

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

Untersuchungen zur Substrataufnahme durch
Cercarien von *Schistosoma mansoni*:
Aminosäuren und Zucker

Bernd Hippel

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. G. Häcker

Die Dissertation wurde am 18.12.2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.02.2002 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1 Historische Bezüge
- 1.2 Gattungen und Entwicklungszyklus
- 1.3 Epidemiologie und Zukunftsperspektiven

2. Literaturübersicht

- 2.1 Cercarien-Morphologie
- 2.2 Cercarienphysiologie
 - 2.2.1 Beobachtungen unter natürlichen Bedingungen
 - 2.2.2 Beobachtungen unter Laboratoriumsbedingungen
 - 2.2.2.1 Energiestoffwechsel
 - 2.2.2.2 Energieverbrauch
 - 2.2.2.3 Metabolismus und Penetration
 - 2.2.3 Umgebungsfaktoren und Überleben der Cercarien
 - 2.2.3.1 Literaturübersicht
 - 2.2.3.2 Problemstellung der eigenen Arbeit

3. Material und Methodik

- 3.1 Infektionszyklus unter Laboratoriumsbedingungen
 - 3.1.1 Schneckenhaltung
 - 3.1.2 Infektion der Schnecken
 - 3.1.3 Miracidien-Gewinnung
 - 3.1.4 Versuchsbedingungen
- 3.2 Versuchsdurchführung
- 3.3 Versuche zum Nachweis der Substrataufnahme
 - 3.3.1 Nachweis der Glucoseaufnahme
 - 3.3.2 Nachweis der Alaninaufnahme

4. Ergebnisse

- 4.1 Ergebnisse der Untersuchungen zur maximalen Überlebenszeit
 - 4.1.1 Untersuchung mit dechloriertem Trinkwasser (DTW)
 - 4.1.2 Untersuchung mit Alanin 0,03 mol/ l in DTW
 - 4.1.3 Untersuchungen mit verschiedenen Testlösungen
- 4.2 Ergebnisse der Untersuchungen zur Substrataufnahme
 - 4.2.1 Glucoseaufnahme
 - 4.2.2 Alaninaufnahme

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methode in der Literaturübersicht.

5.2 Auswahl der Agenzien

5.3 Diskussion der Ergebnisse zur maximalen Überlebenszeit

5.3.1 Eigene Untersuchungen

5.3.2 Gemeinsame Charakteristika der Versuchsreihen

5.3.3 Fehlermöglichkeiten

5.4 Diskussion der Versuche zum Nachweis der Substrataufnahme

5.4.1 Glucoseaufnahme

5.4.2 Alaninaufnahme

6. Zusammenfassung

7. Literaturverzeichnis

8. Geräte- und Chemikalienverzeichnis

9. Verzeichnis der Abbildungen

10. Anhang

1. Einleitung

Die Bilharziose (Schistosomiasis) zählt zu den weitverbreitetsten Tropenkrankheiten der Erde mit mehr als 200 Millionen Infizierten in 77 Ländern, die Zahl der Infektionsgefährdeten liegt um ein vielfaches höher (49). Die Bedeutung der Erkrankung wird gesundheitspolitisch häufig unterschätzt, da nur etwa 10 % der infizierten Patienten einen schweren Krankheitsverlauf, 50 % jedoch larvierte Symptome aufweisen. Durch Tourismus und Migrationsbewegungen steigt die Zahl der (importierten) Fälle auch in den westlichen Industrienationen. Intensive Landwirtschaft mit künstlicher Bewässerung, Überbevölkerung und mangelhafte hygienische Verhältnisse zusammen mit der Destabilisierung natürlicher Ökosysteme bilden die Hauptursache für die Verbreitung dieser Krankheit.

1.1 Historische Bezüge

Bereits in den ältesten ägyptischen Schriften, dem Papyrus Ebers (ca. 1500 v. Chr.) werden die klassischen Krankheitssymptome der Urogenital-Bilharziose beschrieben, tatsächlich ließen sich schon in Mumien verkalkte Schistosomeneier nachweisen. Bereits im mittelalterlichen Ägypten beschrieb der bedeutende persische Arzt Ibn Sina (Avicenna) die Symptome der Krankheit (22). Doch erst der Arzt und Zoologe Theodor Bilharz (6) erkannte die adulten Trematoden als Erreger der im Niltal ubiquitären Hämaturie. In mehreren Briefen an seinen Freund und Mentor Th. v. Siebold beschrieb er 1851-1853 viele menschliche Wurminfektionen, darunter auch *Schistosoma haematobium*. W. Griesinger schließlich führte 1854 die Pathologie der Erkrankung auf die Infektion von Blase und Ureter zurück. 1902 beschrieb Manson als erster einen Fall von Darmbilharziose in der Karibik, Sambon nannte den Erreger 1907 nach dem Erstbeschreiber *S. mansoni* (39). 1908 wurde der Darmparasit auch in Südafrika entdeckt. 1915 wurde der Lebenszyklus, das Zwischenwirtverhalten und die Morphologie von *S. mansoni* eingehend durch Leiper untersucht. Die erste Beschreibung des Infektionskreislaufes von *S. japonicum* (32) gelang schon 1904 (Katsurada und Kawanishi), 1909-1914 (Fujinami, Nakamura, Mujigawa et al.) wurden die einzelnen Schritte detailliert dargestellt und 1915 von Leiper bestätigt.

1.2 Gattungen und Entwicklungszyklus

Schistosoma mansoni gehört zur Überfamilie der Schistosomatoidea, das sind Trematoden, welche in den Blutgefäßen von Wildtieren leben. Sie entwickeln sich aus Gabelschwanz-Cercarien, die ihren Endwirt perkutan befallen.

In der Familie der Schistosomatiden zeigen die Cercarien bestimmte Verhaltensweisen, welche die Unterscheidung zu den nicht humanpathogenen Formen der Strigoidea ermöglichen:

- 1.) Das Schwimmverhalten enthält minutenlange Aktivitätsphasen
- 2.) In der Passivphase sind die Cercarien entweder am Oberflächenfilm oder an feste Flächen angeheftet. Vorwärts- und Rückwärtsschwimmen ist möglich.
- 3.) Humanpathogene Cercarien besitzen keinen Pharynx.

Wir kennen zwei Unterfamilien, die Schistosomatinae, die in Säugern parasitieren und die überwiegend in Vögeln parasitierenden Bilharziellinae. Zur Gattung *Schistosoma* zählen, als der Erreger der nach der Malaria zweitwichtigsten parasitären Krankheit in warmen Ländern, das *Schistosoma haematobium* (Urogenitalbilharziose), das *Schistosoma mansoni* (Darmbilharziose), das *Schistosoma japonicum* et *mekongi* (ostasiatische Darmbilharziose) und das *Schistosoma intercalatum* (Darmbilharziose).

Im wesentlichen liegt ein gleichförmiger Entwicklungszyklus der verschiedenen *Schistosoma*-Arten vor. Die Schistosomen sind getrenntgeschlechtliche Trematoden, die im Blut ihres Endwirts in Dauerpaarung leben. Im „Canalis gynaecophorus“ des Männchens liegen die dünneren, längeren Weibchen. Die Parasiten erfahren eine geschlechtliche Vermehrungsphase im Endwirt (z.B. Mensch), es folgt danach eine ungeschlechtliche Reproduktionsphase im Zwischenwirt (der Schnecke). Im Detail ergibt sich also folgender Entwicklungszyklus (38):

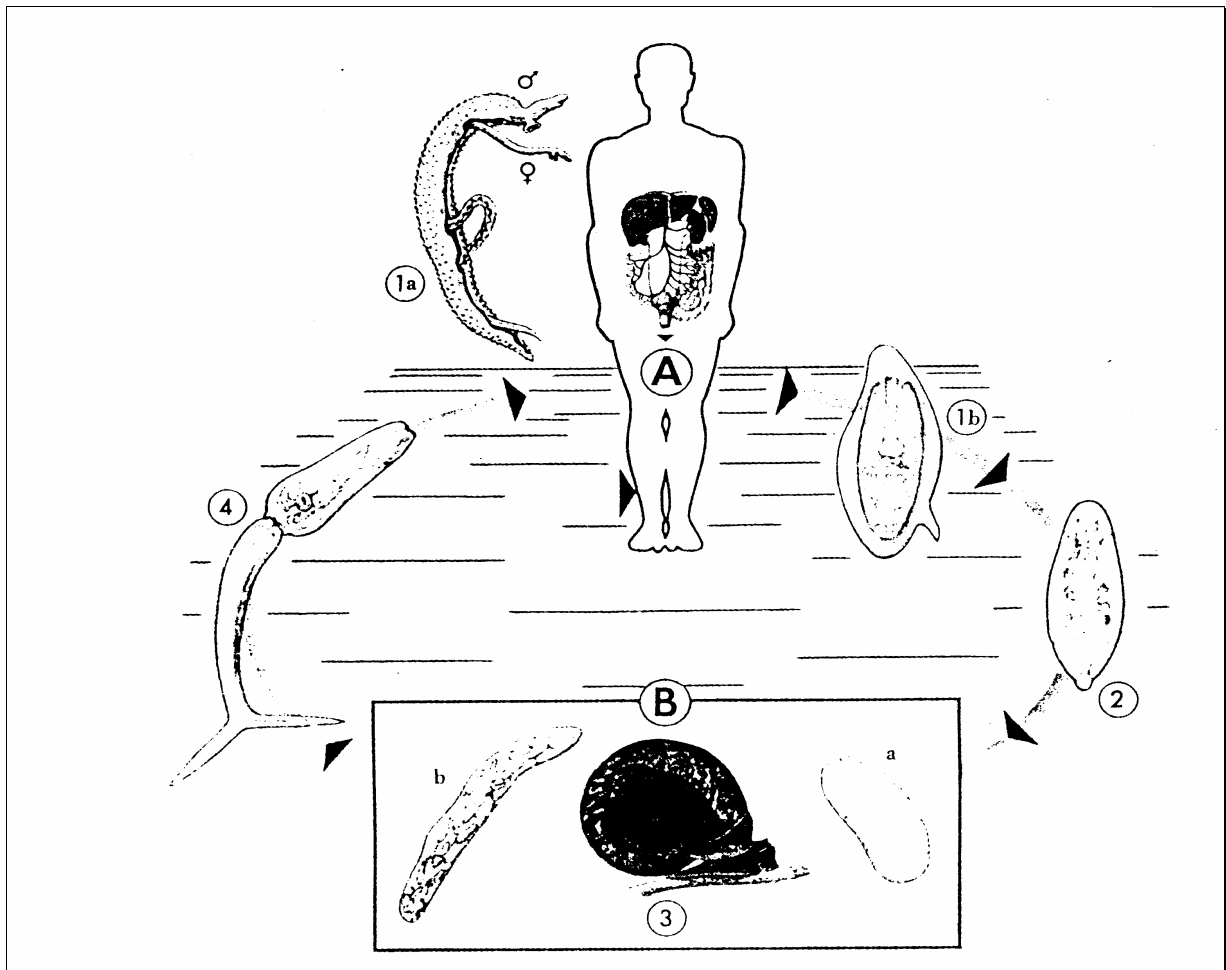


Abb. 1: Entwicklungszyklus von *Schistosoma mansoni* [aus Piekarski (38)]

Die mit Faeces oder Urin der infizierten Endwirte ausgeschiedenen arttypischen Eier (1b) der Schistosomen geben bei Kontakt mit Wasser die bereits schlüpfertige Larve, das Miracidium (2) frei. Mit Chemotaxis findet das Miracidium eine geeignete Schnecke (zum Beispiel *Biomphalaria glabrata* bei *Schistosoma mansoni*) und dringt mit Hilfe von proteolytischen Enzymen in die Weichteile der Schnecke ein und gelangt über das Lymphsystem zum Hepatopankreas. Die Infektion schreitet fort mit der Umwandlung des Miracidiums in die Muttersporocyste (3a), gefolgt von den pathogenetisch gebildeten Tochtersporocysten (3b) und schließlich den Cercarien (4), einhergehend mit einer ständigen Zunahme der Individuen, so daß ein einzelnes Miracidium ca. 40000 Cercarien entstehen läßt. Die lichtsensitiven Cercarien verlassen 3-15 Wochen nach Infektion (je nach Umgebungstemperatur und Art) die Schnecke und müssen innerhalb von maximal 48 Stunden einen geeigneten Endwirt finden, bevor die Glycogenreserven

erschöpft sind. Fettsäuren der Haut von Säugetieren und die Wasserbewegung durch die Wirtstiere dienen den Cercarien als Sinnesreize.

Sie nähern sich ihrem Endwirt aktiv schwimmend, den Schwanz gegen den Uhrzeigersinn als „Zugpropeller“ einsetzend. 4 Minuten bis 24 Stunden dauert der Vorgang der Penetration über einen Haarfollikel teils mechanisch, teils unterstützt durch Sekretionen der Hautdrüsen, bis die Cercarien unter Zurücklassung des Schwanzes über Hautvenen die rechte Herzkammer, Lungenarterien, Lungenvenen und schließlich die linke Herzkammer und das Pfortadersystem erreichen. Ungefähr 20% (bei *Schistosoma mansoni*) der eingedrungenen Cercarien reifen zu adulten Schistosomen (1a), wobei die Weibchen erst nach der Paarung die Geschlechtsreife erlangen. Mit Eiablage in Mesenterialgefäße, Wanderung der Eier in die Kapillaren und Durchbruch mittels proteolytischer Enzyme ins Darmlumen schließt sich der Entwicklungszyklus.

1.3 Epidemiologie und Zukunftsperspektiven

Das Verbreitungsgebiet der Bilharziose erstreckt sich im wesentlichen auf ein Gebiet zwischen 36° nördlicher und 34° südlicher Breite mit Wassertemperaturen zwischen 25 und 30° Celsius. Vor allem betrifft dies Afrika und Südamerika, kleinere Endemiegebiete finden sich auch im Vorderen Orient und Südostasien. Insbesondere das Nilbecken in Nordafrika stellt als Region mit hoher Bevölkerungsdichte und schlechten Hygieneverhältnissen ein ideales Reservoir für die Erreger dar (49). Im Einzelnen treten Infektionen mit *S. haematobium* im gesamten Afrika nördlich und südlich der Sahara, ferner im Vorderen Orient (Irak), auf Zypern, Mauritius und in Südwestasien auf. *S. mansoni* ist auf der arabischen Halbinsel, in ganz Afrika, in Südamerika (Brasilien, Venezuela, Surinam) und auf einigen karibischen Inseln (Dominikanische Republik, Puerto Rico) beheimatet. *S. japonicum* wird nur in China, Indonesien und auf den Philippinen übertragen, *S. intercalatum* schließlich ist in West- und Zentralafrika (vor allem Kongobecken) anzutreffen.

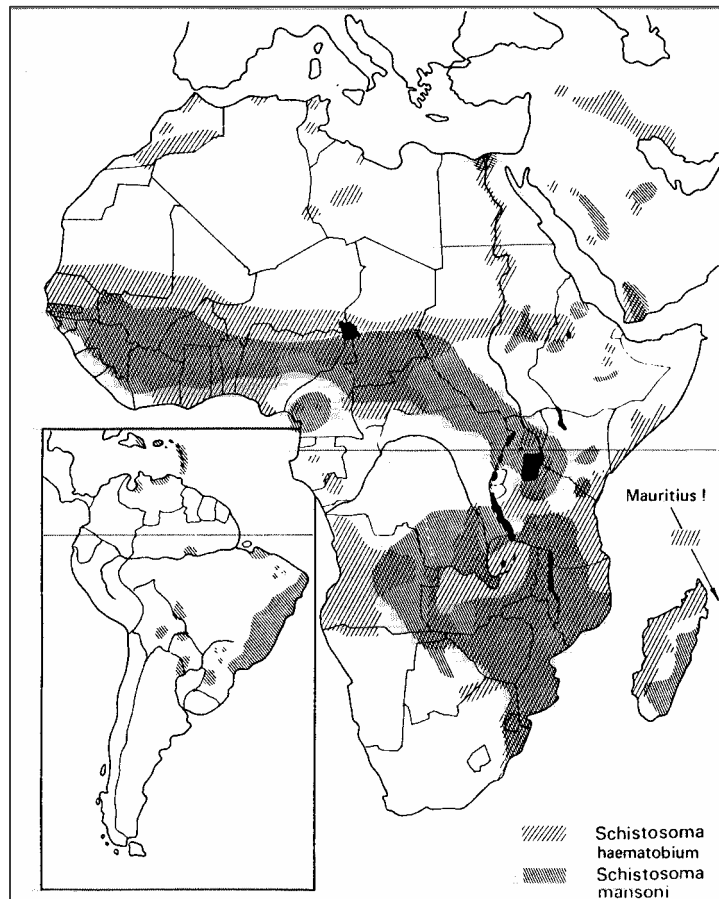


Abb. 2: Geographische Verbreitung von *S. haematobium* und *S. mansoni* (17)

Falls Wasserschnecken als artspezifische Zwischenwirte vorkommen, beispielsweise für *S. mansoni*, *Biomphalaria straminea* in Südamerika, *B. pfeifferi* und *B. alexandrinae* in Afrika, kann sich ein Infektionszyklus bilden, wobei überwiegend der Mensch, seltener auch andere Primaten oder Ratten als Endreservoir und Endwirte fungieren. *S. intercalatum* und *S. japonicum* entwickeln sich auch in verschiedenen Haussäugetieren (z.B. Wasserbüffel, Hund), hier ist das tierische Erregerreservoir von epidemiologischer Bedeutung.

Die Wärme des tropischen und subtropischen Klimas ist Voraussetzung für Wachstum und Vermehrung der Wasserschnecken. Der Wassermangel in der Trockenzeit fördert die Konzentration von Schnecken, Miracidien und Cercarien und begünstigt somit eine erhöhte Infektionsrate. Der Kontakt mit dem, durch menschliche Ausscheidungen verunreinigten, cercarienhaltigen Wasser läßt vor allem bei Kindern bis 15 Jahren die Infektionsrate in endemischen Gebieten auf bis zu 90 % ansteigen. Nur durch geeignete Präventivmaßnahmen wie Aufklärungsarbeit unter der einheimischen Bevölkerung, verbesserte sanitäre Bedingungen und Schneckenbekämpfung ist eine Kontrolle der Bilharziose möglich.

Versuche, die Schistosomiasis durch Bekämpfung des Zwischenwirts einzudämmen, scheiterten, trotz Schneckenbekämpfung und Gabe von Praziquantel, im deutsch-ägyptischen Gemeinschaftsprogramm „El-Fayoum“ (1968-1973) (16).

Die Toxizität des Molluskizides Niclosamid verursachte weitreichende Schäden in der Umwelt.

Die fortwährende, stetige Bevölkerungszunahme in den Entwicklungsländern und die daraus resultierende Notwendigkeit der Anlage von Staudämmen und Bewässerungskanälen führt zu einer zunehmenden Vermehrung der Wirtsschnecken.

Aus klimatischen Gründen, das heißt mangels geeigneter Zwischenwirte und fehlender Übertragbarkeit von Mensch zu Mensch, ist eine Ausbreitung der Parasitose in unseren Breiten nicht denkbar.

2. Literaturübersicht

2.1 Cercarien-Morphologie

Die Bedeutung der Cercarie im Entwicklungszyklus von *Schistosoma mansoni* liegt in der Aufrechterhaltung und Verbreitung der Infektionskette mit Hilfe von geeigneten Endwirten (Mensch). Zur Erfüllung dieser Aufgabe ist die Infektionslarve in der Lage sich selbständig fortzubewegen, wobei der Gabelschwanz als Antriebsorgan dient. Ferner verfügt die Cercarie über ein sensorisches System zur Wirtsfindung, Drüsen mit lytischen Enzymen zur Wirtspenetration und ist als Schistosomulum zur Wirtsinfektion via Blut-Lymphsystem befähigt. Viele Anteile des Organsystems des adulten Trematoden sind bereits in der Cercarie angelegt. In grundlegenden Arbeiten von Stirewalt (48) und Erasmus (21) erfolgte eine detaillierte Darstellung der Cercarienfeinstruktur.

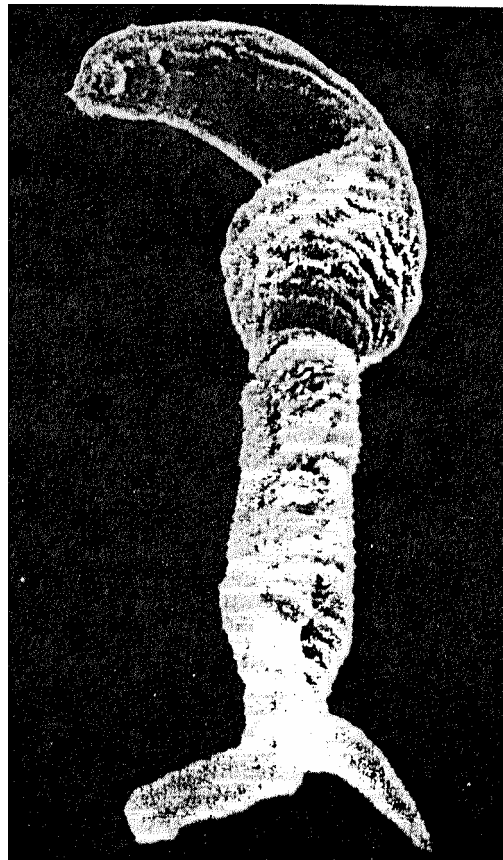


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Rückenansicht einer Cercarie von *S. mansoni* [x400] (48)

Die enorme osmoregulatorische Anpassungsfähigkeit der Parasiten gegenüber den wechselnden Milieubedingungen (ufernahes Süßwasser im Vergleich zu menschlicher Lympflüssigkeit) wird vor allem durch das Tegument gewährleistet, bestehend aus Glycocalyx, äußerem und innerem Plasmalemm, „spines“, circulärem und longitudinalen Muskel und subtegumentalen Zellen, welche in Verbindung stehen mit „dense bodies“ im syncytialen Zytoplasma.

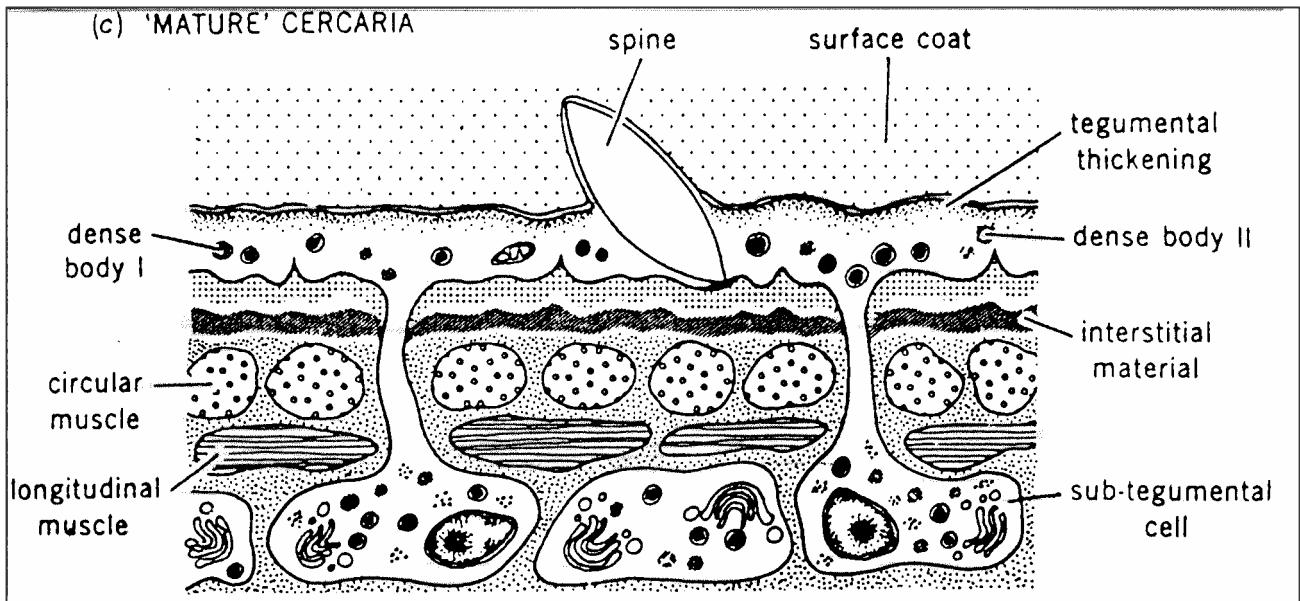


Abb. 4: Tegument einer reifen Cercarie, kurz vor dem Ausschwärmen aus der Sporocyste. Das primitive Epithel ist verschwunden und das Tegument ist mit angehäuften subtegumentalen Zellen verbunden (nach Smyth & Halton, 47).

Das Tegument durchziehen Papillen nervalen Ursprungs, welche als Mechano- oder Chemorezeptoren dienen. Dorsey und Cousin fanden zusätzlich oral der ventralen Saugöffnung gelegene Sensorzellen, wahrscheinlich der Wahrnehmung biogener Amine dienend (19). Lamelläre Strukturen am vorderen Ende der Cercarie entsprechen Photorezeptoren (47). Das Verdauungssystem ist nur rudimentär ausgebildet, bestehend aus oralem und ventralem Saugnapf, einem Ösophagus und kurzem, wohl funktionslosen Coecum; allerdings ist die Existenz einer Esterase (Frijp, 1967) und einer Aminopeptidase (Stirewald und Walters, 1973) bewiesen (47). Das Ausscheidungsorgan bilden Flammzellen, 3 Paar im Körper, 1 Paar im Schwanz der Cercarie (8), verschiedene Sammelkanäle, ferner Exkretionsblase, Exkretionsvorhof und Exkretionsporen am Gabelschwanzende. Hinter dem oralen Saugorgan liegt ein paarweise angelegtes cerebrales Ganglion mit hoher Cholinesterase-Aktivität und

Nachweis von Katechol (9), von dem aus sich jeweils spezifische vordere und hintere longitudinale Nervenfasern (unmyelinisierte Axone verbunden durch dorsal gelegene Kommissurfasern) erstrecken, welche Saugorgane und den Schwanz innervieren. Die Drüsen zum Eindringen in den Endwirt, zwei Paare von vorderen und drei Paare von hinteren Acetabulardrüsen und die Kopfdrüse haben lytische enzymatische Aktivität. Daneben existieren zystenbildende Drüsen, die nach dem Eindringen in den Endwirt aktiviert werden.

Die Cercarienglycocalyx besteht hauptsächlich aus sauren Mukopolysacchariden und ist immunogen.

Sie verbirgt die Oberflächen-Spines (Mikrovilli), dient der Erhaltung der Cercarien-Homöostase und wird bei Penetration in den Endwirt weitestgehend abgestoßen (42). Hauptkomponenten der kohlehydratreichen Glycocalyx sind Fucose und Glucose, verbunden durch N-Acetylgalactosamin (36). Caulfield et al. (9) finden Threonin, Serin und Glutamat als wichtigste Aminosäuren, als Zucker zusätzlich zu den oben erwähnten noch Galactosamin, Glucosamin, Galactose und Mannose.

Die Sterinzusammensetzung der Cercarie weist einen hohen Anteil an Cholesterin (50%) und Desmosterin (38%) auf, ferner finden sich geringe Mengen von Campesterin, Stigmasterin und β -Sitosterin (24). Das Lipidprofil von Adulten und Schistosomula weicht hiervon in charakteristischer Weise ab, die Phospholipide hingegen, mit dem vorherrschenden Phosphatidylcholin (>50%), unterscheiden sich in den drei Entwicklungsstufen kaum.

2.2 Cercarienphysiologie

2.2.1 Beobachtungen unter natürlichen Bedingungen

Die Cercarienausschüttung bei *S. mansoni* erfolgt aus der Wirtsschnecke *Biomphalaria glabrata* in circadianer Rhythmik, mit maximalem Peak in der fünften Stunde nach Beleuchtungsbeginn (21). In natura variiert die Periodik zwischen 10 und 30 Stunden je nach Lebensraum (2). Das Ausschlüpfen aus den Schnecken wird von vielerlei Faktoren beeinflusst, wie zum Beispiel durch Temperatur, Lichteinstrahlung, Luftfeuchtigkeit und pH-Wert. Entsprechend gestaltet sich die Quantität der Ausschüttung sehr variabel. Insbesondere steigt die Cercarienausschüttung bei gut gefütterten Schnecken, was auf die dann erhöhten endogenen Glycogenreserven der Infektionslarven und den dadurch erleichterten aktiven Schlüpfvorgang zurückgeführt wird (4).

Der Cercarienkörper weist eine hohe Anpassungsfähigkeit auf, welche ihm freies Schwimmen, Wirtssuche, Hautkontakt und schließlich Hautpenetration des Endwirts ermöglichen. Der besonders gut als Fortbewegungsorgan ausgebildete Schwanz ermöglicht durch Kontraktion und Entspannung der bipolaren Muskelzellen eine rechts- bzw. linksseitige Vibration und dient als propellerartiges Antriebsorgan (48). Die überwiegende Schwimmaktivität der Cercarien ist mit dem Schwanz voraus helikal gerichtet. Die zirkuläre und longitudinale Muskulatur ist reich an Mitochondrien und Glycogen. Im Mittelteil des Schwanzes liegen die „caudal bodies“, die als Glycogenspeicher und Energiequellen dienen und sich daher nach längerer Aktivitätsphase in Größe und Glycogengehalt verkleinern. In natürlicher Umgebung wechseln sich kurze Schwimmphasen, oft eingeleitet durch eine plötzliche Helligkeitsabnahme (Schatten) oder einen Bewegungsreiz, und längere Schweb- und Sinkperioden miteinander ab. Die Cercarien weisen eine negative Geotaxis auf und halten sich überwiegend in einer Zone zwischen Oberflächenfilm und 1 cm Tiefe auf. Je weiter sich die Cercarien nach dem Schlüpfen von ihrer „Mutterschnecke“ entfernen, mit Zunahme von Wasserströmung und Dauer der Schwimmaktivität verlieren die Cercarien in Abhängigkeit von ihren endogenen Glycogenreserven ihre Infektiosität.

2.2.2 Beobachtungen unter Laboratoriumsbedingungen

2.2.2.1 Energiestoffwechsel

Cheng (11) berichtete über die Abhängigkeit der Cercarientwicklung vom Glycogengehalt im Verdauungstrakt von *Biomphalaria glabrata*. Die Glucose der Schneckenlymphe wird für die Synthese von Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden verwendet. Die von der Schnecke „angebotenen“ Substrate werden rasch von der Cercarie metabolisiert und dienen der Synthese von Makromolekülen und Glycogen (7). Fast 50 % des Glycogens und mehr als 50 % der Cytochromoxidase-Aktivität sind im Schwanz der Cercarie gespeichert, dem Bewegungsorgan und Hauptenergieservoir. Das restliche Körperglycogen dient der Penetration, dementsprechend reduziert eine länger andauernde Schwimmperiode mit Abnahme des endogenen Glycogens die Infektiosität.

2.2.2.2 Energieverbrauch

In den ersten Stunden nach dem Schlüpfen erfolgt keinerlei Glucoseutilisation; nach 18 Stunden, mit Abnahme des cercarieneigenen Glycogens, sind die Larven begrenzt in der Lage, Glucose zu verbrauchen (8) und die CO₂-Ausscheidung steigt an. In erster Linie wird Pyruvat, deutlich geringer Alpha-Ketoglutarat und Acetat, schließlich in Spuren Glutamin/Glutamat verstoffwechselt. Der Alpha-Ketoglutarat/Acetat-Verbrauch weist auf einen vorhandenen Citratcyclus freilebender Cercarien hin. Ebenso finden sich Hinweise für den Ablauf von Glykolyse und Cytochrom-Atmungskette und auch für den Pentose-Phosphat-Weg, auf allerdings geringerem Niveau (4). Somit läßt sich der Energiestoffwechsel der Cercarie in drei Schritte gliedern:

1. In der Schnecke erfolgt die Synthese von Makromolekülen (Proteinen, Nukleinsäuren, Lipiden, usw.) mittels rascher Metabolisierung von Glucose und anderen Substraten der Schneckenlymphe.
2. Freilebende Cercarien halten ihren Energiehaushalt überwiegend durch endogenes Glycogen aufrecht.

3. Mit der Transformation zum Schistosomulum erfolgt die Wirtsadaptation.

Biochemisch zeigen Cercarien einen Pasteur-Effekt (Unterdrückung von Gärungsprozessen durch oxydative Phosphorylierung) und den Crabtree-Effekt (Inhibierung der O₂-Aufnahme bei Anstieg der endogenen Glucose) (4,8).

2.2.2.3 Metabolismus und Penetration

Lipide, vornehmlich neutrale Fette und Fettsäuren, erfüllen vor allem eine hydrostatische Funktion, indem sie das Körpergewicht freischwimmender Cercarien verringern (21,27). Vermehrte Lipaseaktivität findet sich vor allem auf der Oberfläche von schwimmaktiven, langlebigen Cercarien.

Eine große Anzahl von Enzymen konnte aus Cercarien von *S. mansoni* isoliert werden, quantitativ am bedeutendsten sind darunter Pyruvatkinase, Lactatdehydrogenase, Malatdehydrogenase und die Alaninaminotransferase (48).

Die Penetration des Endwirts erfolgt mittels eines elastolytischen und keratolytischen Proteasen-Komplexes, dieser wird durch steigende Calcium-Spiegel und Plasma-Protease-Inhibitoren in der Haut von Säugern reversibel inhibiert. Die Haut-Eicosanoide (Fettsäuren) sind einer von vielen, für die Penetration erforderlichen, Faktoren und dienen als Präkursoren des cercarieneigenen Arachidonsäuremetabolismus (25,26). Salafsky (40) konnte mittels Ibuprofen (Prostaglandinsynthesehemmung) die Penetration verhindern. Während die aliphatischen Hydrocarbonketten an der Haut des Endwirts penetrationsfördernd wirken, erwiesen sie sich bei freischwimmenden Cercarien als toxisch (30). Der Wirtsfindung von *S. mansoni* durch die Cercarie dient die Aminosäure Arginin als entscheidendes chemisches Signal der menschlichen Haut (31).

2.2.3 Umgebungsfaktoren und Überleben der Cercarien

2.2.3.1 Literaturübersicht

Wichtige Kriterien, welche die Überlebensfähigkeit der Cercarien beeinflussen, sollen im folgenden erläutert werden: Nach Schreiber und Schubert (44) sterben in 30 ° warmem Quellwasser 50 % der Cercarien innerhalb von 8-16 Stunden, teilweise konnte die Überlebensfähigkeit auf mehr als 26 Stunden gesteigert werden. Im Gegensatz dazu fand Chernin (12) keine Verlängerung der Überlebenszeit mit Glucose und Trehalose. Die Abhängigkeit der Cercarien-Schwimmfähigkeit von der Umgebungstemperatur und den noch vorhandenen Glycogenreserven bestätigte Cheng (11). Bruce et al. (7) wiesen auf die Bedeutung der Pufferung und des pH-Werts für den Erhalt der Cercarien-Aktivität unter Laborbedingungen hin. Die Absterberate der Cercarien weist eine Abhängigkeit von der Individuendichte auf und ist vermutlich vom sinkenden Sauerstoffgehalt des Wassers, der Zunahme der toxischen Ausscheidungsprodukte und dem Alter der Cercarien bestimmt. Anderson et al. (1) finden eine maximale Überlebenszeit von 44 Stunden.

Asch (3) gelang es, eine Steigerung der durchschnittlichen Überlebenszeit von 10,5 Stunden in DTW (dechloriertes Leitungswasser) mittels Glucose herbeizuführen, allerdings fand er zusätzlich eine Abhängigkeit von der Gefäßgröße. Eine „balanced salt solution“ (BSS) verlängerte in den Versuchen von Becker (5) die Cercarien-Aktivität im Vergleich zu Aqua dest. dreifach, besondere Bedeutung kam hierbei den Natrium- und Magnesium-Ionen zu. Ein hoher Salzgehalt (17,5%) mit entsprechend erhöhtem osmotischen Druck und damit erhöhtem Energieverbrauch konnte die Überlebenszeit drastisch (bis auf 11 Minuten) verringern (Donnelly, 18). Bereits Krakower (35) hatte auf die Toxizität von konzentrierten Salzlösungen (>0,6 %) hingewiesen.

2.2.3.2 Problemstellung der eigenen Arbeit

In Fortführung und Ergänzung der oben angeführten Arbeiten und in Hinblick auf mögliche lebensverlängernde Substrate sollte angesichts der sehr unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur, durch Einhaltung streng standardisierter Untersuchungsbedingungen eine Antwort auf folgende Fragen gefunden werden:

1. Sind Cercarien in der Lage, Substrate aus dem umgebenden Medium aufzunehmen und verändert sich dadurch die Schwimmaktivität?
2. Welche Substrate sind lebenszeitverlängernd, welche –verkürzend ?

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bestimmte Aminosäuren und Zucker hinsichtlich obiger Fragen zu untersuchen.

Bisher erstreckte sich die Prävention der Schistosomiasis in erster Linie auf die Kontrolle der Schneckenpopulation mittels Einsatz von Molluskiziden, Bekämpfung durch natürliche Feinde (Enten, Fische etc.) oder Nahrungskonkurrenten und durch Veränderung der Milieufaktoren (z.B. Erhöhung der Fließgeschwindigkeit des Wassers). Nur letztere haben auch auf die Infektiosität der Cercarien entscheidenden Einfluß. Die Beantwortung der oben gestellten Fragen könnte zum besseren Verstehen der Cercarienphysiologie und damit in der Zukunft schließlich auch zur Unterbrechung des Infektionszyklus beitragen.

2.2.3.3 Vorversuche im eigenen Laboratorium

Seitz (46) konnte die Schwimmaktivität von Cercarien der Art *Schistosoma mansoni* durch die Zugabe von NaCl und MgSO₄ erheblich steigern, die Zufuhr von Glucose erbrachte keinen Effekt. G. Herrmann (1989, persönliche Mitteilung) testete gegen verschiedene Trägerlösungen, wie „balanced salt solution“ (BSS), Tris-Puffer, dechloriertes Leitungswasser (DTW), Brackwasser und Aqua dest., dem Zusatz von Pyruvat und ATP (Adenosintriphosphat) in einer Konzentration von 10⁻⁵ M, sowie Succinat. Als Einzelsubstanz erwies sich Succinat am wirksamsten in DTW. Eine Lebensverlängerung trat bei Kombination von Pyruvat, ATP, und BSS, ähnlich wie bei der Gabe von Succinat und ATP auf. Weder die Mischung aller drei Einzelsubstanzen noch Sauerstoffeinleitung in den Versuchsbehälter aktivierten das Schwimmverhalten der Cercarien. Diesen Effekt wiesen jedoch Glucose und Glucose-6-Phosphat auf. Großwieser (28) fand Pyruvat als einziges effektives Substrat des Citratzyklus, welches die Schwimmaktivität in Salzlösung (BSS) entscheidend verlängerte und konnte auch den indirekten Nachweis der Substanzaufnahme aus dem Testmedium führen.

3. Material und Methodik

3.1 Infektionszyklus unter Laboratoriumsbedingungen

Die Gewinnung von Cercarien erfordert den Parasiten (*Schistosoma mansoni*, Stamm Hoechst, Herkunftsland Brasilien) ferner seinen Zwischenwirt (Albinoschnecken, *Biomphalaria glabrata*, Stamm Hoechst, Herkunftsland Brasilien) und den Endwirt Labormaus (Koloniestamm SWISS, weiß, männlich, Infektion jeweils im Alter von 8 Wochen).

3.1.1 Schneckenhaltung

In drei Glasaquarien à 20 l befanden sich je 100 infizierte Schnecken gleicher Größe und gleichen Alters. Ihre Ernährung erfolgte mit frischem, gewaschenen Kopfsalat. Wasser- und Raumtemperatur lagen konstant bei 27°C, der pH-Wert des Wassers betrug 7,2-7,4, die Wasserhärte 8 Grad dH. Das Becken wurde fortwährend belüftet und alle 2 Wochen gereinigt, mit gleichzeitigem Wasserwechsel. Die Schneckenhaltung wurde in einem vom Außenlicht völlig abgeschirmten Raum durchgeführt, der über eine Zeitschaltautomatik im 12 Stunden Hell-Dunkel-Wechsel (Hellphase 6.°-18.°) beleuchtet wurde. Tageslichtleuchtstoffröhren mit 700 Lux erzeugten die notwendige Helligkeit.

3.1.2 Infektion der Schnecken

Hundert, etwa gleich große (ca. 5 mm) Schnecken wurden einzeln in die Kammern einer Makrotiter-Platte aus Polyethylen eingebracht unter Zugabe von 26° C warmen Leitungswasser und je 15-20 Miracidien. Man setzte die Tiere 6 Stunden lang einer 60-Watt-Glühbirne aus, danach folgte die Nachtphase ohne Lichtreiz und anschließend am nächsten Morgen wurden die infizierten Schnecken in ein Aquarium eingebracht. Nach einer Inkubationszeit von 28 Tagen schütteten etwa 90 % der Schnecken Cercarien aus.

3.1.3 Miracidien-Gewinnung

Die zur Infektion der Schnecken erforderlichen Miracidien erhielten wir aus dem homogenisierten Darm der in Äthernarkose getöteten Mäuse, die 6 Wochen zuvor mit einer subcutanen Dosis von je etwa 200 Cercarien infiziert worden waren.

3.1.4 Versuchsbedingungen

Alle Untersuchungen wurden im selben Raum unter nachfolgenden Bedingungen durchgeführt:

- Temperatur 26° C
- Abschirmung vom Außenlicht und simulierter Tag-Nacht-Wechsel im 12-Stunden-Rhythmus ohne Dämmerungsperiode
- Licht: Leuchtstoffröhren Osram Daylight 5000 Deluxe, Beleuchtungsstärke 1000 Lux
- Cercarien: Alle an einem Versuchstag bzw. in einem Versuchsansatz verwendeten Cercarien stammten aus derselben Charge, d. h. die ausschüttenden Schnecken waren am selben Tag infiziert worden.

3.2 Versuchsdurchführung

Zur Gewinnung der Cercarien für die Versuchsdurchführung (und auch für die Infektion der Mäuse) entnahmen wir zunächst 10 infizierte Schnecken aus dem Bassin und spülten sie vorsichtig unter warmem Leitungswasser ab. Die Schnecken wurden in Glasbehälter mit 15 ml Aqua dest. (26°C Temperatur) gegeben und unter standardisierten Bedingungen jeweils von 10⁰⁰ bis 12⁰⁰ eines Versuchstags einer Glühlampenbestrahlung von 60 Watt ausgesetzt.

Nach diesem Zeitraum filterten wir das Schneckenwasser über einen Gaze-bedeckten Trichter in einen Glaskolben zur Eliminierung von gröberen Verunreinigungen wie Exkrementen etc. und brachten die Schnecken wieder ins Aquarium zurück. Die filtrierte, cercarienreiche Lösung wurde dann umgehend in ein 26 °C warmes Wasserbad eingebracht. Unter dem Stereomikroskop pipettierten wir mit Hilfe einer 50 Mikroliter Eppendorf-Pipette jeweils 20 Cercarien ab und setzten sie in die Glasküvetten (1x1x4 cm) mit den Testlösungen (jeweils 3,5 ml) ein. Ein dünnes Mikroskopier-Deckglas benutzten wir zur Abdeckung der Lösung als Schutz vor Verschmutzung und Verdunstung während der zum Teil über mehrere Tage andauernden Versuchsreihen.

Die nebeneinander in einer Haltevorrichtung auf einem Stativ befestigten Küvetten mit den Cercarien-Suspensionen beobachteten wir im 2-4 Stunden Zeitintervall zu jeweils vorgegebenen Zeitpunkten mit Hilfe einer Zeiss-Prismen-Lupenbrille mit 6-facher Vergrößerung vor einem schwarzen Hintergrund (s. Abb. 5).

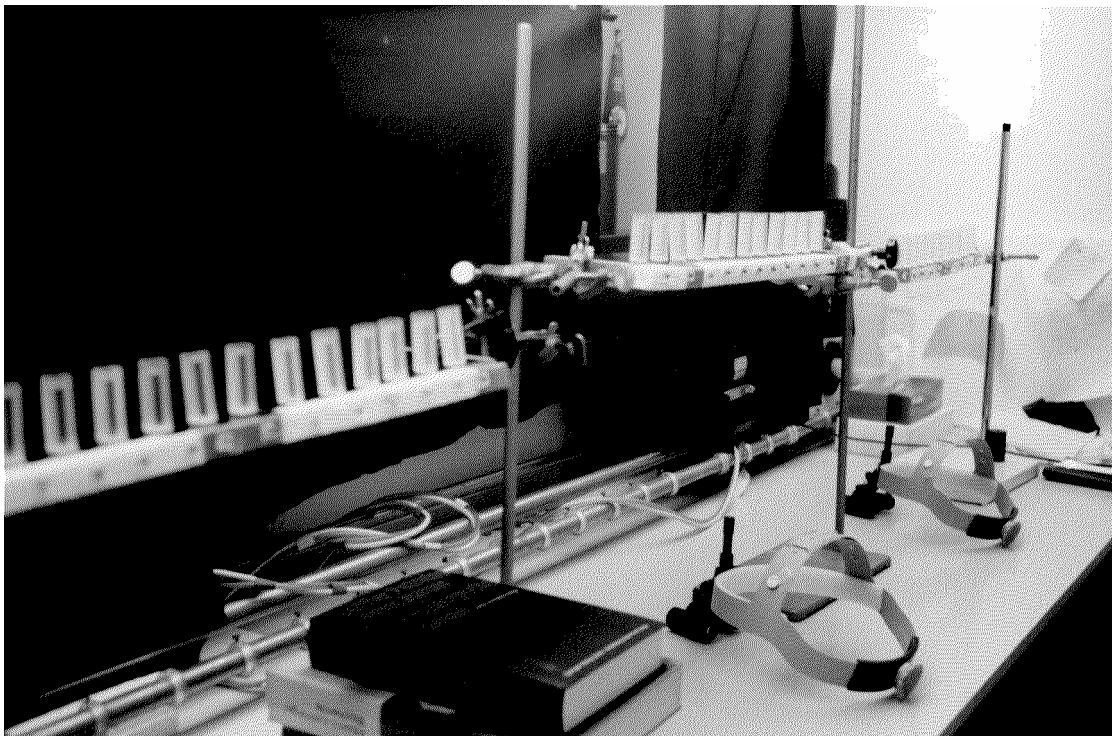


Abb. 5: Photographie der Versuchsanordnung

Der Zeitaufwand pro Küvette betrug 1-2 Minuten. Im Anschluß an jede Zählung der Cercarien setzten wir die Tiere einem etwa 5 sec, dauernden Dunkelreiz (29) aus, um so eine Aktivierung von ansonsten unbewegten und somit auch unsichtbaren, d.h. nicht zählbaren Cercarien zu erreichen. Nur diese Zahlen (nach Dunkelreizaktivierung) sind im Folgenden aufgeführt und ausgewertet. „Aktivierte“ Cercarien zeichnen sich durch die typischen propellerartigen Schwimmbewegungen aus oder sie befinden sich im Schwebezustand überwiegend in Oberflächennähe. Bei jedem Versuchsansatz wurde die Grundlösung DTW (dechloriertes Leitungswasser) mitgetestet.

Während eines Versuchs befanden sich die Küvetten in einem vom Außenlicht abgeschirmten Raum, der 12 Stunden pro Tag (von 6° -18°) mit künstlichem Licht beleuchtet wurde und die restliche Zeit dunkel blieb. Zählungen erfolgten nur in der Hell-Phase und zwar 2h, 4h, 20h, 24h, 28h, 44h usw. nach Einsetzen der Cercarien in die Versuchslösung. Zwischen den Versuchstagen fand sich also regelmäßig eine 16-stündige Zählpause. Die Raumtemperatur lag gleichmäßig bei 26° C. Um Rückstandsfreiheit der Glasküvetten zu erreichen, reinigten wir sie standardisiert mit Chromschwefelsäure und spülten sie anschließend sorgfältig mit Aqua dest. aus. In einen Brutschrank wurden sie dann über Nacht zum Trocknen aufgestellt.

3.3 Versuche zum Nachweis der Substrataufnahme

3.3.1 Nachweis der Glucoseaufnahme

In den, in der Literatur (s.o.), vorgeschriebenen Versuchsreihen konnte unter anderem durch Zugabe von Glucose ins Versuchsmedium eine z.T. signifikante Verlängerung der Cercarien-Überlebenszeit erzielt werden.

Um den tatsächlichen Nachweis einer Glucoseaufnahme durch die Cercarien zu erbringen, erfolgte eine Messung der Glucosekonzentration in der Testlösung mittels der Glucose-Oxidase-Methode, wobei die Analytik mit einem VITROS 250 (s. **8. Geräte- und Chemikalienverzeichnis**) entsprechend den Richtlinien des Herstellers durchgeführt wurde.

In jede Küvette wurden nacheinander 2 ml einer 0,005- molaren Glucose/DTW-Lösung, 1 ml DTW und 0,5 ml cercarienhaltiges Wasser mit je 400 Cercarien pipettiert (28).

Ein Ansatz umfaßte jeweils drei Küvetten gleichen Inhalts, wobei nach 24, 48 und 72 Stunden der Glucosegehalt der Suspension bestimmt wurde. Parallel führten wir fünf Ansätze à drei Küvetten durch:

- A Glucose + Cercarien
- B Glucose + Cercarien + Antibiotika (10000 I.U./ml Penicillin und 10000 µg Streptomycin/ml im Verhältnis 1:1 – entsprechend 800 µl Antibiotika in 30 ml Lösung – zum Schutz vor akzidentieller bakterieller Verunreinigung).
- C Glucose + Cercarien + GABA 0,03 molar (Hemmung der Cercarienstoffwechselaktivität)
- D Glucose ohne Cercarien (Kontrolle)
- E Glucose ohne Cercarien bakteriengefiltert (2. Kontrolle)

Wie in allen Versuchen wurden die Küvetten bei 26° C Raumtemperatur und 12-stündigen Hell-Dunkel-Wechsel stengelassen. Jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden wurde der Inhalt einer Küvette steril filtriert und die Glucosekonzentration bestimmt.

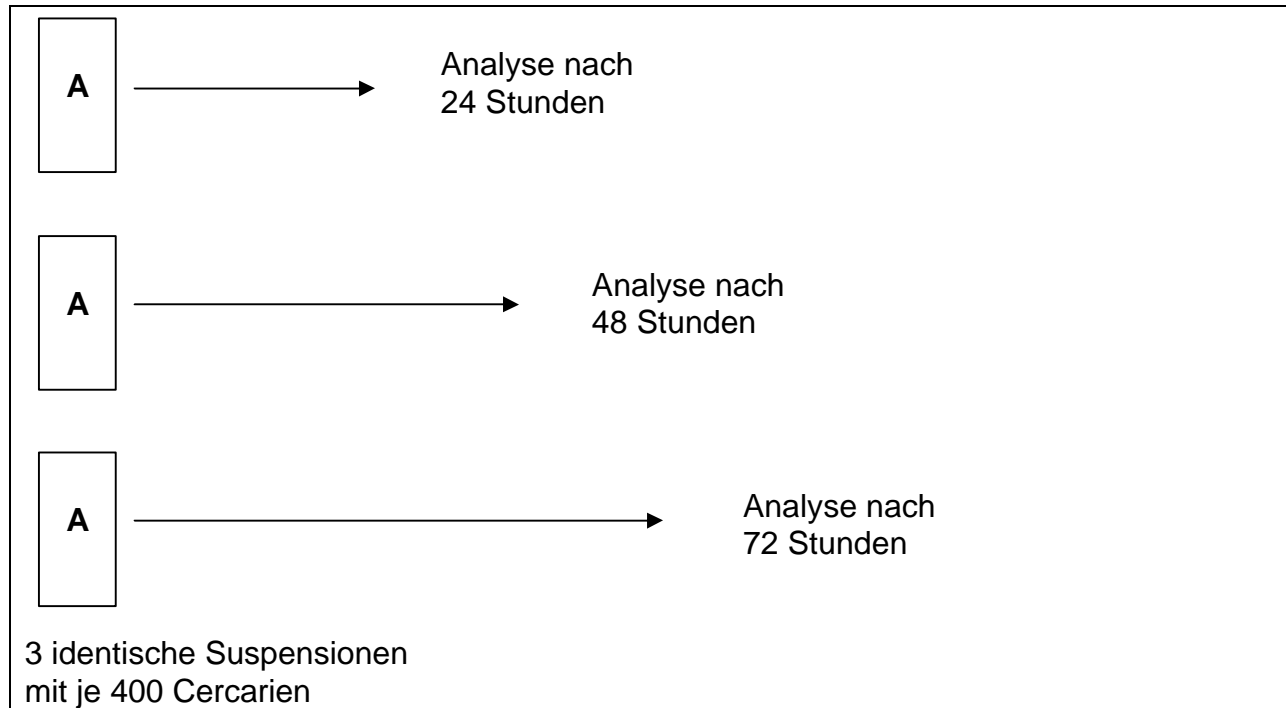


Abb. 6: Schema der Versuchsanordnung:

Zeitgleicher Ansatz von 3 Küvetten mit jeweils 400 Cercarien gleichen Alters in identischen Versuchslösungen, hier mit Glucose und DTW (Lösung A). Nach 24, 48 und 72 Stunden Messung des Substratverbrauchs der Cercarien durch Bestimmung des Restglucosegehalts der Küvetten

3.3.2 Nachweis der Alaninaufnahme

Entsprechend obiger Versuchsanordnung wurde auch der Verbrauch von Alanin im Testmedium untersucht, da sich insbesondere diese glucoplastische Aminosäure (s. unter **Ergebnisse**) als interessantes und wirksames Substrat für die Schwimm- und Überlebensfähigkeit der Cercarien von *S. mansoni* erwiesen hatte.

Die Versuchsansätze entsprachen mit Ausnahme der Verwendung von 0,005- molarer Alaninlösung den unter 3.3.1 beschriebenen. Auch hier wurden fünf parallele Suspensionen (A – E) verwendet und im Anschluß die jeweilige Alaninkonzentration nach 24, 48 und 72 Stunden mit Hilfe der Ionen-Austauscher-Chromatographie bestimmt. Eingesetzt wurde hierbei im Institut für Genetik und Mikrobiologie der Universität München (Maria-Ward-Str. 1 a) ein Aminosäuren – Analysator 6001 von BIOTRONIC entsprechend den Richtlinien des Herstellers.

4. Ergebnisse

Ergebnisse der Untersuchungen zur maximalen Überlebenszeit von Cercarien von *S. mansoni* in verschiedenen Testlösungen:

Die vorliegende Arbeit versucht unter standardisierten Bedingungen die Frage zu klären, ob Cercarien *in vitro* mittels eingesetzter Nährsubstrate (Aminosäuren, Zucker) über einen längeren Zeitraum schwimmfähig bleiben als in substratfreien Lösungen. Falls sich ein solcher Effekt zeigen sollte, könnte daraus indirekt auf eine Substrataufnahme aus dem umgebenden Medium geschlossen werden.

Im einzelnen wurden jeweils drei identische Versuchsansätze mit je 20 Cercarien in 2-3 unterschiedlichen Konzentrationen am selben Tag durchgeführt.

Die Versuchsbedingungen wurden konstant hinsichtlich zeitlichem Ablauf, Untersuchungsintervall, Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Lichtverhältnissen gehalten. Nicht beeinflussbar war naturgemäß das Außenmilieu, insbesondere der Luftdruck in 550 m Seehöhe.

Auffallend war in fast allen Versuchsansätzen die starke Schwankungsbreite der Ergebnisse trotz identischer, zeitgleich begonnener Testreihen mit gleichalten Cercarien aus derselben Schneckencharge.

Alle Überlebenszeitkurven wiesen jedoch ähnliche Verläufe auf. Wie in Abbildung 8 anhand der DTW-Standardlösung dargestellt, findet sich in den ersten 4 Stunden nach Einsetzen in die Versuchslösung ein rascher Abfall auf ca. 40 % der verwendeten Cercarien, nach 20 Stunden auf ca. 15 %.

In Abbildung 9, der Alanin-Basislösung (0,03 mol/l in DTW) ist der Abfall in den ersten 4 Stunden identisch, danach jedoch erheblich abgeflacht, und verläuft über bis zu 92 Stunden maximaler Überlebenszeit. Nach 20 Stunden leben noch 33 %, nach 44 Stunden noch 15 %, nach 68 Stunden weniger als 5 %.

Mein Hauptinteresse bezog sich also im folgenden auf die Form der Absterbekurve, auf die maximale Überlebenszeit und auf die zum Zeitpunkt **28 Stunden** noch prozentual lebenden Cercarien (**28-Stunden-Wert**) vor der zweiten, 16-stündigen Zählpause.

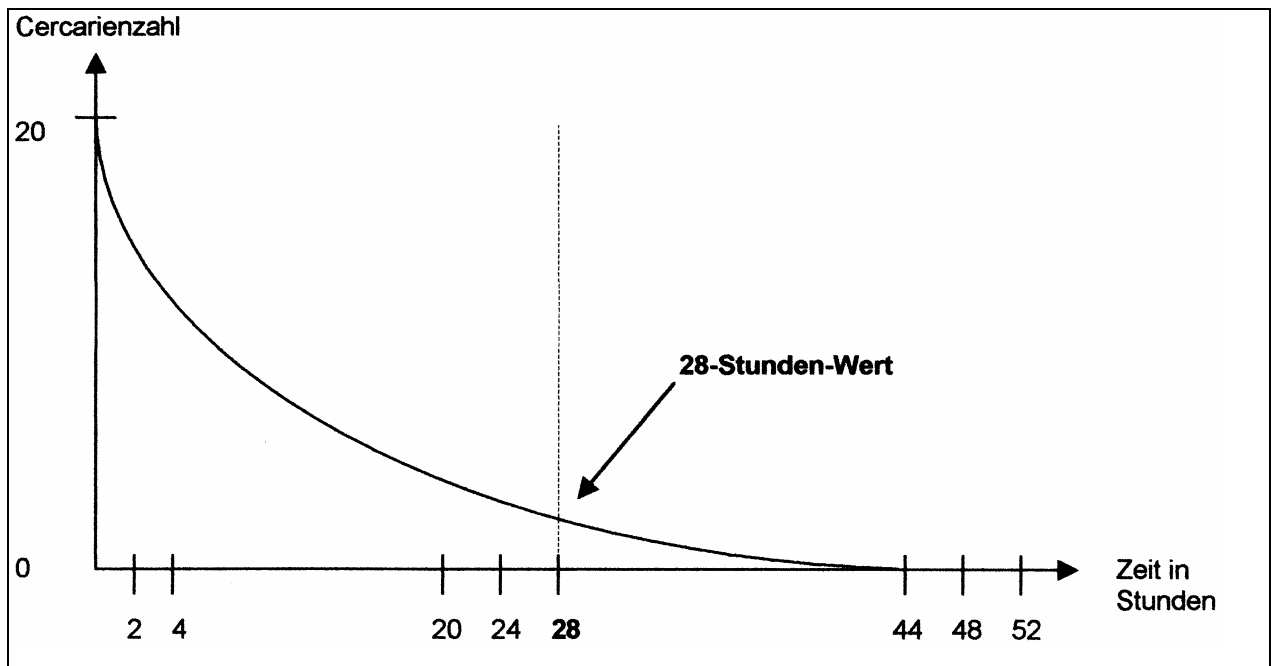


Abb. 7: Typischer Kurvenverlauf des Absterbeverhaltens der Cercarien von *S. mansoni* mit überproportionalem Abfall in den ersten 4 Stunden auf 50-60%, protrahiertem Verlauf, **28-Stunden-Wert** (entsprechend ca. 5-10% der eingesetzten Cercarien) und Erreichen des „Nullwerts“ vor dem 2. Zählzyklus

Bei gleichzeitiger Verwendung von unterschiedlichen Konzentrationen wurden dann je 3 identische Ansätze gepoolt, woraus sich Summen-Absterbekurven ergaben.

Hierbei wurden die absoluten Zahlen auf eine fiktive Küvette mit 20 Versuchstieren zur besseren Vergleichbarkeit und Anschaulichkeit der Kurven gemittelt.

Im folgenden werden die Charakteristika der Kurvenverläufe und das jeweilige Absterbeverhalten erläutert.

4.1 Ergebnisse der Untersuchungen zur maximalen Überlebenszeit

4.1.1 Untersuchung mit dechloriertem Trinkwasser (DTW)

DTW entspricht der Grundlösung in allen Versuchen, einerseits als Vergleichsstandard, andererseits als Trägerlösung für die zu testenden Substanzen. Normales Leitungswasser aus München (s. Geräte- und Chemikalienverzeichnis) wurde in einem abgedeckten Behälter mehrere Tage aufbewahrt, bevor es als Versuchslösung diente. Zu diesem Zeitpunkt war der pH- Wert auf 8 - 8,5 angestiegen. Damit entsprach das Untersuchungsmedium weitgehend den natürlichen Milieubedingungen der Cercarien und erleichterte die Vergleichbarkeit mit früheren Ansätzen anderer Autoren (3, 44, 39, 35).

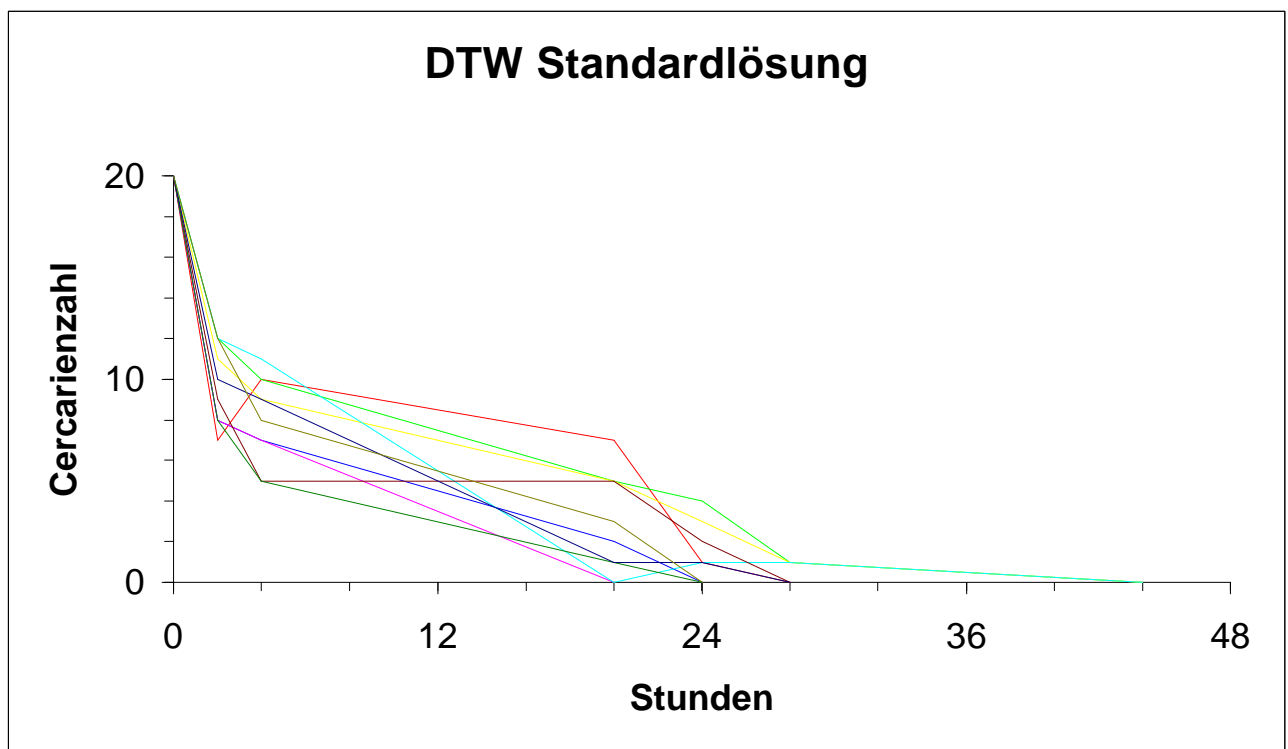


Abb. 8: Überlebenszeit der Cercarien von *S. mansoni* in zehn Versuchsansätzen mit DTW-Lösung

In den 10 Testmedien mit insgesamt 200 Cercarien ist ein starker Abfall der überlebenden Parasiten bereits zum Zeitpunkt der 1. Zählung nach 2 h auf weniger als 50 % der Ausgangsmenge festzustellen. Danach erfolgt ein fast linearer Abfall über die (dunkelheitsbedingte) Zählpause von 16 h hinweg. 1,5% der Versuchstiere erreichten die 28 h - Zeitgrenze, zu Beginn des folgenden Versuchstags (44 h) sind keine Cercarien mehr nachweisbar.

Dargestellt ist in der Graphik die während des gesamten Meßzyklus anhaltende gleichmäßig hohe Divergenz der Meßwerte trotz identischer Versuchsbedingungen und gleicher Cercarienzahl zu Beginn.

Zur Vereinfachung wurde daher eine Mittelwertkurve gebildet (Abbildung 9). Diese sollte in den eigentlichen Versuchsansätzen als Vergleichskurve dienen.

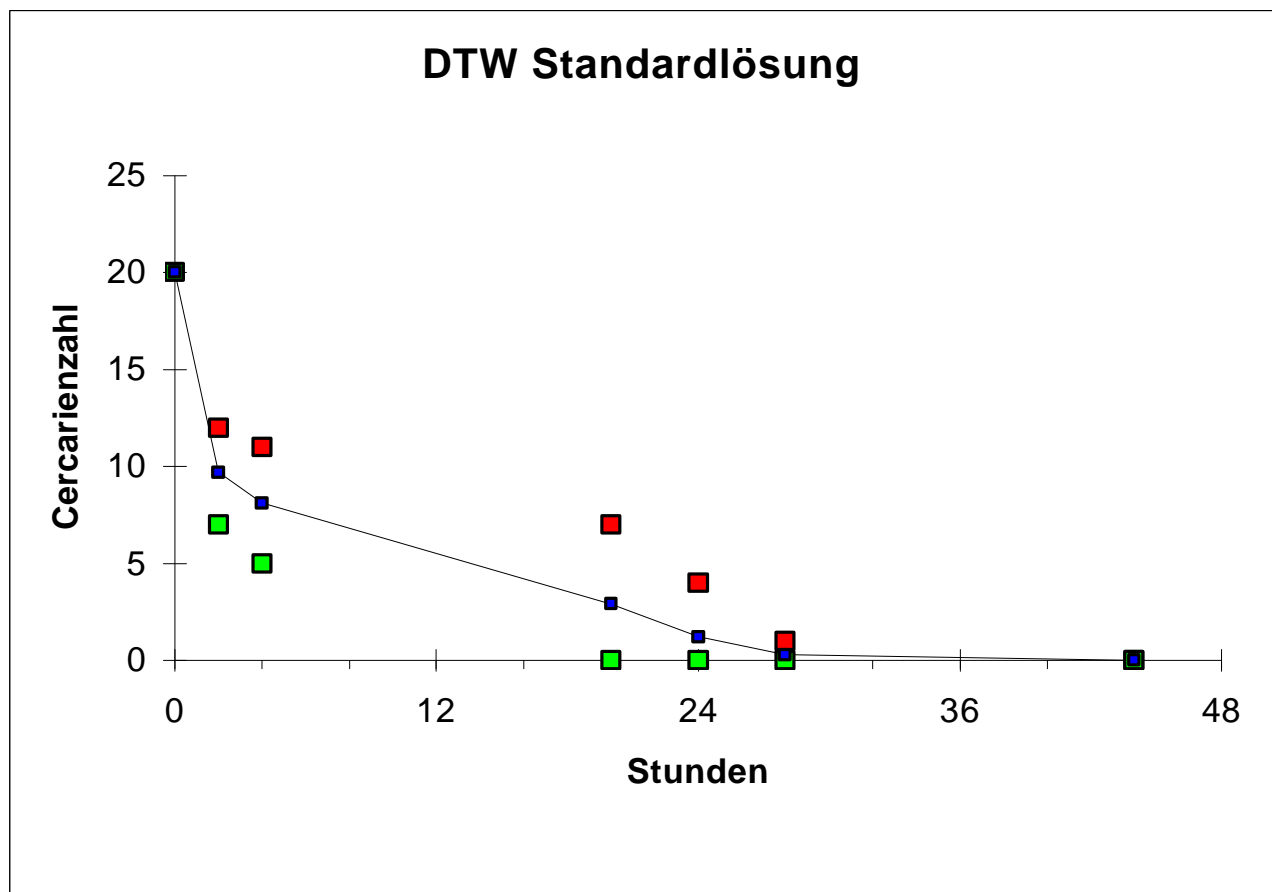


Abb. 9: Mittelwertkurve und Maximalabweichung aus zehn Untersuchungsserien mit Cercarien von *S. mansoni* in DTW-Lösung

4.1.2 Untersuchung mit Alanin 0,03 mol/ l in DTW

Die zweite Vergleichslösung bestand aus der glucoplastischen Aminosäure Alanin in der Trägerlösung DTW in 0,03 - molarer Konzentration. Auch hier fand sich der bekannte "2 h – Effekt" mit ca. 50 % igem Abfall der Cercarien zum Zeitpunkt der 1. Messung mit allerdings noch deutlicheren Schwankungsbreiten zwischen den einzelnen Ansätzen (s. Abbildung 10)

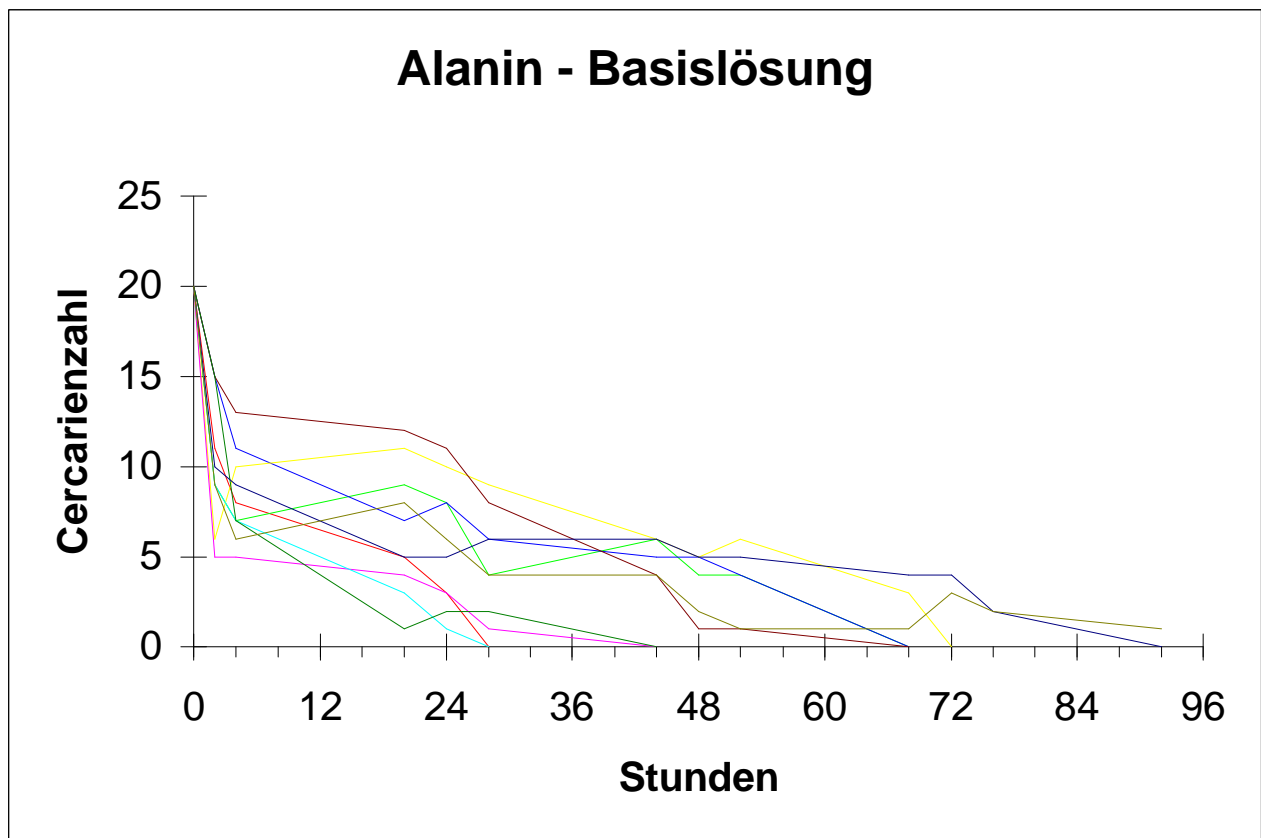


Abb. 10: Überlebenszeit der Cercarien von *S. mansoni* in zehn Versuchsansätzen mit 0,03 - molarer Alaninlösung

Wie in der DTW - Lösung war erneut ein fast linearer Verlauf der Absterbekurve nach der 2. Messung (4 h) zu erkennen, ausgehend von einem nahezu identischen Ausgangsniveau. Nach 20 h liegt jedoch der Durchschnittswert, ungeachtet der hohen Divergenz der Meßwerte im Einzelnen, mehr als doppelt so hoch wie in der DTW - Lösung.

Mehr als 10 % der Versuchstiere überlebten sogar den 3. Versuchstag (> 52 h) und 2 % den 4. Versuchstag (> 76 h). 1 Cercarie (= 0,5 %) war auch nach 92 h noch schwimmfähig.

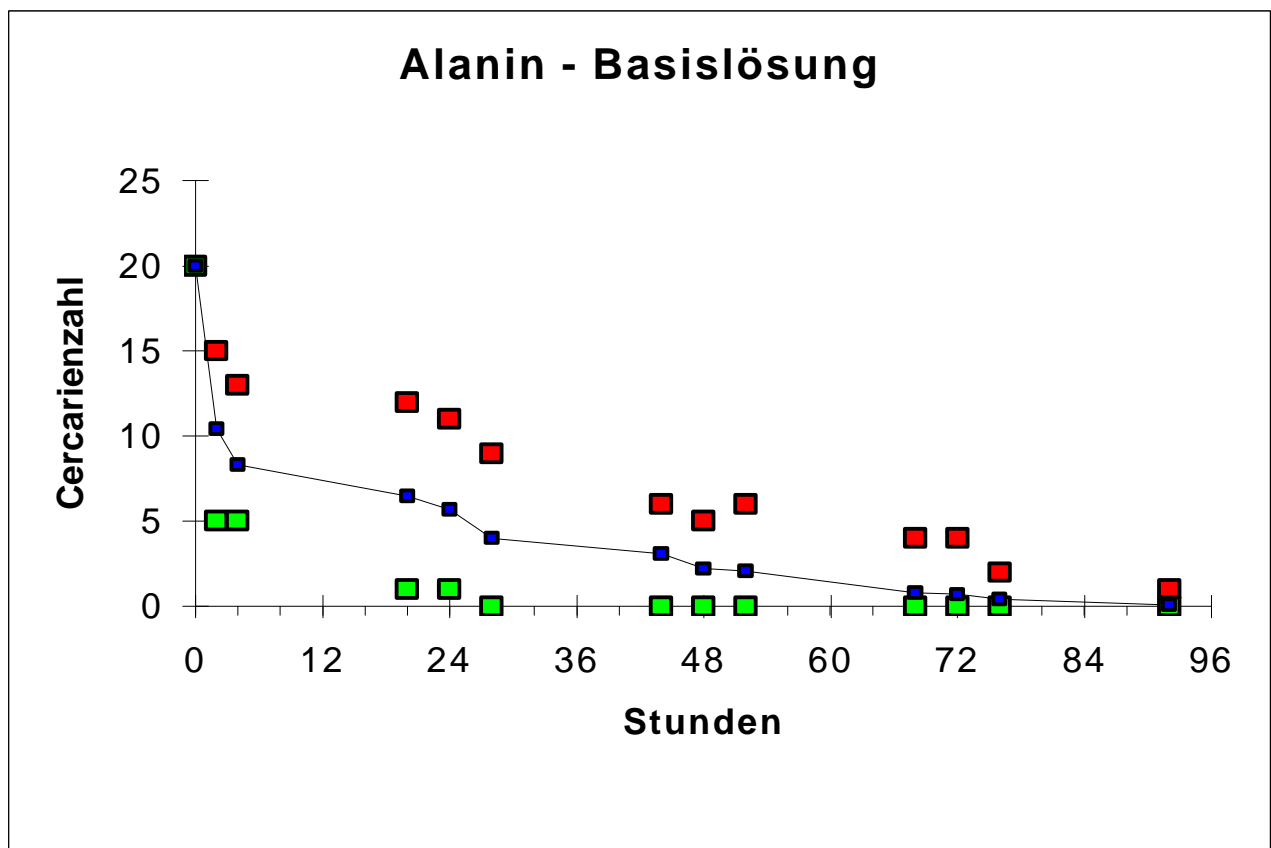


Abb. 11: Mittelwertkurve und Maximalabweichung aus zehn Untersuchungsserien mit Cercarien von *S. mansoni* in 0,03 - molarer Alaninlösung

Die Mittelwertkurve verlief also im Vergleich zur DTW- Lösung ohne Substrat ab der 4. Versuchsstunde wesentlich flacher wie oben in Abbildung 11 dargestellt. Deutlich ist der Unterschied ab 20 Stunden, eindeutig am 3. Versuchstag (ab 44 h). In der Folge sollte diese "Alanin - Kurve" als 2. Vergleichskurve dienen.

Eine weitere Versuchsreihe diene zur Ermittlung der optimalen Alaninkonzentration. Hierbei ergab sich zwischen 0,01 mol/ l und 0,1 mol/ l kein signifikanter Unterschied in den Überlebenszeiten.

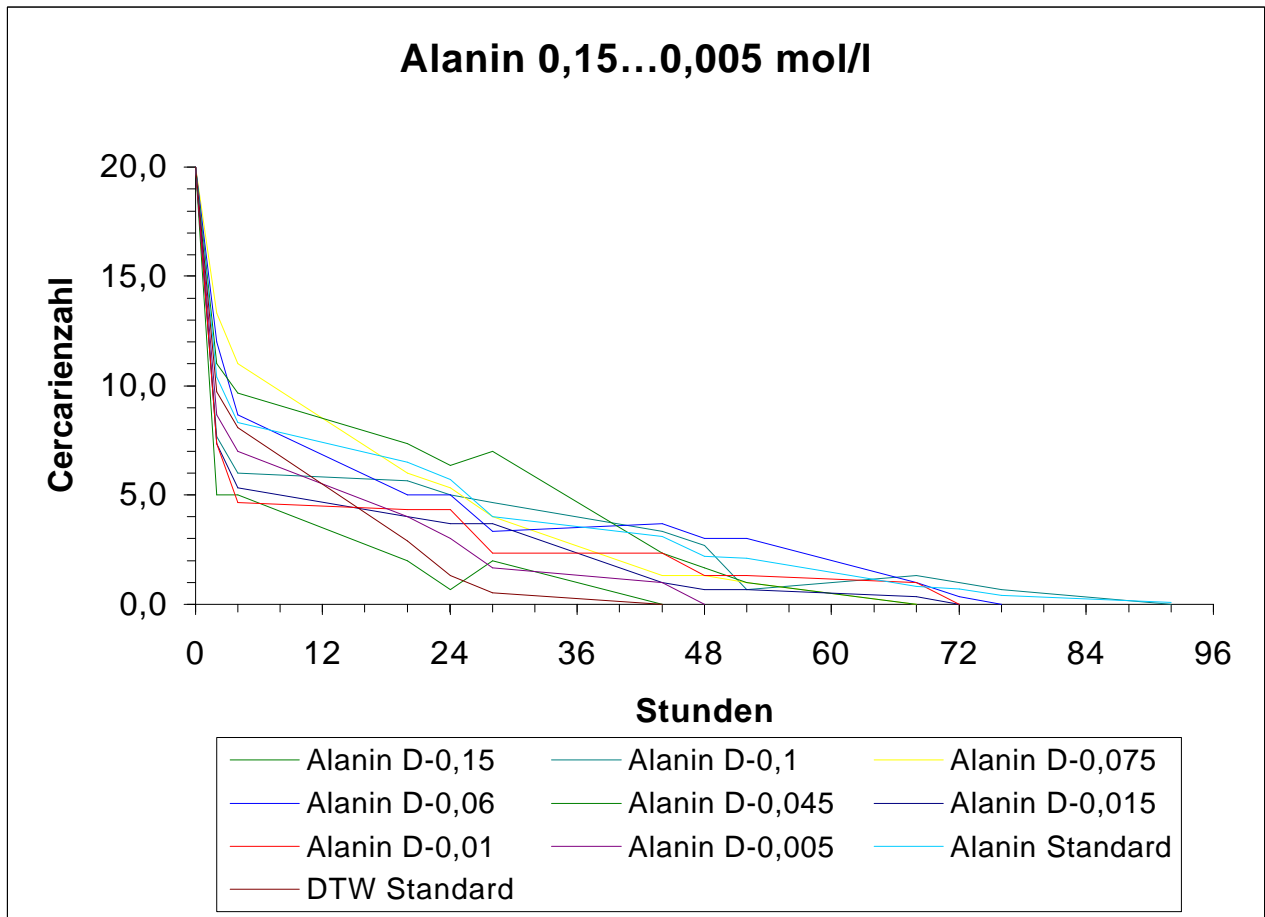


Abb. 12: Überlebenszeit der Cercarien von *S. mansoni* in unterschiedlich konzentrierter Alaninlösung

Alle Versuchsansätze lagen deutlich über der DTW - Basislösung. Lediglich 0,005 mol/l als niedrigste Konzentration und 0,15 mol/l als höchste näherten sich der substratfreien Lösung an. Zu erklären ist dies dadurch, daß die Alaninmenge mit 0,005 mol/l zu gering für einen Substrateffekt ist, andererseits ist 0,15 mol/l aufgrund der hohen Osmolarität „toxisch“.

Die Versuchsreihe belegt insgesamt die in einem weiten Konzentrationsbereich (Faktor 10 x) gleichbleibende Wirkung von Alanin auf das Schwimmverhalten der Cercarien.

4.1.3 Untersuchungen mit verschiedenen Testlösungen

Zur besseren Vergleichbarkeit sind die oben beschriebenen Mittelwertkurven von DTW – Lösung und Alanin – Basislösung in allen folgenden Diagrammen enthalten.

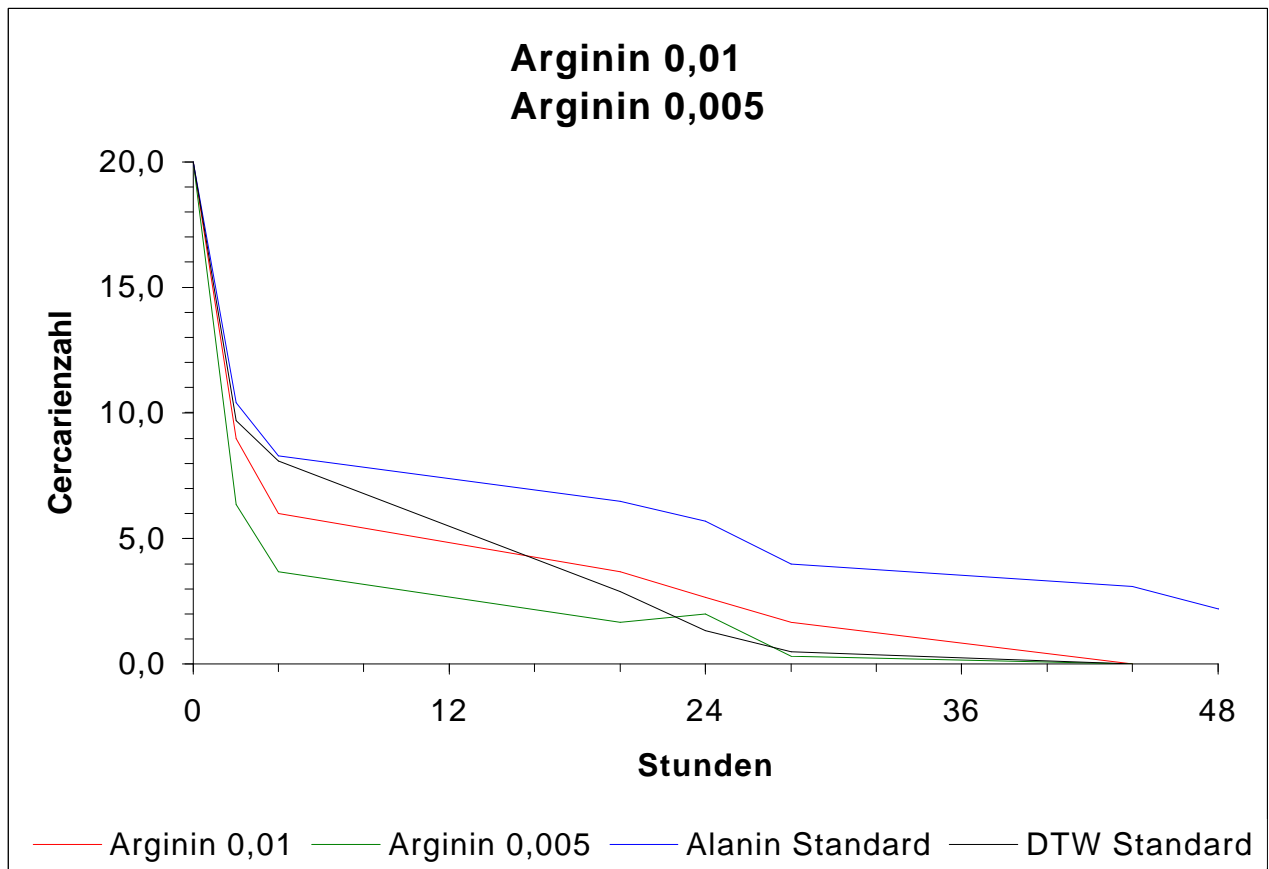


Abb. 13: Überlebenszeit der Cercarien von *S. mansoni* in Argininlösung (0,01 und 0,005 mol/l in DTW)

Der 28 h- Wert der 0,001 mol/l – Lösung zeigte einen geringfügigen Effekt, insgesamt aber erwies sich die basische Aminosäure als nicht lebenszeitverlängernd.

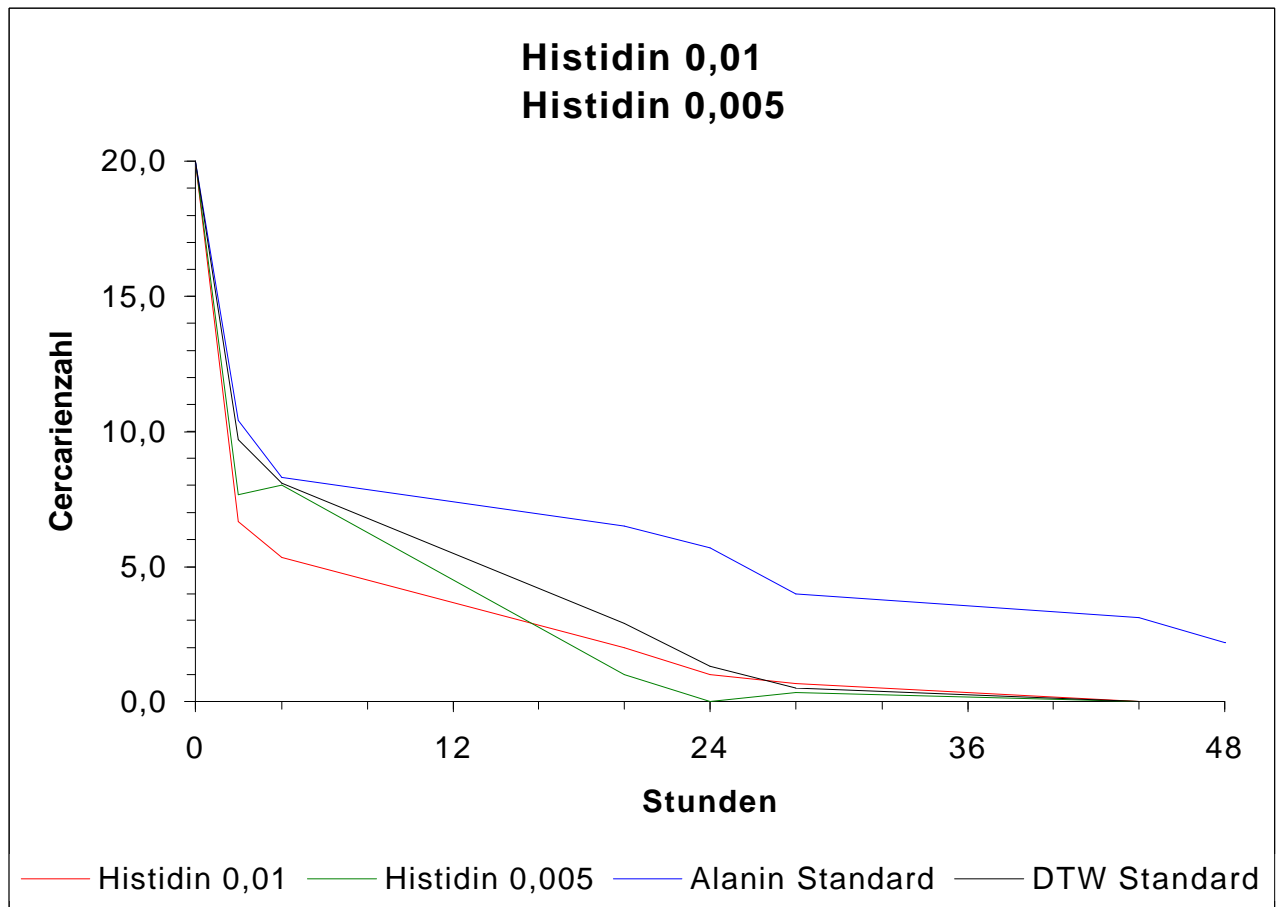


Abb. 14: Überlebenszeit der Cercarien von *S. mansoni* in Histidinlösung (0,01 und 0,005 mol/l in DTW)

Die Histidinlösung war der DTW-Lösung in beiden Konzentrationen vergleichbar. Keine Cercarie überlebte länger als 28 Stunden.

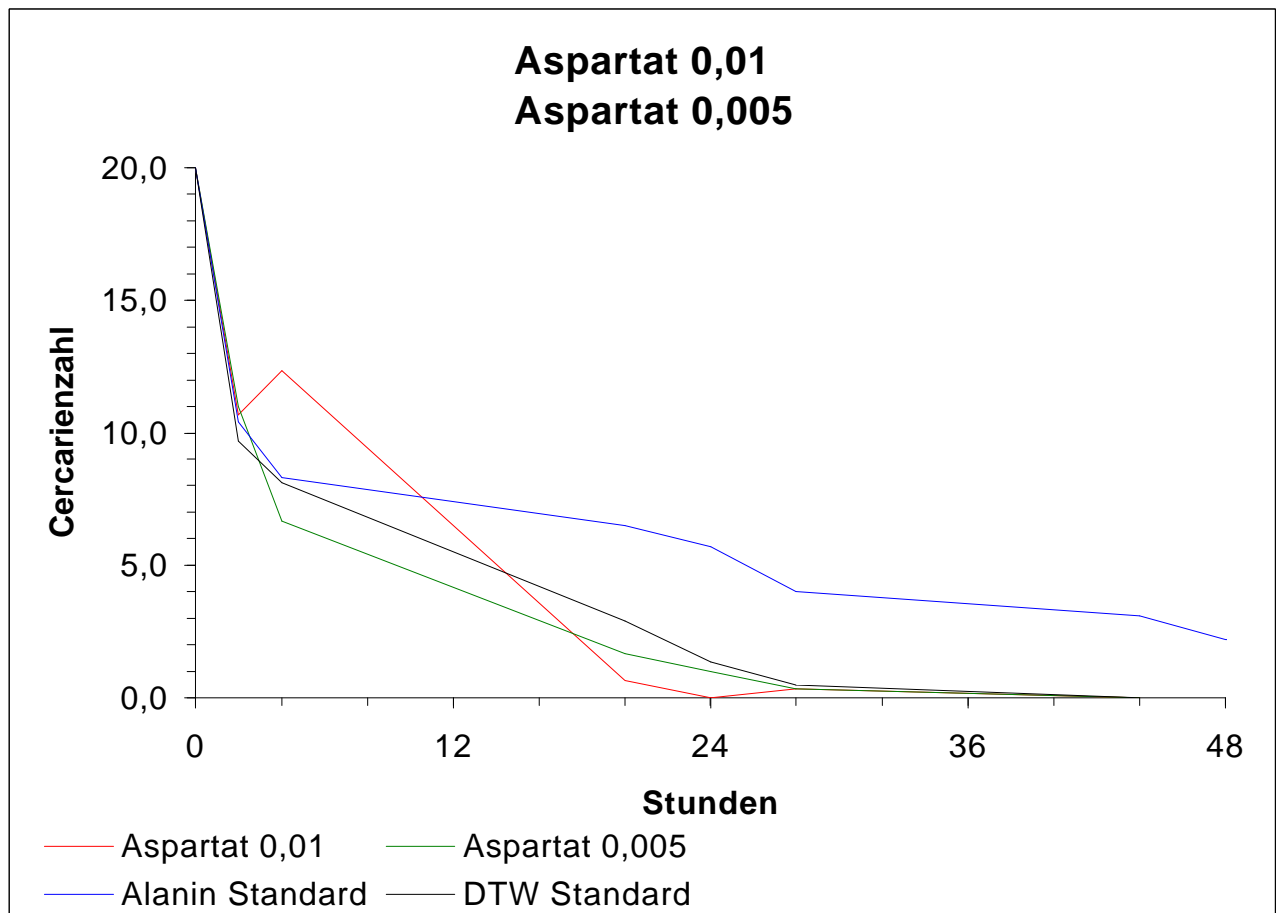


Abb. 15: Überlebenszeit der Cercarien von *S. mansoni* in Aspartatlösung (0,01 und 0,005 mol/l in DTW)

Die saure Aminosäure Aspartat lag in beiden Konzentrationen gering unter den Vergleichswerten der DTW- Lösung, insgesamt fand sich in der höheren Konzentration ein leicht toxischer Effekt mit verfrühtem Absterben der eingesetzten Cercarien.

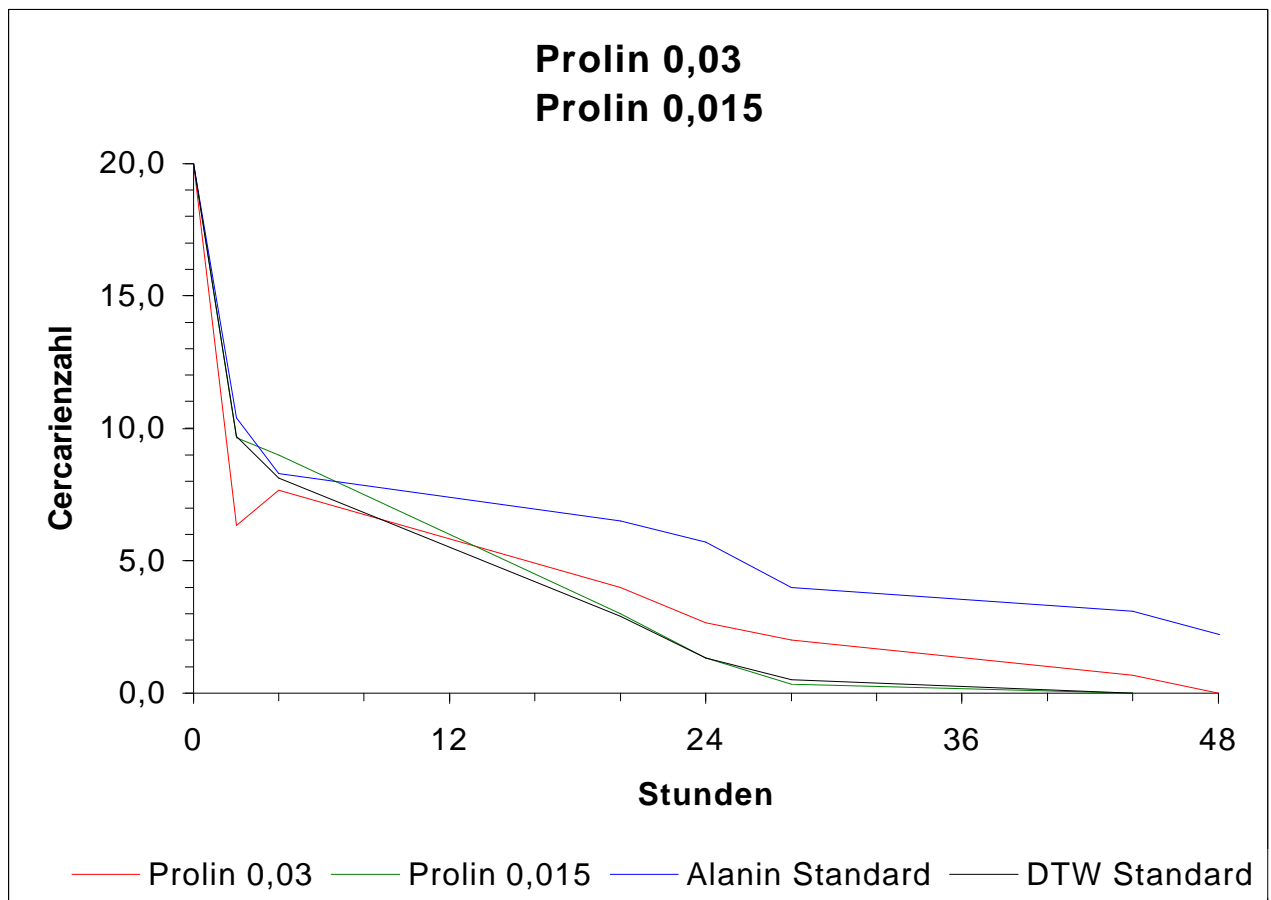


Abb. 16: Überlebenszeit der Cercarien von *S. mansoni* in Prolinlösung (0,03 und 0,015 mol/l in DTW)

Prolin zeigt in der höheren Konzentration (0,03 mol/l) im Zeitraum von 20 bis 44 Stunden Versuchsdauer einen Kurvenverlauf parallel zur Alanin-Basislösung auf niedrigerem Niveau.

Während die niedrige Konzentration (0,01 mol/l) deckungsgleich mit der DTW - Lösung verläuft, zeigt die höhere also ein eindeutig verzögertes Absterbeverhalten.

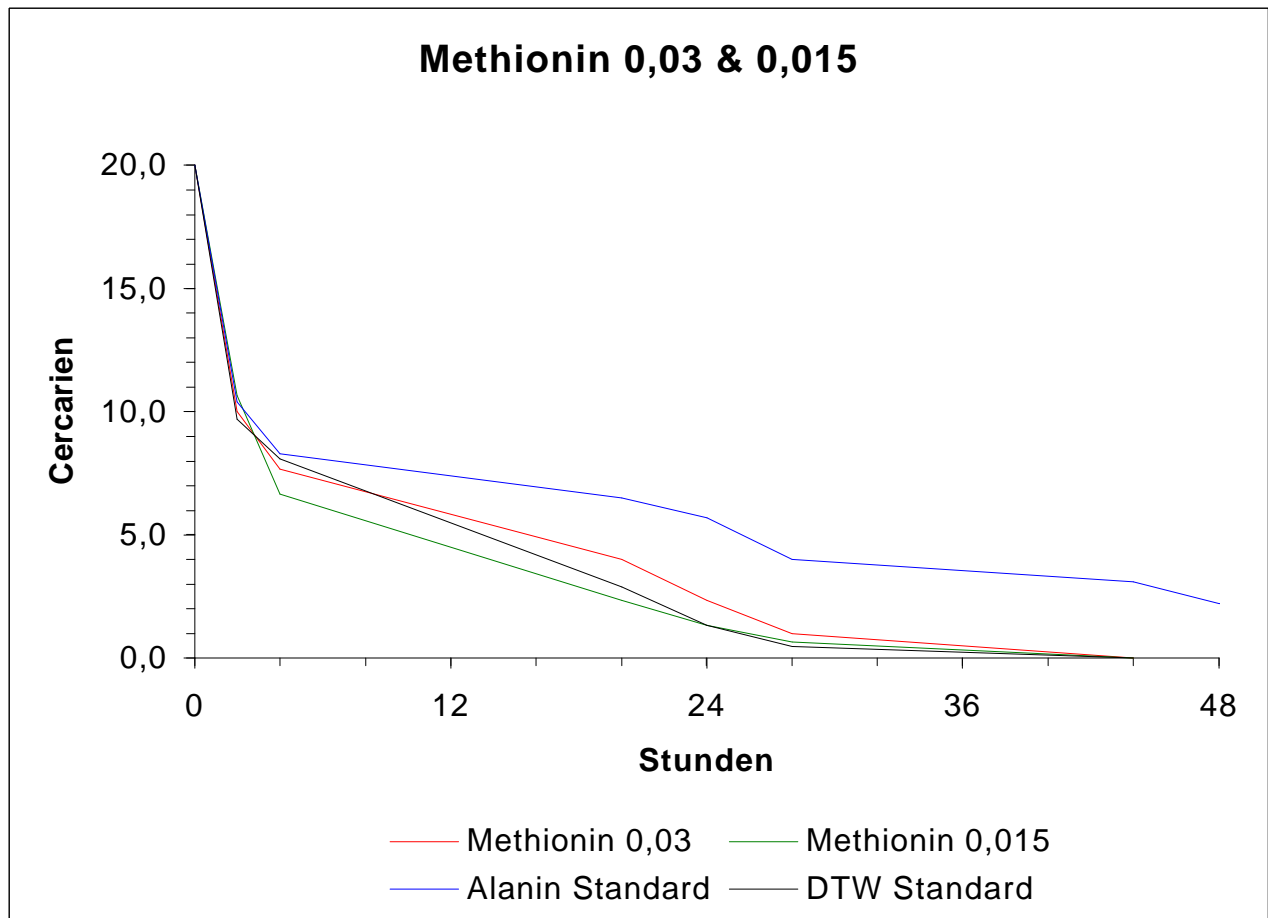


Abb. 17: Überlebenszeit der Cercarien von *S. mansoni* in Methioninlösung (0,03 und 0,015 mol/l in DTW)

Die höhere Konzentration (0,03 mol/l) ist von der 20. - 24. Stunde der DTW- Lösung überlegen, danach gleicht sie sich dieser an.

Die Alanin - Kurve wird nirgends erreicht.

Die niedrige Konzentration (0,015 mol/l) verläuft deckungsgleich mit der DTW-Lösung.

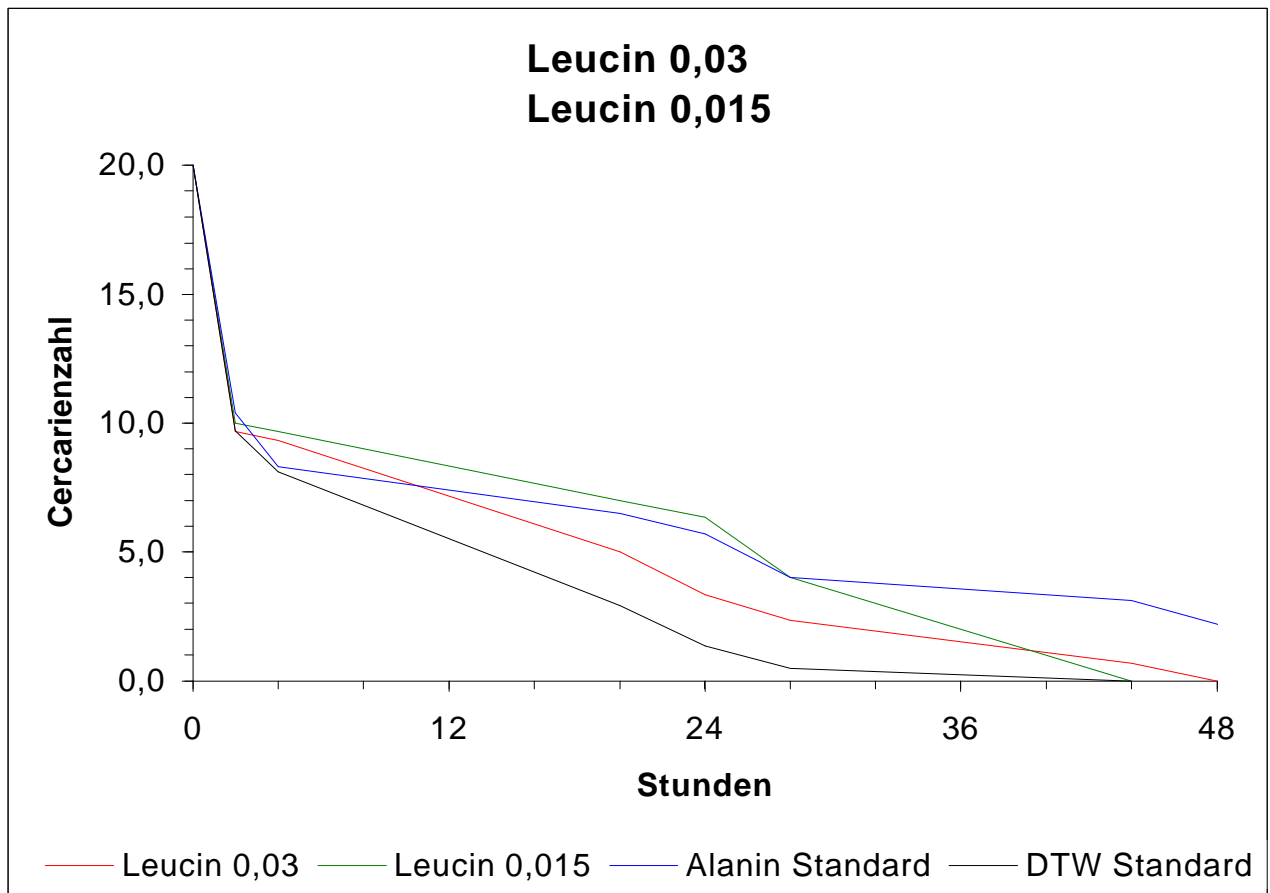


Abb. 18: Überlebenszeit der Cercarien von *S. mansoni* in Leucinlösung (0,03 und 0,015 mol/l in DTW)

Wie nahezu alle Kurven verlaufen beide Versuchsansätze in den ersten 4 Stunden symmetrisch mit Abfall auf ca. 50% der eingesetzten Cercarien.

Die niedrige Konzentration (0,015 mol/l) ist der Alanin- Standardlösung nach 20 und 24 Stunden leicht überlegen, danach erfolgt jedoch ein rascher Abfall auf 0 Cercarien nach 44 Stunden.

Die höhere Konzentration (0,03 mol/ l) verläuft genau zwischen DTW- und Alanin- Lösung und zeigt ein protrahiertes Überlebensverhalten der Cercarien bis 44 Stunden (3 % der Ausgangszahl).

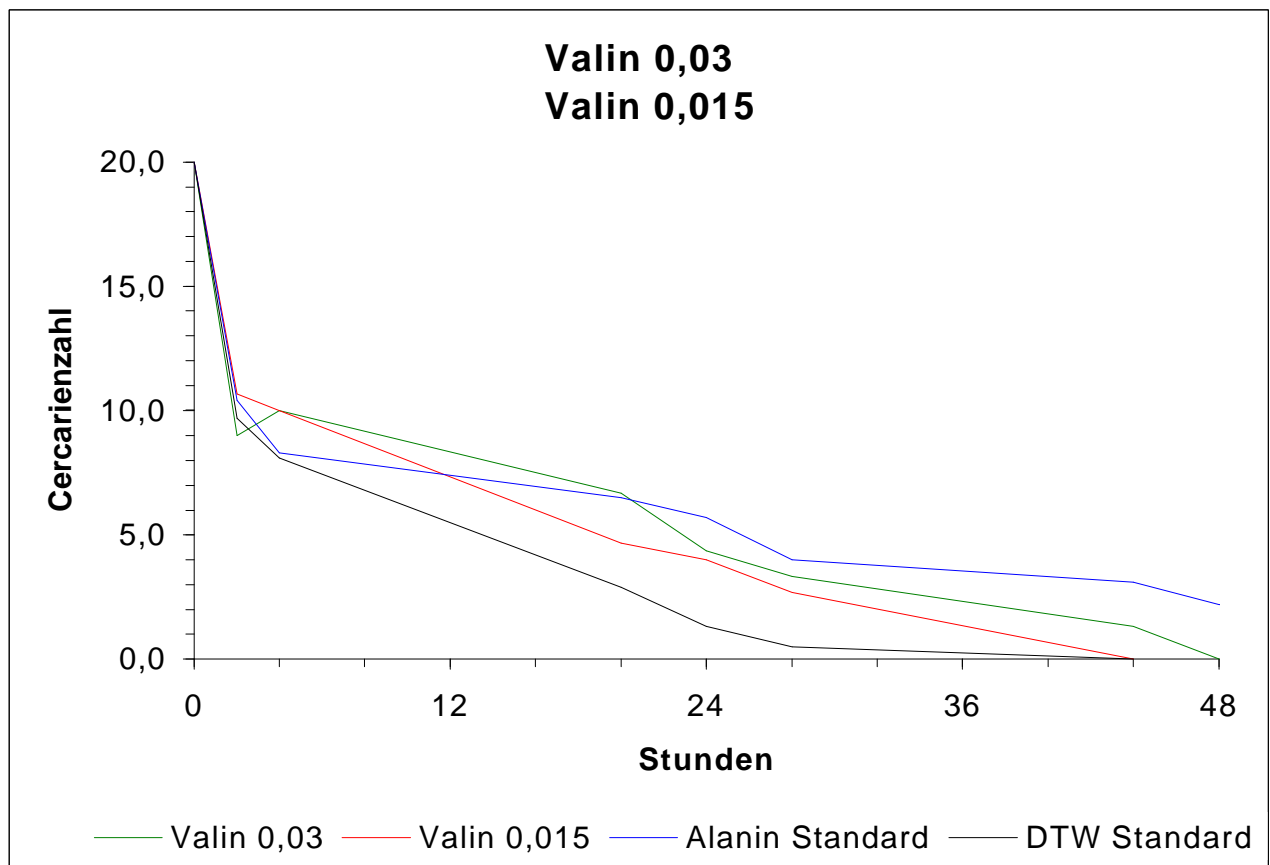


Abb. 19: Überlebenszeit der Cercarien von *S.mansoni* in Valinlösung (0,03 und 0,015 mol/l in DTW)

Ab der 20. Stunde sind beide Versuchslösungen der DTW - Lösung signifikant überlegen, die höhere Konzentration (0,03 mol/l) liegt bis zur 28. Stunde nur gering unter der Alanin - Lösung.

6,5% der eingesetzten Cercarien überleben in diesem Ansatz 44 Stunden. Auch die niedrigere Konzentration weist von der 20. - 28. Stunde ein verzögertes Absterbeverhalten auf.

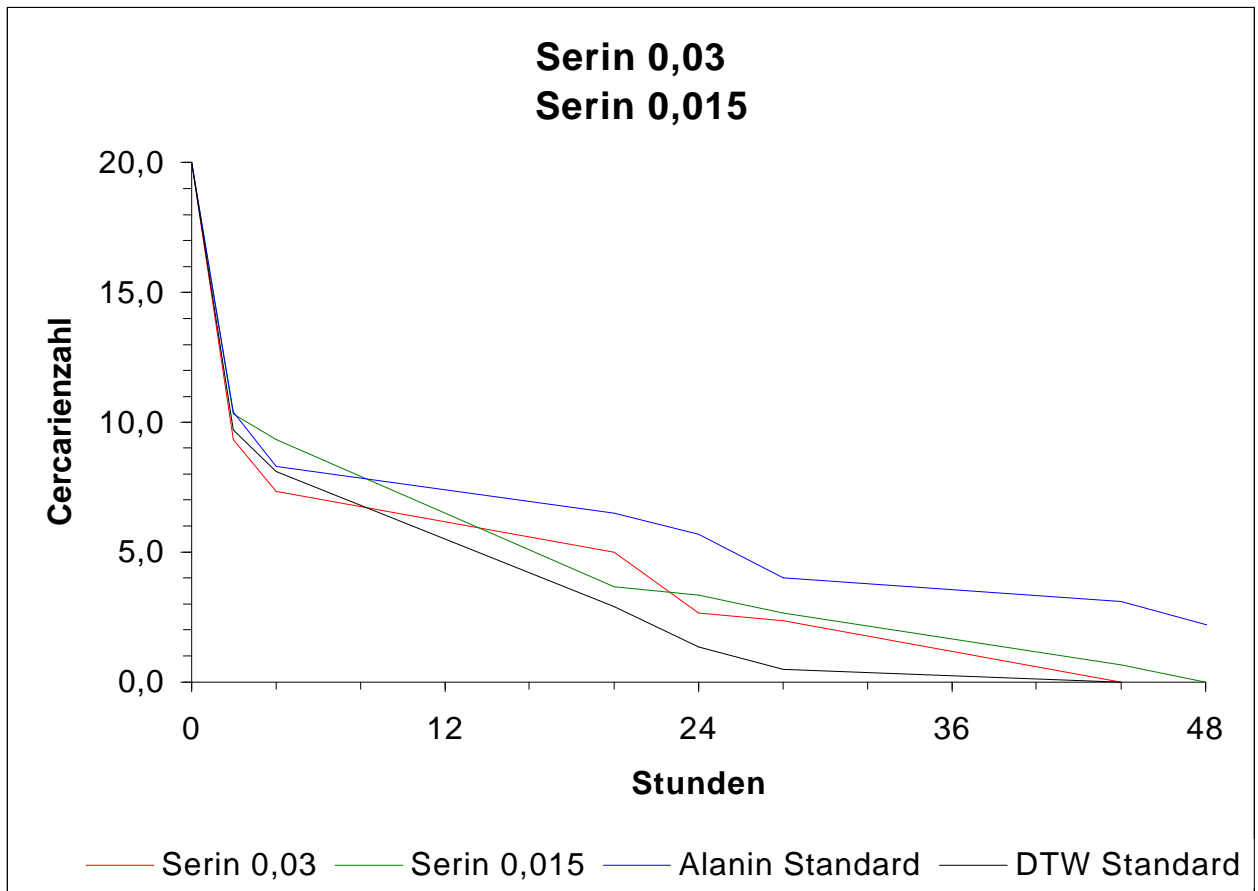


Abb. 20: Überlebenszeit der Cercarien von *S.mansoni* in Serinlösung (0,03 und 0,015 mol/l in DTW)

Beide Konzentrationen befinden sich ab der 20. Stunde oberhalb des Verlaufs der DTW - Lösung, besonders deutlich ist dies nach 28 Stunden.

Die Wirksamkeit der Alanin - Lösung auf das Überleben wird jedoch nicht erreicht. In der niedrigeren Konzentration (0,015 mol/l) überleben etwa 3% der Cercarien 44 Stunden.

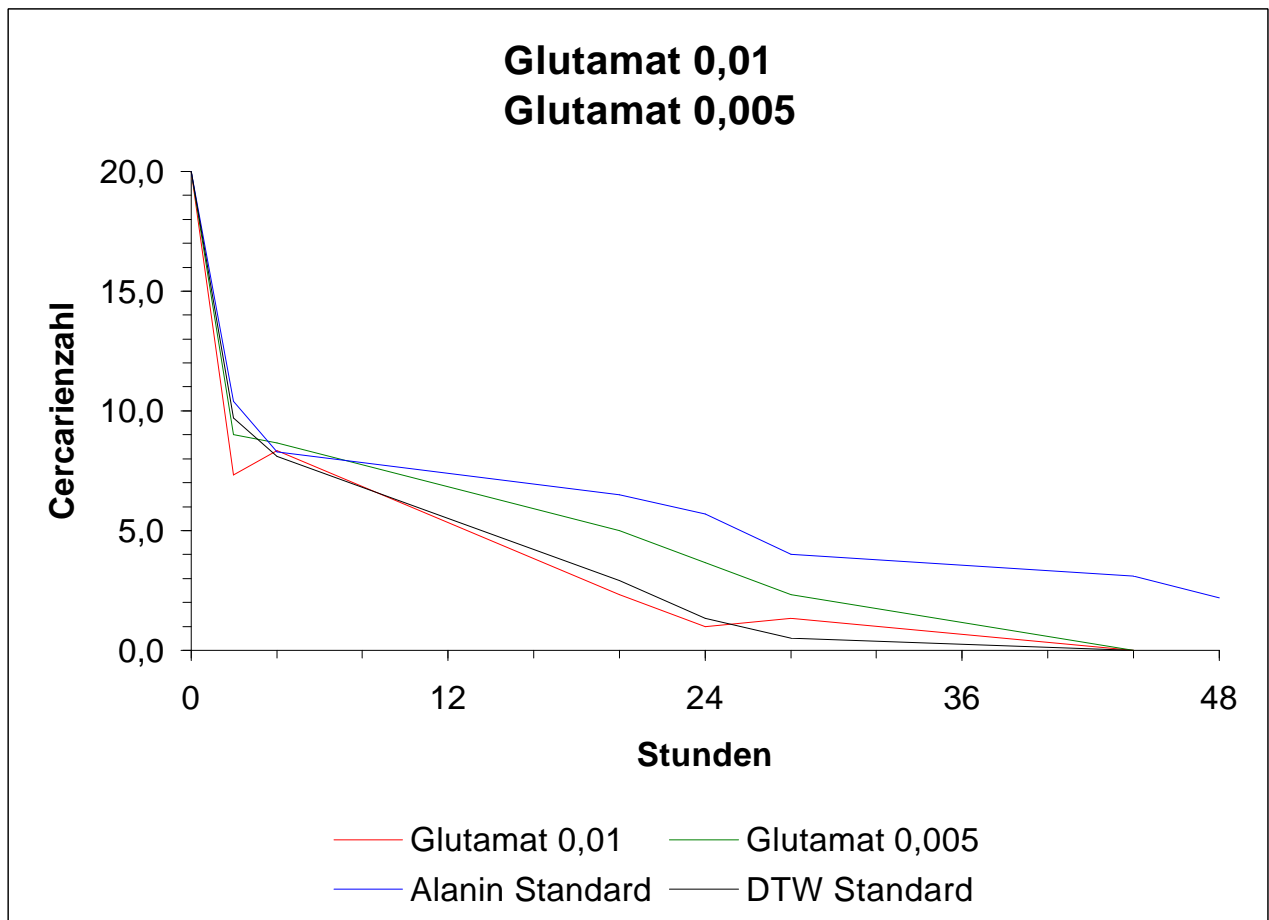


Abb. 21: Überlebenszeit der Cercarien von *S.mansoni* in Glutamatlösung (0,01 und 0,005 mol/l in DTW)

Die höhere Konzentration (0,01 mol/l) der sauren Aminosäure entspricht im Absterbeverhalten der DTW- Lösung, die weniger konzentrierte Lösung (0,005 mol/l) ist dieser von der 20. - 28. Stunde deutlich überlegen, ohne das Niveau der Alanin - Lösung zu erreichen.

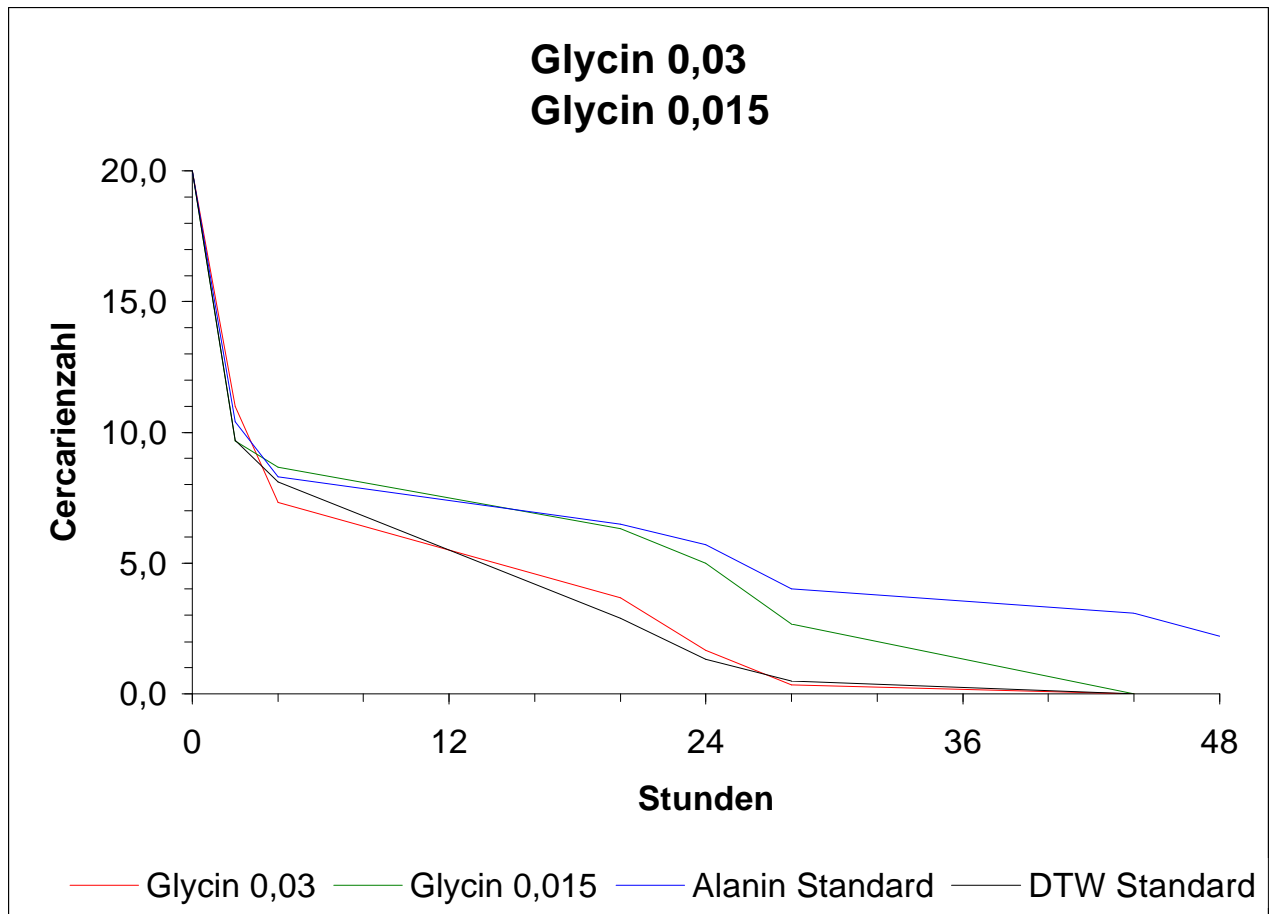


Abb. 22: Überlebenszeit der Cercarien von *S. mansoni* in Glycine (0,03 und 0,015 mol/l in DTW)

Die höhere Konzentration (0,03 mol/l) zeigt einen fast identischen Kurvenverlauf wie die DTW - Lösung.

Die niedrigere Konzentration (0,015 mol/l) weist im Zeitraum von 20 bis 28 Stunden ein signifikant verzögertes Absterbeverhalten auf. Nach einem alanin - ähnlichen Plateau setzt ein rascher Abfall ein, so daß nach 44 Stunden keine Cercarien mehr nachweisbar sind.

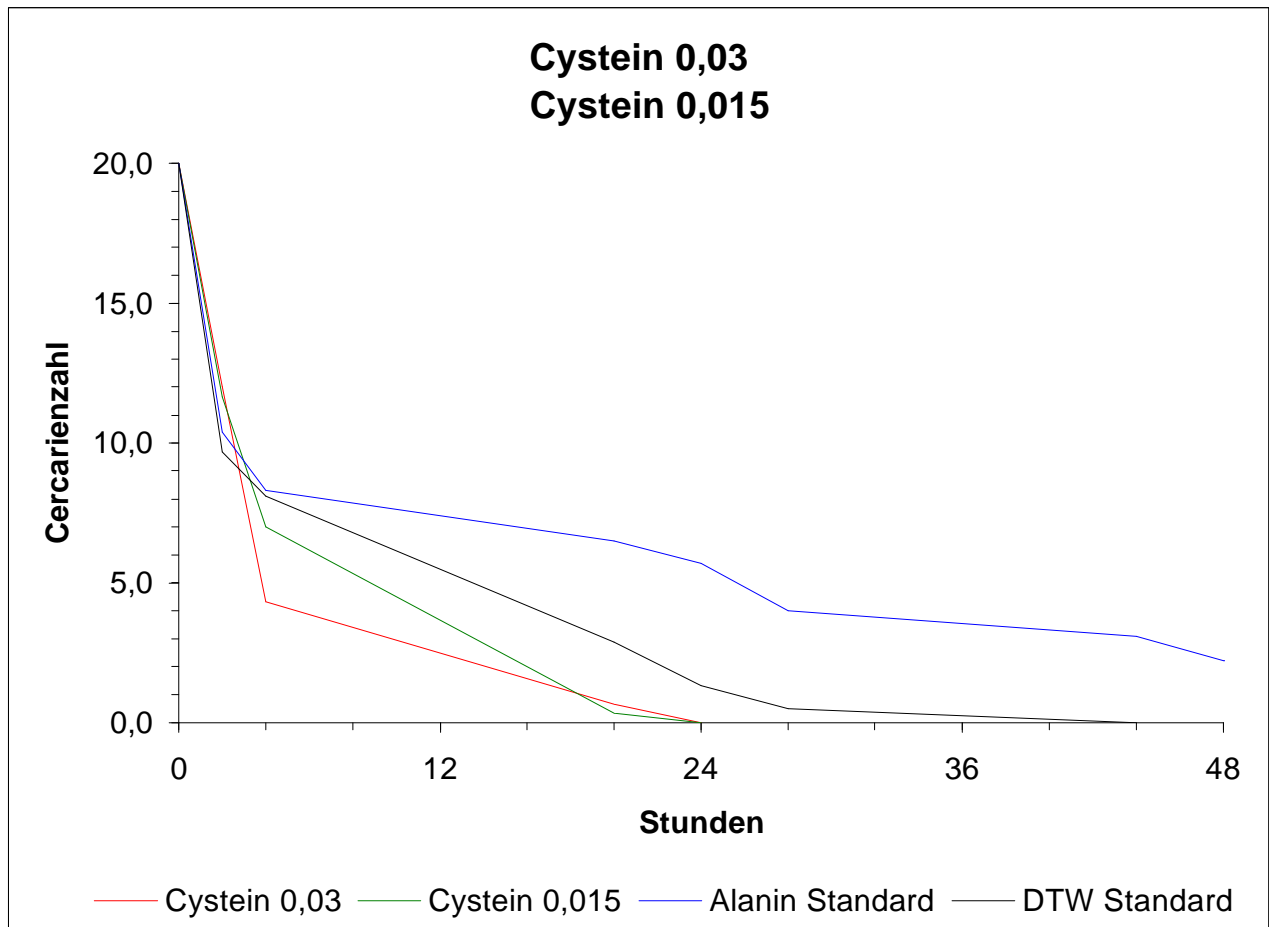


Abb. 23: Überlebenszeit der Cercarien von *S.mansoni* in Cysteinlösung (0,03 und 0,015 mol/l in DTW)

Konzentrationsunabhängig wirkt sich Cystein eindeutig negativ auf das Überleben der Cercarien aus. Bereits nach 4 Stunden ist ein toxischer Effekt erkennbar, nur 2% der Cercarien sind nach 20 Stunden aktivierbar. Im Gegensatz dazu ist nach 2 Stunden mit ca. 60% eine sehr hohe Cercarienzahl nachweisbar.

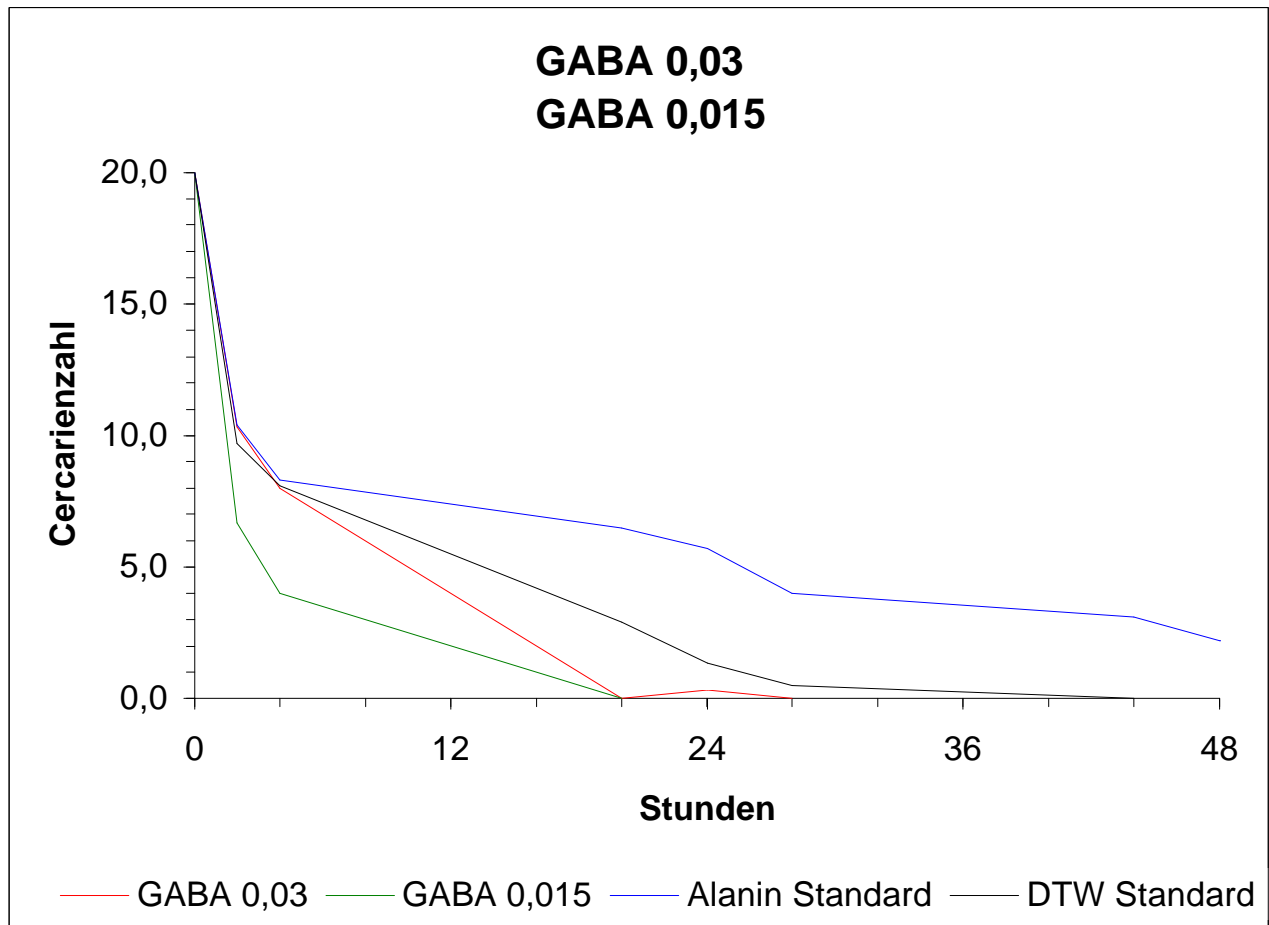


Abb. 24: Überlebenszeit der Cercarien von *S.mansoni* in GABA-Lösung (0,03 und 0,015 mol/l in DTW)

Wohl konzentrationsunabhängig tritt ein toxischer Effekt für das Überlebensverhalten der Cercarien ein, welcher in der geringeren Konzentration (0,015 mol/l) noch deutlicher zu sein scheint. Nur weniger als 1% aller Cercarien in beiden GABA - Lösungen sind am 2. Versuchstag (nach 20 Stunden) noch beweglich.

In der 0,015 - molaren Lösung tritt die Toxizität bereits nach 2 Stunden ein. Der Kurvenverlauf befindet sich deutlich unterhalb der DTW - Lösung.

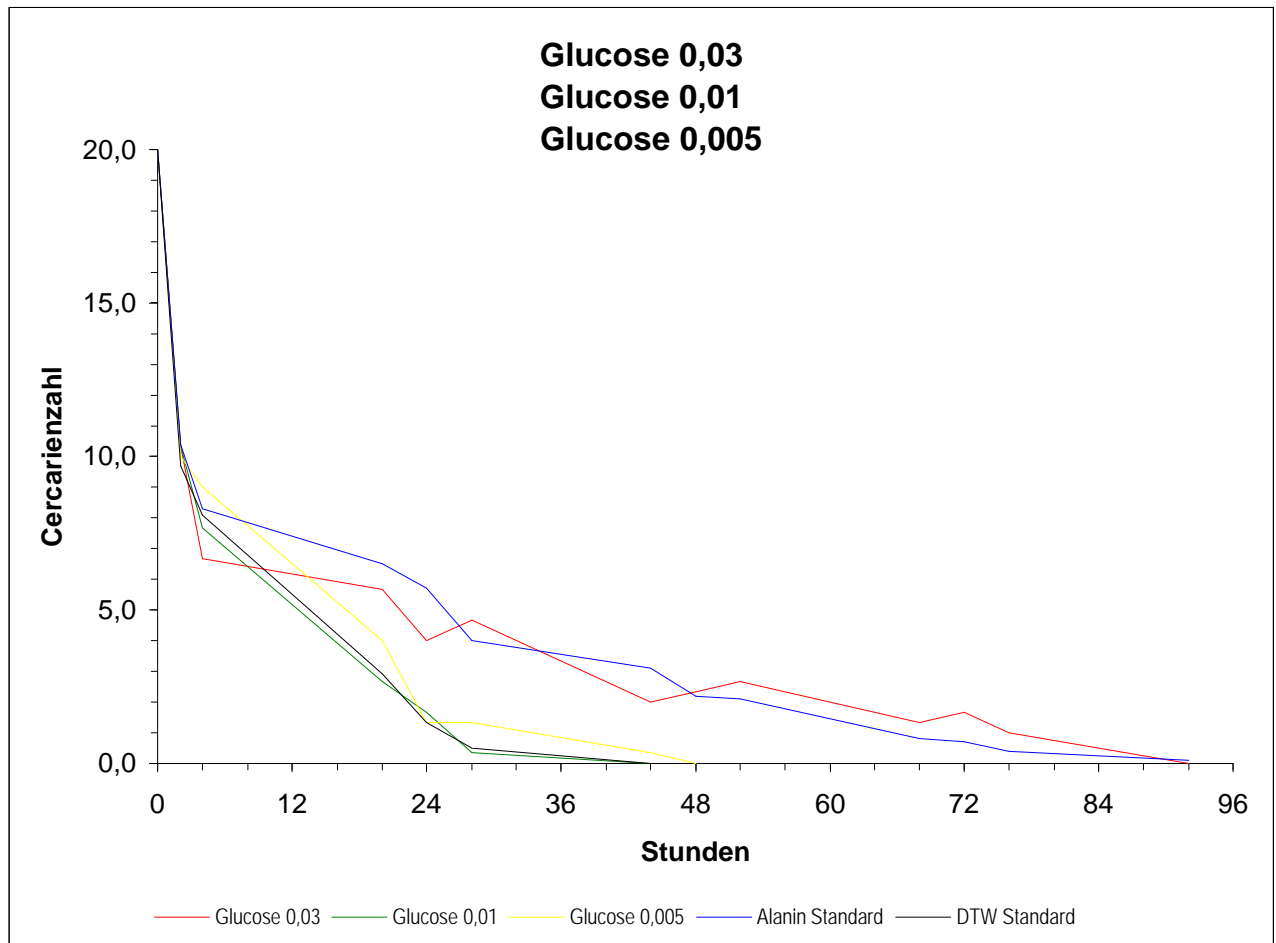


Abb. 25: Überlebenszeit der Cercarien von *S. mansoni* in Glucoselösung (0,03, 0,01 und 0,005mol/l in DTW)

Die Glucoselösung niedrigster Konzentration zeigt einen geringfügig prolongierten Verlauf der Absterbekurve, während sich die 0,01 - molare Lösung nicht von der DTW - Lösung unterscheidet.

Deutlich abgeflacht und annähernd deckungsgleich mit der Alaninkurve ist der Verlauf der 0,03 - molaren Glucoselösung, welche nach 68 Stunden im Vergleich noch etwas mehr lebende Cercarien enthält. Nach 92 Stunden erst sind keine aktivierbaren Cercarien mehr nachweisbar.

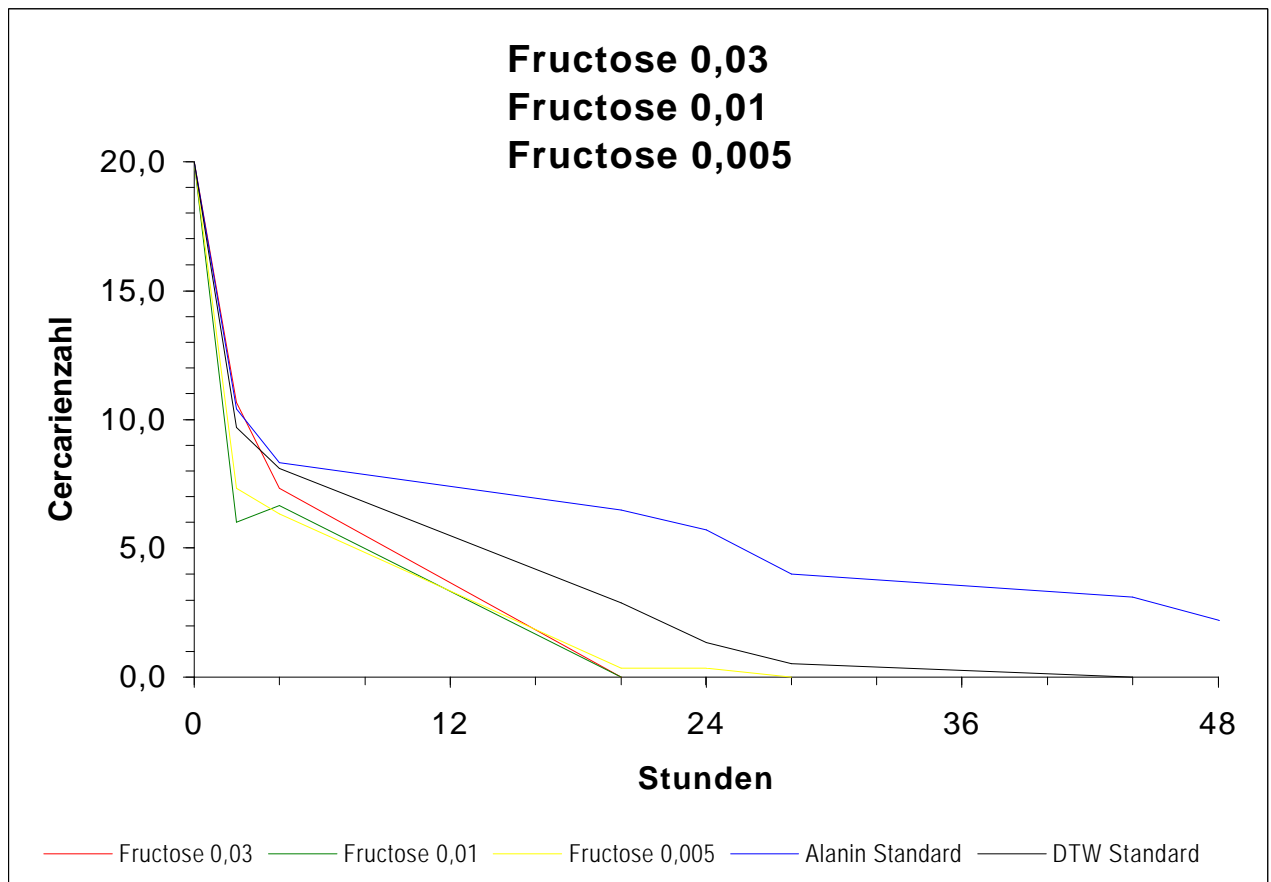


Abb. 26: Überlebenszeit der Cercarien von *S.mansoni* in Fructoselösung (0,03, 0,01 und 0,005 mol/l in DTW)

Alle Konzentrationen erweisen sich im Vergleich zur DTW - Lösung als toxisch, d.h. es findet sich ein schnelles Absterben der eingesetzten Cercarien.

Dieser Effekt zeigt sich schon nach 4 Stunden und ist in der geringsten Konzentration (0,005 mol/l) am wenigsten deutlich.

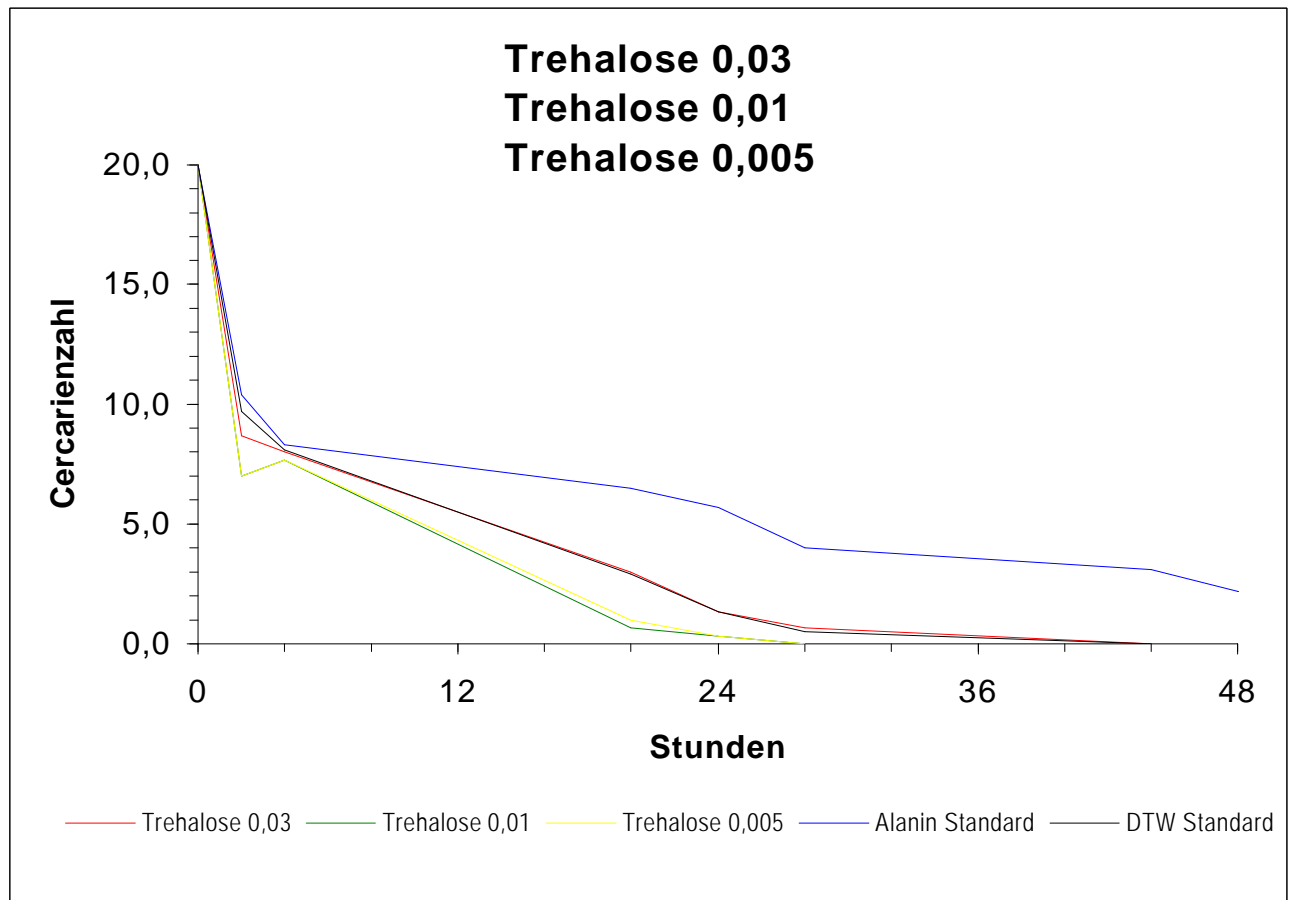


Abb. 27: Überlebenszeit der Cercarien von *S.mansoni* in Trehaloselösung (0,03, 0,01 und 0,005 mol/l in DTW)

In den beiden geringeren Konzentrationen (0,01 und 0,005 mol/l) scheint der Verlauf der Absterbekurve noch unterhalb der DTW - Kurve zu liegen (geringe Toxizität ?). Die höhere Konzentration (0,03 mol/l) ist mit dieser nahezu deckungsgleich, das heißt es zeigt sich kein spezifischer Effekt auf das Überleben der Cercarien.

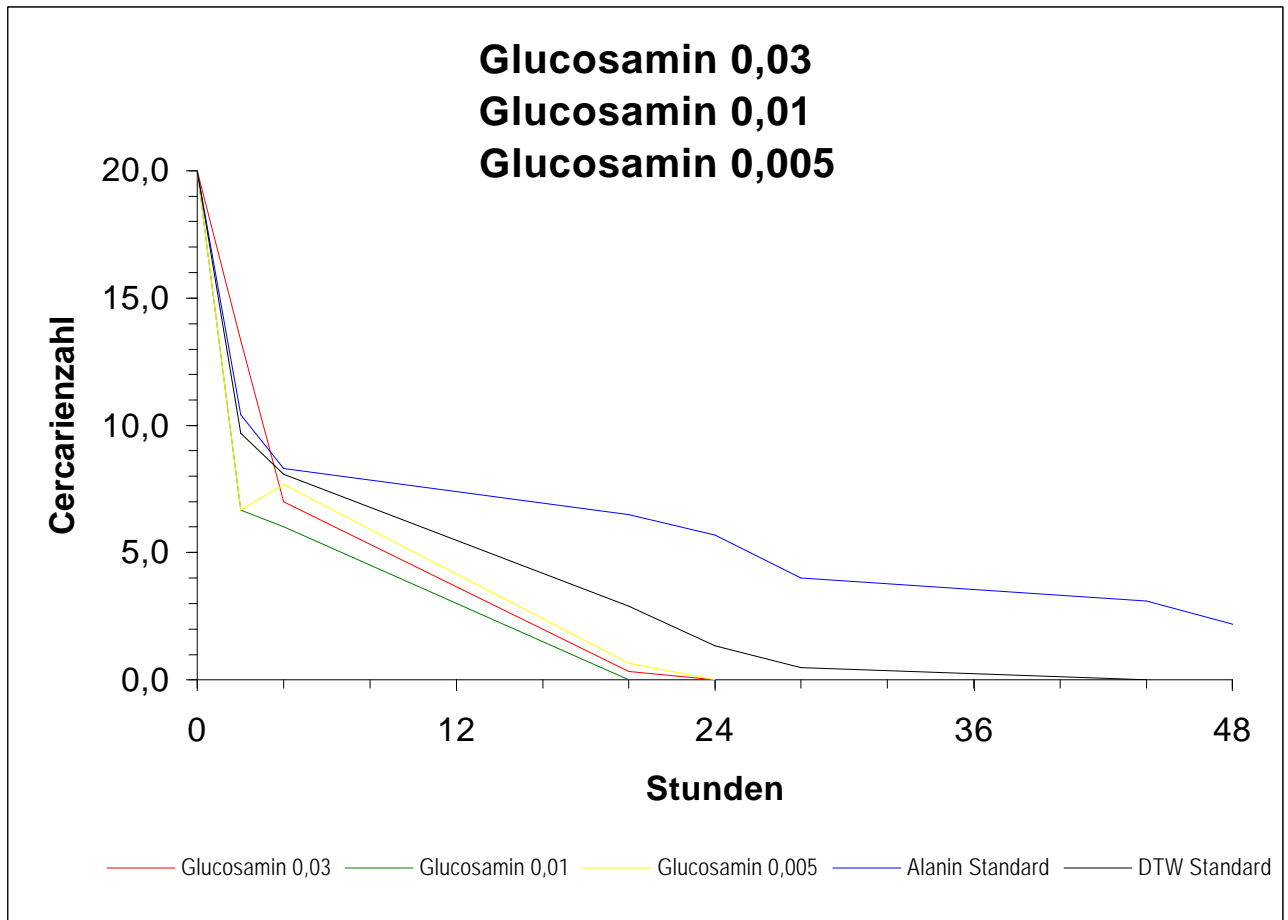


Abb. 28: Überlebenszeit der Cercarien von *S. mansoni* in Glucosaminlösung (0,03, 0,01 und 0,005 mol/l in DTW)

Konzentrationsunabhängig tritt in allen Lösungen ein sehr rascher Abfall der Cercarienzahl auf, so daß weniger als 2% nach 20 Stunden nachweisbar sind.

Auffallend ist in der 0,03 - molaren Lösung eine sehr hohe Aktivität der Cercarien nach 2 Stunden, deutlich die Alanin - Lösung übertreffend. In geringerer Konzentration ist dieser Effekt nicht nachweisbar.

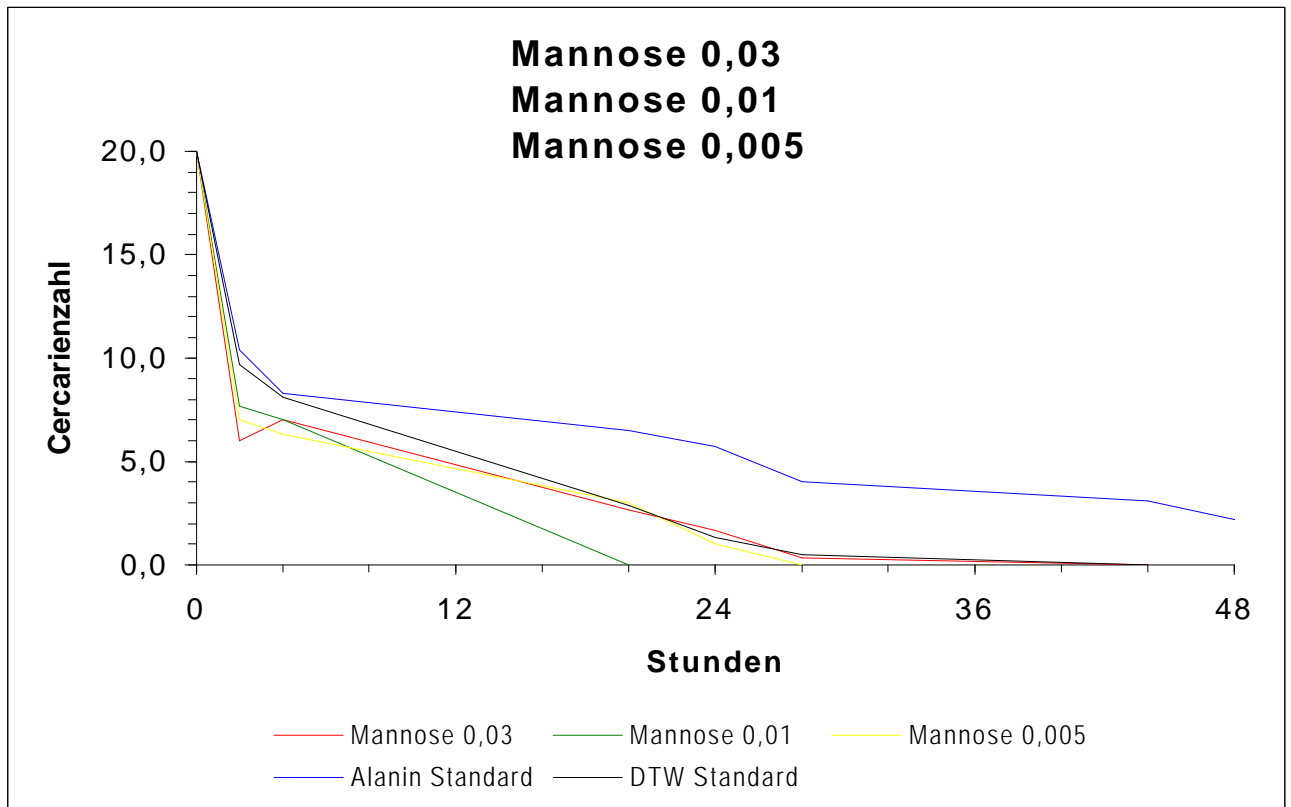


Abb. 29: Überlebenszeit der Cercarien von *S. mansoni* in Mannoselösung (0,03, 0,01 und 0,005 mol/l in DTW)

Höhere (0,03 mol/l) und niedrige (0,005 mol/l) Konzentration entsprechen in ihrem Kurvenverlauf der DTW- Lösung. Lediglich die 0,01 - molare Lösung zeigt eine steilere Absterbekurve.

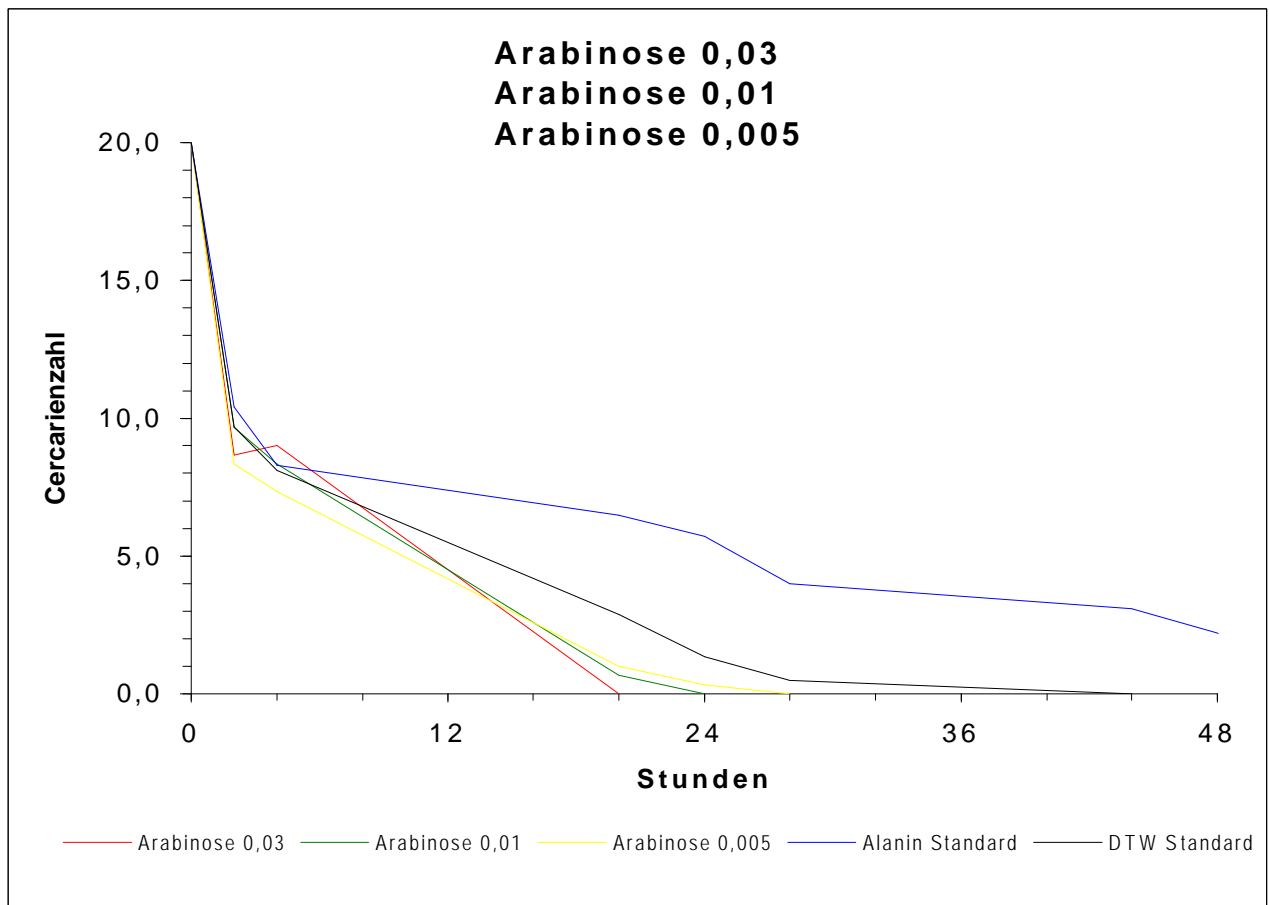


Abb. 30: Überlebenszeit der Cercarien von *S. mansoni* in Arabinoselösung (0,03, 0,01 und 0,005 mol/l in DTW)

Arabinose zeigt einen deutlich konzentrationsabhängigen Verlauf der Absterbekurve. Je geringer die Konzentration, desto flacher der Verlauf und umso größer ist die Annäherung an die DTW - Kurve. Auch die am wenigsten konzentrierte Lösung (0,005 mol/l) zeigt jedoch im Vergleich zur DTW - Lösung eindeutige Toxizität. Deutlich wirkt sich dies nach 20 Stunden aus. Der 28-Stunden-Wert liegt bei Null.

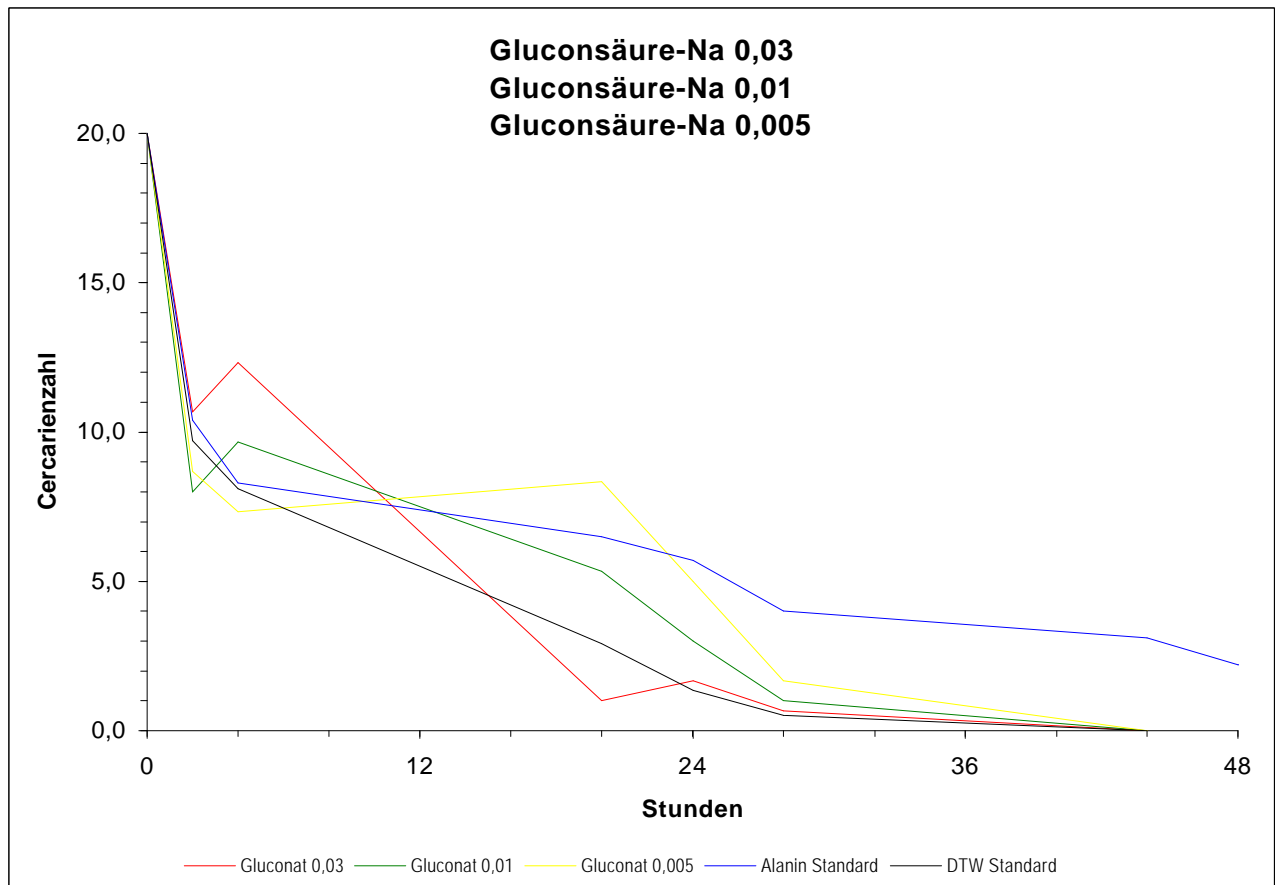


Abb. 31: Überlebenszeit der Cercarien von *S. mansoni* in Gluconatlösung (0,03 und 0,01 und 0,005 mol/l in DTW)

Die Gluconsäure hat eine inverse konzentrationsabhängige Wirkung auf das Absterbeverhalten der Cercarien.

Während die höchste Konzentration (0,03 mol/l) der DTW - Lösung vergleichbar ist, ist die Absterbekurve der 0,01 - molaren leicht und der 0,005 - molaren Lösung deutlich abgeflacht.

Letztere ist der Alanin- Lösung bis zur 24. Stunde vergleichbar, erst danach setzt ein rascher Abfall ein, so daß keine Cercarie 44 Stunden überlebt.

4.2 Ergebnisse der Untersuchungen zur Substrataufnahme

4.2.1 Glucoseaufnahme

In den oben beschriebenen Versuchen zur Verlängerung der Schwimm- und Überlebensfähigkeit der Cercarien von *S. mansoni* hat es sich von den untersuchten Zuckerlösungen lediglich Glucose als wirksames Substrat erwiesen. Entsprechend den Voruntersuchungen von Großwieser (28) verwendeten wir 400 Cercarien je Küvette und beobachteten den Abfall der Glucosekonzentration über die Zeit.

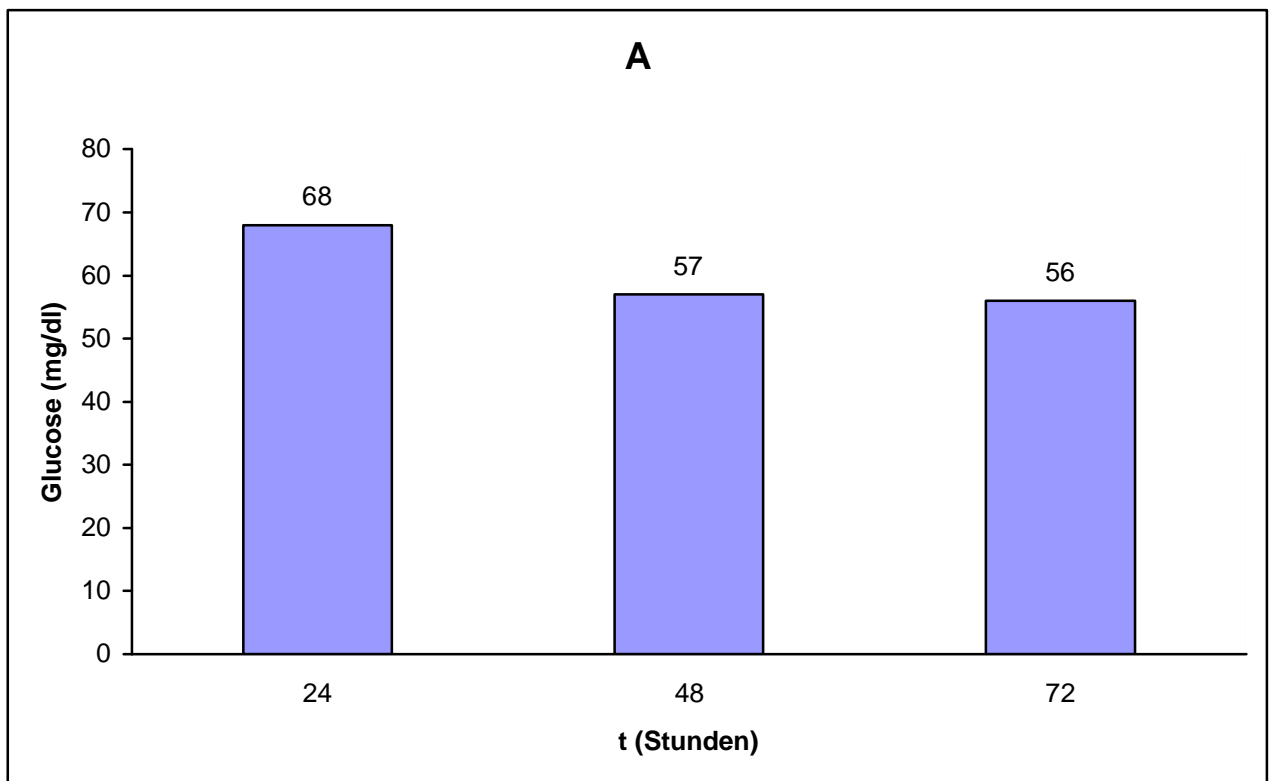


Abb. 32: Abnahme der Glucosekonzentration während 72 Stunden Versuchsdauer

Die Säulenreihe lässt einen nach 48 und 72 Stunden gleichbleibend geringen nicht-signifikanten Abfall der Glucosekonzentration erkennen.

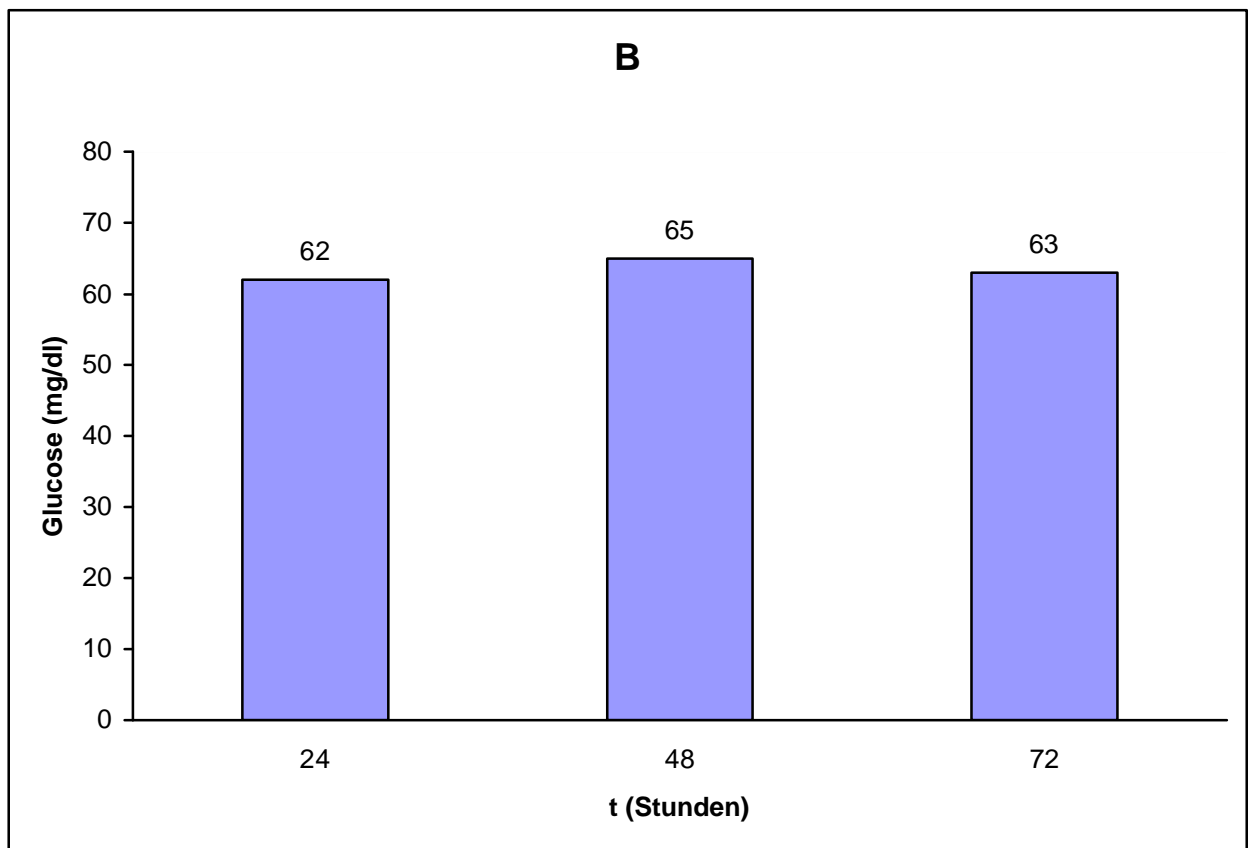


Abb. 33: Glucosekonzentration bei gleichzeitigem Zusatz bakterizider Substanzen (Penicillin, Streptomycin)

Es stellt sich keine Konzentrationsänderung über 72 Stunden dar.

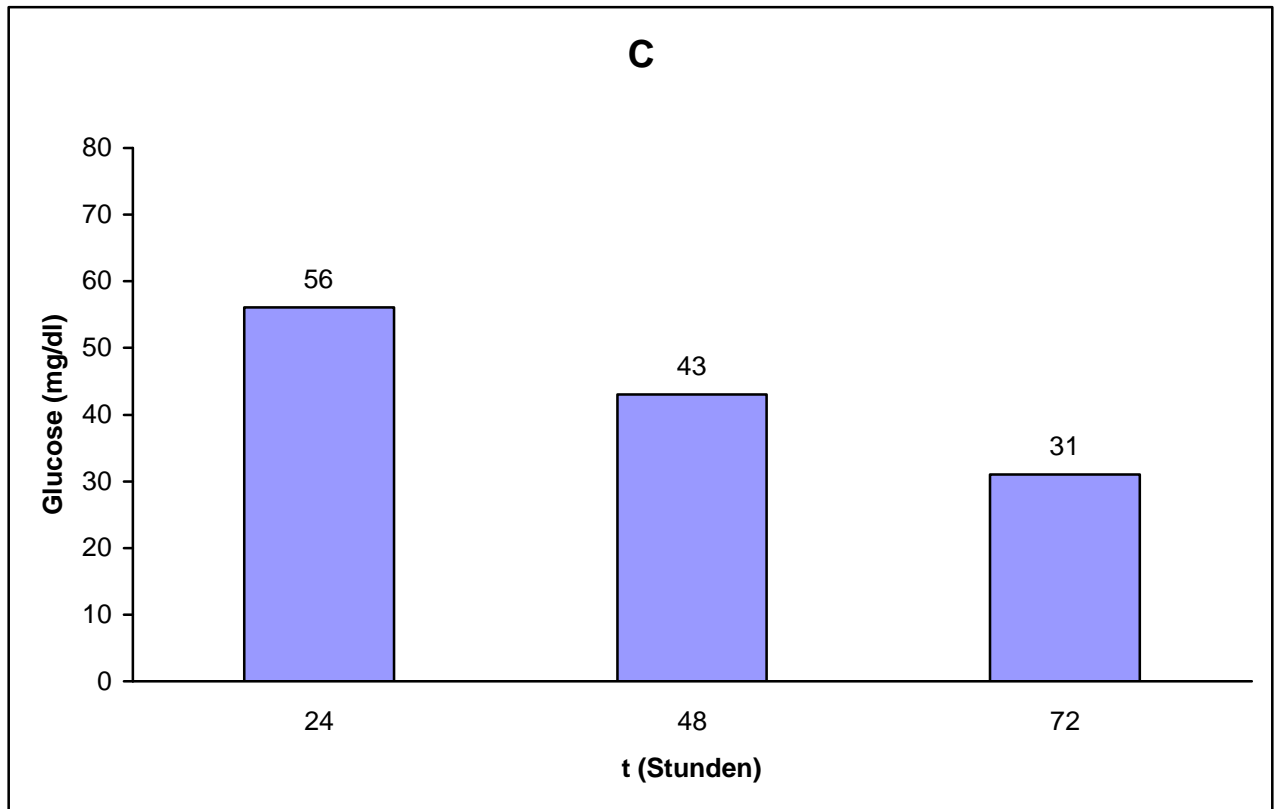


Abb. 34: Glucosekonzentration bei gleichzeitigem Zusatz von GABA als Hemmsubstanz der Cercarienaktivität

Es stellt sich ein signifikanter Konzentrationsabfall von Glucose im Untersuchungsmedium dar.

Während sich mit Zugabe von Glucose 0,005 mol/l zur Cercariensuspension ein geringer Abfall der Glucosekonzentration nach 48 Stunden (und gleichbleibend nach 72 Stunden) abzeichnet, wird dieser Effekt durch Hinzufügen von Antibiotika wieder vollständig aufgehoben. Der Zusatz von GABA, einem hemmenden Neurotransmitter sollte die Cercarienaktivität wirksam unterdrücken. In den eigenen Vorversuchen zur Überlebenszeit hatte sich diese Substanz als „toxisch“ erwiesen (4.1.3). Es lässt sich hier ein signifikanter Glucoseabfall über die Zeit darstellen, nach 72 Stunden waren 45% Glucose weniger vorhanden als nach 24 Stunden.

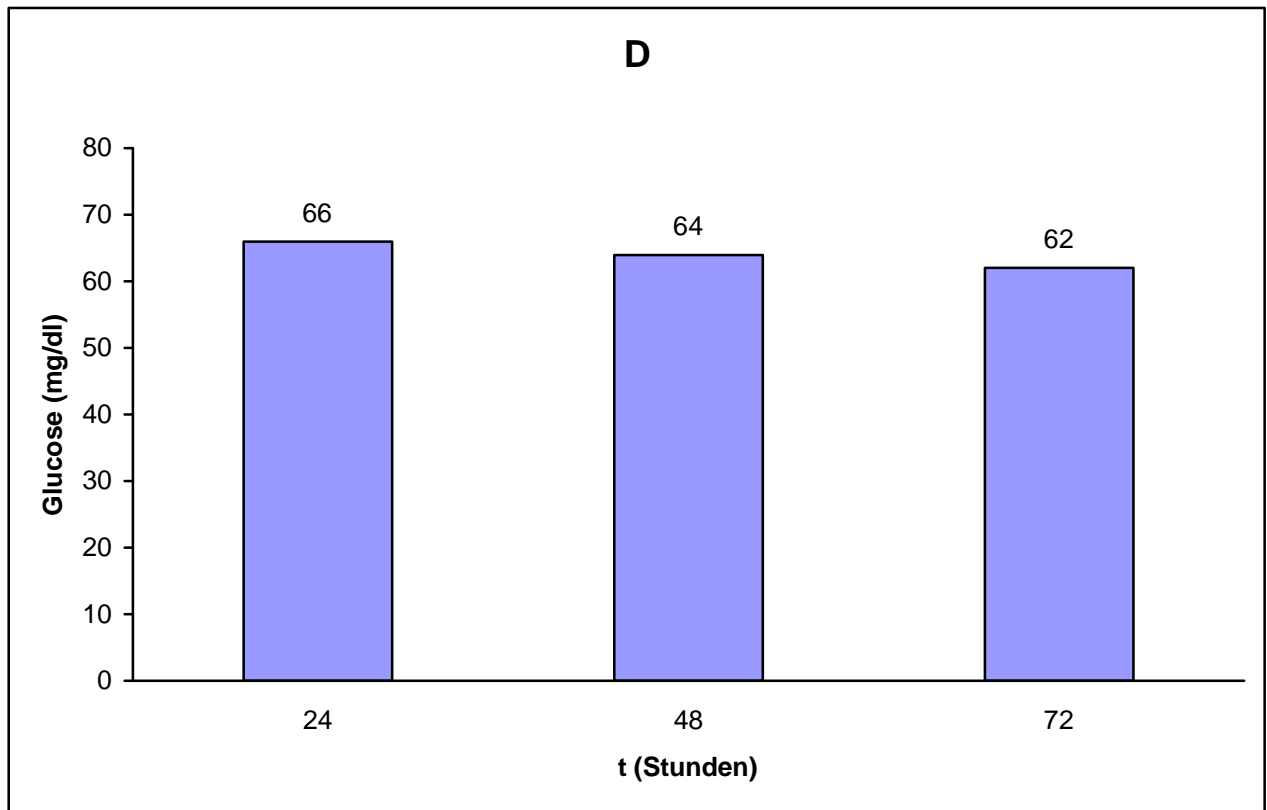


Abb. 35: Glucosekonzentration ohne Zugabe von Cercarien, in einem nicht bakteriengefilterten Referenzansatz

Es tritt keine signifikante Änderung des Glucosegehalts der Suspensionen auf.

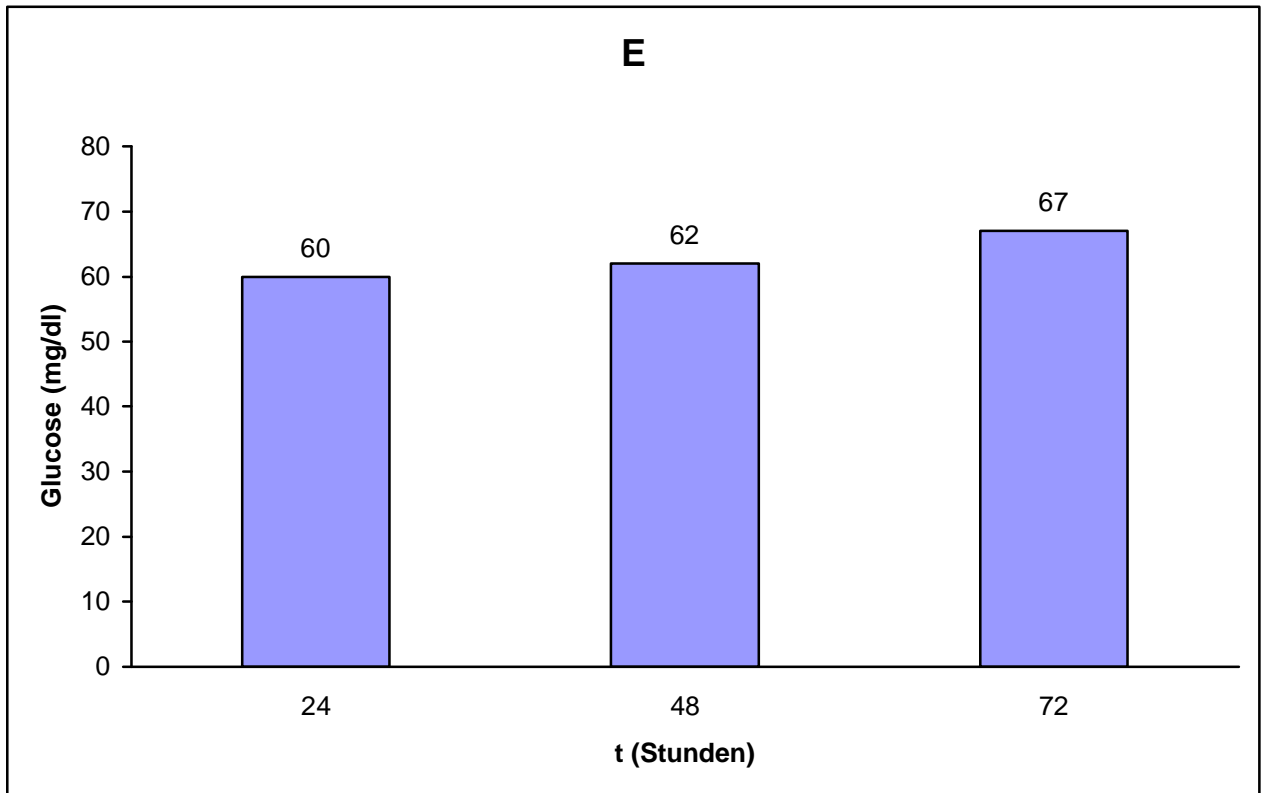


Abb. 36: Bakteriengefilterte Glucoselösung als Vergleichsansatz ohne Einfluß von eventuellen bakteriellen Verunreinigungen und ohne Cercarien

Ein geringer Anstieg der Glucosekonzentration um 10% nach 72 Stunden bleibt unter der Signifikanzschwelle.

Die Kontrollösungen ohne Cercarien dienten als sogenannter Nullwert zum Beweis dafür, daß der Glucosegehalt in den Versuchsansätzen stabil bleibt, solange keine Cercarien das Substrat verbrauchen. Es zeigten sich keine relevanten Konzentrationänderungen von Glucose in den Versuchen D und E während des Beobachtungszeitraums.

4.2.2 Alaninaufnahme

In bestimmten Konzentrationen hatte Alanin in obigen Vorversuchen zum Teil eindrucksvolle Effekte auf die Überlebenszeit der Cercarien bewirkt.

Unser Ansatz sollte auf ähnliche Weise wie bei Glucose durch Konzentrationsänderungen von Alanin im Untersuchungsansatz über 24-72 Stunden den indirekten Nachweis einer aktiven Substrataufnahme durch Cercarien von *Schistosoma mansoni* erbringen.

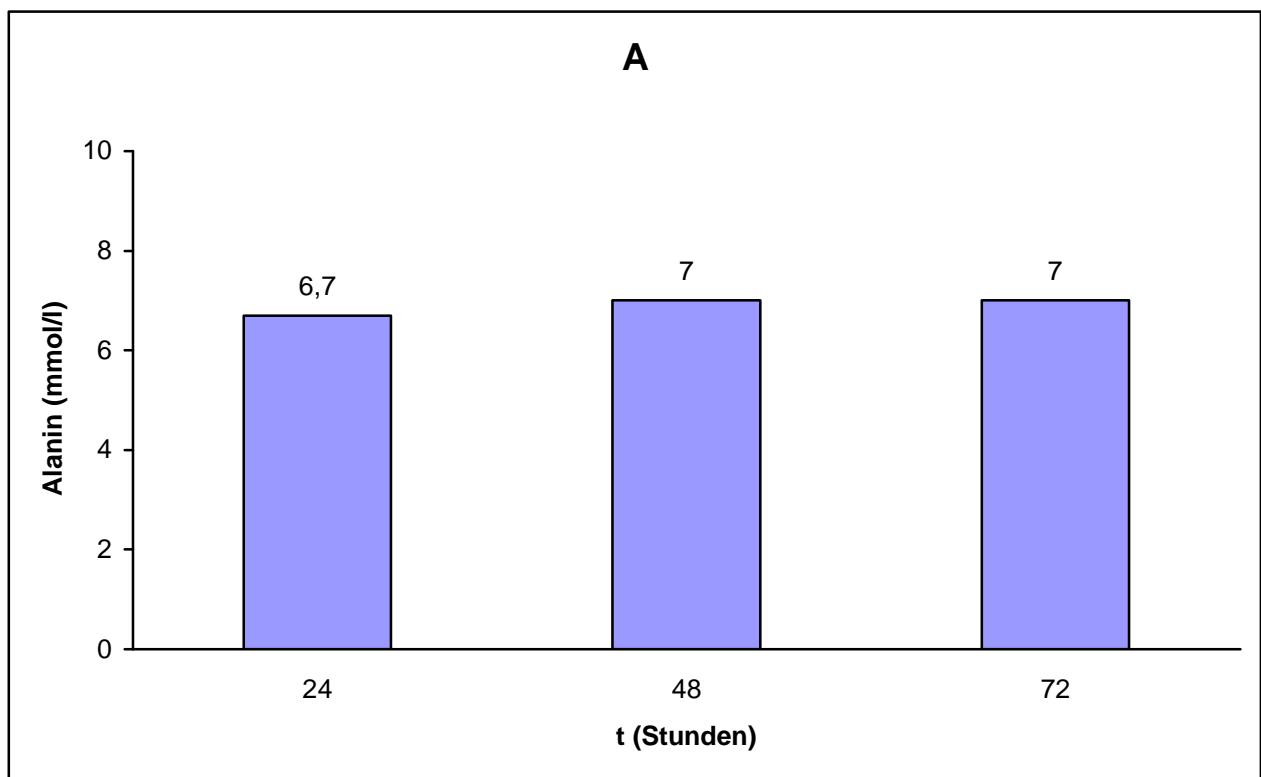


Abb. 37: Veränderung der Alaninkonzentration während 72 Stunden Versuchsdauer

Es zeigt sich keine relevante Konzentrationsänderung von Alanin während des Untersuchungszeitraums.

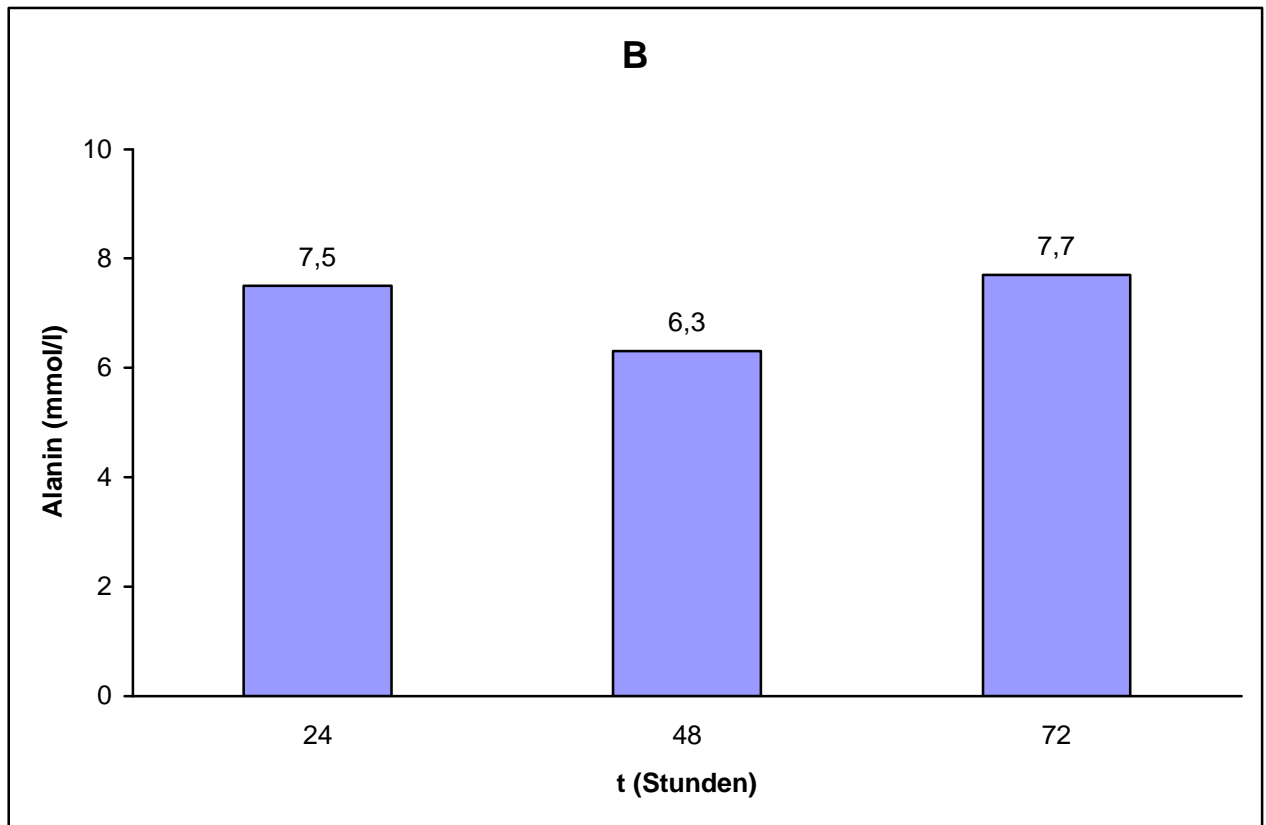


Abb. 38: Alaninkonzentration bei gleichzeitiger Zugabe bakterizider Substanzen (Penicillin, Streptomycin)

Die Säulenreihe läßt keine signifikante Konzentrationsänderung von Alanin erkennen.

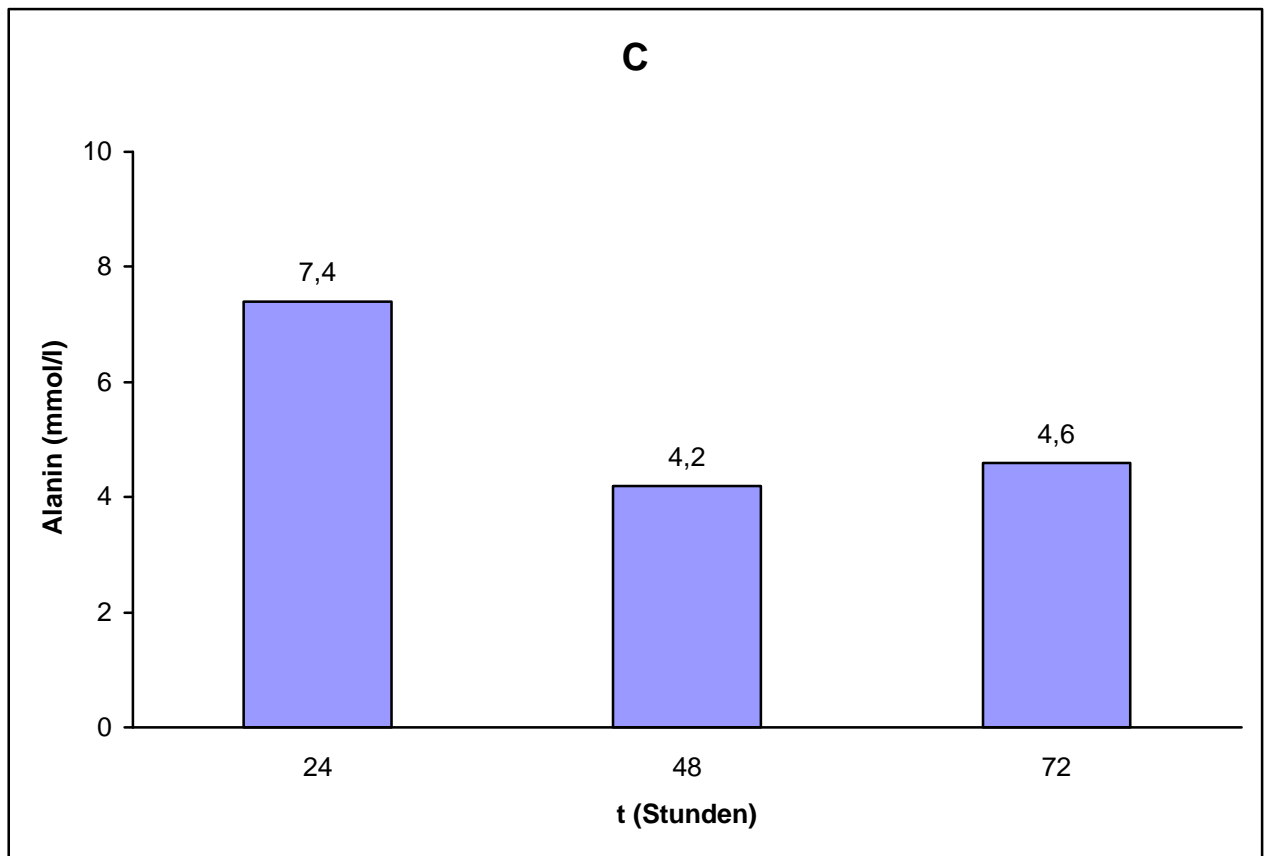


Abb. 39: Alaninkonzentration bei gleichzeitiger Zugabe von GABA als Hemmsubstanz der Cercarienaktivität

Während die 24-Stunden-Konzentration obigen Versuchsansätzen entspricht, zeigt sich nach 48 und 72 Stunden eine gleichbleibend und deutlich erniedrigte Alaninkonzentration.

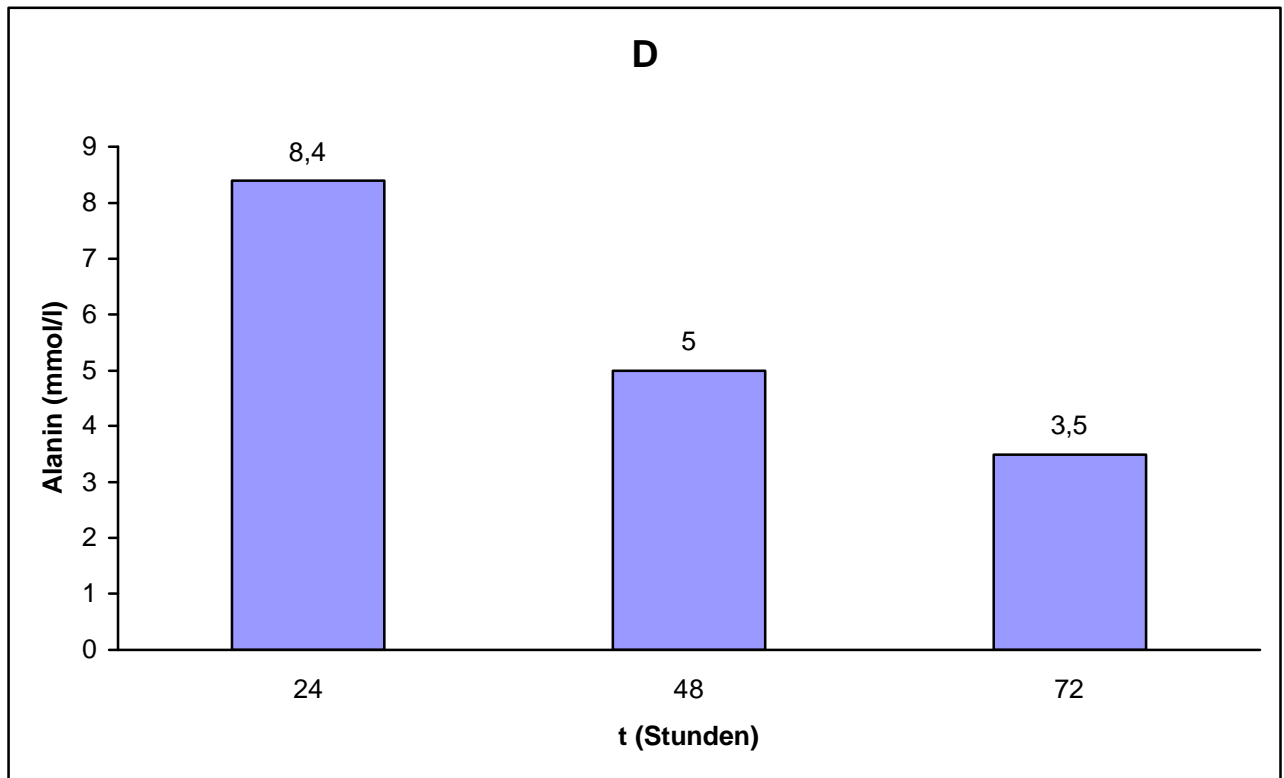


Abb. 40: Alaninkonzentration ohne Zugabe von Cercarien

Die Konzentration von Alanin nimmt um 40% nach 48 Stunden und um weitere 30% nach 72 Stunden ab.

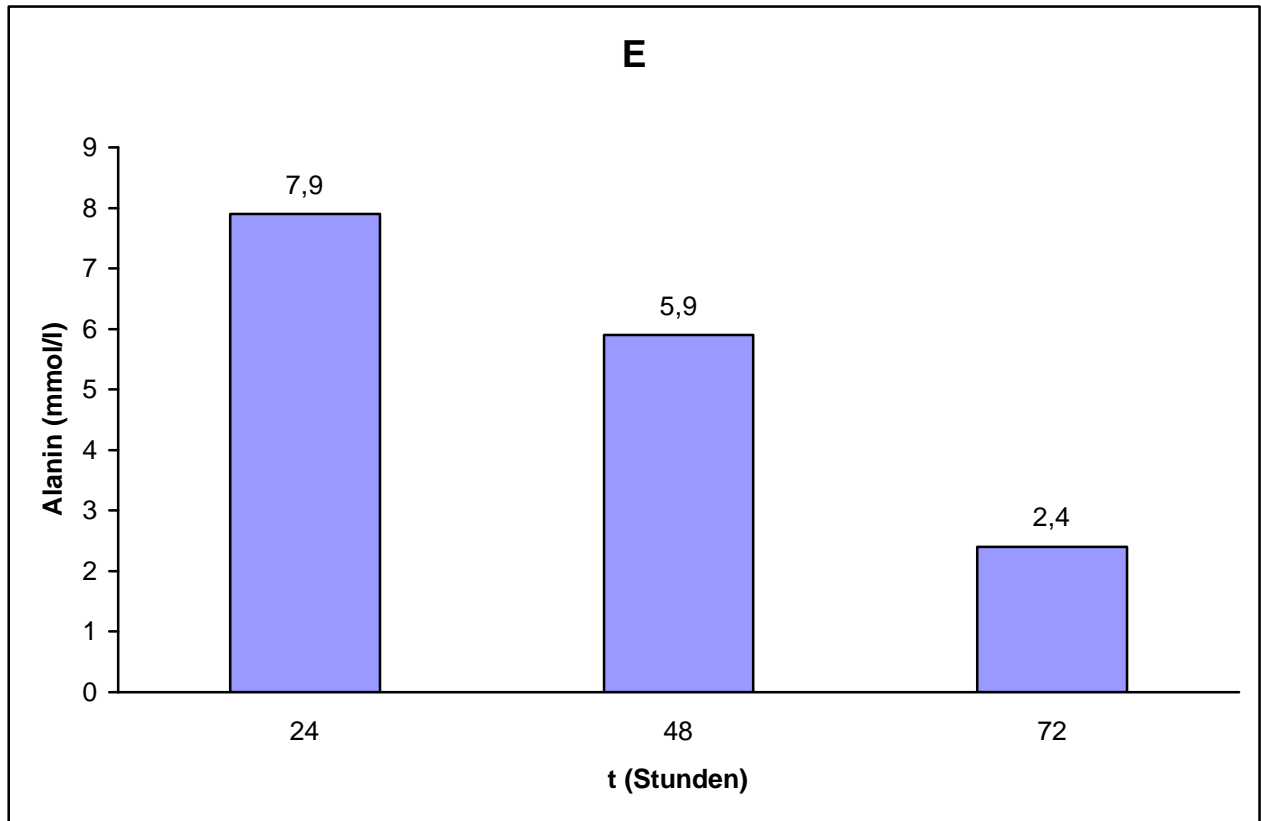


Abb. 41: Bakteriengefilterte Alaninlösung ohne Cercarien

Der Alaningehalt nimmt nach 48 Stunden um 25% und nach 72 Stunden um weitere 60% in den untersuchten Lösungen ab.

In beiden Kontrolllösungen zeigt sich also ein nahezu linearer Konzentrationsabfall über die Zeit unabhängig von einer zuvor durchgeführten Bakterienfilterung.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte in Ergänzung der Arbeit von Großwieser (28) die Dauer der Schwimmaktivität von Cercarien von *Schistosoma mansoni* in definierten Testmedien unter Zugabe von bestimmten Aminosäuren, Zuckern und einem hemmenden Neurotransmitter untersucht werden.

5.1 Diskussion der Methode in der Literaturübersicht.

Bereits frühzeitig fand Cheng (11) einen Zusammenhang zwischen Glycogenspeicher der Cercarien und Abbau desselben durch verlängerte Schwimmaktivität und steigende Außentemperatur (30 °C). Entscheidend für den Glycogengehalt der Cercarie war die Menge des Glycogenangebots im Schneckenverdauungstrakt und in der Schneckenlymphe. Entleerte Glycogenspeicher korrelierten mit dem Verlust der Schwimmaktivität (21).

Während Chernin (12) keine Verlängerung der Überlebenszeit von Cercarien unter Zugabe von Glucose und Trehalose zu einer BSS-Lösung fand, wiesen Bruce et al. (7) nach, daß in Abhängigkeit vom Verlust der eigenen Glycogenreserven nach ca. 18 Stunden in begrenztem Umfang exogene Substrate verbraucht werden können. Dies traf vor allem für Pyruvat, in geringerem Maße für α -Ketoglutarat, Acetat und für Glucose und sehr geringfügig für Glutamin und Glutamat zu.

Eine Aufnahme von Lipiden, Nukleinsäuren und Proteinen fand sich nicht.

In den Arbeiten von Conde del Pino et al. (14), Asch et al. (2) und Coles (13) wurden in Cercarien Enzyme der Glycolyse und des Citratzyklus, aber auch des Aminosäurenstoffwechsels (Aspartat-Amino-Transferase und Alanin-Amino-Transferase) gefunden. Bezüglich der Methioninaufnahme des Schistosomulums wies Chappell (10) auf ein sättigbares Transportsystem mit niedriger Spezifität für Aminosäuren sowie einfache Diffusion entsprechend dem Konzentrationsgradienten als wichtige Schritte im Substratstoffwechsel hin. Die zum Teil mittels aktiven Transports erfolgende Aminosäureaufnahme der Adulten beschrieb Isseroff (33) für Arginin.

Aus diesen Untersuchungen lassen sich auch für freilebende Cercarien ähnliche Stoffwechselwege vermuten.

Entscheidende Grundsätze des Cercarien-Stoffwechsels faßte Barrett (4) zusammen: Freischwimmende Cercarien verfügen über einen hauptsächlich aeroben Stoffwechsel, kurzfristige Anaerobie als „homolactic fermenter“ ist möglich. Hierbei wird Milchsäure als Gärungsprodukt im Organismus angehäuft. Wichtige Stoffwechselprinzipien sind ferner der „Crabtree Effect“, d.h. die Inhibierung der Sauerstoffaufnahme durch Hinzufügen exogener Glucose und der „Pasteur-Effekt“, welcher den vermehrten Glycogenverbrauch unter anaeroben Bedingungen beschreibt, der mit entsprechend erhöhter Lactatbildung einhergeht. Durch die Atmung, mit der Möglichkeit der Energiegewinnung durch Atmungskettenphosphorylierung, werden Gärungsprozesse gehemmt. Aminosäuren spielen seiner Meinung nach keine Rolle für den Cercarienstoffwechsel.

Neben den oben erwähnten Stoffwechselwegen existiert also auch eine säugetierähnliche Cytochrom-Atmungskette und β -Oxidation der Fettsäuren.

Der unterschiedliche Stoffwechsel von Infektionslarve und Wurm wird im wesentlichen durch das umgebende Milieu bedingt. Durch Penetration in den Endwirt kommt es zu einer radikalen Veränderung. Dieser Übergang vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel tritt exklusiv im Kopf der Larve (32) ein. Beginnend mit dem Anstieg der Lactat- und Abnahme der Pyruvat-Produktion wird die Larve zum Schistosomulum nach Abwerfen des Schwanzes, in welchem zuvor Glucose zu Kohlendioxid abgebaut worden war.

Van Oordt et al. (52) und Samuelson et al. (43) wiesen nach, daß die metabolischen Veränderungen durch die biologische Transformation bedingt sind.

Bezüglich der Aufnahme exogener Substrate durch Infektionslarven eines Trematoden fand Uglem (51) beispielhaft für *Proterometra macrostoma*, einer fisch-pathogenen, in Nordamerika vorkommenden Cercarienart („Longear Sunfish“), die erleichterte Glucosediffusion von der externen Natriumkonzentration im umgebenden Medium abhängig.

5.2 Auswahl der Agenzien

In Ergänzung der oben erwähnten Arbeiten, sowie insbesondere den Versuchen von Großwieser (28) sollten aufgrund der nahen Verbindung des Aminosäurenstoffwechsels zum Citratzyklus (s. Abb. 40) die Fähigkeit der Cercarien zur Aufnahme dieser Substrate untersucht werden. Hierbei wurde postuliert, daß eine relevante Aufnahme dieser Stoffe eine Verlängerung der Schwimmaktivität bewirken würde. Zur Untersuchung kamen die glucoplastischen Aminosäuren Alanin, Glycin, Cystein und Serin mit Abbauverwertung des Kohlenstoffgerüsts zu Pyruvat, die ketogene Aminosäure Leucin mit Abbau zu Acetyl-CoA, die glucoplastischen Aminosäuren Histidin, Arginin, Prolin und Glutamat mit Abbau zu α -Ketoglutarat, die glucoplastischen Aminosäuren Valin und Methionin mit Abbau zu Succinyl-CoA, sowie die glucoplastische Aminosäure Aspartat mit Abbau zu Oxalacetat.

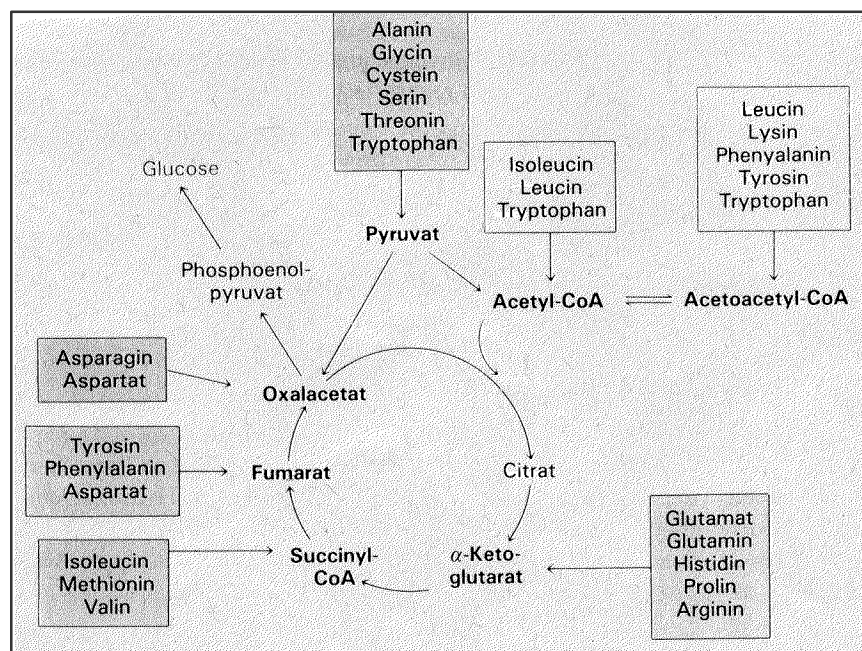


Abb. 42: Die Verwertung der Kohlenstoffgerüste der Aminosäuren. Glucogene Aminosäuren sind dunkel, ketogene hell unterlegt [aus Stryer (50)]

Von diesen Aminosäuren hielt Caulfield (9) Serin und Glutamat für wesentliche Bestandteile der Cercarienglycolyse. Arginin dient nach Haas et al. (31) als wichtigstes chemisches Signal für die Cercarie zur Wirtsfindung.

Beantwortet werden sollte die bisher ungelöste Frage, ob Aminosäuren-Aufnahme möglich und ob ein Zusammenhang zwischen beobachteter Reaktion der Cercarien und des Abbaus der Aminosäuren im Citratzyklus besteht (s.o.).

Einen hemmenden Neurotransmitter stellt GABA (Gammaaminobuttersäure, ein Decarboxylierungsprodukt von Glutamat) dar. Es sollte ein möglicher inhibitorischer Effekt auf das nervale System der Cercarie gezeigt werden. Bisher zeigten Ercoli et al. (22) lediglich für die Neurotransmitter Histamin und Serotonin einen positiven Einfluß auf die Cercarienbeweglichkeit, hemmend wirkte diesbezüglich Acetylcholin.

Neben den Aminosäuren sollte die Aufnahme von Zuckern aus dem Umgebungsmedium der Cercarien untersucht werden. In Ergänzung der Arbeiten von Bruce et al. (7) wurde von mir Glucose und ihr Oxidationsprodukt Gluconsäure verwendet. Caulfield et al. (9) fanden Fructose, Galactosamin, Galactose, Glucosamin und Mannose als Hauptbestandteile der Cercarienglycolyx. Neben einem Aminozucker (Glucosamin) und einer Hexose (Mannose) verwendete ich ein nicht-reduzierendes Disaccharid (Trehalose) (46, 12), welches in niederen Lebewesen und in Insekten (als „Blutzucker“) vorkommt. Schließlich wurden zwei Pentosen, Fructose und Arabinose hinsichtlich ihrer Verwertbarkeit durch die Cercarien von *Schistosoma mansoni* untersucht.

5.3 Diskussion der Ergebnisse zur maximalen Überlebenszeit

5.3.1 Eigene Untersuchungen

Es folgen nun im Einzelnen die Ergebnisse meiner Versuchsreihen mit den oben erwähnten Substraten.

Als Vergleichslösungen dienten mir DTW (dechlorated tape water) ohne Zusatz einer Testsubstanz und die 0,03 molare DTW-Alaninlösung. Alle untersuchten Lösungen basieren auf DTW als Grundlösung.

Die untersuchten Konzentrationen der Aminosäuren betragen 0,03 und 0,015 mol/l bei neutralen, sowie 0,01 und 0,005 mol/l bei sauren und basischen Aminosäuren. Bei

letzteren war jeweils eine Konzentrationsminderung um den Faktor 3 notwendig, um den Zusatz von neutralisierenden Ionen (HCl, NaOH) so gering wie möglich zu halten. Insgesamt sollten die unterschiedlich konzentrierten Versuchslösungen (jeweils Faktor 2) Hinweise auf wirkstoffabhängige Einflüsse auf das Schwimmverhalten der Cercarien geben.

Ebenso wurde bei den pH- neutralen Zuckern, hier durch Verwendung von drei Konzentrationen (0,03, 0,01 und 0,005 mol/l), versucht Hinweise für dosisabhängige Effekte zu erbringen.

Bei Aminosäuren wie Zuckern lagen die verwendeten Konzentrationen im zuvor ermittelten optimalen Bereich (s. Abb.12, (45)) hinsichtlich Osmolarität und erwarteter Wirkung.

Zwei Kriterien möchte ich im folgenden zur Beschreibung der Ergebnisse verwenden: zum einen den **28-Stunden-Wert** (Anzahl der überlebenden Cercarien in % zur Gesamtzahl der eingesetzten Individuen nach 28 Stunden), zum anderen die **maximale Überlebenszeit**.

Der **28-Stunden-Wert** bezog sich in meinen Untersuchungen auf die maximale Überlebenszeit von Cercarien in DTW-Lösung (3 von 200 Cercarien) und ermöglichte eine Analyse unterschiedlicher Lösungen vor der darauffolgenden 16-stündigen Zählpause. Da in diesem Zeitraum naturgemäß viele Cercarien absterben ginge also wertvolle Information verloren, würde man nur das 2. Kriterium, die **maximale Überlebenszeit**, berücksichtigen (s. Abb.7 unter Material und Methodik).

Letzteres beschreibt die Schwimmfähigkeit von weniger als 5% der eingesetzten Cercarien, hat sich aber dennoch als entscheidender Parameter erwiesen, mit dem die eingesetzten Substrate in ihrer Wirkung auf das Cercarienüberleben unterscheidbar werden.

Andere Autoren benutzten häufig die „**mittlere Cercarienüberlebenszeit**“, also den Zeitpunkt, zu dem noch 50% der eingesetzten Cercarien leben. In meinen Untersuchungen würde dieses Kriterium die Unterschiede zwischen den Lösungen nivellieren, da nach 4 Stunden Untersuchungszeit in nahezu allen Versuchsansätzen ca. 50% der Cercarien abgestorben waren.

Die Basislösung (DTW-Standardlösung) hat einen **28-Stunden-Wert** von 1,5%, die Alanin 0,03 molare Lösung von 20%, die **maximale Überlebenszeit** beträgt 28 Stunden vs. 92 Stunden.

Im Bereich von 0,01 bis 0,1 mol/l waren die Unterschiede zwischen den Alanin-Lösungen nicht signifikant, es lagen aber alle Ansätze deutlich über den DTW-Basiswerten. Lediglich die Lösungen mit 0,005 mol/l und 0,15 mol/l näherten sich der Basislösung an, in ersterem Untersuchungsansatz besteht wohl eine zu hohe Verdünnung, während in letzterem von einer beginnenden Toxizität, wohl aufgrund der hohen Osmolarität, auszugehen ist.

Die basischen Aminosäuren Arginin und Histidin zeigten lediglich in der 0,01 molaren Argininlösung eine geringe Tendenz zur Verlängerung der Überlebenszeit. Aspartat als saure Aminosäure war eher toxisch; Glutamat (0,01) wies hingegen einen **28-Stunden-Wert** von 11% auf, in der 0,005 molaren Lösung war es ohne Effekt auf die **maximale Überlebenszeit**.

Von den neutralen Aminosäuren Prolin, Methionin, Leucin, Valin, Serin, Glycin und Cystein, erwies sich Cystein als eindeutig toxisch. Methionin war DTW vergleichbar, Glycin (0,015 mol/l) war nur tendentiell der Basislösung überlegen.

Prolin 0,03 mol/l (10%, 44 h), Leucin 0,03 mol/l (11%, 44 h), Valin 0,03 mol/l (17%, 44 h) und Serin 0,015 mol/l (13%, 44 h) hatten einen nur etwas geringeren Effekt als die vergleichbaren Alanin-Lösungen, verlängerten also die Überlebenszeit deutlich (in Klammern jeweils der prozentuale **28-Stunden-Wert** und die **maximale Überlebenszeit**).

Diese Versuche legen nahe, daß die Cercarien mittels Alanin-Aminotransferase Pyruvat als ihren Hauptenergielieferanten aus Alanin aufbauen können und ein Pyruvat vergleichbarer, konzentrationsabhängiger Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Larven eintritt (8, 28).

Die restlichen Aminosäuren lassen sich in insgesamt drei Gruppen einteilen:

1. „Toxisch wirkende“:Aspartat und Cystein
2. „Neutral wirkende“:Arginin, Histidin, Glycin, Methionin
3. „Positiv wirkende“:Alanin, Prolin, Leucin, Valin, Serin und (mit Einschränkung) Glutamat

Daraus läßt sich folgern, daß vor allem neutrale Aminosäuren an verschiedenen Schlüsselstellen in den Citratzyklus eingeschleust werden können (s. Abb. 40), so daß nach Aufnahme dieser Substanzen eine spürbare Verlängerung der Schwimmaktivität der Cercarien zu erkennen ist.

Die Gammaaminobuttersäure (GABA) erwies sich für die Cercarien als extrem toxisch, nur 1% der Cercarien überlebte 24 Stunden.

Erklärbar ist dies durch die Funktion als hemmender Neurotransmitter, welcher entweder gabaerge Rezeptoren im Nervensystem der Cercarie blockiert und so die Schwimmaktivität deutlich verkürzt, oder auf Grund der Stellung im Citratzyklus einen erhöhten endogenen Energieverbrauch bewirkt.

In einem weiteren Teil unserer Untersuchungen wurden, basierend auf den Arbeiten von Bruce et al. (8) und Uglem (51), welche die Aufnahme von Glucose aus einem Nährmedium bei mehr als 18 Stunden alten Cercarien nachweisen konnten, verschiedene Zucker untersucht.

Lediglich Glucose 0,03 mol/l verlängerte die maximale Überlebenszeit auf bis zu 76 Stunden und der 28-Stunden-Wert betrug 23%; dieser Effekt war deutlich konzentrationsunabhängig. Fructose, Arabinose und Glucosamin waren dosiskorrelativ toxisch, Mannose und Trehalose der Basislösung vergleichbar und nur die Gluconsäure 0,005 mol/l dieser tendentiell etwas überlegen. Aminozucker und Pentosen wirken also, wenigstens in den eingesetzten Substanzen, toxisch, andere Mono- und Disaccharide neutral.

Bei Glucose bestätigten sich die oben erwähnten Voruntersuchungen, beim Oxidationsprodukt Gluconsäure blieb noch eine Tendenz zur Verbesserung der Überlebenszeit – in den höheren Konzentrationen dürfte hier der niedrigere pH-Wert einen negativen Effekt gezeigt haben.

5.3.2 Gemeinsame Charakteristika der Versuchsreihen

In allen Versuchen zeigt sich als wesentliches gemeinsames Merkmal ein ca. 50% Absterben bzw. die Immobilisierung jeder zweiten Cercarie in den ersten 2 Stunden nach Einsetzen in die Lösung. Dies ist ein Effekt, der unabhängig von der verwendeten Lösung zu beobachten ist und wohl durch den Milieuwechsel bzw. durch Traumatisierung der Cercarien beim Pipettiervorgang bedingt ist.

Ab der 4. Versuchsstunde läßt sich in der Mehrheit aller Versuche ein weitgehend linearer Abfall der Cercarienzahl erkennen, die Steilheit der Absterbekurve variiert jedoch in charakteristischer Weise zwischen verfrühtem Abfallen gegen Nullwert ("toxisch" z.B. bei Cystein) und späterem Erreichen des Nullwertes ("lebenszeitverlängernd" z.B. bei Glucose).

Bei gleicher Versuchslösung ist dennoch die Standardabweichung so erheblich (s. DTW, Alanin), daß eine statistische Auswertbarkeit nicht gegeben ist. Aus diesem Grund läßt sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Testlösungen in der Regel erst ab 6 bis 30fachen Konzentrationsunterschied darstellen.

In den meisten Testansätzen konnten 5-10% der Cercarien bis 28 h überleben.

Daneben ist in einigen Lösungen das freie Schwimmen der Cercarien bereits in der 3. Zählung (nach 20 h) nicht mehr nachweisbar (z.B. GABA, Fructose, Mannose).

In Alanin und Glucose läßt sich das Phänomen des Langzeitüberlebens am eindrucksvollsten erkennen: einige wenige Tiere bleiben ca. 3 x so lange schwimmfähig wie in den Vergleichslösungen und dieser Effekt macht sich erst nach 20 Stunden bemerkbar und wird dann nach 44 Stunden deutlich. Auch bestimmte neutrale Aminosäuren zeigen ein ähnliches Verhalten (Valin, Serin, Leucin, Prolin).

5.3.3 Fehlermöglichkeiten

In allen Versuchsansätzen achteten wir auf die größtmögliche Übereinstimmung der Testbedingungen, dennoch waren unter den gegebenen Verhältnissen verschiedene Fehlermöglichkeiten unvermeidbar.

Je Testreihe wurden standardisierte Parasiten und Schnecken (Stamm Hoechst) und gleichaltrige SWISS-Mäuse eingesetzt. Lichtstärke im Untersuchungsraum, Zeitraster des Hell-Dunkel-Wechsels (12 Stunden) und Lufttemperatur waren jeweils konstant.

Die verwendeten Cercarien entstammten jeweils der selben Schneckencharge.

Fehlerquellen:

- Das Pipettieren von lebenden Cercarien mit einer 50 µl Eppendorf-Pipette beinhaltet trotz Stereomikroskops die Gefahr einer Verletzung der Cercarie und/oder das versehentliche Aufnehmen einer nicht aktiven/toten Cercarie. Insgesamt ist also von einem Pipettierfehler von ca. +/- 5% = +/- 1 Cercarie pro Küvette auszugehen.
- Die Temperatur der Untersuchungslösungen und des Schlüpfmediums der Cercarien waren identisch, erhebliche Unterschiede bestanden in der Zusammensetzung der Lösungen. Die gemessenen Unterschiede in den Überlebenszeiten können neben den gewünschten Effekten der jeweiligen Prüfsubstanzen auch auf Einflüsse seitens des pH der Lösungen, der Verwendung von Puffersubstanzen und osmotischer Faktoren beruhen. Insbesondere die in fast allen Lösungen bis zu 50% Nichtaktivierbarkeit dürfte also zu einem wesentlichen Teil auf den Milieuwechsel (Aqua dest. / Prüfsubstanz) zurückzuführen sein.
- Zählfehler nach Dunkelreiz könnten ihre Ursache in minimalen Bewegungen noch lebender Parasiten haben, zudem fördert die induzierte Schwimmaktivität der Cercarien den Abbau ihrer endogenen Energiereserven, somit nimmt unsere Versuchsanordnung mit der Dauer der Untersuchung zunehmend Einfluß auf das Ergebnis.
- Die Gleichsetzung von lebend = aktivierbar erwies sich als praktikabel, dennoch besteht eine Fehlermöglichkeit in einer vorübergehenden Inaktivierbarkeit der Cercarien, was angesichts der geringen Zahl von Cercarien pro Küvette,

insbesondere zu den Zählzeiten 4 Stunden, 28 Stunden, 52 Stunden, 76 Stunden problematisch war, da auf diese Untersuchungszeitpunkte jeweils eine 16-stündige Zählpause folgte.

- Die lockere Abdeckung der Küvetten mittels Glasplättchen zur Vermeidung von Verdunstung, ohne gleichzeitige Erzeugung anaerober Milieuverhältnisse (37), ließ innerhalb der ersten 28 Versuchsstunden keine wesentliche Volumenänderung (Konzentrationszunahme innerhalb der verwendeten Lösungen) zu. In den darauffolgenden Zeiträumen war ein Volumenverlust von ca. 10% in jeweils 24 Stunden trotz korrekt plaziertem Glasdeckelchen unvermeidlich.
- Zählfehler bei der Beobachtung mittels 6 x vergrößernder Lupenbrille aufgrund der geringen Größe / regen Schwimmaktivität der untersuchten Cercarien waren in ihrem Umfang allenfalls in den ersten 4 Beobachtungsstunden bedeutsam. Durch optimierte Untersuchungstechnik mit idealen Beleuchtungs- / Kontrastverhältnissen war hier ein Fehler von weniger als 5% realistisch. Zu späteren Untersuchungszeitpunkten war die Zahl der aktivierten und schwimmfähigen Cercarien überschaubar und die Bewegungen der Cercarien waren, wohl aufgrund nachlassender Energiereserven, geringer ausgeprägt.

5.4 Diskussion der Versuche zum Nachweis der Substrataufnahme

5.4.1 Glucoseaufnahme

Analog zu den Vorversuchen aus dem eigenen Laboratorium (Großwieser (28)), wollten wir den Nachweis einer tatsächlichen Glucoseaufnahme aus dem Umgebungsmedium führen.

Glucose 0,03 mol/l hatte sich in unseren Untersuchungen als wirksames Substrat bezüglich einer Verlängerung der Schwimmmaktivität der Cercarien von *S. mansoni* erwiesen. Zum Einsatz kam Glucose in niedrigerer Konzentration (ca. 0,04 mol/l), da sich bereits in den Arbeiten von Bruce et al. und Uglem (7, 51) Hinweise für eine exogene Substrataufnahme der Cercarien fanden.

Zwar zeigte sich ein 16 % -iger Abfall der Glucosekonzentration im Untersuchungsmedium zwischen 24 und 48 Stunden Beobachtungszeit, bei gleichzeitiger Zugabe von Penicillin und Streptomycin zur Hemmung einer akzidentiellen bakteriellen Kontamination, verschwand dieser Effekt jedoch. Da in den Parallelversuchen ohne Cercarien (D, E) die Glucosekonzentration stabil blieb, ergeben sich somit zwei Erklärungsmöglichkeiten:

1. Der Abfall der Glucosekonzentration ist durch aktive Stoffwechselmechanismen der Cercarien bedingt, wofür insbesondere das Fehlen eines weiteren Glucoseverbrauchs nach 72 Stunden spricht. Dies ist erwartungsgemäß, da zu diesem Zeitpunkt, entsprechend den eigenen Vorversuchen zur Überlebenszeit, nur noch sehr wenige aktive Cercarien vorhanden sind. Die Zugabe von Antibiotika hemmt diesen Prozess der Glucoseaufnahme von Cercarien auf unbekannte Weise.

2. Der Abfall der Glucosekonzentration ist durch bakterielle Kontamination der Suspensionen bedingt. Eine gewisse bakterielle Verunreinigung der Untersuchungsmedien ist aufgrund der Herkunft der Cercarien (Schlüpfvorgang im Schneckenwasser) sehr wahrscheinlich. Eine cercarientoxische Wirkung obiger Antibiotika in der angewandten Konzentration ist bisher nicht nachgewiesen

Auffallend ist der Glucosegehalt der Suspension C, welche mit GABA als hemmendem Neurotransmitter versetzt ist. In den eigenen Vorversuchen (s.o.) wurde GABA (in DTW) als potenter Hemmer der Cercarienaktivität identifiziert. Statt des erwarteten geringeren Glucoseverbrauchs der Cercarien zeigt sich im Vergleich mit den anderen Versuchsansätzen bereits nach 24 Stunden eine um 12,5% verringerte Glucosekonzentration. Nach 48 und 72 Stunden ist ein weiterer Glucoseabfall um 23% und schließlich 28% zu erkennen, was einem nahezu linearen Verlauf des gemessenen Glucosegehalts entspricht.

Offensichtlich führt die Zugabe von GABA zu einer erhöhten Stoffwechselaktivität der Cercarien in einer Glucoselösung mit entsprechend gesteigertem Substratverbrauch. Ein Erklärungsmodell könnte im Synergismus von Glucose und GABA im Citratzyklus bestehen. Hierbei liefert Glucose via Pyruvat Oxalacetat und Acetyl-CoA, GABA via Succin-semialdehyd das Substrat Succinat (s. Abbildung 41). Letzteres wird als „Amino-Buttersäure-Weg“ bezeichnet, hierbei wird die oxidative Decarboxylierung zugunsten der Bildung stickstoffhaltiger Zwischenprodukte umgangen.

Der Nachweis dieses Stoffwechselweges bei Cercarien ist allerdings noch nicht geführt. Eindeutige Klarheit könnten hier nur weitere Versuche mit Kombinationen verschiedener Substrate des Citratzyklus erbringen, bis dahin bleibt lediglich festzustellen, daß Glucose in niedriger Konzentration die „toxischen“ Effekte von GABA auf die Stoffwechselaktivität vollständig antagonisiert, ob es sich hierbei um eine neuronale Hemmung im eigentlichen Sinn, oder um eine Inhibition des Energiemetabolismus der Cercarie handelt, muß offen bleiben.

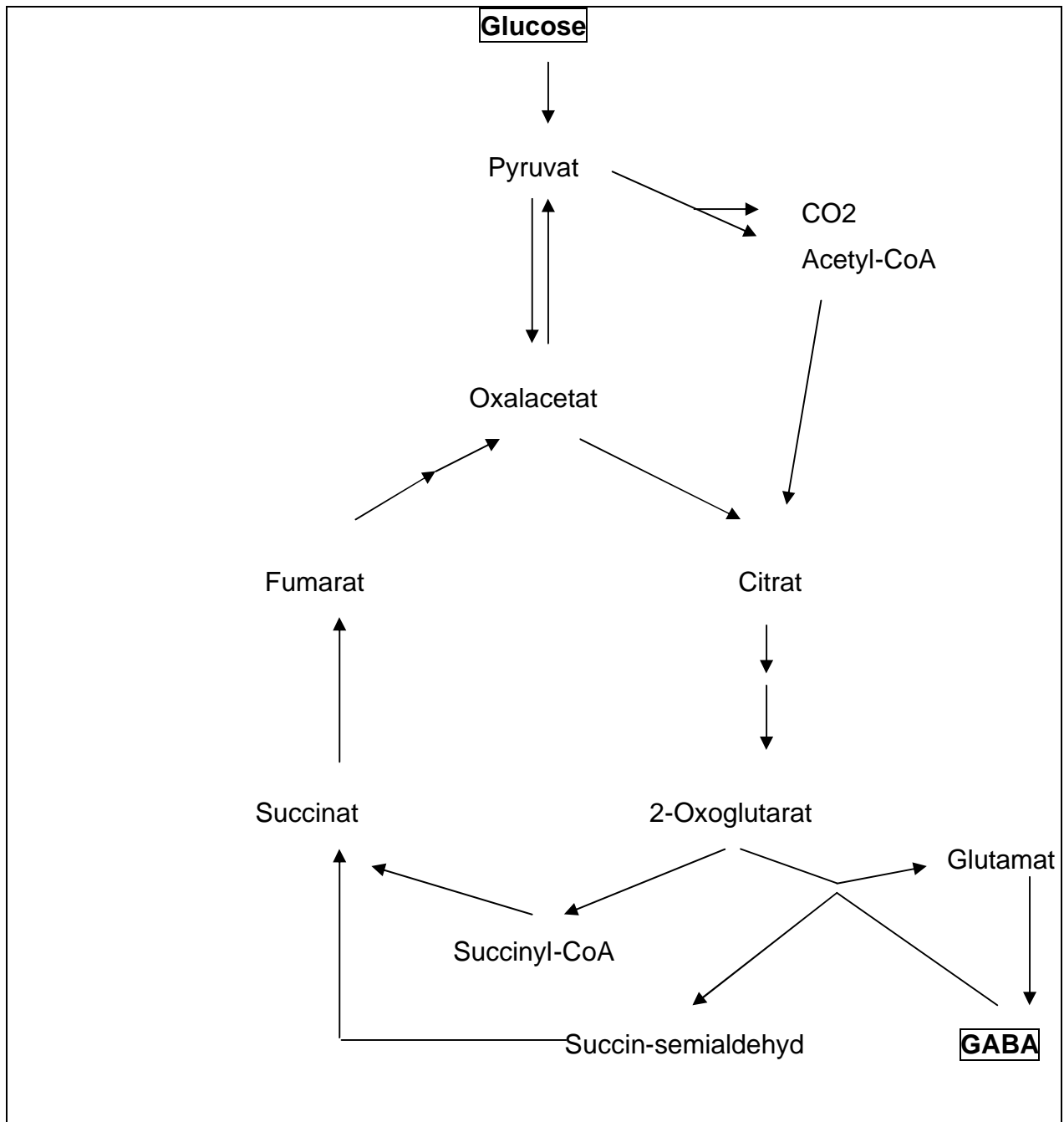


Abb.43: Schema des Citratzyklus (hier mit Aminobuttersäureweg)

5.4.2 Alaninaufnahme

Alanin entsteht durch Transaminierung von Pyruvat

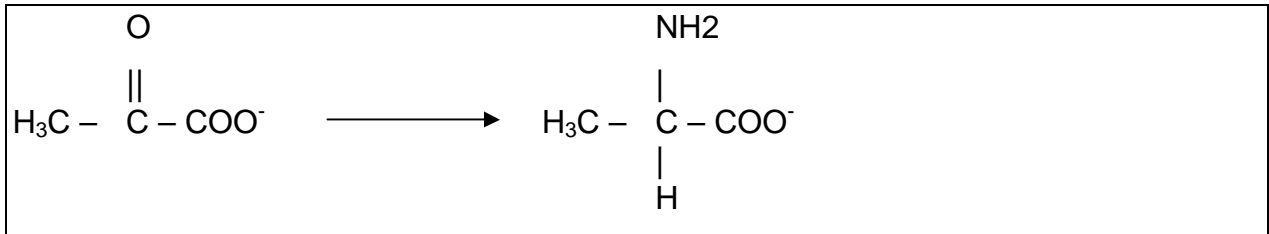


Abb. 44: Transaminierung von Pyruvat

Entsprechend der Versuche von Großwieser mit Pyruvat hatte sich bei mir Alanin als wirksamstes Substrat zur Verlängerung der Schwimmaktivität von Cercarien erwiesen. Entgegen dem erwarteten meßbaren Alaninverbrauch ließ sich in den durchgeführten Versuchen zur Ermittlung des tatsächlichen Alaninverbrauchs / Alaninaufnahme der Cercarien mit und ohne Antibiotika keine relevante Konzentrationsänderung finden. Die Hypothese der Versuchsanordnung C war, daß die gleichzeitige Hemmung / Aktivierung der Cercarien durch Zugabe von GABA den Alaninverbrauch deutlich reduzieren sollte. Es tritt hingegen wie schon bei Glucose ein signifikanter Alanin-Konzentrationsabfall auf (43% nach 48 Stunden).

Erklärung hierfür könnte die bereits oben dargestellte mutmaßlich synergistische Wirkung von GABA und Alanin auf die Stoffwechselaktivität der Cercarien sein.

Auch die Kontrollansätze ohne Cercarien bakteriengefiltert oder nativ zeigten ähnliche Konzentrationsverläufe von Alanin über die Zeit entsprechend einem deutlichen Abfall des Alaningehalts. Dieser nahezu lineare Konzentrationsgradient ist am ehesten durch eine akzidentielle bakterielle Verunreinigung oder durch eine zufällige Reaktion mit dem Meß-Reagens zu erklären.

Die uneinheitlichen Ergebnisse der Alaninbestimmung sind wohl auf die (notwendigerweise) geringe Alaninkonzentration von ca. 4 nmol/l zurückzuführen. In den eigenen Versuchen war Alanin in derartig niedriger Konzentration nicht signifikant von "reiner" DTW-Lösung in der Schwimmaktivität der Cercarien unterscheidbar. Daraus läßt sich ableiten, daß wahrscheinlich zuwenig Cercarien nach 48 oder 72 Stunden aktiv waren, um einen relevanten Alaninverbrauch darzustellen. Eine Erhöhung der Alaninkonzentration um den Faktor 10 entsprechend der „wirksamen“

Konzentration in den Untersuchungen zur Überlebenszeit (siehe 4.1.2) würde jedoch die Meßgenauigkeit der Ionen-Austauscher-Chromatographie hinsichtlich des nachzuweisenden Alanin-Verbrauchs übersteigen und könnte nur durch eine deutliche Erhöhung der Cercarienzahl (auf ca. 2000 Individuen pro Küvette) kompensiert werden (s. Großwieser (28)).

Somit ist (mindestens für die Bestimmung des Alaninverbrauchs) die eingesetzte Meßmethode kritisch zu betrachten.

6. Zusammenfassung

Cercarien sind von Süßwasserschnecken als Zwischenwirte in das Wasser ausgeschiedene freischwimmende Larven (0,4-0,6mm) parasitischer Saugwürmer (Trematoden). Die größte Bedeutung besitzen unter den Trematoden als Erreger von Tropenkrankheiten die Schistosomen (Pärchenegel), Erreger menschlicher Schistosomiasis (Bilharziose). Ihre Cercarien dringen durch die Haut und entwickeln sich in venösen Blutgefäßen des Menschen zu den geschlechtsreifen Würmern.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den Cercarien von Schistosoma mansoni, der verbreitetsten Art. Herrschende Auffassung war bisher, dass Cercarien von *S. mansoni* nicht in der Lage sind, exogene Substrate zu verstoffwechseln.

In dieser Arbeit wurde die Dauer der Schwimmtätigkeit und damit die Fähigkeit der Cercarien von *Schistosoma mansoni* zur Aufnahme und Verwertung von 12 Aminosäuren (**Alanin**, Arginin, Histidin, Aspartat, Prolin, Methionin, Leucin, Valin, Serin, Glutamat, Glycin und Cystein), einem Neurotransmitter (GABA) und von 7 Zuckern (**Glucose**, Fructose, Trehalose, Glucosamin, Mannose, Arabinose und Gluconsäure) untersucht.

Dazu wurden die maximalen Überlebenszeiten und die prozentuale Anzahl der überlebenden Cercarien nach 28 Stunden (28-Stunden-Wert) in verschiedenen Substratlösungen bestimmt. Als Grundlösung diente jeweils dechloriertes Leitungswasser (DTW).

Von den untersuchten Aminosäuren wies vor allem **Alanin** in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,01 und 0,1 mol/l mit einem Optimum bei 0,03 mol/l eine deutliche Steigerung der Cercarienüberlebenszeit auf. Im Vergleich zur DTW-Lösung erhöhte sich die maximale Überlebenszeit von 28 Stunden auf 92 Stunden und der 28-Stunden-Wert von 1,5% auf 20%. In deutlich geringerem Maße war dieser Effekt auch bei Prolin, Leucin, Valin und Serin zu beobachten.

Bei den untersuchten Zuckern war allein **Glucose**, ebenfalls in einer Konzentration von 0,03 mol/l, signifikant wirksam mit einer maximalen Überlebenszeit von 76 Stunden und einem 28-Stunden-Wert von 23%. Alle anderen untersuchten Aminosäuren und Zucker erwiesen sich für die eingesetzten Cercarien als neutral oder als toxisch.

Insbesondere GABA, Fructose und Glucosamin verkürzten die Überlebenszeit im Vergleich zur Standardlösung deutlich.

Der indirekte Nachweis der Substrataufnahme durch Cercarien - für **Glucose** mittels **Glucose**-Oxidase-Methode und für **Alanin** mittels Ionen-Austauscher-Chromatographie - konnte für **Glucose** nur partiell erbracht werden, für **Alanin** nicht sicher festgestellt werden. Dies ist am ehesten in der angewandten Methodik (Bestimmung des relativen Substratverbrauchs in cercarienhaltiger Suspension) begründet.

Insgesamt konnte diese Arbeit jedoch die These stützen, daß die Cercarien von *S. mansoni* aus dem umgebenden Medium unterschiedliche Substrate aufnehmen können und daraus sowohl eine Verlängerung als auch eine Verkürzung der Überlebenszeit resultieren kann.

7. Literaturverzeichnis

1. Anderson, R.M.; Whitfield, P.J.: "Survival characteristics of the free-living cercarial population of the ectoparasitic digenean *Transversotrema patialensis* (Soparker, 1924)", *Parasitol.* 70, 295-310 (1975)
2. Asch, H.L.: "Rhythmic emergence of *Schistosoma mansoni* cercariae from *Biomphalaria glabrata*: Control by illumination". *Exp.Parasitol.* 31, 350-355 (1972)
3. Asch, H.L.: "Effect of selected chemical agents on longevity and infectivity of *Schistosoma mansoni* cercariae" *Exp. Parasitol.* 38, 208-216 (1975)
4. Barrett, J.: "Biochemistry of parasitic helminths" Macmillan Publishers Ltd., London and Basingstoke, Hongkong p. 85, 91, 108, 122-124, 129-264 (1981)
5. Becker, W.: "Die Wirkung von Salzlösungen unterschiedlicher Ionenzusammensetzung auf die Schwimmaktivität der Cercarien von *Schistosoma mansoni*" *Z. Parasitenk.* 50, 99-101 (1976)
6. Bilharz, T.: "Ein Beitrag zur Helminthographia humana...", aus brieflichen Mitteilungen des Dr. Bilharz in Cairo nebst Bemerkungen von Prof. C. Th. v. Siebold in Breslau *Z.wiss.Zool.*4, 53-71 (1853)
7. Bruce, J.I.; Weiss, E.; Stirewalt, M.A.; Lincicome, D.R.: "Schistosoma mansoni: Glycogen Content and Utilisation of Glucose, Pyruvate, Glutamate and Citric Acid Cycle Intermediates by Cercariae and Schistosomules" *Exp. Parasitol.* 26, 29-40 (1969)
8. Bruce, J.I.; Ruff, M.D.; Hasegawa, H.: "Schistosoma mansoni: Endogenous and Exogeneous Glucose and Respiration of Cercariae" *Exp. Parasitol.* 29, 86-93 (1971)

9. Caulfield, J.P.; Cianci, C.M.L.; Mc Diarmid, S.S.; Suyemitsu, T.; Schmid, K.: "Ultrastructure, Carbohydrate And Amino Acid Analysis Of Two Preparation Of The Cercarial Glycocalyx Of Schistosoma Mansoni" J. Parasit. 73, 514-522 (1987)
10. Chappell, L.H.: "Methionine Uptake By Larval And Adult Schistosoma Mansoni" Int. J. Parasitol. 4, 361-369 (1974)
11. Cheng, T.C.: "Biochemical Requirements of Larval Trematodes" Ann.N.Y.Acad. Sci. 113, 289-321 (1963)
12. Chernin, E.: "Maintenance in vitro of larval Schistosoma mansoni in tissues from the snail, Australorbis glabratus" J. Parasit 50, 531-545. (1964)
13. Coles, G.C.: "Enzyme Levels in Cercariae and Adult Schistosoma mansoni" Int.J.Parasitol. 3, 505-510 (1973)
14. Conde-del-Pino, E.; Perez-Vilar, M.; Chintrón-Ruera, A.A.; Seneriz, R.: "Studies in Schistosoma mansoni: I.Malic and Lactic Dehydrogenase of Adult Worms and Cercariae" Exp.Parasitol. 18, 320-326 (1966)
15. Disko, R.: "Experimentelle Untersuchungen zur Tagesperiodik des Ausschwärmens der Cercarien von Schistosoma mansoni aus der Schnecke Australorbis glabratus" Z.Parasitenk. 39, 82-83 (1974)
16. Disko, R.: "Schistosomiasis. Probleme und Erfolge" Fortschr. Med. 100, 778 - 784 (1982)
17. Doenges, J.: "Digenea, Schistosomatidae. In: "Parasitologie" Georg Thieme Verlag, Stuttgart. New York. 2. Überarb.erw. Auflage, S. 189-203 (1988)
18. Donnelly, F.A.; Appleton, C.C.; Schutte, C.H.J.: "The Influence of Salinity on the Cercariae of Three Species of Schistosoma" Int.J.Parasitol.14, 13-21 (1984)
19. Dorsey, C.H.; Cousin, C.E.: "Schistosoma mansoni: A New Parenchymal Cell in Cercariae" Exp. Parasitol. 61, 33-41 (1986)
20. Ebrahimzadeh, A.; Kraft, M.: "Ultrastrukturelle Untersuchungen zur Anatomie der Cercarien von Schistosoma mansoni: II. Das Exkretionssystem" Z.Parasitenk. 36, 265-290 (1971)

21. Erasmus, D.A.: "The Cercaria". In: Erasmus, D.A., "The Biology of Trematodes" Edward Arnold (Publishers), The Universities Press, Belfast, London p. 78-83, 93-110 (1972)
22. Ercoli, N.; Payares, G.; Nunez, D.: "Schistosoma mansoni: Neurotransmitters and the Mobility of Cercariae and Schistosomules" Exp. Parasitol. 59, 204-216 (1985)
23. Farooq, M.: "Historical development". In Ansari, N.: "Epidemiology and Control of Schistosomiasis", Karger, Basel p. 1-16 (1973)
24. Furlong, S.T.; Caulfield, J.P.: "Schistosoma mansoni: Sterol and Phospholipid Composition of Cercariae, Schistosomula and Adults" Exp. Parasitol. 65, 222-231 (1988)
25. Fusco A.C.; Salafsky, B.; Kevin, M.B.: "Schistosoma mansoni: Eicosanoid production by cercariae" Exp. Parasitol. 59, 44-50 (1985)
26. Fusco, A.C.; Salafsky, B.; Whitely, K.; Yohe, S.: "Schistosoma mansoni: pH Dependence of Cercarial Eicosanoid Production, Penetration and Transformation" Exp. Parasitol. 64, 139-146 (1987)
27. Ginecinskaya, T.A.: "Glycogen im Körper von Cercarien und Abhängigkeit seiner Verteilung von der Besonderheit ihres Parasiten. (Russisch)" Dokl. Akad. Nauk. SSSR.Otd. Biol. 135, 1012-1015 (1960)
28. Großwieser, H.: "Untersuchungen zur Substrataufnahme durch Cercarien von Schistosoma mansoni", Inaugural-Dissertation Med. Fak.,TU-München, 1999
29. Haas, W.: "Reizphysiologische Untersuchungen an Cercarien von Diplostomum spathaceum" Z. vergl. Physiol. 54, 254-287 (1967)
30. Haas, W.; Schmitt, R.: "Characterization of chemical stimuli for the penetration of Schistosoma mansoni Cercariae" Z. Parasitenk. 66, 293-307 (1982)
31. Haas, W.; Haberl, B.; Schmalfuss, G.; Khayyal, M.T.: "Cercarial host finding response of Schistosoma haematobium differ from that of Schistosoma mansoni" J. Parasitol. 80, 345-353 (1994)

32. Horemans, A.M.; Tielens, A.G.; Van-den-Bergh, S.G.: "The transition from an aerobic to an anaerobic energy metabolism in transforming *Schistosoma mansoni* cercariae occurs exclusively in the head" *Parasitol.* 102, 259-265 (1991)
33. Isseroff, H.; Ertel, J.C.; Levy, M.G.: "Absorption Of Aminoacids By *Schistosoma Mansoni*" *Comp. Biochem. Physiol.* 54 B, 125-133 (1976)
34. Katz, M.; Despommier, D.; Gwadz, R.: "18. The Schistosomes : *Schistosoma mansoni* (Sambon 1907), *Schistosoma japonicum* (Katsurada 1904), and *Schistosoma haematobium* (Bilharz 1852)". In: "Parasitic diseases", Springer Verlag New York Berlin Heidelberg, 2. ed. p. 97-107 (1988)
35. Krakower, C.A.: "Some Observations on the Effects of Physical and Chemical Agents on the Cercariae of *Schistosoma mansoni*" *Puerto Rico J. Publ. Hlth. Trop. Med.* 16, 26-44 (1940)
36. Nanduri, J.; Dennis, J.E.; Rosenberry, T.L.; Mahmoud, A.A.; Tortakoff-A.M.: "Glycocalyx of bodies versus tails of *Schistosoma mansoni* cercariae. Lectin-binding, size, charge, and electron microscopic characterization" *J. Biol. Chem.* 266, 1341-1347 (1991)
37. Olivier, L.J.; v. Brandt, T.; Melham, B.: "The Influence of Lack of Oxygen on *Schistosoma mansoni* Cercariae and on infected *Australorbis glabrata* " *Exp. Parasitol.* 2, 258-270 (1953)
38. Piekarski, G.: "Medizinische Parasitologie in Tafeln" Springer-Verlag , Berlin-Heidelberg , 3. A., S.160 ff. (1987)
39. Porter, A.: "The Larval Trematoda found in certain South African mollusca" *Publ. S.Afr. Inst. Med. Res.* 8, 1-492 (1938)
40. Salafsky, B.; Fusco,A.C.: "*Schistosoma mansoni* : Cercarial eicosanoid production and penetration response inhibited by esculetin and ibuprofen" *Exp. Parasitol.* 60, 73-81 (1985)
41. Sambon, L.W.: "Remarks on *Schistosoma mansoni*" *J.Trop. Med. Hyg.* 10, 303-304 (1907)
42. Samuelson, J.C.; Caulfield, J.P.: "The Cercarial Glycocalyx of *Schistosoma mansoni* " *J. Cell Biol.*100 , 1423-1434 (1985)

43. Samuelson, J.C.; Stein, L.D.: "Schistosoma mansoni : Increasing Saline Concentrations Signals Cercariae to Transform to Schistosomula" Exp. Parasitol. 69, 23-29 (1989)
44. Schreiber, F.G.; Schubert, M.: "Experimental Infection of the Snail *Australorbis glabratus* with the Trematode *Schistosoma mansoni* and the Production of Cercariae" J. Parasitol. 35, 91-100 (1949)
45. Scott, Th.: Concise Encyclopedia of Biochemistry, Walter de Gruyter, Berlin-New York, p. 178-179, 470-471 (1983)
46. Seitz, G.: "Die Beeinflussung des Schlüpfverhaltens und der Aktivität von Cercarien von *Schistosoma* durch osmotische Faktoren, Kalium- und Magnesium" Inaugural-Dissertation Med. Fak., TU-München, 1988
47. Smyth, J.D. Halton :Biology of The Cercaria. In: "The Physiology of Trematodes" , Cambridge University Press 2. ed. p. 154-178 (1983)
48. Stirewalt, M.A. : "Schistosoma mansoni : Cercaria to Schistosomule". In : "Advances in Parasitology" (Ed. Ben Dawes)", Academic Press, London and New York 12, 115-187 (1974)
49. Strickland, G.T.V. (ed): "Schistosomiasis" in: Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases, w. B. Saunders Company, 8. ed. p. 804 – 832 (2000)
50. Stryer, L. : Biochemie (aus dem Amerikanischen übersetzt von Pfeiffer B. und Guglielmi J.) Spektrum Akad. Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin-Oxford, S.525 (1994)
51. Uglem, G.L.: "Environmental sodium regulates cutaneous sugar transport in a digenean fluke" Parasitol. 94, 1-6 (1987)
52. Van-Oordt, B.E.; Tielens, A.G.; Van-den-Bergh, S.G.: "Aerobic to anaerobic transition in the carbohydrate metabolism of *Schistosoma mansoni* Cercariae during transformation in vitro" Parasitol. 98, 409-415 (1989)

8. Geräte- und Chemikalienverzeichnis

Geräte:

Lupenbrille mit Zeiss® - Prismenlupe F und 6-facher Vergrößerung

Glasküvetten, 1×1×4cm aus optischem Glas

Aminosäuren-Analysator LC 6001 von BIOTRONIC ® (Institut für Genetik und Mikrobiologie der LMU München)

Vitros 250 von Orthoclinical Diagnostics ® GmbH Neckarsgünd (Institut für Klinische Chemie Klinikum Rechts der Isar TU München)

Chemikalien:

DTW: Dechloriertes Leitungswasser, mindestens 48 Stunden abgestanden, pH 8-8,5 (siehe Anhang).

Chemikalien der Firma Sigma ® Diagnostika:

L-Alanin: Kristallin, M: 89,09 mol $C_3H_7NO_2$

L-Arginin: Hydrochlorid, kristallin, M: 174,2 mol $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl$

L-Histidin: Monohydrochlorid, Monohydrat, kristallin, M: 209,6 mol $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$

L-Aspartat: Freie Säure, kristallin, M: 133,1 mol $C_4H_7NO_4$

L-Prolin: Kristallin, M: 115,1 mol $C_5H_9NO_2$

L-Methionin: Kristallin, M: 149,2 mol $C_5H_{11}NO_2S$

L-Leucin: Kristallin, M: 131,2 mol $C_6H_{13}NO_2$

L-Valin: Kristallin, M: 117,1 mol $C_5H_{11}NO_2$

L-Serin: Kristallin, M: 105,1 mol $C_3H_7NO_3$

L-Glutamat: Mononatrium-Salz, kristallin, 99 – 100% M: 169,1 mol $C_5H_8NO_4$

Glycin: Freie Base, kristallin, M: 75,07 mol $C_2H_5NO_2$

L-Cystein: Freie Base, kristallin, 98%, M: 121,2 mol $C_3H_7NO_2S$

L-GABA: Kristallin, 99%, M: 103,1 mol $C_4H_9NO_2$

D-Glucose: Wasserfrei, gemischte Anomere, M: 180,2 mol $C_6H_{12}O_6$

D-Fructose: Kristallin, M: 180,2 mol $C_6H_{12}O_6$

D-Trehalose: Dihydrat von *Saccharomyces cerevisiae*, M: 387,3 mol $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2 H_2O$

D-Glucosamin: Hydrochlorid, kristallin, M: 215,6 mol $C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl$

D-Mannose: Kristallin, M: 180,2 mol $C_6H_{12}O_6$

D-Arabinose: Kristallin, M: 150,1 mol $C_5H_{10}O_5$

D-Gluconsäure: Kristallin, 99-100%, M: 178,1 mol $C_6H_{10}O_6$

Dilutionspuffer (Aminosäurenanalyse)

Penicillin-Streptomycin-Lösung: 10000 I.U. pro ml Penicillin

10 mg pro ml Streptomycin in 0,9% NaCl

Salzsäure (HCl): 36,5 – 38 % Lösung, M: 36,46 mol

Natronlauge (NaOH): 1,0 Normal-Lösung, M: 40 mol

9. Verzeichnis der Abbildungen

	Seite
Abbildung 1: Entwicklungszyklus von <i>S. mansoni</i>	3
Abbildung 2: Geographische Verbreitung	5
Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme	7
Abbildung 4: Tegument einer reifen Cercarie	8
Abbildung 5: Photographie der Versuchsanordnung	18
Abbildung 6: Schema der Versuchsanordnung	21
Abbildung 7: Typischer Kurvenverlauf des Absterbeverhaltens	24
Abbildung 8: Überlebenszeit der Cercarien DTW	25
Abbildung 9: Mittelwertkurve und Maximalabweichung in DTW	26
Abbildung 10: Überlebenszeit der Cercarien in 0,03 - molarer Alaninlösung	27
Abbildung 11: Mittelwertkurve und Maximalabweichung in Alanin	28
Abbildung 12: Unterschiedlich konzentrierte Alaninlösung	29
Abbildung 13: Überlebenszeit der Cercarien in Argininlösung	30
Abbildung 14: Überlebenszeit der Cercarien in Histidinlösung	31
Abbildung 15: Überlebenszeit der Cercarien in Aspartatlösung	32
Abbildung 16: Überlebenszeit der Cercarien in Prolinlösung	33
Abbildung 17: Überlebenszeit der Cercarien in Methioninlösung	34
Abbildung 18: Überlebenszeit der Cercarien in Leucinlösung	35
Abbildung 19: Überlebenszeit der Cercarien in Valinlösung	36
Abbildung 20: Überlebenszeit der Cercarien in Serinlösung	37
Abbildung 21: Überlebenszeit der Cercarien in Glutamatlösung	38
Abbildung 22: Überlebenszeit der Cercarien in Glycinlösung	39
Abbildung 23: Überlebenszeit der Cercarien in Cysteinlösung	40
Abbildung 24: Überlebenszeit der Cercarien in GABA-Lösung	41
Abbildung 25: Überlebenszeit der Cercarien in Glucoselösung	42
Abbildung 26: Überlebenszeit der Cercarien in Fructoselösung	43
Abbildung 27: Überlebenszeit der Cercarien in Trehaloselösung	44
Abbildung 28: Überlebenszeit der Cercarien in Glucosaminlösung	45
Abbildung 29: Überlebenszeit der Cercarien in Mannoselösung	46
Abbildung 30: Überlebenszeit der Cercarien in Arabinoselösung	47
Abbildung 31: Überlebenszeit der Cercarien in Gluconatlösung	48
Abbildung 32: Abnahme der Glucosekonzentration	49
Abbildung 33: Abnahme der Glucosekonzentration mit bakteriziden Substanzen	50

Abbildung 34: Abnahme der Glucosekonzentration mit GABA	51
Abbildung 35: Abnahme der Glucosekonzentration ohne Cercarien	52
Abbildung 36: Abnahme der Glucosekonzentration ohne Cercarien (bakt.-gefilt.)	53
Abbildung 37: Abnahme der Alaninkonzentration	54
Abbildung 38: Abnahme der Alaninkonzentration mit bakteriziden Substanzen	55
Abbildung 39: Abnahme der Alaninkonzentration mit GABA	56
Abbildung 40: Abnahme der Alaninkonzentration ohne Cercarien	57
Abbildung 41: Abnahme der Alaninkonzentration ohne Cercarien (bakt.-gefilt.)	58
Abbildung 42: Verwertung der Kohlenstoffgerüste der Aminosäuren	61
Abbildung 43: Schema des Citratzyklus	71
Abbildung 44: Transaminierung von Pyruvat	72

10. Anhang

DTW:

Trinkwasseranalyse (Leitungswasser der Stadt München)

Die hier angegebenen Werte sind Mittelwerte. Es werden monatlich ca. 200 Proben chemisch und rund 1200 Proben mikrobiologisch analysiert. (Stand Januar 2001)

Chemische Stoffe	Mittelwert mg/l	Grenzwert nach TVO mg/l
Arsen	< 0,001	0,01
Blei	< 0,003	0,04
Cadmium	< 0,001	0,005
Chrom	< 0,003	0,05
Cyanid	< 0,0005	0,05
Fluorid	0,12	1,5
Nickel	< 0,003	0,05
Nitrat	7,7	50
Nitrit	< 0,005	0,1
Quecksilber	< 0,0005	0,001
Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (Summe aus 6 Parametern)	< 0,00003	als C: 0,0002
Organische Chlorverbindungen		
Summe		0,01
Dichlormethan	n.b.	
1,1,1-Trichlorethan	< 0,0001	
Trichlorethylen	< 0,1	
Tetrachlorethylen	< 0,1	
Tetrachlorkohlenstoff	< 0,0001	0,003
Pestizide (Triazine)		
Einzelsubstanz		0,0001
Summe		0,0005
Atrazin	< 0,00003	
Simazin	< 0,00003	
Desethylatrazin	< 0,00003	
Desisopropylatrazin	< 0,00003	

Terbutylazin	< 0,00003	
Chemische Stoffe		
Aluminium	< 0,02	0,2
Ammonium	< 0,05	0,5
Sulfat	21	240
Chlorid	6,2	250
Phosphor (PO ₄)	< 0,01	6,7
Natrium	3,6	150
Kalium	1,1	12
Magnesium	19,9	50
Calcium	85,1	400
Mangan gesamt	< 0,001	0,05
Eisen gesamt	< 0,01	0,2
Kupfer gesamt	< 0,001	3,0 (Richtwert)
Silber	< 0,001	0,08
Zink gesamt	< 0,01	5,0 (Richtwert)
Sauerstoff	10,5	-
Silicium	2	-
Barium	0,022	1
Strontium	0,27	-
Bor	< 0,05	1
Temperatur	10,9	-
Kohlendioxid	15,7	-
Hydrogenkarbonat	316,9	-
Karbonat	0,54	-
Physikalisch-chemische Kenngrößen		
pH-Wert	7,51	6,5-9,5
Sättigungs - pH	7,34	muß kleiner pH sein
Leitfähigkeit (µS/cm)	544	2000
Oxidierbarkeit (mg/l)	< 0,5	5

Danksagung:

Bedanken möchte ich mich in erster Linie bei Herrn Prof. Dr. Disko für die Überlassung des Themas und die unermüdliche Beratung und Unterstützung bei Versuchsdurchführung (diesbezüglich möchte ich auch in Dankbarkeit an Frau Winter (†) erinnern) und Abfassung der Arbeit.

Dank auch an Herrn PD Dr. Baum (Institut für Klinische Chemie der TU München) und Frau Dr. Schubert (Institut für Genetik und Mikrobiologie der LMU München).

Letztendlich konnte die Arbeit nur gelingen durch tatkräftigen und moralischen Beistand von Andreas Ebeling und von meiner „Doktorschwester“ Dr. Hildegard Großwieser (sowie vielen weiteren hier ungenannt bleibenden Freunden und Familienangehörigen).