohne weiterführende Untersuchungen nicht beurteilen.

6.4.2. Aszites

Aszites ist ein weiteres unsicheres Zeichen des Befalls mit *S. mansoni*. Bei höheren Infektionsgraden ist Aszites in BL/6-Mäusen häufig vorhanden, da hier vermehrt Lebergefäße durch Würmer und Eier verlegt sind. Bei der Flüssigkeit dürfte es sich vornehmlich um ein Transsudat handeln, welches durch die Dehnung der Gefäßwände entsteht. Bei NMRI-Mäusen fand sich in den untersuchten Gruppen keine freie Flüssigkeit in der Bauchhöhle.

Die immundefizienten K.O.-Mäuse können dagegen schon in niedrigeren Inokulationsstufen Aszites aufweisen. Ein Zusammenhang mit der Anzahl adulter Würmer ist zwar wahrscheinlich, doch nicht so klar erfassbar, wie bei den BL/6-Mäusen. Bei den K.O.-Tieren lässt sich lediglich eine leicht steigende Tendenz der Asziteshäufigkeit mit höherer Inokulationsmenge feststellen.

Vergleichsweise öfter auftretender Aszites in den transgenen Mäusen könnte sich, wie bereits bei der Granulomazählung angeführt, daraus erklären, dass die kleinere Körpermasse mit sichtbar kleineren Lebern einhergeht und somit weniger Platz für Würmer und deren Eier in dem Sinne bietet, dass das Lumen der Gefäße schneller verschlossen ist und somit frühzeitig transsudative Vorgänge entstehen.

7. Interpretation und Diskussion der Ergebnisse

7.1. Zusammenfassende Interpretation

Bei Betrachtung aller in den vorherigen Abschnitten erhaltenen Befunde zeigen sich einige grundlegende Tendenzen. Am deutlichsten ist der Unterschied in der Granulomhäufigkeit zwischen den verwendeten Mausstämmen ausgeprägt.

7.1.1. Granulomreaktion im NMRI-Stamm

Die wenigsten Ei-Abwehrreaktionen pro Auswertungseinheit finden sich bei den NMRI-Mäusen. Diese großen Mäuse werden gewöhnlich als Standard-Versuchs-Mäuse für parasitologische Fragestellungen eingesetzt und gelten als vollständig immunkompetent. Die relativ geringe Granulombildung bei vergleichsweise hohen ausspülbaren Wurmzahlen weist auf zwei Punkte hin: Erstens lassen sich die Würmer, die ja in identischer Dosis in sämtliche Maus-Rassen eingebracht wurde, aus den NMRI-Mäusen entweder besser ausspülen oder es kommen mehr Individuen zur Entwicklung. Gegen die letztere Schlussfolgerung spricht die geringere Granulomdichte. Die einzelnen Abwehrzellnester sind konzentrisch organisiert, mit einem Ei in der Mitte, umgeben von einem Wall aus Phagozyten, die nach der immunhistochemischen Beurteilung aktivierten gewebsständigen Makrophagen entsprechen, ohne dass vermehrt Blutmonozyten nachgewiesen werden können. Daraus lässt sich ableiten, dass sich die Makrophagen vorwiegend aus monozytären Zellen des lokalen RES der Leber entwickeln. Umgeben werden die Zellen des monozytären Systems von Granulozyten, die sich bei der immunologischen Analyse als Eosinophile erweisen. Diese Granulozyten zeigen sich als erste Welle der Immunabwehr am Pathogen. Erst nachdem sich solch ein Eosinophiles Granulom gebildet hat, entsteht ein organisiertes Granulom. Die Zellen des RES müssen offenbar erst durch Modulationen im Interleukin-System aktiviert werden, welche von den granulozytären Zellen vorgenommen werden kann. Möglich wäre unter anderem allerdings auch eine Aktivierung der Makrophagen chemotaktisch durch Zerfallsstoffe, die bei einem Einsatz von Peroxidase als zellzerstörendem Enzym automatisch frei werden.

Auf welche Weise diese Abwehrreaktion auch initiiert werden mag, das Ergebnis ist der oben beschriebene Granulomtyp mit zentralem Ei, Makrophagen-Randwall und umgebendem Eosinophilen-Saum. Frische Granulome zeichnen sich durch große Granulozy-

ten-Ansammlungen aus. In älteren Granulomen überwiegt der phagozytäre Anteil. Um das Schistosomen-Ei zeigt sich häufig eine nekrotische Zone. Auch Neutrophile Granulozyten sind im Rahmen der beobachteten Abwehrreaktion zu finden. Allerdings sind sie in den Granulomen erst im fortgeschrittenen Stadium erkennbar. Sie durchziehen dann die gesamte Struktur, halten sich also nicht an die eben beschriebene Zonenbildung. Eventuell stammen die nekrotischen Zellreste um das Ei von diesem Zelltyp, da er zum Freisetzen seiner zytolytischen Enzyme zerfallen muss.

7.1.2. Granulomreaktion im BL/6-Stamm

Die kleineren BL/6-Mäuse weisen eine merklich höhere Granulomzahl auf als die NMRI-Mäuse. Diese Abwehrzellnester zeigen einen strukturell gleichen Aufbau wie die entsprechenden Befunde in NMRI-Standard-Mäusen. Die möglichen physikalischen Gründe für die Häufung in Form von Abflussbehinderung wurden bereits diskutiert. Trotzdem ist eine differente Abwehrfunktion im Vergleich zur NMRI-Maus ebenfalls in Betracht zu ziehen. Egal ob nur einer dieser Aspekte oder auch beide zutreffen, in jedem Fall belegt diese Situation eine bessere Eignung der schwarzen BL/6-Maus als Kontrollgruppe für den Hauptversuch, in dem die genetisch und körperlich ähnliche K.O.-Maus untersucht wird.

Im Gegensatz zur NMRI-Maus treten bei den schwarzen Mäusen auch extrahepatische Symptome auf, die ebenfalls bei den Gen-insuffizienten Mäusen beobachtet werden können, jedoch beim weißen Standard-Stamm nicht zu erkennen sind. Hierzu zählen in erster Linie Begleitpankreatitis und Milzgranulome sowie Aszites. Da Aszites und Pankreatitis jedoch nicht in deutlich erkennbarer Korrelation mit dem Infektionsgrad stehen, sind sie wohl eher darauf zurückzuführen, dass gelegentlich einzelne Granulome entsprechende Gefäße verlegen, die zu den genannten Manifestationen führen.

Um zu erklären, warum die NMRI-Tiere diese Erscheinungen nicht aufweisen, kommt wiederum die Theorie der größeren Gefäße in größeren Mäusen bei – wegen des größeren Verteilungsvolumens – vergleichsweise weniger Granulomen in Betracht.

7.1.3. Granulomreaktion im K.O.-Stamm

Die eigentliche Untersuchungsgröße für die vorliegende Versuchsreihe stellte jedoch der Einfluss des Tumor-Nekrose-Faktors α auf die Entwicklung parasitärer Granulome dar. Hierzu wurde die Haupt-Untersuchungsgruppe der K.O.-Mäuse untersucht. Ausge-

gangen wird hierbei von der These, dass der größte Teil immunologischer Effekte des TNF- α durch Interaktion mit dem so ausgeschalteten Rezeptor bewirkt wird. Beurteilt werden müssen Anzahl, Struktur und Ausdifferenzierungsgrad der Granulome.

Bezüglich des ersten Punktes zeigt sich eine deutliche Tendenz zu geringeren Granulomzahlen in den K.O.-Lebern, was auf einen fehlerhaften Signalgeber-Prozess im Bereich der zellulären Abwehr hinweist. Gerade für diese Vorgänge der Makrophagenaktivierung und Leukozyten-Chemotaxis wird TNF- α eine Beteiligung zugesprochen (z.B. LEPTAK/MCKERROW 1997)

Als nächstes wird die Granulomstruktur beurteilt. Hier zeigen sich meistens lediglich ungeordnete Ansammlungen von Leukozyten, deren fehlende Organisation als ein Ausdruck fehlender Impulse und Modulationsvorgänge von Seiten der am TNF-Rezeptor p55 angreifenden Interleukine gewertet werden kann.

In den K.O.-Mäusen werden außerdem häufig Granulome beobachtet, die lediglich die erste Phase, die Eosinophilen-Aggregation zeigen, was auf ungenügende Reifungsprozesse hindeutet. Dieser Aspekt ist nicht von den eben beschriebenen Veränderungen der Granulomorganisation trennbar, da die angenommenen gestörten modulatorischen Vorgänge beide Bereiche beeinflussen. So kommt offenbar durch die fehlende Rezeptorbindungsstelle für TNF- α eine geringere Interleukinausschüttung aus retikuloendothelialen Zellen zustande, weshalb eine verminderte Einwanderung von Granulozyten, in unserem Falle insbesondere der Eosinophilen Zelllinie, stattfindet. Die Folge ist eine geringere Ausschüttung zytotoxischer Stoffe um das Pathogen, wodurch es zu einer verminderten Produktion von Zelldetritus kommt. Daher entstehen weniger chemische Reize für die chemotaktisch angelockten Bestandteile des Immunsystems. In der Folge wird durch die geringe Abwehr vor Ort wiederum weniger Detritus produziert. Es entsteht ein Circulus vitiosus einerseits durch die geringere oder zumindest gestörte Interleukin-Stimulation und -Modulation im phagozytären System, andererseits als Folge der wegen dieser Abweichung geringeren Ausschüttung von chemotaktischen Stoffen.

7.1.4. Granulomreaktion bei männlichen Tieren

Ein weiterer Vergleich fand zwischen männlichen und weiblichen Tieren der BL/6 und K.O.-Mäuse statt. Bei diesem Nebenversuch zeigt sich eine geringere Granulomzahl bei männlichen Tieren beider Stämme. Die Anzahl an Versuchstieren war jedoch zu klein,

um hier definitiv eine Aussage treffen zu können. Lediglich die Tendenz kann hier festgehalten werden.

Außer den beschriebenen Reaktionen der Leber wurden auch andere Organe untersucht. In der mikroskopischen Beurteilung erbrachten Milz und Darm keine zusätzlichen Erkenntnisse. Zwischen den einzelnen Stämmen konnten im Rahmen der untersuchten Stichproben keine Unterschiede festgestellt werden.

7.1.5. Gesamtüberblick über die Granulomreaktionen

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich in den Lebern mit *Schistosoma mansoni* infizierter K.O.-Mäuse weniger Granulome erkennen lassen als in den Gesunden Vergleichsmäusen des BL/6-Stammes. Zusätzlich zeigt sich eine geringere Differenzierung bezüglich des Granulomaufbaus. Hier überwiegt bei den Rezeptorinsuffizienten Mäusen eine inhomogene Ansammlung von Eosinophilen, während in den BL/6- und NMRI-Kontrollen sowohl eine zentrale Makrophagenansammlung um das Schistosomen-Ei, als auch eine von Eosinophilen Granulozyten gebildete, schärfer begrenzte Randzone erkennbar ist. Diese Beobachtungen deuten auf eine Beteiligung des TNF-Rezeptors p55 und somit des an ihn gebundenen TNF- α bei den Vorgängen der Granulominitiation und der Granulomdifferenzierung hin. Allerdings ist eine Granulombildung auch ohne diesen Rezeptor möglich, wie die wenigen Granulome in den K.O.-Tieren zeigen. Wahrscheinlich wirkt TNF- α an anderen Rezeptoren ähnlich bezüglich der induzierten Interleukinausschüttung, wenngleich eine deutliche Verschiebung im Zellaktivierungsmuster (weniger aktivierte Gewebsmakrophagen bei K.O.-Mäusen) erkennbar ist.

7.2. Beurteilung des Versuchsablaufs

Zunächst soll auf mögliche Fehlerquellen im Versuchsaufbau und in der Interpretation der Ergebnisse hingewiesen werden. Man darf vor allem nicht aus den Augen verlieren, dass es sich um einen Tierversuch handelt, der an dem Modell einer Gen-insuffizienten Maus durchgeführt wurde. Das heißt für die Beurteilung, dass wir letztendlich nicht wissen, was außer den beschriebenen Veränderungen im Immunsystem an darüber hinausgehenden Störungen im Stoffwechsel der K.O.-Mäuse vorliegt, da in den vorliegenden Versuch nur ein ganz bestimmter Aspekt der Körperabwehr, nämlich die Reaktion der Zellen auf parasitäre Infektion untersucht wurde. Letztendlich wissen wir auch

nicht, ob die Immunologie des Menschen in dieser Hinsicht mit derjenigen der Maus kompatibel ist.

7.2.1. Untersuchung auf Fehlerquellen

Da die vorliegenden Untersuchungen von bestimmten Prämissen ausgehen, ist es durchaus möglich, dass sich Fehler bereits im Aufbau des Versuches manifestieren. Schließlich gibt es keine Garantie für die als weitgehend konstant angenommenen Parameter wie z. B. eine homogene Cercarienverteilung in der inokulierten Flüssigkeit. Solche Parameter wurden durch Kontrollen innerhalb des Versuches verifiziert (z. B. Wurmausschwemmung), doch bleibt die Tatsache bestehen, dass Experimente im biologischen Bereich in ihrem Ergebnis durch das Fehlen einer übergreifenden Kontrollmöglichkeit über alle in Frage kommenden Einflussgrößen (Wachstum, zusätzliche Erkrankungen, sozialer Stress usw.) schwierig beurteilbar sind und so keine Absolutwerte, sondern lediglich Tendenzen und Verhältnisse darstellen können.

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, sind die beschriebenen Experimente unter Berücksichtigung bestimmter Prämissen erfolgt, die sich wie folgt zusammenfassen lassen.

Die BL/6- und NMRI-Vergleichsgruppen besitzen im Gegensatz zum K.O.-Stamm ein suffizientes Immunsystem, welches den Standard bezüglich der granulomatösen Abwehrreaktion gegen Schistosomen in der Versuchs-Auswertung darstellen soll. Der Granulomaufbau war in diesen beiden Kontrollgruppen gleich, wie aus den oben genannten Aufstellungen ersichtlich ist.

Eine möglicherweise störende Einflussgröße entstand durch die Infektion der Mäuse im Tierstall der Immunologischen Abteilung der Technischen Universität München mit Mäusehepatitis. Diese befiel jedoch, wie serologische Kontrollen zeigten, in statistischer Form einer Zufallsverteilung BL/6- und K.O.-Mäuse gleichermaßen. Außerdem wurden Tiere mit sämtlichen Infektionsgraden sowie gesunde Tiere betroffen. Die Hepatitissträger zeigten keine Unterschiede in der histologischen und immunohistochemischen Auswertung, mit Ausnahme des etwas vermehrten Leukozyteninfiltrates in den Lebersinusoiden im Vergleich zu den seronegativen Tieren. Die Infektionswelle betraf nur zwei Versuchsreihen, die keine Unterschiede oder erhöhte Ausfallraten gegenüber den vorangegangenen Reihen zeigten. Die fehlenden Unterschiede können teilweise wohl dadurch erklärt werden, dass immunologisch bei Schistosomiasis sowohl eine

Th1-, als auch eine Th2-Reaktion ausgelöst werden, so dass alle Abwehrsysteme eingeschaltet sind. Die Hepatitis führt in erster Linie zu einer Th2-Reaktion mit Lymphozytenaktivierung, so dass sich mit Ausnahme erhöhter Lymphozyteneinwanderung in die Leber keine wesentlichen Unterschiede ergeben.

7.2.2. Übertragbarkeit auf den Menschen

Die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen erworbenen Ergebnisse sind lediglich an den verwendeten Versuchstieren – also Mäusen – nachgewiesen. Allerdings zeigt sich bei Nagetieren eine ähnlich aufgebaute Abwehrreaktion wie beim Menschen. So werden in beiden Spezies eine Th1-Reaktion mit TNF- α -Produktion (BRITO ET AL 2000, PEARCE ET AL 1998) und eine folgende Th2-Reaktion mit Lymphozytenaktivierung beobachtet. Auch der Granulomaufbau entspricht zumindest in der immunkompetenten BL/6-Maus dem beim Menschen beobachteten (STRICKLAND 2000).

7.3. Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass TNFRp55 im Bereich der schistosomalen Immunreaktion von Bedeutung ist. Die Granulomzahl in der Leber nach *S. mansoni*-Infektion war in den vorliegenden Versuchsreihen verringert und deutet auf eine partielle Insuffizienz der Granulominduktion in K.O.-Mäusen, die nicht zur Ausbildung dieses Rezeptors für TNF befähigt sind. Auf eine bedeutsame Beteiligung des p55-Rezeptors an der Granulom-Differenzierung weist die ungenügende Strukturierung der Eigranulome in den K.O.-Mäusen im Vergleich zur Gen-gesunden Kontrollgruppe hin.

Die Untersuchung einer Beteiligung des TNF an der Abwehrlage des Organismus gegen Schistosomeninvasion wurde in vorangegangenen Arbeiten unterschiedlich bewertet. Im Bereich der Schistosomula-Abwehr schreiben SEGER ET AL (1993) TNF lediglich eine geringere Bedeutung zu. Bei Messungen in einer humanen Population in Kenia wurden bei bereits wiederholt mit *S. mansoni* infizierten Patienten lediglich erhöhte IL-5-Spiegel gefunden, während andere Zytokine (z. B. auch TNF) nicht regelmäßig erhöht waren (ROBERTS ET AL 1993). Auch OSWALD (1992) sieht bei der Schistosomula-Bekämpfung TNF- α als Co-Faktor der Immunabwehr, welche in diesem Zusammenhang vorwiegend durch IFN- γ reguliert werden soll.

Ebenfalls am Schistosomula-Stadium zeigte sich eine nach ca. 7 Tagen post infectionem stattfindende Monozytenaktivierung durch IFN- γ (JAMES/COOK ET AL 1990). Die so

entstehenden zytotoxisch weitaus stärker wirksamen Makrophagen bilden erhöhte TNF-Mengen (COTRELL/JONES 1990), welches die Toxizität den Schistosomula gegenüber erhöht (JAMES/GLAVEN ET AL 1990).

Auf die Lebensdauer und spezifische Toxizität der Eosinophilen Granulozyten gegenüber den Schistosoma-Larven hat TNF nach Untersuchungen von ROTHENBERG ET AL 1998 keinen Einfluss. Diese werden stattdessen durch IL-3 in ihrer Funktion gefördert. Dafür verstärkt TNF- α die Zytotoxizität von Blutplättchen bei der Schistosomula-Abwehr (DAMONNEVILLE 1988).

Interessanterweise konnten LEPTAK/MCKERROW (1997) zeigen, dass die alleinige Injektion von Schistosomeneiern in die Leber keine Granulombildung hervorrief, wohl aber die Inokulation von Homogenaten oder die Einbringung einzelner adulter Würmer. Weiter wurde von den genannten Autoren postuliert, dass TNF- α nur in Mäusen mit adulten Wurmern oder deren Proteinen ausgeschüttet würde, da die Injektion von TNF- α in mit Wurmeiern infizierten Mäusen eine Granulombildung auslösen konnte. Diese Beobachtung kann jedoch nicht auf die Wirkung am TNF-Rezeptor p55 zurückzuführen sein, da in unseren Versuchen bei den bezüglich dieses Rezeptors Gen-insuffizienten Mäusen eine Granulominduktion erfolgte. Entweder wirkt TNF- α zur Induktion der granulomatösen Parasitenabwehr über einen anderen Mechanismus, oder es wird ein zusätzlicher Faktor benötigt, um die Reaktion auszulösen, der nur im Beisein von TNF- α wirksam oder ausgeschüttet wird. Letztendlich ist TNF- α zumindest in der Differenzierung der Granulome über den p55-Rezeptor wirksam, wie wir zeigen konnten, und die eingeschränkte Granulomzahl ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Granulominduktion nicht vom TNF alleine abhängt, aber von ihm gefördert wird.

LUKACS ET AL (1994) untersuchten hierzu die Granulombildung bei Inhibition des intercellulären Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM-1), was mit einer deutlichen Reduktion der granulomatösen Reaktion einherging. TNF fördert die ICAM-1-Expression, so dass in diesem Vorgang einer derjenigen Mechanismen angenommen werden kann, über die der Tumor-Nekrose-Faktor die Granulominduktion triggert.

7.3.1. Bezug zu anderen Arbeiten zur Immunologie bei Schistosomiasis

Bei Infektion mit *S. mansoni* entsteht eine Th1-Reaktion mit TNF- α - und NO-Produktion zum direkten Angriff am Pathogen (BRITO ET AL 2000). Als Folge würden

die befallenen Organe durch die zytolytische Wirkung der genannten Mechanismen stark geschädigt, wenn nicht eine zusätzliche Th2-Reaktion erfolgen würde, die eine Eindämmung der Schädigung und nachfolgender Fibrosierung durch Produktion anti-inflammatorischer Interleukine bewirkt (PEARCE ET AL 1998).

Diese Th2-Reaktion, welcher eine IL-2-Produktion und Lymphozyten-Aktivierung vorausgeht, wurde in Versuchen von RUTH ET AL (1996) und KEISARI ET AL (1993), welche sich mit potentiellen Schistosomiasis-Impfstoffen beschäftigten, bestätigt.

Die frühe Einwanderung von Granulozyten und die Expression von IL-4 und TNF war bereits im Rahmen früherer Versuche in Bezug auf die peribronchialen Strukturen untersucht worden (LUKACS 1996).

HAASEB ET AL (1996) berichteten über eine Abnahme in der Eiproduktion bei *S. mansoni*-Weibchen, die gegenüber rTNF- α exponiert waren. Dieses Ergebnis konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bezüglich TNF nicht bestätigt werden. Allerdings beobachten wir deutlich weniger Granulome in K.O.-Mäusen. Hierbei handelt es sich lediglich um einen Rezeptordefekt, also um den Verlust eines körpereigenen Wirkortes, während TNF- α nicht direkt gemessen wurde. Sollte Tumor-Nekrose-Faktor wegen der fehlenden Wirksamkeit am Organ im Organismus akkumulieren, so wäre unter Umständen der Parasit einer höheren Dosis ausgesetzt als im Gen-gesunden Tier. Daraus würde dann eine Abnahme der Eiproduktion erfolgen, wenn die Theorie von HAASEB (1998) auf diese Situation zutrifft. Gleichzeitig liefert diese Annahme die Erklärung für die Beobachtung, dass weniger Granulome in der K.O.-Maus gebildet werden, obwohl TNF erhalten ist, und der fehlende Rezeptor offenbar seine hauptsächliche Rolle bei der Differenzierung der Eigranulome erfüllt, so dass die geringere Granulomzahl sich nicht sicher auf den Rezeptor-Defekt alleine zurückführen lässt.

Diese Beobachtungen werden auch durch die Entdeckung eines 53-kDa-Moleküls in den Hämozyten der Zwischenwirts-Schnecke *Biomphalaria glabrata* unterstützt (OUWE-MISSI-OUKEM-BOYER ET AL 1994), welches immunoreaktiv TNF- α entspricht und bei Befall mit Mirazidien in geringerem Maße nachweisbar ist. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass TNF- α in den von Schistosomiasis betroffenen Lebewesen als Antagonist fungiert, der vom Parasiten ausgeschaltet wird, wenn dieser sich im Wirt einnistet.

7.3.1.1. Mykobakterielle Granulome

Die Arbeiten von CHENSUE ET AL (1994 und 1995) legen deutlich dar, dass Granulom-Reaktionen über zwei verschiedene immunologische Aktivierungswege zustande kommen. Während die Granulomausbildung bei Schistosomen weniger in ihrer Anzahl als vielmehr in ihrer Ausdifferenzierung durch die Anwesenheit von funktionalem TNF beeinflusst werden, zeigt sich bei den mykobakteriellen Granulomen eine deutliche Induktions- und Größenzunahme durch TNF- α . Diese Untersuchungen wurden allerdings im Bronchialsystem durchgeführt, so dass unsicher ist, inwiefern sich die Daten auf die Leber übertragen lassen, obgleich eine Übereinstimmung der Abwehrmechanismen in beiden Organsystemen als wahrscheinlich angesehen werden muss, da entsprechende Interleukine in den aktivierten Zellen ausgeschüttet werden, die sich im gesamten Körper auswirken.

7.3.1.2. Parasitäre Granulome

CHENSUE ET AL. (1995) zeigten, dass die Lungengranulom-Größe bei der Infektion mit Lösungen aus Oberflächen-Antigenen der Schistosomen-Eier nur um etwa 15% verringert ist, wenn TNF durch Antikörper inhibiert wird. Dagegen gab es eine deutliche Veränderung im Bereich der mykobakteriellen Granulome. Aufgrund der geringeren Entstehungsrate von IL-4 und IL-10 in Lymphknoten der parasitär befallenen Mäuse bei TNF-Inhibition wird postuliert, dass TNF hauptsächlich die Th2-Antwort, also die Granulom-Differenzierung im Lymphknoten steuert. Dies bestätigt sich in unseren Untersuchungen, doch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass in den Versuchen von LEPTAK (1997) die Ei-Antigene alleine keine Produktion von TNF- α auslösen konnten, so dass fragwürdig bleibt, inwiefern im eben geschilderten Experiment von CHENSUE ET AL (1995) TNF überhaupt gebildet und dann inhibiert wurde. Somit kann aufgrund der Datenlage nur postuliert werden, dass TNF zumindest zur Initiation des Granulomaufbaus benötigt wird, wenngleich der Mechanismus unklar bleibt. Wahrscheinlich wird dieser Schritt zumindest teilweise über den TNF-Rezeptor p55 abgewickelt, da die fehlende Expression dessen in unserem Versuch mit einer geringeren Granulomexpressionsrate einhergeht. Der zweite Schritt der Granulomdifferenzierung wird durch unsere Ergebnisse bestätigt und zeigt den Effektor-Ort des TNF- α in diesem Zusammenhang eindeutig im p55-Rezeptor auf.

7.3.2. Mögliche Anwendungen

Hier sollen die Möglichkeiten eines therapeutischen Eingriffes in die Immunabwehr bei Schistosomiasis aufgezeigt werden. Da bisher keine uns bekannten Langzeit-Untersuchungen der Wirksamkeit einer solchen Therapie bei Pärchenegelfall bestehen, sind die folgenden Vorschläge lediglich als Anregungen für weitere Versuche aufzufassen. Der Einsatz von InfliximabTM zum Beispiel sollte nicht zur Suppression einer Th1-Reaktion geschehen, solange nicht gezeigt werden kann, dass Mäuse mit Schistosomen-Infektion durch die geringere TNF- α -Wirkung wirklich profitieren. Evtl. könnte sich nämlich herausstellen, dass die Parenchymschäden durch die Eier der Schistosomen einen dramatischeren Verlauf oder höhere Letalität zeigen, als durch die Granulom-Fibrosen unter TNF- α hervorgerufen wird.

Der Ansatz einer Krankheitslinderung bei Schistosomiasis durch Impfung wird bereits seit Jahren untersucht, warf aber immer wieder neue Fragen und Probleme auf. Die Ansätze beziehen sich vor allem auf ein frühes Erreichen des Th2-Stadiums, da dann die inflammatorische Th1-Reaktion durch einen Wechsel in der Interleukin-Produktion abgeschwächt wird und die granulomatöse Ummauerung und spezifische Bekämpfung eingeleitet wird. Die Th2-Reaktion wird jedoch in Versuchen von RUTH ET AL (1996) und KEISARI ET AL (1993) erst bei zusätzlicher Injektion von BCG erreicht. Die spezifische Abwehr lässt sich also nicht durch die Einbringung von Oberflächen-Antigenen der Eier oder der Cercarien triggern.

7.3.2.1. Immunmodulation allgemein

In mit *Schistosoma mansoni* infizierten Mäusen wurden bereits Versuche mit Injektionen von rTNF- α und rIL-2 unternommen, um den Einfluss von immunmodulatorischen Maßnahmen auf die Granulombildungsreaktion (Th2) und die entzündlichen Vorgänge (Th1) in Leber und Lunge zu untersuchen (JOSEPH ET AL 1993). TNF- α -Injektionen verstärkten hierbei die Granulombildung und IL-2 senkte die Immun-Antwort in Form von Granulombildung. Die Modulierung des Entzündungsprozesses in der Leber ist also möglich. Jedoch gibt es keine Angaben über die Lebenserwartung einer so behandelten Maus gegenüber einer unmodifizierten Vergleichsgruppe. Die Risiken eines solchen relativ unselektiven Eingriffes in das Immunsystem sind jedoch offensichtlich: Die Senkung der spezifischen Abwehr in Form von Granulombildung durch IL-2 ist insofern kritisch zu betrachten, dass hier der gesamte Weg einer Aktivierung spezifischer Ab-

wehrreaktionen herunterreguliert wird. Die Inhibition der spezifischen Abwehr würde eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber vielen Keimen bewirken, die über eine Th2-Reaktion ausgeschaltet werden. Die Verstärkung der inflammatorischen Th1-Schiene wäre für den Patienten nicht von Vorteil, da auf diesem Wege die eigentlichen Beschwerden wie Fieber und Schmerzen entstehen, die eine Infekt-Erkrankung mit sich bringt.

7.3.2.2. TNF- α -Hemmung

Der TNF- α -Hemmer Infliximab ist ein monoklonaler chimärischer Antikörper, der selektiv den Tumor-Nekrose-Faktor inhibiert. Wie bereits zuvor erwähnt, muss an dieser Stelle erneut darauf hingewiesen werden, dass somit nach der neuen Nomenklatur Lymphotoxin- α inhibiert wird, welches den überwiegenden Anteil im TNF-Komplex ausmacht, sofern es um die Lymphknotenaktivierung im Gastrointestinaltrakt geht. Diese Substanz wird derzeit in der Therapie der rheumatoiden Arthritis mit großem Erfolg eingesetzt und auch bei M. Crohn zeigten sich beachtliche Behandlungserfolge, vor allem in häufig rezidivierenden, fortgeschrittenen Stadien der chronischen Erkrankung.

Im Rahmen dieser Unterdrückung einer Lymphfollikelaktivierung und Granulombildung würde allerdings auch die inflammatorische Th1-Reaktion verschlechtert, welche die erste Abwehrwelle gegen den Erreger bildet und die Aktivierung des histiozytären Makrophagensystems einleitet, sowie die Einwanderung der Eosinophilen initiiert. Somit ist eine Immunabwehr insgesamt gestört, sowohl unspezifisch als auch spezifisch.

Dieser Punkt wird auch bei den beschriebenen Nebenwirkungen von Infliximab deutlich. So kommt es offenbar leicht gehäuft zu allgemeinen Infekten v.a. des Respirationstraktes. Des weiteren treten gehäuft autoimmune Reaktionen in Form von Autoimmun-Antikörpern auf. Die klinische Relevanz dieser Erscheinung konnte bisher nicht geklärt werden (MAMULA/BALDASSANO 1999). 13% der Erwachsenen entwickelten unter Infliximab-Therapie Antikörper gegen Infliximab, weswegen hier ein erhöhtes Risiko eines Zwischenfalls bei Infusion des Medikamentes besteht. Bei Kindern wurde weder eine Ausbildung von Autoimmun-Antikörpern noch von Antikörpern gegen die Chimären-Antikörper beobachtet.

Ein weiterer negativer Effekt der Tumor-Nekrose-Faktor-Ausschaltung kann selbstverständlich auch darin liegen, dass das Krebsrisiko erhöht sein dürfte. Zwar gibt es zu diesem Thema keine entsprechenden Studien, doch ist TNF, wie sein Name schon sagt,

ein wichtiger Faktor der Bekämpfung von Tumoren. Deshalb ist anzunehmen, dass seine Inhibition das Risiko des Ausbrechens einer malignen Erkrankung erhöht.

Aus dem gesagten folgt, dass es derzeit keinen Sinn macht, bedenkenlos InfliximabTM zur Abschwächung granulomatöser Reaktionen bei Schistosomiasis zu infundieren. Weder kann man die Risiken ausschließen, die mit einer Verschlechterung der gesamten Immunsituation einhergehen, noch kann man sagen, ob der Nutzen wirklich einen derartigen Eingriff in die Abwehrlage des Organismus rechtfertigt. Denn letztendlich wissen wir bisher nicht, ob die Schistosomiasis-Symptome überhaupt gebessert würden, wenn eine granulomatöse Abwehrreaktion nicht länger stattfindet. Schließlich kann das Gegenteil ebenso der Fall sein, wenn die Eier nicht mehr durch Makrophagen demarkiert werden.

So bleibt festzuhalten, dass der TNF-Rezeptor p55 eine wichtige Rolle in der Granulominduktion und -organisation spielt, was sich histologisch in Gewebeschnitten der Leber sehr gut nachweisen lässt. Der klinische Verlauf der Erkrankung an sich, zwischen den immuninsuffizienten und -kompetenten Versuchsgruppen, weist keinen signifikanten Unterschied im Beobachtungszeitraum von 8 Wochen auf. Dafür zeigte sich histologisch ein deutlicher Unterschied, der die oben genannte Interpretation in dieser Form zulässt. Eine Behandlung mit Inhibitoren des TNF-Komplexes ist somit möglicherweise effizient für die Verminderung der durch Granulomansammlungen ausgelösten Symptome wie z.B. Aszites, jedoch geht diese Therapie mit zu vielen Risiken und Nebenwirkungen einher, um sie als Standard bei schwerer Schistosomiasis einzusetzen, zumal es bisher keine entsprechenden Untersuchungen gibt, die eine Langzeitbeobachtung des Krankheitsverlaufes bieten, wenn keine spezifische granulomatöse Reaktion mehr stattfindet.

8. Zusammenfassung

Zur Bestimmung der Rolle von TNF α bei der Bildung parasitärer Granulome am Beispiel des Pärchenegels *Schistosoma mansoni* wurde die Anzahl und Ausbildung der granulomatösen Abwehrreaktion in Knockout-Mäusen untersucht, die bezüglich des TNF-Stoffwechsels durch Rezeptormangel immunologisch inkompetent sind.

Zuerst wurde den Mäusen eine Suspension mit Cercarien von *S. mansoni* injiziert. Die Inkubationsphase betrug 8 Wochen. Nach Einschlafen der Mäuse erfolgte eine Ausspülung der Würmer aus dem Portalvenensystem. Die zu untersuchenden Organe wurden entnommen und histologisch (Hämatoxilin-Eosin-Färbung) und immunhistochemisch aufbereitet. Von den verwendeten Markern für Oberflächen-Antigene erwies sich lediglich F4/80 als aussagekräftig, jedoch konnten in den K.O.-Mäusen im Vergleich zur gesunden Gruppe zu wenige derart markierte Zellen gefunden werden, um ausreichend Rückschlüsse auf Granulomzahl und -aufbau zu erhalten. Zur Bestätigung der Ergebnisse der in dieser Hinsicht überlegen erscheinenden Histologie wurden Eosinophile Granulozyten über Zugabe von AEC-Substrat angefärbt.

Die Untersuchungen zeigen eine Abhängigkeit der granulomatösen, spezifischen Immunreaktion bei Befall mit *Schistosoma mansoni* vom Vorhandensein des TNF-Rezeptors p55. Dies zeigt sich an den veränderten immunologischen Vorgängen in TNFRp55-Knockout-Mäusen.

Im direkten Vergleich der K.O.-Mäuse mit einer Gen-gesunden, immunkompetenten Kontrollgruppe aus BL/6-Mäusen, die dem K.O.-Stamm genetisch nahestehen, zeigen sich

- eine geringere Strukturierung der Granulome in der Leber,
- eine verzögerte Ausbildung der Granulome und
- eine verminderte Nachweisbarkeit von aktivierten Gewebsmakrophagen über spezifische, Antikörper-vermittelte Markierung von Oberflächenantigenen.

Die Aktivierung von Granulozyten erfolgt jedoch in unveränderter Art und Weise. Die Granulomzahl in der Leber ist bei den immuninkompetenten K.O.-Mäusen ebenfalls vermindert.

Untersuchungen in Milz und Darm ergaben keine aussagekräftigen Ergebnisse. In der Milz-Pulpa lassen sich keine Granulome nachweisen, lediglich in der Kapsel treten sie gelegentlich auf. Die Anzahl der im Darm erkennbaren spezifischen Abwehrreaktionen um Schistosomeneier korreliert zumindest im untersuchten Bereich des proximalen Colons nicht signifikant mit dem Schistosomenbefall, der anhand anderer Parameter ermittelt wurde.

Die Ergebnisse insgesamt weisen auf eine insuffiziente Abwehr bei Nichtvorhandensein des p55-Rezeptors für TNF α gegen die pathogenen Eier des Parasiten *S. mansoni* hin. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass TNF für die spezifische granulomatöse Immunreaktion bei parasitären Erkrankungen benötigt wird. Allerdings lässt sich aufgrund dieser Erkenntnis nicht mit Sicherheit sagen, ob die Unterdrückung der Granulombildung und der inflammatorischen Reaktion auf den Reiz der Schistosomeneier einen Benefit für den Wirt bedeutet, oder andere pathologische Reaktionen fördert.

9. Literatur

- ALIMZHANOV MB, KUPRASH DV, KOSCO-VILBOIS MH, LUZ A, TURETSKAYA RL, TARAKHOVSKY A, RAJEWSKY K, NEDOSPASOV SA, PFEFFER K, Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin β -deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 9302-7, Immunology, 1997 Aug
- AMIRI P, HAAK-FRENDSCHO M, ROBBINS K, MCKERROW JH, STEWART T, JARDIEU P, Anti-immunoglobulin E treatment decreases worm burden and egg production in Schistosoma mansoni-infected normal and interferon gamma knockout mice, J Exp Med 180:43-51, 1994 Jul
- AMIRI P, LOCKSLEY RM, PARSLow TG, SADICK M, RECTOR E, RITTER D, MCKERROW JH, Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice, Nature 356(6370):604-7, 1992 Apr 16
- BACHMEIER K, PUMMERER C, KOZIARDSKI I, PFEFFER K, MAK TW, NEU N, PENNINGER JM, Low-Molecular-Weight Tumor Necrosis Factor Receptor p55 Controls Induction of Autoimmune Heart Disease, Circulation 95(3):655-66, 1997
- BELL DR, Lecture notes on tropical medicine, Blackwell Sciences Ltd, Oxford u.a. 1981-1995, Reprint der 4. Auflage 1996
- BRAUN JR, WILLNOW TE, Die „Knockout“-Maus als Krankheitsmodell – Prinzipien und klinische Relevanz, Dt Ärztebl 93(26):B1385-7, 1996
- BRITO CF, CALDAS IR, COURA FILHO P, CORREA-OLIVEIRA R, OLIVEIRA SC, CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14KDA Schistosoma mansoni fatty acid-binding protein, Scand J Immunol 51(6):595-601, 2000 Jun
- BURDON D, TIEDJE T, PFEFFER K, VOLLMER E, ZABEL P, The role of tumor necrosis factor in the development of multiple organ failure in a murine model, Crit Care Med 28(6):1962-7, 2000
- CHEEVER AW., POINDEXTER RW., WYNN TA., Egg laying is delayed but worm fecundity is normal in SCID mice infected with Schistosoma japonicum and S.

- mansoni with or without recombinant tumour necrosis factor alpha treatment, *Infection & Immunity* 67(5):2201-8, 1999 May
- CHENSUE SW, TEREBUH PD, WARMINGTON KS, HERSHEY SD, EVANOFF HL, KUNKEL SL, HIGASHI GL, Role of IL-4 and IFN-gamma in *Schistosoma mansoni* egg-induced hypersensitivity granuloma formation. Orchestration, relative contribution, and relationship to macrophage function, *J Immunol* 148(3):900-6, 1992 Feb 1
- CHENSUE SW, WARMINGTON KS, RUTH JH, LINCOLN P, KUNKEL SL, Cytokine function during mycobacterial and schistosomal antigen-induced infection. Local and regional participation of IFN-gamma IL-10, and TNF, *J Immunol* 154(11):5969-76, 1995 Jun 1
- CHENSUE SW, WARMINGTON K, RUTH J, LINCOLN P, KUO MC, KUNKEL SL, Cytokine responses during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Production of Th1 and Th2 cytokines and relative contribution of tumor necrosis factor, *Am J Pathol* 145(5):1105-13, 1994 Nov
- CHENSUE SW, WARMINGTON K, RUTH JH, LUKACS N, KUNKEL SL, Mycobacterial and schistosomal antigen-elicited granuloma formation in IFN-gamma and IL-4 knockout mice: analysis of local and regional cytokine and chemokine networks, *J Immunol* 159(7):3565-73, 1997 Oct 1
- CLASSEN M, ALLOLIO B, *Innere Medizin*, 4. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München, p. 365-66, 1998
- CONTIGLI C, CARMO SA., GOES AM, Characterization of *Schistosoma mansoni* specific human T-T hybrids, *Hybridoma* 17(5):421-9, 1998 Oct
- COOK GC, *Manson's Tropical Diseases*, 20th Ed, Saunders, London-Philadelphia-Toronto-Sydney-Tokyo, 1413-56, 1996
- COTTRELL B, JONES D, Functional and phenotypic changes associated with the in vitro development of human monocytes into activated macrophages, *FEMS Microbiology Immunology* 2(5-6):333-7, 1990 Dec
- DAMONNEVILLE M, WIETZERBIN J, PANCRE V, JOSEPH M, DELANOYE A, CAPRON A, AURIAULT C, Recombinant tumor necrosis factors mediate platelet cytotoxicity to *Schistosoma mansoni* larvae, *J Immunol* 140(11):3962-5, 1988 Jun 1

- DIESFELD HJ, KRAUSE G, Praktische Tropen- und Reisemedizin: Empfehlungen zur Beratung, Diagnose und Therapie von Tropenkrankheiten. Thieme, Stuttgart - New York, 1997
- DISKO R, KRAMPITZ HE, Eine quantitative Methode zur zahl- und volumenregulierten Übertragung von Mikroorganismen in Suspensionsmedien, *Experientia* 26(2): 222-4, 1969
- DISKO R, An Automatic Method for Recording the Emergence of Cercariae of *Schistosoma mansoni* From the Snail *Biomphalaria glabrata*, *Z Parasitenkd* 155:235-9, 1978
- DISKO R, Schistosomiasis. Probleme und Erfolge, *Fortschr Med* 100(17):778-84, 1982
- DUVALL RH, DEWITT WB, An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals, *Am. J. Tropical Medicine and Hygiene* 16:483-86, 1967 Nov 4
- EHLERS S, KUTSCH S, EHLERS EM, BENINI J, PFEFFER K, Lethal Granuloma Disintegration in Mycobacteria-Infected THFRp55^{-/-} Mice is Dependent on T Cells and IL-12, *J Immunol* 165(1):483-92, 2000
- ENDRES R, ALIMZHANOV MB, PLITZ T, FÜTTERER A, KOSCO-VILBOIS MH, NEDOSPASOV SA, RAJEWKY L, PFEFFER K, Mature Follicular Dendritic Cell Networks Depend on Expressions of Lymphotoxin β and Tumor Necrosis Factor by B Cells, *J Exp Med* 189(1):159-67, 1999
- ENDRES R, LUZ A, SCHULZE H, NEUBAUER H, FÜTTERER A, HOLLAND SM, WAGNER H, PFEFFER K, Listeriosis in p47^{phox}^{-/-} and TRp55^{-/-} Mice: Protection Despite Absence of ROI and Susceptibility Despite Presence of RNI, *Immunity* 7:419-32, 1997
- FALCONE FH, DAHINDEN CA, GIBBS BF, NOLL T, AMON U, HEBESTREIT H, ABRAHAMSEN O, KLAUCKE J, SCHLAAK M, HAAS H, Human basophils release interleukin-4 after stimulation with *Schistosoma mansoni* egg antigen, *Eur J Immunol* 26 (5): 1147-55, 1996
- FÜTTERER A, MINK K, LUZ A, KOSCO-VILBOIS MH, PFEFFER K, The Lymphotoxin β Receptor Controls Organogenesis and Affinity Maturation in Peripheral Lymphoid Tissues, *Immunity* 9:59-70, 1998

- HASEEB MA, *Schistosoma mansoni*: females enhance [14C]-tyrosine incorporation in males maintained in vitro, *J Helminthol* 72(2):123-6, 1998 Jun
- HASEEB MA, SOLOMON WB, PALMA JF, *Schistosoma mansoni*: effect of recombinant tumor necrosis factor alpha on and [14C]-tyrosine uptake in females maintained in vitro, *Comparative Biochemistry & Physiology. Part C Pharmacology Toxicology Endocrinology* 115(3):265-9, 1996 Nov
- HERNANDEZ HJ, WANG Y, STADECKER MJ, In infection with *Schistosoma mansoni*, B cells are required for T helper type 2 cell responses but not for granuloma formation, *J Immunol* 158:4832-7, 1997
- HERNANDEZ HJ, WANG Y, TZELLAS N, STADECKER MJ, Expression of class II, but not class I, major histocompatibility complex molecules is required for granuloma formation in infection with *Schistosoma mansoni*, *Eur J Immunol* 27:1170-6, 1997
- HIEN N, DISKO R, Versuche zum periodischen Verhalten von *Biomphalaria glabrata*, *Z Parasitenkd* 64:217-31, 1981
- JAMES SL, CHEEVER AW, CASPAR P, WYNN TA, Inducible nitric oxide synthase-deficient mice develop enhanced type 1 cytokine-associated cellular and humoral immune responses after vaccination with attenuated *Schistosoma mansoni* cercariae but display partially reduced resistance, *Infection & Immunity* 66(8): 3510-8, 1998 Aug
- JAMES SL, COOK KW, LAZDINS JK, Activation of human monocyte-derived macrophages to kill schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro, *J Immunol* 145(8):2686-90, 1990 Oct 15
- JAMES SL, GLAVEN J, GOLDENBERG S, MELTZER MS, PEARCE E, Tumour necrosis factor (TNF) as a mediator of macrophage helminthotoxic activity, *Parasite Immunol* 12(1):1-13, 1990 Jan
- JOSEPH AL, BOROS DL, Tumor necrosis factor plays a role in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation, *J Immunol* 151(10):5461-71, 1993 Nov 15

- KAYSER FH, BIENZ KA, ECKERT J, LINDENMANN J, Medizinische Mikrobiologie: Immunologie, Bakteriologie, Mykologie, Virologie, Parasitologie, 8. Überarb. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1993
- KEISARI Y, SEGER M, LENGY J, PAULI H, NATHAN E, GOLD D, IL-1, TNF-alpha and IL-2 production by peritoneal and spleen cells from *Schistosoma mansoni* infected mice and its potentiation by preimmunization with schistosomal antigens and immunostimulants, *Immunobiol* 188(4-5):446-59, 1993 Aug
- KING CL, MALHOTRA I, JIA X, *Schistosoma mansoni*: Protective immunity in IL-4-deficient mice, *Exp Parasitol* 84:245-52, 1996.
- KING CL, XIANLI J, JUNE CH, ABE R, LEE KP, CD28-deficient mice generate an impaired Th2 response to *Schistosoma mansoni* infection, *Eur J Immunol* 26:2448-55, 1996.
- KUPRASH DV, ALIMZHANOV MB, TUMANOV AV, ANDERSON AO, PFEFFER K, NEDOSPASOV SA, TNF and Lymphotoxin β Cooperate in the Maintenance of Secondary Lymphoid Tissue Microarchitecture But Not in the Development of Lymph Nodes, *J Immunol* 163(12):6575-80, 1999
- LEE SC, JAFFAR ZH, WAN KS, HOLGATE ST, ROBERTS K, Regulation of pulmonary T cell responses to inhaled antigen: role in Th1- and Th2-mediated inflammation. *J Immunol* 162(11):6867-79, 1999 Jun 1
- LEPTAK CL, MCKERROW JH, Schistosome egg granulomas and hepatic expression of TNF-alpha are dependent on immune priming during parasite maturation, *J Immunol* 158(1):301-7, 1997 Jan 1
- LI XQ, ITOH M, YANO A, MIYAMOTO K, TAKEUCHI Y, Immunohistochemical detection of testicular macrophages during the period of postnatal maturation in the mouse. *Int J Androl* 21(6):370-6, 1998 Dec
- LÖSCHER T, RUPPEL A, SCHUBERT S, Schistosomiasis (Bilharziose) und andere Trematodeninfektionen. In: LANG W, LÖSCHER T: Tropenmedizin in Klinik und Praxis, 101-24. 3. Auflage, Thieme, Stuttgart 2000
- LUKACS NW, Cytokines in allergic eosinophilic airway inflammation, *Biol Signals* 5(4):209-14, 1996 Jul-Aug

- LUKACS NW, CHENSUE SW, STRIETER RM, WARMINGTON K, KUNKEL SL,
Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF-alpha-inducible
intercellular adhesion molecule-1, *J Immunol* 152(12):5883-9, 1994 Jun 15
- MAMULA P, BALDASSANO R, *New Therapy, New Hope: Update on Infliximab*, 1999,
<http://www.ccfa.org/weekly/wkly1223.htm>
- MARSHALL AJ, BRUNET LR, VAN GESSEL Y, ALCARAZ A, BLISS SK, PEARCE EJ,
DENKERS E.Y., *Toxoplasma gondii* and *Schistosoma mansoni* synergize to
promote hepatocyte dysfunction associated with high levels of plasma TNF-
alpha and early death in C57BL/6 mice, *J Immunol* 163(4):2089-97, 1999 Aug
15
- MCKNIGHT AJ, GORDON S, *The EGF-TM7 family: unusual structures at the leucocyte
surface. J Leucocyte Biol* 63(3):271-80, 1998 Mar
- MEHLHORN H, PIEKARSKI G, *Grundriß der Parasitenkunde: Parasiten des Menschen und
der Nutztiere*, 4th Ed, G. Fischer, Stuttgart-Jena 1995
- OSWALD IP, WYNN TA, SHER A, JAMES SL, *Interleukin 10 inhibits macrophage
microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis
factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced
activation, Proc Natl Acad Sci USA* 89(18):8676-80, 1992 Sep 15
- OUWE-MISS-OUKEM-BOYER O, PORCHET E, CAPRON A, DISSOUS C, *Characterization of
immunoreactive TNFalpha molecules in the gastropod Biomphalaria glabrata,
Developmental & Comparative Immunol* 18(3):211-8, 1994 May-Jun
- PEARCE EJ, LA FLAMME A, SABIN E, BRUNET LR, *The initiation and function of Th2
responses during infection with Schistosoma mansoni, Advances in
Experimental Medicine & Biology* 452:67-73, 1998
- PFEFFER K, MATSUYAMA T, KÜNDIG TM, WAKEHAM A, KISHIHARA K, SHAHINIAN A,
WIEGMANN K, OHASHI PS, KRONKE M, MACK TW, *Mice Deficient for the 55 kd
Tumor Necrosis Factor Receptor Are Resistant to Endotoxic Shock, Yet
Succumb to L. monocytogenes Infection. Cell* 73: 457-67, 1993
- PFEFFER K, *Inst. f. Med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München,
persönliche Mitteilung*, 1997
- PHARMINGEN, *Research Products Catalog*, San Diego, 1999

- PLITZ T, HUFFSTADT U, ENDRES R, SCHALLER E, MAK TW, WAGNER H, PFEFFER K, The resistance against *Listeria monocytogenes* and the formation of germinal centers depend on a functional death domain of the 55 kDa tumor necrosis factor receptor, *Eur J Immunol* 29:581-91, 1999
- REMOUE F, POULAIN-GODEFROY O, MIELCAREK N, PIERCE R, CAPRON A, LOCHT C, RIVEAU G., Local transient induction of inflammatory cytokines after intranasal administration of recombinant *Bordetella pertussis*, *Microbial Pathogenesis* 22(5):305-13, 1997 May
- RIEDE UN, SCHÄFER HE, *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 4. Aufl, Thieme, Stuttgart - New York, 1995
- RITTER DM, MCKERROW JH, Intercellular adhesion molecule 1 is the major adhesion molecule expressed during schistosome granuloma formation, *Infection & Immunity* 64(11): 4706-13, 1996 Nov
- ROBERTS M, BUTTERWORTH AE, KIMANI G, KAMAU T, FULFORD AJ, DUNNE DW, OUMA JH, STURROCK RF, Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection, *Infection & Immunity* 61(12):4984-93, 1993 Dec
- ROTHENBERG ME, OWEN WF JR, SILBERSTEIN DS, WOODS J, SOBERMAN RJ, AUSTEN KF, STEVENS RL, Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3, *J Clinical Investigation* 81(6):1986-92, 1988 Jun
- RUTH JH, BIENKOWSKI M, WARMINGTON KS, LINCOLN PM, KUNKEL SL, CHENSUE SW, IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) expression, function, and cytokine-mediated regulation during mycobacterial and schistosomal antigen-elicited granuloma formation, *J Immunol* 156(7):2503-9, 1996 Apr 1
- SABIN EA, PEARCE EJ, Early IL-4 production by non-CD4+ cells at the site of antigen deposition predicts the development of a T helper 2 cell response to *Schistosoma mansoni* eggs, *J Immunol* 155(10):4844-53, 1995 Nov 15
- SACCO RE, JENSEN RJ, THOEN CO, SANDOR M, WEINSTOCK J, LYNCH RG, DAILEY MO, Cytokine secretion and adhesion molecule expression by granuloma T lymphocytes in *Mycobacterium avium* infection, *Am J Pathology* 148(6):1935-48, 1996 Jun

- SEGER M, GOLD D, LENGY J, PAULI H, KEISARI Y, The schistosomicidal activity and the production of IL-1 and TNF-alpha by peritoneal macrophages from infected mice and their potentiation by muramyl tripeptide-phosphatidyl ethanolamine (MTP-PE) treatment, *Parasite Immunol* 15(6):339-47, 1993 Jun
- SEGURA JA, RUIZ-BELLIDO MA, ARENAS M, LOBO C, MARQUEZ J, ALONSO FJ, Ehrlich aszites tumor cells expressing anti-sense glutaminase mRNA lose their capacity to evade the mouse immune system. *Int J Cancer* 91(3):379-84, 2001 Feb
- SEILER P, WENZEL I, WAGENFELD A, YEUNG CH, NIESCHLAG E, COOPER TE, The appearance of basal cells in the developing murine epididymis and their temporal expression of macrophage antigens. *Int J Androl* 21(4):217-26, 1998 Aug
- SOUTO JT, FIGUEIREDO F, FURLANETTO A, PFEFFER K, ROSSI MA, SILVA JS, Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Determine Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Mice, *Am J Pathol* 156(5):1811-20, 2000 May
- STREET M, COULSON PS, SADLER C, WARNOCK LJ, MCLAUGHLIN D, BLUETHMANN H, WILSON RA, TNF is essential for the cell-mediated protective immunity induced by the radiation attenuated schistosome vaccine, *J Immunol* 163(8):4489-94, 1999 Oct 15
- STRICKLAND T, RAMIREZ BL, Schistosomiasis. In: STRICKLAND GT, Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infections Diseases, 8th Ed, 804-32. Saunders, Philadelphia 2000
- SUBRAMANIAN G, KAZURA JW, PEARLMAN E, JIA X, MALHOTRA I, KING CL, B7-2 requirement for helminth-induced granuloma formation and CD4 type 2 T helper cell cytokine expression, *J Immunol* 158:5914-20, 1997
- TROTTEIN F, NUTTEN S, ANGELI V, DELERIVE P, TEISSIER E, CAPRON A, STAELS B, CAPRON M, *Schistosoma mansoni* schistosomula reduce E-selectin and VCAM-1 expression in TNF-alpha-stimulated lung microvascular endothelial cells by interfering with the NF-kappaB pathway, *Eur J Immunol* 29(11):3691-701, 1999 Nov
- WYNN TA, JANKOVIC D, HIENY S, ZIONCHECK K, JARDIEU P, CHEEVER AW, SHER A, IL-12 exacerbates rather than suppresses T helper 2-dependent pathology in the absence of endogenous IFN-gamma, *J Immunol* 154:3999-4009, 1995

YAP G, CHEEVER A, CASPAR P, JANKOVIC D, SHER A, Unimpaired down-modulation of the hepatic granulomatous response in CD8 T-cell- and gamma interferon-deficient mice chronically infected with *Schistosoma mansoni*, *Infection & Immunity* 65:2583-6, 1997 Jul

10. Abbildungen und Tabellen

10.1 Abbildungen

- 1.1 *Der Entwicklungszyklus von Schistosoma mansoni.* (p. 2)
- 1.2 *Ei des Pärchenegels Schistosoma mansoni.* (p. 4)
- 3.1 *Adulte Schistosomen, aus dem Portalvenen-System befallener Mäuse ausgeschwemmt.* (p. 12)
- 3.2 *Schistosoma mansoni, Färbung mit Karmesinrot.* (p. 12)
- 3.3 *Biomphalaria glabrata var. Belo Horizonte, Albinoform, 3-fach vergrößert.* (p. 13)
- 3.4 *Cercarie (Gabelschwanzlarve) von Schistosoma mansoni, Länge 0,6 mm, 200-fach vergrößert.* (p. 13)
- 4.1 *Schematischer Aufbau einer Versuchsreihe.* (p. 22)
- 4.2 *Mittelwert und Standardabweichung der Cercarienzahl bei verschiedenen Kanülenstärken (Angaben in Cercarien pro ml).* (p. 25)
- 4.3 *Spritztechnik.* (p. 27)
- 4.4 *Präparationsvorgang.* (p. 28)
- 4.5 *Ausspülvorgang.* (p. 29)
- 6.1 *Makroskopischer Leberbefall.* (p. 41)
- 6.2 *Korrelation zwischen makroskopischen Leberbefallsstufen (x-Achse) und Granulomzahl pro Gesichtsfeld (y-Achse).* (p. 42)
- 6.3 *Skizze zur Zählweise bei der Bestimmung der Granulomdichte in der Leber.* (p. 44)
- 6.4 *Granulome in der Leber (HE-Färbung, Gelbfilteraufnahme 100-fach vergrößert).* (p. 45)
- 6.5 *Zwei Ei-Anschnitte in einem Granulom der Leber (HE-Färbung, 400-fach vergrößert).* (p. 47)

- 6.6** *Ansammlung Eosinophiler Granulozyten (HE-Färbung, Darstellung in veränderter Farbgebung um die eosinophilen Zellsäume sichtbar zu machen, 400-fache Vergrößerung). (p. 49)*
- 6.7** *Unterschiede in der Granulomzahl pro Gesichtsfeld bei K.O.- und BL/6-Mausstämmen. (p. 50)*
- 6.8** *Unterschiede in der Granulomidentifikation bei verschiedenen Färbemethoden. (p. 51)*
- 6.9** *Ei-Granulome im proximalen Colon der BL/6-Mäuse als Beispiel für den Colon-Befall. (p. 53)*
- 6.10** *Makroskopischer Vergleich von Lebern in den Inokulationsstufen I, II und III bei NMRI-Mäusen und BL/6-Mäusen. (p. 56)*
- 6.11** *Vergleich der Leber-Granulomzahlen pro Gesichtsfeld von NMRI-Mäusen und BL/6-Mäusen. (p. 58)*
- 6.12** *Vergleich der Leber zwischen BL/6-Mäusen und K.O.-Mäusen. (p. 60)*
- 6.13** *Milz mit mehrkernigen Riesenzellen (400-fach vergrößert). (p. 61)*
- 6.14** *Frisches Granulom in Form einer Granulozytenansammlung (100-fach vergrößert). (p. 63)*
- 6.15** *Organisiertes Granulom (HE-Färbung, 100-fach vergrößert). (p. 64)*
- 6.16** *Vergleich der Granulomzahlen pro Gesichtsfeld bei K.O.-Männchen und K.O.-Weibchen in Inokulationsstufen I und II. (p. 67)*
- 6.17** *Eigranulom mit Eosinophilen und zentralem Schistosoma-Ei (Eosinophilen-Färbung, 400-fach vergrößert). (p. 68)*
- 6.18** *Vergleich eines Schistosomen-Ei-Granulomes einer K.O.-Maus (linke Spalte) mit einer entsprechenden Reaktion in der BL/6-Kontrollgruppe (rechte Spalte). Das selbe Granulom wurde jeweils mit einem Grünfilter (untere Reihe) und einem Gelbfilter (obere Reihe) aufgenommen (Eosinophilen-Färbung, Vergrößerung 100-fach). (p. 70)*

- 6.19** *Vergleich der Auszählungsergebnisse (Granulome pro Gesichtsfeld) in Eosinophilen-Färbung der Leberpräparate von K.O.-Mäusen und BL/6-Kontrollen in verschiedenen Inokulationsstufen (I bis IV).* (p. 71)
- 6.20** *Neutrophile Granulozyten im Gefäßsystem (Gr1-Antikörper-Markierung, 1000-fach vergrößert).* (p. 73)
- 6.21** *Granulom mit angefärbtem Saum aus Eosinophilen um Ei (Eosinophilen-Färbung, 100-fach vergrößert).* (p. 74)
- 6.22** *Monozyt im Gefäßsystem (Mac1 α -Antikörper-Markierung, 400-fach vergrößert).* (p. 76)
- 6.23** *F4/80-markierte Zellansammlungen (F4/80-Antikörper-Markierung, 100-fach vergrößert).* (p. 77)
- 6.24** *F4/80-markiertes Granulom (Ausschnitt, F4/80-Antikörper-Markierung, 400-fach vergrößert).* (p. 78)
- 6.25** *Eigranulom von Schistosoma mansoni im proximalen Colon (HE-Färbung, 100-fach vergrößert).* (p. 82)
- 6.26** *Granulom mit 2 Eiern von Schistosoma mansoni in der Darm-Mucosa (HE-Färbung, 400-fach vergrößert).* (p. 83)
- 6.27** *Multiple Eier in der Mucosa und Submucosa des Colons (HE-Färbung, 50-fach vergrößert).* (p. 84)

10.2 Tabellen

- 5.1** *Einzelschritte des immunhistochemischen Färbeprozesses.* (p. 33)
- 5.2** *Für die immunhistochemische Färbung verwendete Lösungen.* (p. 35)
- 5.3** *Antikörper-Verdünnungen für die einzelnen darzustellenden Zelltypen.* (p. 36)
- 5.4** *Ablaufplan der immunologischen Färbung.* (p. 37)
- 6.1** *Gewichtszunahme (in g) von NMRI- und BL/6-Mäusen im Beobachtungszeitraum von 8 Wochen.* (p.55)
- 6.2** *Anzahl ausgeschwemmter Würmer bei NMRI- und BL/6-Mäusen.* (p. 57)
- 6.3** *Gewichtszunahme von BL/6- und K.O.-Mäusen im Beobachtungszeitraum von 8 Wochen* (p. 59)

- 6.4** *Mittlere Anzahl ausgeschwemmter Würmer bei weiblichen BL/6- und K.O.-Mäusen. (p. 62)*
- 6.5** *Mittlere Anzahl ausgeschwemmter Würmer bei männlichen BL/6- und K.O.-Mäusen. (p. 65)*
- 6.6** *Mittelwerte der Zahl der durch F4/80-Antikörper markierbaren Leber-Granulome in den drei Mausstämmen, bezogen auf die Inokulationsstufen I-III. (p. 79)*

11. Dank

gilt vor allem meinen Betreuern, Prof. Dr. Disko und Prof. Dr. Pfeffer, für ihre Unterstützung sowohl durch fachliche Ratschläge als auch durch die Bereitstellung von Labor-Material, besonders aber für den interessanten Themenvorschlag zu dieser Arbeit, die mich in den letzten Jahren auf vielseitige Weise beschäftigt hat und mir ermöglichte, neben dem fachlich/theoretischen Hintergrundwissen mir auch vielerlei praktische Kenntnisse, Fähigkeiten und Fertigkeiten anzueignen.

Zur Durchführung dieser Arbeit mussten über einen längeren Zeitraum hinweg insgesamt 87 Mäuse verschiedener Stämme in mehreren Gruppen aufgezogen und versorgt werden. Hierfür möchte ich dem engagierten Tierpflege-Team der TU-München im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene danken, die dies mit großer Sorgfalt erledigten und mir stets Nachricht bei Krankheits- oder Todesfällen gaben. Die Mäuse selbst wurden durch Herrn Endres beschafft und mir von Prof. Dr. Pfeffer zur Verfügung gestellt.

Die Schnecken- und Cercarienzucht im Parasitologie-Labor erfolgte unter Aufsicht von Prof. Dr. Disko durch Frau Herdlicka und Frau Wackenhut, die sich auch dafür einsetzten, dass immer ausreichend Versuchsmaterial vorhanden war. Von mir ausgezählte Cercariensuspensionen wurden stichprobenweise durch Frau Wackenhut kontrolliert. Für die gründliche Einweisung in die Inokulationstechnik danke ich Prof. Dr. Disko. Bei der Präparation der Mausorgane war mir Frau Herdlicka eine große Hilfe, ebenso wie bei der immunhistochemischen Anfärbung großer Präparatemengen. Eingewiesen in die Herstellung von Antikörper-markierten Präparaten hat mich dankenswerter Weise Frau Mink. Die für die Herstellung von Cryoschnitten benötigte Ausrüstung erhielt ich von Frau Graczoll. Histologische Präparate in HE-Färbung wurden von Frau Noll am Institut für Pathologie der TU München angefertigt.

Zellmaterial habe ich zum großen Teil an der FH Regensburg fotografiert, mit tatkräftiger Unterstützung durch Frau Feldhordt, Herrn Gaßner und Herrn Haimerl, die mir hierzu die Verwendung eines Mikroskops mit spezieller Kameraausrüstung ermöglichten. Für das Einscannen und wertvolle Hinweise zur computergerechten Weiterverarbeitung von Dias und Fotos danke ich Prof. Dr. Schicker. Nicht zuletzt möchte ich meinem Vater für viele hilfreiche Tipps beim Computereinsatz danken.

12. Lebenslauf

Name: Philipp Wagner
Geburtsdatum: 18. Dezember 1973
Geburtsort: Heidelberg
Eltern: Prof. Dr. Hans-Jürgen Wagner, Dipl.-Mathematiker
Elisabeth Wagner, geb. Beisel

Schulbildung

1980-1981 Grundschule in Göttingen-Elliehausen
1981-1984 Volksschule Großberg in Pentling bei Regensburg
1984-1993 Gymnasium Neutraubling
09.07.1993 Abitur

Studium der Humanmedizin

1993-1995 Vorklinik an der Universität Regensburg
1995-2000 Klinisches Studium an der TU München
15.05.2000 Drittes Staatsexamen an der TU München

Praktische Tätigkeiten

1994-1995 Stud. Hilfskraft am Inst. f. Anatomie der Universität Regensburg
(Kursassistent in Makroskopischer Anatomie)
1996-2000 Stud. Hilfskraft im Giftnotruf München, Klinikum rechts der
Isar (Aufbau einer Gifttier-Datenbank im Rahmen des Toxinfo-
Informationssystems).
1998 Auslands-Famulatur am Marondera Provincial Hospital,
Marondera, Zimbabwe.
1999 Stud. Hilfskraft am Institut für med. Statistik und Epidemiologie
der TU München (Dokumentationsarbeiten für Toxinfo im
Internet)
seit 01.06.2000 Arzt im Praktikum am Universitätsklinikum Heidelberg, Innere
Medizin I, Endokrinologie und Stoffwechsel.

