

**Pro-karzinogene Effekte einer Infektion mit *Schistosoma mansoni*
in einem Diethylnitrosamin Mausmodell
für das hepatozelluläre Karzinom**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Schneider, Maryam
aus Münster

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Zentrum für Innere Medizin

Schwerpunkt Gastroenterologie

Betreuerin und Gutachterin: Frau Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb, MHAC

Gutachter: Herr PD Dr. med. Jonathan Harnöß

Tag der Disputation: 09.09.2025

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	4
2.1	DAS HEPATOZELLULÄRE KARZINOM	4
2.1.1	DEFINITION UND EPIDEMIOLOGIE	4
2.1.2	ÄTIOLOGIE	5
2.1.3	KLINIK	7
2.1.4	DIAGNOSTIK	8
2.1.5	PATHOLOGIE DES HCC	9
2.1.6	KLASSIFIKATION	10
2.1.7	THERAPIE	10
2.1.8	PROGNOSE	13
2.2	DIE INFEKTION MIT SCHISTOSOMA MANSONI	14
2.2.1	EPIDEMIOLOGIE	14
2.2.2	ÄTIOLOGIE	16
2.2.3	LEBENSZYKLUS	17
2.2.4	PATHOLOGIE DER SCHISTOSOMIASIS	20
2.2.5	INFLAMMATION	21
2.2.6	OXIDATIVER STRESS	26
2.2.7	REPLIKATIONSSTRESS	29
2.2.8	FIBROSE	30
2.2.9	KLINISCHES BILD	32
2.2.10	DIAGNOSTIK	35
2.2.11	THERAPIE	38
2.2.12	PRÄVENTION	40
2.3	HEPATOZELLULÄRE KARZINOGENESE BEI EINER INFEKTION MIT <i>S. MANSONI</i>	41
2.3.1	<i>S. MANSONI</i> AGIERT ALS KO-FAKTOR BEI DER HEPATOZELLULÄREN KARZINOGENESE	41
2.3.2	<i>S. MANSONI</i> AKTIVIERT DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOR STAT3	42
2.3.3	<i>S. MANSONI</i> INDUZIERT DAS ONKOGEN C-JUN	43
3	ZIEL DER ARBEIT	45

4	METHODEN	46
4.1	MAUSLINIE UND BEHANDLUNG	46
4.2	SERUMPARAMETER	48
4.3	KALIUMHYDROXID-VERDAU DER LEBERPROBEN	49
4.4	QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASE-KETTENREAKTION	49
4.5	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	49
4.5.1	PROTEINBESTIMMUNG MITHILFE DES WESTERN BLOT	49
4.5.2	<i>ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)</i>	50
4.6	HISTOLOGISCHE METHODEN	50
4.6.1	EINBETTUNG DER LEBERPROBEN IN PARAFFIN.....	51
4.6.2	IMMUNHISTOCHEMIE MIT PARAFFINSCHNITTEN	51
4.7	KOLORIMETRISCHE UND FLUOROMETRISCHE METHODEN	52
4.7.1	KOLORIMETRISCHE MESSUNG VON MALONDIALDEHYD	52
4.7.2	FLUOROMETRISCHE ANALYSE DER MYELOPEROXIDASE	53
4.7.3	KOLORIMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG VON HYDROXYPROLIN	55
4.8	STATISTISCHE ANALYSE	56
5	ERGEBNISSE	58
5.1	S. MANSONI VERURSACHT EINE SCHÄDIGUNG DER LEBERZELLEN	58
5.1.1	ANSTIEG DER ALANIN-AMINOTRANSFERASE-KONZENTRATION IM SERUM	58
5.1.2	ZUNAHME DES LEBERGEWICHTES UND DER LW/BW-RATIOS.....	59
5.2	DIETHYLNITROSAMIN FÜHRT ZU HEPATISCHEN DYSPLASIEN	60
5.2.1	ALPHA-FETOPROTEIN IM SERUM	60
5.2.2	HISTOPATHOLOGISCHER GRAD DER DYSPLASIE.....	61
5.3	DIETHYLNITROSAMIN BEEINFLUSST NICHT DIE MENGE AN PARASITENEIERN IN DEN LEBERN S. MANSONI-INFIZIERTER MÄUSE	62
5.4	S. MANSONI INDUZIERT EINE GRANULOMATÖSE HEPATISCHE INFLAMMATION	63
5.4.1	HISTOPATHOLOGISCHER GRAD DER INFLAMMATION	63
5.4.2	MIGRATION VON LEUKOZYTEN.....	65
5.4.3	VERSTÄRKUNG DER TH1-IMMUNANTWORT	66
5.4.4	AKTIVIERUNG DER TH2-IMMUNANTWORT	68
5.5	S. MANSONI VERURSACHT OXIDATIVEN STRESS	70
5.5.1	STEIGERUNG DER HEPATISCHEN MALONDIALDEHYD-KONZENTRATION	70
5.5.2	REDUKTION DER HEPATISCHEN <i>SUPEROXIDDISMUTASE 1</i> -EXPRESSION	71
5.5.3	VERRINGERUNG DER HEPATISCHEN <i>KATALASE</i> -EXPRESSION.....	72

5.5.4	ANSTIEG DER HEPATISCHEN <i>GLUTATHION-PEROXIDASE 3</i> -EXPRESSION	73
5.5.5	VERSTÄRKTEN AKTIVITÄT UND KONZENTRATION DER MYELOPEROXIDASE	74
5.6	AKTIVIERUNG DER DNA-REPLIKATIONSMARKER MCM2 UND PCNA	77
5.7	<i>S. MANSONI</i> INDUZIERT EINE LEBERFIBROSE	81
5.7.1	ANSTIEG DER <i>TGF-β</i> -EXPRESSION	82
5.7.2	ERHÖHUNG DER DESMIN-KONZENTRATION	82
5.7.3	STEIGERUNG DER <i>KOLLAGEN</i> -EXPRESSION UND -ABLAGEN	84
5.7.4	ZUNAHME DER HEPATISCHEN HYDROXYPROLIN-KONZENTRATION	86
5.7.5	HISTOPATHOLOGISCHER GRAD DER FIBROSE	87
5.8	<i>S. MANSONI</i> AKTIVIERT ONKOGENE SIGNALWEGE	87
5.8.1	VERSTÄRKTEN PHOSPHORYLIERUNG UND AKTIVIERUNG VON STAT3	88
5.8.2	ERHÖHTE KONZENTRATION VON C-JUN UND PHOSPHO-C-JUN	89
6	DISKUSSION	91
6.1	GRANULOMATÖSE INFLAMMATION DURCH <i>S. MANSONI</i> UND MODIFIKATION DURCH DIETHYLNITROSAMIN	91
6.1.1	DIE TH1- UND TH2-IMMUNREAKTIONEN	91
6.1.2	IMMUNMODULATION DURCH <i>S. MANSONI</i>	93
6.1.3	INFLAMMATION UND KARZINOGENESE	95
6.2	INDUKTION VON HEPATISCHEM OXIDATIVEM STRESS DURCH <i>S. MANSONI</i> UND DIETHYLNITROSAMIN	97
6.2.1	URSACHEN DES OXIDATIVEN STRESSES	97
6.2.2	SCHÄDIGUNG VON BIOMOLEKÜLEN DURCH OXIDATIVEN STRESS	99
6.2.3	REPLIKATIONSSSTRESS ALS DIREKTE FOLGE DER OXIDATIVEN SCHÄDIGUNGEN	101
6.3	AUSLÖSUNG EINER HEPATISCHEN FIBROSE DURCH <i>S. MANSONI</i> UND INTENSIVIERUNG DERSELBEN DURCH DIETHYLNITROSAMIN	104
6.3.1	FIBROGENESE DURCH <i>S. MANSONI</i> UND DIETHYLNITROSAMIN	104
6.3.2	DER HIGH MOBILITY GROUP BOX 1-SIGNALWEG	107
6.4	VERSTÄRKUNG DIETHYLNITROSAMIN-AKTIVIERTER ONKOGENER SIGNALWEGE DURCH <i>S. MANSONI</i>	108
6.4.1	KARZINOGENE MECHANISMEN VON PARASITEN	108
6.4.2	AKTIVIERUNG DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS STAT3 DURCH <i>S. MANSONI</i> UND DIETHYLNITROSAMIN	110
6.5	LIMITATIONEN DER ARBEIT	112
7	ZUSAMMENFASSUNG	115

8 SUMMARY	118
9 ANHANG.....	120
9.1 METHODEN	120
9.1.1 QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASE-KETTENREAKTION.....	120
9.1.2 PROTEINBESTIMMUNG MITTELS WESTERN BLOT	124
9.1.3 HISTOPATHOLOGISCHES SCORING	127
9.2 MATERIALIEN	132
9.2.1 GERÄTE	132
9.2.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	134
9.2.3 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	135
9.2.4 PUFFER UND LÖSUNGEN	138
9.2.5 ANTIKÖRPER.....	142
9.2.6 OLIGONUKLEOTIDE	144
9.2.7 KOMMERZIELLE KITS.....	146
10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	147
11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	153
12 TABELLENVERZEICHNIS	156
13 LITERATURVERZEICHNIS.....	157
14 PUBLIKATIONEN	196
15 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	198

1 Einleitung

Die Schistosomiasis oder Bilharziose ist neben der Malaria eine der häufigsten parasitären Infektionskrankheiten des Menschen (Palumbo, 2007). Weltweit sind schätzungsweise 250 Millionen Menschen betroffen, insbesondere in den subtropischen und tropischen Regionen Afrikas, in Südamerika und Asien (Palumbo, 2007). Darüber hinaus sind in den Endemiegebieten 779 Millionen Menschen dem Risiko einer Infektion ausgesetzt (McManus et al., 2018). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) führt jährlich bis zu 200.000 Todesfälle alleine in Afrika auf diese parasitäre Erkrankung zurück (Ignatius & Burchard, 2020). Dennoch handelt es sich bei der Schistosomiasis um eine sogenannte *Neglected tropical disease* (Kokaliaris et al., 2022). Als solche stellt sie in den endemischen Regionen trotz Bemühungen zur Bekämpfung die zweithäufigste sozioökonomische und gesundheitliche Belastung für die Bevölkerung dar (Al-Olayan et al., 2016). Diese betrifft vor allem die ärmeren Bevölkerungsschichten, da die Infektion mit einem mangelnden Zugang zu sauberem Wasser sowie mit unzureichenden sanitären und hygienischen Einrichtungen verbunden ist (Tchuenté et al., 2017). Der Klimawandel und die Globalisierung, beispielsweise in Form einer Zunahme des Tourismus in Ländern mit begrenzter Infrastruktur, führen jedoch zu einer Ausbreitung der Schistosomiasis (Drudge-Coates & Turner, 2013; McManus et al., 2018). So wurden seit dem Jahr 2000 Ausbrüche der urogenitalen Schistosomiasis in Spanien, Portugal und Frankreich verzeichnet, die das Risiko einer Verlagerung tropischer Infektionskrankheiten in gemäßigtere Breitengrade demonstrieren (Gabielli & Garba Djirmay, 2023).

Hervorgerufen wird die Schistosomiasis durch Trematoden der Gattung *Schistosoma*, von denen sechs humanpathogene Arten existieren: die drei häufigsten Arten *S. haematobium*, *S. japonicum* und *S. mansoni* sowie die drei seltener vorkommenden Spezies *S. guineensis*, *S. intercalatum* und *S. mekongi* (McManus et al., 2018). Die Infektion erfolgt in stehenden oder langsam fließenden Gewässern, in denen sich die infektiösen Stadien der Zerkarien befinden (Löscher & Burchard, 2010). Diese penetrieren die intakte Haut des Wirtes und wandern anschließend mit dem Blutstrom in die Leber, wo sie heranwachsen und sich paaren (Löscher & Burchard, 2010). Als fest verbundenes Paar wandern Weibchen und Männchen gegen den Pfortaderblutfluss im Falle von *S. mansoni* in die Mesenterialvenen (Drudge-Coates & Turner, 2013). Dort legt jedes Paar schätzungsweise 300 Eier pro Tag, von denen ca. 50% über den Darm ausgeschieden werden, um den Lebenszyklus der Parasiten zu komplettieren (Alwan & Loverde, 2021). Die andere Hälfte der Eier gelangt über die Zirkulation in die Leber (Alwan & Loverde, 2021). Dort bleiben sie aufgrund ihrer Größe in den Sinusoiden

stecken und provozieren eine granulomatöse Immunreaktion (Colley et al., 2014). Aufgrund der Entwicklung der Embryonen bleiben die Eier metabolisch aktiv und sezernieren unter anderem zytotoxische Antigene, die über zum Teil unbekannte Mechanismen mit dem umliegenden Leberparenchym interagieren (Costain et al., 2018). Aus dieser Pathophysiologie resultiert bei einem Teil der Patienten eine schwere hepatische Erkrankung, die sich in einer Fibrosierung des Organs inklusive portaler Hypertension, Aszites und der Entstehung portosystemischer Shunts äußert (Zheng et al., 2020). In diesem Zusammenhang stellen gastrointestinale Blutungen aus insbesondere den Ösophagusvarizen die häufigste Todesursache dar (Löscher & Burchard, 2010).

Des Weiteren wurden Infektionskrankheiten durch Bakterien, Viren oder Parasiten mit 20% verschiedener Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht (Martel et al., 2012). Unter den Parasiten klassifiziert die *International Agency for Research on Cancer (IARC)* *S. haematobium*, *Opisthorchis viverrini* und *Clonorchis sinensis* als Klasse 1 Karzinogene (IARC & WHO, 2012). Dagegen wird die Spezies *S. mansoni* derzeit als Klasse 3 Karzinogen eingestuft, bedingt durch bislang unzureichende Beweise hinsichtlich der Karzinogenität dieser Parasitenspezies (IARC & WHO, 2012). In diversen Fallberichten wurde jedoch ein Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *S. mansoni* und dem Auftreten von Karzinomen in Leber, Darm, Prostata sowie von folliculären Riesensymphomen hergestellt (El-Tonsy et al., 2013; Palumbo, 2007). Bestätigend legen jüngste Daten aus Tiermodellen und Zellkulturexperimenten auch aus unserer Arbeitsgruppe (Gastroenterologie, Univ.-Prof. Dr. med. Roeb) die Vermutung nahe, dass *S. mansoni* die Entstehung hepatozellulärer Karzinome (HCC) und kolorektaler Karzinome (CRC) initiieren oder begünstigen kann (Bülow et al., 2021).

Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführte Mausstudie basiert auf den Ergebnissen der Forschungsarbeiten von El-Tonsey et al. (El-Tonsey et al., 2013). Die Autoren beobachteten, dass 70-80% der Patienten mit chronischer Hepatitis, Zirrhose oder hepatozellulärem Karzinom eine Ko-Infektion mit Schistosomen und Hepatitis C-Viren aufweisen (El-Tonsey et al., 2013). Außerdem ging diese Ko-Infektion mit einer frühzeitigen Verschlechterung der Leberfunktion und einem schnelleren Progress über die Zirrhose bis hin zum HCC einher (El-Tonsey et al., 2013). El-Tonsey et al. postulierten daher, dass *S. mansoni* bei Vorhandensein primärer Karzinogene hepatische dysplastische Veränderungen beschleunigt, sodass Karzinome früher auftreten und einen aggressiveren Charakter aufweisen (El-Tonsey et al., 2013). Stellvertretend für diese weiteren Risikofaktoren kombinierten die Autoren das etablierte Hepatokarzinogen Diethylnitrosamin (DEN) mit einer Infektion durch *S. mansoni* und verglichen die

hepatischen Veränderungen mit einer alleinigen DEN-Injektion oder *S. mansoni*-Infektion und einer Kontroll-Gruppe (El-Tonsy et al., 2013). Die doppelte Noxe aus *S. mansoni* und DEN führte zu einem früheren Auftreten der dysplastischen Veränderungen (El-Tonsy et al., 2013). Zudem war in dieser Gruppe eine geringere Dosis an DEN für die Zellveränderungen notwendig (El-Tonsy et al., 2013). Außerdem zeigten die Serumspiegel des Tumormarkers Alpha-Fetoprotein (AFP) früher statistisch signifikante Unterschiede (El-Tonsy et al., 2013).

In der dieser Promotion zugrundeliegenden tierexperimentellen Studie wurde das Hepatokarzinogenese-Modell aus DEN und *S. mansoni* an C57/BL6 Mäusen etabliert und um molekularbiologische Analysen verschiedener Aspekte der Pathologie durch *S. mansoni* erweitert. Diese umfassen Leberschädigung, Inflammation, oxidativen Stress, Proliferation, Fibrose und onkogene Signalwege. Ein besonderer Fokus lag hierbei auf möglichen additiven Wirkungen der Kombination aus DEN + *S. mansoni* im Vergleich zu den alleinigen Wirkungen der jeweiligen Noxen.

2 Literaturübersicht

2.1 Das Hepatozelluläre Karzinom

2.1.1 Definition und Epidemiologie

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist Ursache von 85-90% der primären malignen Lebererkrankungen und ist somit der häufigste Tumor in dieser Kategorie (El-Serag & Rudolph, 2007). Das HCC entwickelt sich langsam und es wird angenommen, dass das Karzinom die tödliche Folge chronischer Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologie ist (Bray et al., 2018; Bülow et al., 2021; He et al., 2013). Insgesamt wurde das HCC weltweit als fünfthäufigste Tumorerkrankung der Männer und als neunthäufigste der Frauen klassifiziert (Bray et al., 2024). Als weltweit dritthäufigste Ursache der Krebssterblichkeit ist das HCC jährlich für schätzungsweise 758.000 Todesfälle verantwortlich (Bray et al., 2024).

Die globale Inzidenz der Erkrankung variiert stark, sodass sich 80-85% der neu aufgetretenen HCC-Fälle auf Regionen südlich der Sahara und auf Ostasien fokussieren (El-Serag & Rudolph, 2007). Weltweit wird aktuell ein starker Anstieg der Neuerkrankungen beobachtet. In Ägypten nahm die Belastung durch das HCC mit einer Verdopplung der Inzidenzrate zwischen den Jahren 2000 und 2013 stark zu (El-Tonsy et al., 2013). Zur gleichen Zeit verzeichnete das *Surveillance Epidemiology End Results Program*, dass das HCC seit Anfang der 2000er Jahre die am schnellsten ansteigende krebsbedingte Todesursache in den USA darstellt (Llovet et al., 2021). Im Jahr 2022 waren maligne Tumore in der Leber die am sechsthäufigsten neu diagnostizierten Karzinome weltweit (Bray et al., 2024). In einer Gegenüberstellung der Mortalitätsraten von 36 Tumorarten belegten Leberkarzinome den dritten Rang (Bray et al., 2024). Weiterhin wurde prognostiziert, dass diese Erkrankung bis 2030 auch in den USA die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache sein wird, wenn sich dieser Trend fortsetzt (Llovet et al., 2021). Diese Zunahme des HCCs ist insbesondere in den westlichen Ländern zum einen auf die wachsende Zahl von Patienten mit den infektiösen Lebererkrankungen chronische Hepatitis B und C (HBV, HCV) sowie auf die konstant hohe Fallzahl alkoholbedingter Lebererkrankungen zurückzuführen (Malek et al., 2014). Zum anderen hängt der verzeichnete Anstieg der Inzidenz auch mit der Zunahme metabolischer Erkrankungen wie der mit metabolischer Dysfunktion-assoziierten steatotischen Lebererkrankung MASLD, der metabolischer Dysfunktion-assoziierten

Steatohepatitis MASH sowie dem Typ-2-Diabetes zusammen (Roeb et al., 2015; Roeb et al., 2022; Roeb et al., 2024; Starley et al., 2010).

2.1.2 Ätiologie

Die Entwicklung hepatozellulärer Karzinome ist häufig die Folge chronischer Lebererkrankungen (El-Serag & Rudolph, 2007). Dagegen entwickelt sich in einem gesunden Organ nur selten ein HCC (El-Serag & Rudolph, 2007). Die Mehrheit der Karzinome entsteht auf dem Boden einer Leberzirrhose, die sich mit einer Latenzzeit von 20-40 Jahren in den chronisch geschädigten Lebern entwickeln kann (El-Serag & Rudolph, 2007). Während das HCC-Risiko in der Latenzzeit gering bleibt, wird mit dem Eintritt in das Zirrhose-Stadium ein exponentieller Anstieg beobachtet (El-Serag & Rudolph, 2007). Insbesondere bei HBV-infizierten Patienten und bei MASH (Roeb et al., 2024) treten HCCs jedoch auch in nicht zirrhotischen Lebern auf (El-Serag & Rudolph, 2007).

Die im Folgenden genannten chronischen Erkrankungen bilden die Hauptrisikofaktoren für die Leberzirrhose. Ist die Zirrhose etabliert, geht das HCC mit einer jährlichen Inzidenz von 1-6% aus dieser Leberschädigung hervor (Trinchet et al., 2015).

Global betrachtet ist in Asien und Afrika die chronische HBV-Infektion mit oder ohne zusätzliche Exposition gegenüber Aflatoxin B1 die häufigste Ätiologie der Zirrhose (Schulze et al., 2015). Im Gegensatz dazu wird in den westlichen Ländern insbesondere das HCV, chronischer Alkoholkonsum und zunehmend das metabolische Syndrom mit dem HCC in Verbindung gebracht (Schulze et al., 2015).

Das HB-Virus ist schätzungsweise für 60% der HCC-Fälle in Asien und Afrika sowie für 20% der Fälle in westlichen Ländern verantwortlich (Akinyemiju et al., 2017). In verschiedenen Studien wurde eine direkte Korrelation zwischen Viruslast, Replikationsrate und Dauer der Infektion mit der Inzidenzrate des HCCs aufgedeckt (Chen et al., 2006; Yang et al., 2002). Dieser Zusammenhang beruht einerseits auf der Tatsache, dass es sich bei dem HBV um ein DNA-Virus handelt, welches als solches die Fähigkeit besitzt, sich in das Wirtsgenom zu integrieren (Llovet et al., 2021). Dies kann eine Veränderung der zellulären Replikation oder auch eine chromosomale Instabilität verursachen (Brecht et al., 1980; Bréchet, 1987). Eine bekannte und wiederkehrende Insertionsstelle des HBV-Genoms ist der *Telomerase-Reverse-Transcriptase- (Tert-)* Promoter, dessen Mutationen mit 60% die häufigsten genetischen Veränderungen im HCC darstellen (Villanueva, 2019). Andererseits verursacht die chronische HBV-

Infektion entzündliche und zum Teil nekrotische Veränderungen in der Leber, die auf die hepatische Immunreaktion zurückzuführen sind (Waghray et al., 2015). Zusammengenommen wiesen Fall-Kontroll-Studien auf ein fünf- bis 15-fach erhöhtes HCC-Risiko als Folge einer chronischen HBV-Infektion hin (El-Serag & Rudolph, 2007). In Europa, Nordamerika und Japan ist die chronische Hepatitis C-Infektion die häufigste dem HCC zugrunde liegende Lebererkrankung (Akinyemiju et al., 2017). Im Gegensatz zum HBV ist das HCV ein RNA-Virus, das sich nicht in das Wirtsgenom integriert (Llovet et al., 2021). Das HCC-Risiko hängt daher in erster Linie von der Entwicklung der Zirrhose, die in 15-35% der Fälle nach 25-30 Jahren entsteht, sowie von den chronischen Leberschäden ab (AWMF, 2024; El-Serag & Rudolph, 2007; Freeman et al., 2001). Der Beitrag zu Letzteren wird vornehmlich durch die chronische Entzündungsreaktion und durch den resultierenden oxidativen Stress geleistet (Llovet et al., 2021). In der Folge führt die chronische HCV-Infektion zu DNA-Doppelstrangbrüchen und erhöht zudem die Häufigkeit von Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Proto-Onkogenen (Machida et al., 2010). Insgesamt verzeichnet die durch das HCV verursachte chronische Hepatitis ein gegenüber der Allgemeinbevölkerung 17-fach erhöhtes HCC-Risiko (Waghray et al., 2015).

Beim Aflatoxin B1 (AFB1) handelt es sich um ein Mykotoxin, welches vom *Aspergillus*-Pilz produziert wird (El-Serag & Rudolph, 2007). Dieser wächst leicht auf Lebensmitteln, die unter feuchten und warmen Bedingungen gelagert werden, wie beispielsweise Erdnüssen und Mais (El-Serag & Rudolph, 2007). Nach der oralen Aufnahme des Toxins wird AFB1 zu seinem aktiven Zwischenprodukt metabolisiert, dem AFB1-Exo-8,9-Epoxid (El-Serag & Rudolph, 2007). Dieses besitzt die Fähigkeit, an die DNA zu binden und kann auf diese Weise DNA-Schäden verursachen (El-Serag & Rudolph, 2007). Zu diesen zählen eine charakteristische Mutation im Tumorsuppressorgen *p53*, welche in 30-60% der HCCs in AFB1-Endemiegebieten nachgewiesen wurde (Bressac et al., 1991; Garner et al., 1972; Turner et al., 2002). Während die alleinige Exposition gegenüber AFB1 zu einem vierfachen Anstieg des HCC-Risikos führte, vervielfältigte die zusätzliche HBV-Infektion diese Wirkung und erhöhte das Risiko insgesamt um ein 60-Faches (Qian et al., 1994).

In Deutschland ist der chronische Konsum von Alkohol/Ethanol ein entscheidender Risikofaktor, der für schätzungsweise ein Drittel der HCC-Fälle verantwortlich ist (Malek et al., 2014). Das HCC-Risiko liegt bei Frauen, die mehr als 20 g und bei Männern, die mehr als 60 g Ethanol über einen Zeitraum von mindestens zehn Jahren konsumieren, bei sechs bis 41% (Lu et al., 2004; Mandayam et al., 2004).

Seit dem Jahr 2010 ist insbesondere in westlichen Industrienationen ein zunehmender Anteil der HCCs auf die metabolisch bedingte Steatohepatitis (MASH) zurückzuführen (Estes et al., 2018). Derzeit werden 15-20% der HCC-Fälle in der westlichen Welt durch die MASH hervorgerufen (Estes et al., 2018). In diesem Zusammenhang begünstigen oxidativer und metabolischer Stress, pathologische Entzündungsreaktionen sowie eine veränderte Immunfunktion und abweichende Adipokine oder endokrine Signalübertragungen die Entstehung eines HCCs (Anstee et al., 2019; Sutti & Albano, 2020).

Zu den weniger häufigen Risikofaktoren gehören Glykogenspeicherkrankheiten, die primär biliäre Cholangitis (PBC), der Alpha1-Antitrypsin-Mangel, der Morbus Wilson und autoimmune Hepatitiden (Waghray et al., 2015). Zudem weisen Patienten, die aufgrund einer erblichen Hämochromatose eine Leberzirrhose entwickelt haben, ein Lebenszeitrisiko für das HCC von 45% auf (Fracanzani et al., 2001).

2.1.3 Klinik

Symptomatisch erscheint das HCC recht unspezifisch in Form eines Druckgefühls im rechten Oberbauch, eines Gewichtsverlustes, Inappetenz oder subfebriler Temperaturen (Arastéh et al., 2018). Des Weiteren sind die karzinombedingten Symptome durch die der Erkrankung oft zugrundeliegenden Leberzirrhose überlagert (Arastéh et al., 2018). Letztere äußert sich ebenfalls in einem Appetitmangel sowie einer leichten Ermüdbarkeit und einer abnehmenden Leistungsstärke (Arastéh et al., 2018). Körperliche Erscheinungen wie das Palmarerythem, Weißnägel, Spider naevi, ein Caput medusae, eine Dupuytren-Kontraktur, Lacklippen oder ein Verlust der Bauch- und Brustbehaarung sind charakteristische Merkmale der fortgeschrittenen Lebererkrankung (Arastéh et al., 2018). Übersteigt der portale Blutdruck zwölf mmHg, spricht man von einer portalen Hypertension (Arastéh et al., 2018). Diese hat eine Umleitung des Blutflusses in die ösophagealen, aber auch in die gastrophrenikorenen, umbilikalen oder retroperitonealen Venen sowie in den Plexus haemorrhoidalis zur Folge (Arastéh et al., 2018). Da die Leber zugleich wichtiges Syntheseorgan und Entgiftungsstation des Körpers ist, äußert sich eine Erkrankung in metabolischen Auffälligkeiten (Arastéh et al., 2018). Ein gestörter Östrogenabbau macht sich bei männlichen Patienten in einer zunehmend femininen Körperbehaarung sowie in einer Gynäkomastie bemerkbar (Arastéh et al., 2018). Bei beiden Geschlechtern sind Libido und Potenz verringert (Arastéh et al., 2018). Darüber hinaus führt eine verminderte Synthese von Gerinnungsfaktoren zu Gerinnungsstörungen, die zu Blutungen führen (Arastéh et al.,

2018). Die mangelnde Entgiftungsleistung in Bezug auf Bilirubin und Ammoniak resultiert in einem mäßig ausgeprägten Ikterus respektive einer hepatischen Enzephalopathie in Form reversibler neuropsychiatrischer Störungen (Arastéh et al., 2018).

2.1.4 Diagnostik

Ein etabliertes Screening-Angebot richtet sich an Patienten, bei denen einer der bekannten Risikofaktoren chronische Hepatitis, Steatohepatitis oder Leberzirrhose im Child-Pugh-Stadium A oder B unabhängig von der Ätiologie diagnostiziert wurde (AWMF, 2024; Malek et al., 2014). Das Programm beinhaltet halbjährige Sonografie-Kontrollen der Leber und kann durch eine Laborbestimmung des AFP ergänzt werden (Samman et al., 2022; Vogel et al., 2018). Meta-Analysen ergaben eine durch diese Kombination gesteigerte Sensitivität von 45% bei alleiniger Sonografie auf 63%, wengleich die Spezifität aufgrund falsch-positiver Ergebnisse mit dem AFP leicht abnahm (AWMF, 2024; Tzartzeva et al., 2018).

Sobald eine Läsion entdeckt wird, bestimmt die Größe dieser den nächsten Schritt. Bei hepatischen Knoten unter einem Zentimeter sollte alle drei Monate eine erneute Sonografie- oder MRT-Kontrolle stattfinden (AWMF, 2024). Bleibt die Läsion über zwei Jahre größenstabil, kann zur routinemäßigen Überwachung nach sechs Monaten zurückgekehrt werden (Waghay et al., 2015; Welch & Black, 2010).

Übertrifft die Läsion einen Zentimeter, wird eine weiterführende Diagnostik mittels dynamischer kontrastverstärkter MRT oder Kontrastmittelsonografie eingeleitet (AWMF, 2024; Waghay et al., 2015). Die maligne Transformation der Hepatozyten geht mit einer Gefäßverschiebung einher (Matsui et al., 2011). Bei dieser werden gutartige Veränderungen, wie regenerative oder dysplastische Knoten, von den Ästen der Pfortader gespeist, wohingegen bösartige Läsionen vor allem aus der Leberarterie versorgt werden (Matsui et al., 2011). Diese Verschiebung zeigt sich in einem Kontrastmittel-*Hyperenhancement* in der arteriellen Phase, gefolgt von einem *Washout* in der venösen oder verzögerten Phase in der kontrastverstärkten MRT oder CT (Villanueva, 2019). Zusätzlich umfassen die Bildgebungskriterien für die HCC-Diagnose die Tumorgöße und die Kontrastmittel-Anreicherung in der Tumorkapsel (Mitchell et al., 2015).

Sollte in der MRT kein charakteristisches Kontrastverhalten bei Läsionen über einem Zentimeter zu sehen sein, empfiehlt die Leitlinie eine zweite Bildgebung beispielsweise als Vierphasen-Multidetektor-CT – unverstärkt, arteriell, venös und verzögert – oder die

Feinnadelbiopsie (AWMF, 2024). Inzwischen ist allgemein anerkannt, dass die potenziellen Risiken der Biopsie – Tumorzellaussaat und Blutungen – selten auftreten und weder den Krankheitsverlauf noch das Gesamtüberleben beeinflussen (Vogel et al., 2018). Aus diesem Grund ist die Histologie in nicht-zirrhatischen Lebern eine obligate Diagnostik vor dem Beginn der definitiven Therapie (AWMF, 2024).

2.1.5 Pathologie des HCC

Die hepatozelluläre Karzinogenese ist ein komplexer und mehrstufiger Prozess (Llovet et al., 2021). Bei diesem sind die frühen Schritte der malignen hepatozellulären Transformation auf das Zusammenspiel verschiedener Faktoren zurückzuführen (Llovet et al., 2021). Diese beinhalten Wechselwirkungen zwischen nicht-viralen und viralen Faktoren, die zelluläre Mikroumgebung inklusive verschiedener Immunzellen, eine genetische Veranlagung sowie den Schweregrad der zugrunde liegenden chronischen Lebererkrankung (Llovet et al., 2021).

Im Rahmen chronischer Lebererkrankungen kommt es zum Einwandern von Entzündungszellen, die durch die Produktion von Zytokinen die Proliferation der Hepatozyten fördern (Svinka et al., 2014). Außerdem erhöht die entzündungsbedingte ROS-Bildung die Wahrscheinlichkeit für DNA-Schäden und Mutationen in den Hepatozyten (Marra et al., 2011). Im Zuge der anschließenden DNA-Replikation und Zellteilung kommt es infolgedessen zu einer Ausbreitung der Hepatozyten-Populationen mit genetischen Veränderungen (Svinka et al., 2014). Folglich ist die Wahrscheinlichkeit der Akkumulation weiterer tumorfördernder Mutationen erhöht und setzt die Karzinogenese in Gang (Svinka et al., 2014).

Das wesentliche Tumormerkmal der veränderten Mikroumgebung kann in allen Tumorstadien Einfluss auf die Progression nehmen (Llovet et al., 2021). Im Falle chronischer Leberentzündungen und des HCCs wird dieses Milieu durch leberansässige Zellen wie hepatische Sternzellen (HSCs), Kupffer-Zellen und sinusoidale Zellen sowie durch infiltrierende Leukozyten wie neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und daraus abgeleitete Makrophagen beeinflusst (Lurje et al., 2020). Von diesen Zellen abgegebene Immunsignale wie der Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-6 und Lymphotoxin- α können die Karzinogenese beschleunigen sowie die Aggressivität des Tumors beeinflussen (Seehawer et al., 2018; Yuan et al., 2017). Transkriptomanalysen menschlicher HCCs zeigen, dass die wichtigsten an der Förderung der hepatischen Karzinogenese beteiligten Entzündungssignalwege der JAK-STAT-Signalweg sowie der NF κ B-Signalweg sind (Hoshida et al., 2008; Llovet et al., 2021).

2.1.6 Klassifikation

Im Zuge der Klassifizierung des HCCs stellt die Evaluation der Tumorlast, der Leberfunktion sowie der körperlichen Leistungsfähigkeit einen relevanten Aspekt dar (AWMF, 2024; Malek et al., 2014).

Mithilfe bildgebender Verfahren wird die Tumorlast anhand der Größe und Anzahl der Tumorknoten sowie anhand einer möglichen makrovaskulären Tumorinvasion oder einer extrahepatischen Ausbreitung ermittelt (Villanueva, 2019).

Klassischerweise wird die Leberfunktion von Zirrhose-Patienten mit dem Child-Pugh-Scoring-System bewertet, welches die Parameter Serumalbumin, Serumbilirubin, Prothrombinzeit, Aszites und hepatische Enzephalopathie berücksichtigt (Agné & Lankisch, 2016). Daraus abgeleitet können fünf bis 15 Punkte ermittelt werden, die eine Klassifikation in die Stadien Child A bis Child C erlaubt, wobei ein höherer Score mit einer schlechteren Leberfunktion und Prognose einhergeht (Agné & Lankisch, 2016).

Innerhalb des Child A Stadiums kann darüber hinaus der Albumin-Bilirubin-Score berechnet werden, welcher eine weitere Einteilung in drei Stadien ermöglicht, die mit der Prognose des HCCs und der Leberfunktion korrelieren (Johnson et al., 2015). Die Formel für diesen ALBI-Score lautet:

$$\text{ALBI-Score} = (\log_{10} \text{Bilirubin} \times 0,66) \times (\text{Albumin} \times 0,085)$$

Die körperliche Leistungsfähigkeit kann mithilfe des *Performance Status* der *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) ermittelt werden (Oken et al., 1982). Anhand einer fünfstufigen Skala werden hierbei das allgemeine Wohlbefinden des Patienten sowie seine Fähigkeit, bestimmte alltägliche Aktivitäten ohne fremde Hilfe auszuführen, bewertet (Oken et al., 1982). Höhere Werte deuteten hierbei auf eine stärkere Einschränkung des Patienten (Oken et al., 1982).

2.1.7 Therapie

Im Jahr 1999 wurde für Lebertumore das *Staging-System* der Barcelona Clinic (BCLC) entwickelt und zuletzt im Jahr 2022 aktualisiert (Abbildung 1; Llovet et al., 1999; Tsilimigras et al., 2022). Dieses ist ein gängiges Tool zur Auswahl einer geeigneten Therapie des HCCs und zur Beurteilung der zugehörigen Prognose (Llovet et al., 1999). Das BCLC-*Staging-System* verknüpft tumorbedingte Symptome, das Tumorstadium und die Leberfunktion mit einem evidenzbasierten Behandlungsalgorithmus (Vogel et al., 2018). Grundsätzlich sind Patienten mit Karzinomen in einem frühen Stadium (BCLC 0-

A) die bevorzugten Kandidaten für eine Transplantation, Resektion oder lokale Ablation (AWMF, 2024). Für Patienten in mittleren Stadien (BCLC B) kommt zunächst die transarterielle Chemoembolisation (TACE) oder transarterielle Radioembolisation (TARE) in Frage (AWMF, 2024). Je nach Tumorgröße und AFP-Wert kann bei diesen Patienten auch eine Transplantation oder bei nicht nachweisbarem Pfortaderfluss sowie diffus infiltrativer Ausbreitung eine systemische Therapie durchgeführt werden (Tsilimigras et al., 2022). Patienten mit einer fortgeschrittenen Erkrankung (BCLC C) erhalten eine systemische Therapie (AWMF, 2024). Patienten im BCLC-Stadium D haben oft eine Überlebensrate von weniger als drei Monaten, weshalb in diesen Fällen die Symptom- und Schmerzkontrolle im Sinne einer *best supportive care* im Vordergrund steht (AWMF, 2024; Llovet et al., 2021; Vogel et al., 2018).

Evidenzbasierter Behandlungsalgorithmus des HCCs anhand der BCLC-Stadien

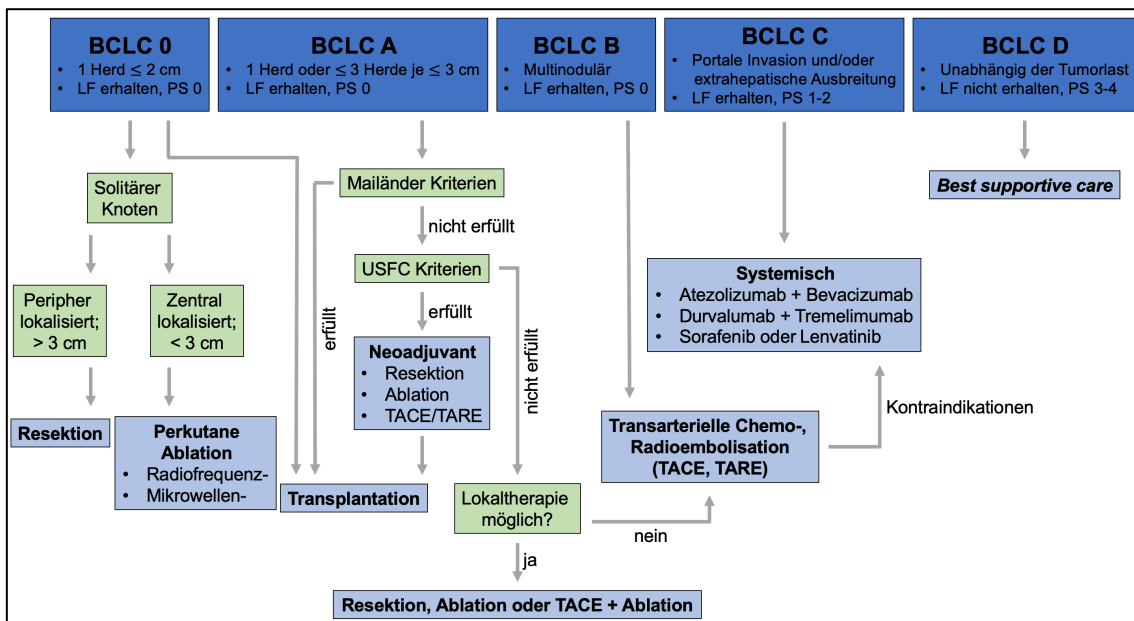


Abbildung 1: Evidenzbasierter Behandlungsalgorithmus des HCCs anhand der BCLC-Stadien. Einteilung in die BCLC-Stadien 0-D anhand der Tumorlast und Tumorverteilung, anhand der *Performance Status* der ECOG sowie der Leberfunktion, beurteilt nach Child-Pugh-Klassifikation, ALBI-Score, AFP-Wert und MELD-Score (berücksichtigt Serum-Bilirubin, INR, Serum-Kreatinin). Zuordnung der entsprechenden Therapieempfehlung. LF = Leberfunktion. Erstellt mit PowerPoint und modifiziert nach (AWMF, 2024; Tsilimigras et al., 2022).

Das primäre Therapieverfahren für Patienten der BCLC-Stadien A mit kurativ behandelbarem HCC stellt die Lebertransplantation dar (AWMF, 2024). Die Auswahl geeigneter Patienten erfolgt hierbei in Anlehnung an die Mailänder Kriterien. Nach diesen kommen diejenigen Patienten direkt für eine Transplantation in Betracht, die einen einzelnen Knoten unter fünf Zentimetern oder drei Knoten mit einem jeweiligen Durchmesser unter drei Zentimetern aufweisen (AWMF, 2024). Bei einer voraussichtlichen Wartezeit auf ein Spenderorgan von mehr als drei Monaten besteht für diese Patienten die Möglichkeit, die Zeit therapeutisch zu überbrücken (Vogel et al.,

2018). Für dieses sogenannte *Bridging* bietet sich sowohl die TACE/TARE als auch die lokale Ablation oder Resektion an, um den Progress des Karzinoms in der Wartezeit zu minimieren (AWMF, 2024). Bei Kontraindikationen gegen die Durchführung der Lokalthherapie ermöglicht die *Stereotactic Body Radiotherapy* eine hochpräzise Bestrahlung des Tumors (AWMF, 2024). Erfüllt ein Patient die Mailänder Kriterien nicht, erfassen die *University of California San Francisco-* (UCSF-) Kriterien diejenigen Patienten, die an einem solitären Knoten unter 6,5 Zentimetern oder an maximal drei Herden unter 4,5 Zentimetern und einer Summe der addierten Karzinomdurchmesser unter acht Zentimetern erkrankt sind (AWMF, 2024). Für diese Patienten kommt eine neoadjuvante Therapie in Form einer lokalen Ablation, Resektion oder TACE/TARE in Frage (AWMF, 2024). Diese kann zu einem *Downstaging* führen, sodass die Tumore anschließend innerhalb der Mailänder Kriterien liegen und der Patient einer Transplantation zugeführt werden kann (AWMF, 2024). Darüber hinaus ist eine Grundvoraussetzung für die Transplantation das Fehlen von Anzeichen für Fernmetastasen oder für eine Gefäßinvasion (AWMF, 2024).

Neben dem Einsatz der operativen Resektion im Rahmen des *Bridgings* und *Downstagings* kommt die Resektion auch als alternatives primäres Therapieverfahren bei Patienten der BCLC-Stadien 0-A in Betracht, die an einem solitären Knoten leiden (AWMF, 2024; Vogel et al., 2018). Idealerweise liegt dieser peripher in der Leber und ist daher gut zugänglich für ein offenes oder minimalinvasives Operationsverfahren (AWMF, 2024). Zu beachten ist jedoch, dass die Resektion die zugrundeliegende Lebererkrankung nicht therapiert. Dies führt dazu, dass Patienten in 29% der Fälle nach einem Jahr und in 65% der Fälle nach fünf Jahren ein Rezidiv erleiden (Arnaoutakis et al., 2014; Lang et al., 2007).

Perkutane Ablationsverfahren beinhalten die Radiofrequenzablation (RFA) und die Mikrowellenablation (MWA) und stellen einen minimalinvasiven Ansatz zur lokalen Tumorthherapie dar (AWMF, 2024; Waghray et al., 2015). Hierbei ergibt sich das therapeutische Wirken aus der thermischen Tumornekrose (Curley, 2001). Die Verfahren zeigten bei Erkrankungen im Frühstadium und einer Tumorgöße von unter drei Zentimetern ähnliche Ergebnisse wie die Resektion und kommen daher ebenso zum Einsatz (Cucchetti et al., 2013). Bei HCCs unter drei Zentimetern und einer zentralen Lokalisation sowie einer eingeschränkten Leberfunktion ist die perkutane Ablation gegenüber der Resektion vorzuziehen (AWMF, 2024). Im Vergleich zur Operation weist die Ablation zudem eine geringere Invasivität und Morbidität auf (Cucchetti et al., 2013).

Die fast ausschließlich über die Arteria hepatica erfolgende Blutversorgung des HCCs führte zur Anwendung intraarterieller Therapien (Waghray et al., 2015). Diese umfassen

die Applikation von Chemotherapeutika wie Anthrazyklinen, Platinderivaten und/oder Mitomicin C (AWMF, 2024). Während der Durchführung intraarterieller Therapien bleibt das angrenzende nicht-tumoröse Gewebe eher von den therapeutischen Interventionen verschont, da dieses hauptsächlich aus der Pfortader gespeist wird (Villanueva, 2019). Leitlinienkonform kommt die TACE bei Patienten der BCLC-Stadien A oder B zum Einsatz, deren Leberfunktion erhalten ist, für die eine kurative Therapie aber nicht in Frage kommt (AWMF, 2024).

Patienten des BCLC-Stadiums C bilden die Kandidaten für eine systemische Therapie (Vogel et al., 2018). Schätzungsweise erreichen 50-60% der HCC-Patienten im Laufe ihres Lebens diesen Therapiezeitpunkt (Llovet et al., 2018). Als wirksamste Systemtherapie gilt derzeit die Kombination des PD-L1-Antikörpers Atezolizumab mit dem VEGF-Antikörper Bevacizumab, alternativ die Kombination des PD-L1-Antikörpers Durvalumab mit dem CTLA-4-Antikörper Tremelimumab (AWMF, 2024; Finn et al., 2020). Als Immuncheckpoint-Inhibitoren stellen Atezolizumab, Durvalumab und Tremelimumab die T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion und auf diesem Wege die gegen den Tumor gerichtete Aktivität der Effektor-T-Zellen wieder her (Liu et al., 2021). Der *Vascular Endothelial Growth Factor* vermittelt die Angiogenese in primären Lebertumoren (Liu et al., 2021). Außerdem wirkt der VEGF über eine Inhibition der Reifung dendritischer Zellen, eine verstärkte Infiltration immunsuppressiver Zellen und eine gesteigerte Expression von Immuncheckpoint-Molekülen immunsuppressiv (Liu et al., 2021). Über eine Antagonisierung des VEGF werden somit die Gefäßneubildung gehemmt und die Immunantwort gefördert (Liu et al., 2021). Bei Kontraindikationen gegen die Kombinationstherapie wird eine Einzeltherapie mit dem PD-L1-Antikörper Durvalumab oder den Tyrosinkinase-Inhibitoren Sorafenib oder Lenvatinib durchgeführt (AWMF, 2024).

2.1.8 Prognose

Nach erfolgter Karzinom-Resektion kommt es in 50-70% der Fälle innerhalb von fünf Jahren zu einem Rezidiv (Vogel et al., 2018). Tritt dieses innerhalb von zwei Jahren nach der Operation auf, handelt sich dabei meist um intrahepatische Metastasen (Vogel et al., 2018). Ein neues HCC innerhalb der noch immer zirrhotischen Leber entwickelt sich dagegen meist erst nach dem Ablauf von zwei Jahren (Vogel et al., 2018).

Im Falle einer durchgeführten Transplantation korreliert das Rezidivrisiko zudem mit dem Alter des Organspenders und war bei Spendern über 60 Jahren um 70% erhöht (Filgueira, 2019). Mögliche Ursachen für dieses Phänomen könnten die geringere

Toleranz gegenüber Konservierungsverletzungen und eine erhöhte Anfälligkeit für eine Kälteischämie sein (Sharma et al., 2012).

Des Weiteren lieferten eine mikro- und/oder makrovaskuläre Invasion, eine schlechte Differenzierung, eine AFP-Konzentration über 16 ng/mL und im Falle einer Transplantation ein geringes vorheriges Ansprechen auf eine TACE Hinweise auf eine erhöhte Rezidiv-Wahrscheinlichkeit (Berry & Ioannou, 2013; Sandow et al., 2019). Zudem war diese proportional zum Durchmesser des größten Knoten (Filgueira, 2019).

Ein weiterer prognostischer Marker ist das Neutrophilen-Lymphozyten-Verhältnis (NLR) im peripheren Blut. Bei einigen Tumoren kommt es zu einer Entzündungsreaktion, die zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Zytokinen führt und somit das Risiko für eine Metastasierung durch Hemmung der Apoptose, durch eine Förderung der Angiogenese und von DNA-Schäden erhöht (Filgueira, 2019; Halazun et al., 2009).

Insgesamt ist das HCC noch immer mit einer sehr geringen 5-Jahres-Überlebensrate von 18% behaftet und stellt den weltweit am dritthäufigsten zum Tode führenden malignen Tumor dar (Bahardoust et al., 2023; El-Khoueiry et al., 2023; Jemal et al., 2017).

2.2 Die Infektion mit *Schistosoma mansoni*

2.2.1 Epidemiologie

Die Schistosomiasis, auch Bilharziose genannt, ist neben der Malaria eine der häufigsten parasitären Infektionskrankheiten des Menschen (Palumbo, 2007). Der WHO zufolge sind weltweit mehr als 250 Millionen Menschen betroffen, von denen 201,5 Millionen in Afrika leben (McManus et al., 2018). Unter den Infizierten beträgt der Anteil derjenigen, die mit der Spezies *S. mansoni* infiziert ist, ca. 100 Millionen (Löscher & Burchard, 2010). Hinzu kommen 779 Millionen Menschen, die einem Risiko der Infektion ausgesetzt sind (McManus et al., 2018). Jährlich deklariert die WHO 200.000 Todesfälle in Afrika als direkte Folge der Schistosomiasis (Ignatius & Burchard, 2020).

Dennoch handelt es sich bei Schistosomiasis um eine sogenannte vernachlässigte Tropenkrankheit (*Neglected tropical disease*) (Kokaliaris et al., 2022). Infektionskrankheiten wie Malaria oder HIV imponieren mit einer hohen Krankheitslast und ziehen daher den Großteil der Finanzmittel und Rahmenregelungen der öffentlichen Gesundheit von Organisationen wie beispielsweise der WHO auf sich (Pisarski, 2019).

Dies führt dazu, dass eine Großzahl der Infektionskrankheiten unerkannt und zum Teil unbehandelt bleibt (Pisarski, 2019).

Eine Folge dieser Vernachlässigung ist die Tatsache, dass eine Infektion durch Schistosomen unter den Tropenkrankheiten weltweit eine häufige Ursache für Mortalität und Morbidität darstellt (Vennervald & Dunne, 2004).

Unter den Schistosomen-Spezies gibt es sechs humanpathogene: *S. haematobium* kommt insbesondere in Afrika und im Nahen Osten vor, während sich das Endemiegebiet von *S. japonicum* auf Asien, vor allem auf die Philippinen und China fokussiert (Colley et al., 2014). *S. mansoni* ist ebenfalls in Afrika südlich der Sahara verbreitet (Colley et al., 2014). Zudem erstrecken sich die Endemiegebiete auf Libyen, das Nildelta und auf die Arabische Halbinsel (Colley et al., 2014). Im 16. Jahrhundert wurde *S. mansoni* zudem in die USA importiert und ist heute in der Karibik und an der südamerikanischen Ostküste endemisch (Löscher & Burchard, 2010). Neben dieser Hauptgruppe gibt es noch drei weitere Arten, die Erkrankungen beim Menschen auslösen können: *S. mekongi* im Mekong-Becken sowie *S. intercalatum* und *S. guineensis* in Zentral- und Westafrika (Colley et al., 2014).

Innerhalb der genannten Endemiegebiete fällt eine fokale Ausbreitung von Infektionsherden auf (McManus et al., 2018). Schon in einem Dorf weisen Intensität der Infektion und Prävalenz eine starke Variabilität auf, die durch das Zusammenspiel von Zwischenwirtsschnecken, Menschen und Mensch-Wasser-Kontaktmustern bestimmt wird (McManus et al., 2018). Letzteres ist insofern relevant, da der Kontakt mit den infektiösen Zerkarien beim Baden, Durchwaten sowie Waschen an und in verseuchten Gewässern erfolgt (McManus et al., 2018). Ein unzureichender Zugang zu sauberem Wasser, mangelnde Hygiene und sanitäre Einrichtungen amplifizieren das Risiko einer Infektion (McManus et al., 2018). Daher betrifft die Schistosomiasis oft ärmere Bevölkerungsgruppen, die in ländlichen oder in benachteiligten städtischen und stadtnahen Regionen leben (Tchuenté et al., 2017).

In den Endemiegebieten handelt es sich bei der Schistosomiasis in erster Linie um eine chronische und über Jahrzehnte andauernde Infektion, die durch eine wiederholte Exposition gegenüber den infektiösen Zerkarien in Gewässern entsteht (Colley & Secor, 2014). Die Erstinfektion erfolgt oft schon in den ersten Lebensmonaten (Tchuenté et al., 2017). Aufgrund der wiederholten Ansiedlung neuer Würmer in den Körpern der Heranwachsenden nimmt die Infektionslast in den nächsten Jahren zu (Colley et al., 2014). Zwischen dem zehnten und 19. Lebensjahr erreicht die Intensität und auch die Prävalenz ein Maximum (Löscher & Burchard, 2010). Anschließend nimmt die Intensität

deutlich ab, was sich durch einen Rückgang der Eiausscheidung äußert (Löscher & Burchard, 2010). Nach dem 30. Lebensjahr folgt auch die Prävalenz dem Abwärtstrend (Löscher & Burchard, 2010). Dieser Rückgang der Prävalenz ist wahrscheinlich auf eine fortlaufende Exposition gegenüber Antigenen unterschiedlicher Entwicklungsstufen und auf die damit zusammenhängende Reifung der Immunantwort zurückzuführen (Colley & Secor, 2014). Dennoch bleiben 20-40% der Erwachsenen aktiv infiziert (Colley & Secor, 2014). Bei dieser Teilgruppe handelt es sich oft um Menschen, die häufig Kontakt zu Gewässern haben (Colley et al., 2014). Insbesondere landwirtschaftliche Berufe wie Reisbauern, Fischer, Arbeiter in Bewässerungsanlagen und Wäscherinnen sind von dieser anhaltenden Prävalenz betroffen (Löscher & Burchard, 2010). Auffällig innerhalb der auch im Erwachsenenalter aktiv infizierten Teilgruppe ist eine Prädominanz des männlichen Geschlechts (Löscher & Burchard, 2010).

Epidemiologisch relevant ist ebenfalls die zunehmende Ausbreitung der Schistosomiasis in Regionen außerhalb der bisherigen Endemiegebiete. Der Klimawandel fördert die Neuansiedlung der Zwischenwirte und die Industrialisierung der Entwicklungsländer, der zunehmende Tourismus in Endemiegebiete sowie eine Migration der Bevölkerung führt zu einem Einschleppen der Parasiten (Jauréguiberry et al., 2010; Laval et al., 2014; Patz et al., 2000; Ross et al., 2007; Steinmann et al., 2006). So ergab ein Screening afrikanischer Einwanderer in Spanien und Italien eine Bilharziose-Prävalenz von 12,3% respektive 17% (Gabrielli & Garba Djirmay, 2023). Dies hat zur Folge, dass seit dem Jahr 2000 Ausbrüche der urogenitalen Schistosomiasis in Portugal, Spanien und Frankreich verzeichnet wurden (Gabrielli & Garba Djirmay, 2023). Im Jahr 2003 infizierten sich vier Landwirte in einem Teich in einem Gebiet in Andalusien, das von Migranten aus Subsahara Afrika besiedelt wurde (Gabrielli & Garba Djirmay, 2023). Verursacht wurde ein Ausbruch auf Korsika im Jahr 2014 durch einen Hybrid zwischen *S. haematobium*, der seinen Ursprung wahrscheinlich im Senegal hat, und *S. bovis*, einem Parasiten der Viehzucht (Boissier et al., 2016).

2.2.2 Ätiologie

Bei den Parasiten der Schistosomiasis handelt es sich um Trematoden der Gattung *Schistosoma* (Colley et al., 2014). Diese sind im adulten Zustand ca. sieben bis 20 mm lang und besitzen einen zylindrischen Körper, der zwei endständige Saugnäpfe, ein komplexes Tegument, einen blinden Verdauungstrakt und Fortpflanzungsorgane aufweist (Gryseels et al., 2006). Im Gegensatz zu anderen Trematoden lebt die Gattung *Schistosoma* getrenntgeschlechtlich (Gryseels et al., 2006). Der Körper des Männchens

ist blattförmig abgeplattet und bildet mit den außenstehenden Rändern einen gynäkophoren Kanal, in dem sich das runde Weibchen befindet (Ignatius & Burchard, 2020). Als verbundenes Paar leben die Parasiten im Venengeflecht des Wirtes, wobei es sich im Falle von *S. mansoni* um die mesenterialen Venen handelt (Gryseels et al., 2006). Die Ernährung der Würmer erfolgt über die Aufnahme und Verdauung von Blut und Globulinen durch anaerobe Glykolyse (Gryseels et al., 2006). Aufgrund ihres blind endenden Verdauungstraktes können sie jedoch keine Abfallprodukte ausscheiden, so dass sie diese in den Blutkreislauf regurgitieren (Colley et al., 2014).

Im Durchschnitt leben Schistosomen drei bis zehn Jahre, wobei in einigen Fällen auch von einer Lebensdauer von fast 40 Jahren berichtet wurde (Chabasse et al., 1985).

Jede Schistosomenart hat ein spezifisches Spektrum geeigneter Schneckenwirte, weshalb ihre Verbreitung vom Lebensraumangebot ihrer Wirtsschnecken abhängig ist (Löscher & Burchard, 2010). Schistosomen der Spezies *S. mansoni* benötigen die aquatischen Süßwasserschnecken *Biomphalaria*, welche als solche fast immer auf dauerhaftes Wasser angewiesen sind (Löscher & Burchard, 2010). Die *Biomphalaria* Schnecken bevorzugen stehende oder langsam fließende Gewässer wie Tümpel, Teiche, Wassergräben, Bewässerungskanäle, Drainagen oder Reisfelder (Löscher & Burchard, 2010). Jedoch kommen sie auch am Rande von großen Seen, breiten Bewässerungskanälen und Flüssen vor (Löscher & Burchard, 2010).

2.2.3 Lebenszyklus

Im Süßwasser schlüpfen aus den Schistosomen-Eiern unter geeigneten Bedingungen wie einem nicht zu hohen Salzgehalt sowie bei Temperaturen von 18-35°C die Mirazidien (Abbildung 2; Franz, 2001). Diese besitzen aufgrund zahlreicher Zilien auf ihrer Membran die Fähigkeit, sich schnell und weit im Wasser fortzubewegen (Löscher & Burchard, 2010). Dabei werden sie von optischen und gattungsspezifischen chemotaktischen Molekülen ihrer Zwischenwirte angelockt (Löscher & Burchard, 2010). Nach dem Eindringen in die Süßwasserschnecke verliert das Mirazidium seine Membran und entwickelt sich zur schlauchförmigen Muttersporozyste (Löscher & Burchard, 2010). Daraufhin vermehrt sich diese vegetativ über mehrere Generationen sekundärer Sporozysten und erreicht letztendlich nach durchschnittlich einem Monat das Stadium der Zerkarie (Löscher & Burchard, 2010). Nach insgesamt vier bis sechs Wochen beginnen die Zerkarien, die Schnecke zu verlassen (Gryseels et al., 2006). Diese Ausscheidung wird durch Licht provoziert und findet daher hauptsächlich tagsüber statt (Löscher & Burchard, 2010). Somit fällt die Zeit des hauptsächlichlichen Mensch-Wasser-

Kontaktes mit der maximalen Zerkarien-Ausschüttung zusammen (Löscher & Burchard, 2010).

Der Lebenszyklus von *S. mansoni*

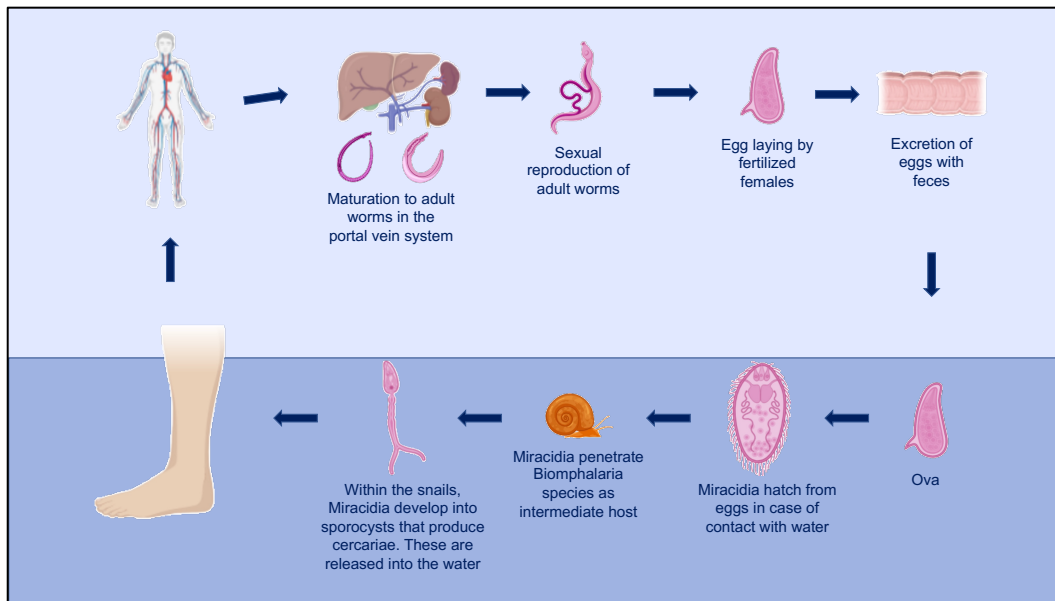


Abbildung 2: Der Lebenszyklus von *S. mansoni*. Modifiziert nach (Pfeil et al., 2017) und erstellt mit biorender.com.

Im Wasser veranlassen spezifische Fettsäuren humaner Haut die Zerkarien zur Anheftung an diese mithilfe eines Saugnapfes und zur anschließenden Penetration (Löscher & Burchard, 2010). Enzyme der Zerkarien wie die Elastase der Azetabulardrüsen und mechanische Aktivität ermöglichen das perkutane Eindringen (Löscher & Burchard, 2010). Nachdem die Zerkarie in die Haut eingedrungen ist, wirft sie ihren Ruderschwanz und die Glykokalix ab und wird fortan als Schistosomulum bezeichnet (Löscher & Burchard, 2010). Mit dem Lymph- oder Blutstrom gelangen die Schistosomula nach fünf bis sieben Tagen in die Lunge, von wo aus sie nach weiteren zwei Wochen erneut in den arteriellen Kreislauf und damit zur Leber transportiert werden (Schwartz & Fallon, 2018). Nach dem Heranwachsen und Reifen der adulten Würmer in den hepatischen Sinusoiden verlassen sie die Leber erneut, da sie es vorziehen, in der geräumigeren und besser mit Sauerstoff sowie Nährstoffen versorgten Pfortader zu leben und zu kopulieren (Barsoum et al., 2013). Gemeinsam wandert das Wurmpaar anschließend gegen den Pfortaderfluss in die Mesenterialvenen (Drudge-Coates & Turner, 2013). Diese Wanderung ist möglicherweise durch vom Wirt stammende Signale wie Hormone oder aus dem Darmlumen resorbierte Verdauungsprodukte gesteuert (Cheever & Duvall, 1982; Costain et al., 2018). Außerdem eignen sich Regionen mit geringerer Scherspannung, damit die gelegten Eier nicht mit dem Blutfluss weggeschwemmt werden (Cheever & Duvall, 1982; Costain et al., 2018). Innerhalb der

Blutgefäße entziehen sich die Schistosomen erfolgreich dem Immunsystem und legen täglich schätzungsweise 300 Eier pro Paar (Alwan & Loverde, 2021; Colley et al., 2014).

Bei der Neuablage bestehen die Eier aus einer Eizelle, 30-40 Dotterzellen und einer vernetzten Proteinhülle (Mathieson & Wilson, 2010). Noch im Körper des Wirtes differenziert sich die Eizelle in das Mirazidium (Mathieson & Wilson, 2010). Der Prozess dauert fünf bis sechs Tage und beinhaltet zudem den Abbau der Dotterzellen, vermutlich um das Mirazidium zu ernähren (Mathieson & Wilson, 2010). Außerdem resorbiert das sich entwickelnde Ei Nährstoffe aus der Umgebung des Wirtes, wodurch es zu einer Vergrößerung seines Volumens um das Dreifache kommt (Mathieson & Wilson, 2010).

Um nun ihren Lebenszyklus fortzusetzen, müssen die Eier die Gefäße verlassen und im Falle von *S. mansoni* über den Darm ausgeschieden werden (Costain et al., 2018). Die Schistosomen-Eier besitzen keine intrinsischen Bewegungsmechanismen (Costain et al., 2018). Aus diesem Grund sind sie auf vom Wirt gesteuerte Umgebungsprozesse angewiesen, um die Darmbarriere zu überwinden (Costain et al., 2018). Die weiblichen Schistosomen unterstützen den Ausscheidungsprozess, indem sie das Ei bereits während der Ablage durch Muskelkontraktionen in ihren Genitalporen in das Endothel vorschieben (Linder, 2017). Sobald es zum Ei-Endothel-Kontakt gekommen ist, unterstützen verschiedene Adhäsionsmechanismen das Haften der Eier. Adressierte Adhäsionsmoleküle auf dem Endothel sind hierbei beispielsweise das *intracellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), das *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) und E-Selektin, wobei die Bindung an E-Selektin durch eine Komponente der Eischale vermittelt wird, die mit Lewis-x-Motiven glykosyliert ist (Lejoly-Boisseau et al., 1999; Ritter & McKerrow, 1996). In Studien wurde als Reaktion auf die Eier und auf vom Ei ausgeschüttete Faktoren eine Hochregulierung von ICAM-1 beobachtet (Lejoly-Boisseau et al., 1999). Des Weiteren korrelierte der Spiegel von löslichem ICAM-1 bei infizierten Patienten positiv mit der Eiausscheidungsrate (Secor et al., 1994). Zusätzlich können Schistosomen-Eier an hämostatische Komponenten wie die Plasmaproteine von-Willebrand-Faktor (vWF), Fibrin oder Fibrinogen binden, die die frisch abgelegten Eier bald umgeben (Dewalick et al., 2014; Linder, 2017; Sadler, 1998; Wu et al., 2007). Insbesondere der vWF könnte die anfängliche Anheftung an das geschädigte oder aktivierte Endothel unterstützen (Costain et al., 2018).

Mit dem Ziel der schützenden Abgrenzung des Wirtes vom Darminhalt wird die Darmwand aus dicht beieinander liegenden Darmepithelzellen gebildet, die mit einem Netz von Immunzellen kommunizieren (Costain et al., 2018). *Tight Junctions* sind Multiproteinkomplexe, die benachbarte Darmepithelzellen an ihrer apikalen Membran verbinden und somit eine praktisch undurchlässige Barriere bilden (Lee, 2015). Auf diese

Weise wird die parazelluläre Permeabilität reguliert (Lee, 2015). Verschiedene durch die Infektion ausgelöste Immunreaktionen können in diesem Kontext die Barrierefunktion beeinflussen. So ist während der chronischen Schistosomiasis die Konzentration von Interleukin-13 im Kolon erhöht (Driss et al., 2016). Dieses verursacht eine verstärkte Expression des porenbildenden *Tight-Junction*-Moleküls Claudin-2 (Heller et al., 2005). Außerdem können proinflammatorische Mediatoren wie $\text{TNF}\alpha$ und/oder Interferon γ ($\text{IFN}\gamma$) die *Tight Junctions* unterbrechen (Holzscheiter et al., 2014).

Schätzungsweise erreichen auf diese Weise 20-55% der Eier das Darmlumen und werden über die Defäkation im Wasser in dieses freigesetzt (Costain et al., 2018). Der Rest der Eier wird jedoch in andere Organe geschwemmt, in denen sie sich festsetzen (Colley et al., 2014). Dies verursacht eine vom Immunsystem vermittelte granulomatöse Reaktion um das eingeschwemmte Ei, die für den Hauptteil der systemischen und lokalen pathologischen Effekte verantwortlich ist (Chatterji et al., 2024; Colley et al., 2014). Die Th2-Immunreaktion korreliert erstaunlicherweise umgekehrt proportional mit der hepatischen Eilast (Russ et al., 2024).

2.2.4 Pathologie der Schistosomiasis

Die ausgewachsenen Schistosomen besiedeln oft jahrelang die kleinsten erreichbaren Venen des intestinalen Systems (Colley et al., 2014; Löscher & Burchard, 2010). Dort legt jedes Paar durchschnittlich 300 Eier pro Tag (Alwan & Loverde, 2021), die entweder über den Darm ausgeschieden oder in andere Organe wie die Leber gespült werden, in der sie sich in den präsinusoidalen Portalgefäßen festsetzen (Löscher & Burchard, 2010). Die Eischale besteht aus Proteinen, die über Tyrosin vernetzt sind und die eine wichtige Funktion bei der Resistenz gegenüber dem Immunsystem besitzen (Löscher & Burchard, 2010). Innerhalb der Eischale ermöglichen Mikroporen den Austausch des Mirazidiums mit dem umgebenden Parenchym (Löscher & Burchard, 2010).

Während seiner drei- bis vierwöchigen Lebenszeit in den festgesetzten Eiern produziert das Mirazidium verschiedene Glykoproteine, Stoffwechselprodukte und Proteine, die als *soluble egg antigens* (SEA) bezeichnet werden (Löscher & Burchard, 2010). Unter den SEA-Bestandteilen bildet ein Anteil die sekretorische oder exkretorische Fraktion (ES), die zu Lebzeiten des Mirazidiums aktiv vom Ei ausgeschieden wird (Hams et al., 2013). Andere SEA-Komponenten treten dagegen erst nach dem Absterben der Eier mit dem umliegenden Gewebe in Kontakt (Hams et al., 2013). Insgesamt konnten bereits über 1.000 SEA-Proteine nachgewiesen werden, die ein breites Spektrum an Funktionen und Zielen besitzen und sowohl nukleäre und zytosolische Proteine innerhalb der Zelle als

auch sekretorische und Membranproteine außerhalb der Zelle adressieren (Ashton et al., 2001; Hams et al., 2013; Mathieson & Wilson, 2010). Auf diesem Weg interagieren die Schistosomen-Eier proaktiv mit dem Wirt, um das Immunsystem zu beeinflussen und um ihre Ausscheidung zu erreichen (Schwartz & Fallon, 2018). Der Wirt schützt sich vor den potenziell hepatotoxischen und gewebeschädigenden SEA-Komponenten mit einer immunvermittelten granulomatösen Entzündung (Dunne et al., 1991; Hams et al., 2013). Diese soll das Parenchym größtenteils abschirmen und die Pathologie eindämmen (Colley et al., 2014). Bei den entstehenden Granulomen handelt es sich um vielzellige und hoch organisierte Strukturen (Costain et al., 2018). Sie sind mit verschiedenen Immunzellen wie M2-Makrophagen, Th2-Zellen, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen angereichert und akkumulieren Th2-Zytokine (Costain et al., 2018). Zusätzlich sind ebenfalls Stromazellen und Fibroblasten an der Granulombildung in der Leber beteiligt (Costain et al., 2018). Im Laufe der Zeit werden die Granulome der Leber fibrotisch, worauf eine zunehmende Obstruktion portaler Gefäße und die Ausbildung einer portalen Hypertension folgt (Schwartz & Fallon, 2018).

2.2.5 Inflammation

Die Leber enthält eine Vielzahl von Immunzellen, die an der Abwehr von Krankheitserregern beteiligt sind. Zu diesen Immunzellen gehören die T-Lymphozyten, die im Allgemeinen in CD8⁺ zytotoxische T-Zellen und in CD4⁺ T-Helferzellen (Th-Zellen) unterteilt werden (Zheng et al., 2020). Letztere spielen eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort des Wirtes gegen eingedrungene Parasiten (Zheng et al., 2020). Anhand von spezialisierten Funktionen und der Produktion charakteristischer Zytokine werden die Th-Zellen in verschiedene Subtypen eingeteilt (Zheng et al., 2020). Diese variable phänotypische Entwicklung wird maßgeblich von der lokalen Mikroumgebung in einem Gewebe bestimmt und unterliegt der Regulation durch verschiedene andere Immunzellen über ein interagierendes Netzwerk (Zheng et al., 2020).

Im Falle einer *S. mansoni*-Infektion durchlebt der Parasit verschiedene Entwicklungsstufen im Wirt, die starken Einfluss auf die Immunreaktion haben (Löscher & Burchard, 2010). In den ersten drei bis fünf Wochen wandern die unreifen Schistosomula durch das Gefäßsystem und provozieren dabei eine Th1-dominante Immunabwehr (Hams et al., 2013). Diese ist durch proinflammatorische Zytokine wie den TNF α , Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und IFN γ gekennzeichnet (Zheng et al., 2020).

TNF α bindet an zwei verschiedene Rezeptoren und kann so entweder eine Entzündung, den Zelltod oder die Proliferation auslösen (Wajant et al., 2003). Die unterschiedliche Wirkung hängt dabei von den Signalwegen ab, die durch die Rezeptorbindung aktiviert werden. Diese beinhalten die Aktivierung der Aktivator-Protein-1- (AP-1-) Transkriptionsfaktoren über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) oder die Einschaltung von NF κ B über die I κ B-Kinasen (IKK) (Brenner et al., 1989; DiDonato et al., 1997; Liu et al., 1996). Über die Produktion proinflammatorischer Zytokine hält NF κ B die entzündliche Mikroumgebung in den Hepatozyten aufrecht (He & Karin, 2011). Bei einem dieser Zytokine handelt es sich um IL-6, das seine Funktion während der Akute-Phase-Reaktion in der Leber ausübt (He & Karin, 2011).

IL-6 bindet an einen heterodimeren Rezeptor, der aus einer gp130-Signaluntereinheit und einer IL-6-bindenden IL-6-Rezeptor-Untereinheit gp80 aufgebaut ist (Kamimura et al., 2003). Die Bindung von IL-6 an den Rezeptor aktiviert Janus-Kinasen (JAK) und darüber die Effektormoleküle Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3-K/Akt), SHP-2/Ras und den Transkriptionsfaktor *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) (Grivennikov & Karin, 2008; Kamimura et al., 2003). Insgesamt scheint das Zytokin über diesen Weg relevant zu sein für Zellüberleben, Immunreaktion, Proliferation, Apoptose und Krebs (Kamimura et al., 2003; Rose-John et al., 2023). Erhöhte Konzentrationen der durch IL-6 hochregulierten Akute-Phase-Proteine Komplementkomponente 3 und Serum-Amyloidprotein wurden in *S. mansoni*-infizierten Mäusen zu Beginn der Granulomformation identifiziert (Khalil et al., 1996). Weitere Daten unterstreichen sowohl eine lokale als auch eine systemische Funktion von IL-6 bei der Immunantwort des Wirtes nach einer Infektion von Mäusen mit *S. mansoni*. Diese spiegelt sich in einem Anstieg der *Il-6*-mRNA im Lebergewebe sechs Wochen sowie in einer erhöhten Konzentration der *Il-6*-mRNA im Serum acht Wochen post infectionem wider (Khalil et al., 1996). Im chronischen Erkrankungsstadium vermuteten Mutengo et al. eine protektive Funktion von IL-6 bei der Entwicklung einer schweren Leberfibrose und hepatosplenischen Verlaufsform der Schistosomiasis (Mutengo et al., 2018). Die Autoren ermittelten eine negative Korrelation der IL-6-Expression mit dem Ausmaß der Leberfibrose in chronisch mit *S. mansoni* infizierten Patienten (Mutengo et al., 2018). Bei HCV-infizierten Patienten korreliert eine erhöhte Konzentration von IL-6 mit einem beschleunigten Progress zum HCC (Nakagawa et al., 2009).

Als Inflammasomen werden oligomere Proteinkomplexe bezeichnet, die angeborene Entzündungs- und Immunreaktionen regulieren (Kanneganti, 2010; Lamkanfi & Dixit, 2009). Gebildet werden sie aus Mitgliedern der *Nod-like* Rezeptor- (NLR-) Familie oder aus dem *Pyrin and hematopoietic interferon-inducible nuclear domain-* (PYHIN-)

Familienmitglied AIM2 (Chen et al., 2019). Beide Inflammasomen werden durch *S. mansoni* und durch reaktive Sauerstoffspezies aktiviert (Chen et al., 2019). In der Folge wird die inflammatorische Caspase-1 aktiviert, die Zytokine wie IL-1 β proteolytisch verarbeitet und sezerniert (Martinon, 2010).

Beim IFN γ handelt es sich ebenfalls um ein Th1-typisches Zytokin (Schwartz & Fallon, 2018). Eine wichtige Funktion scheint es jedoch auch während der folgenden Th2-dominanten Reaktion (s.u.) zu erfüllen. Hierbei reguliert es die Th2-Reaktion und verhindert über seine antifibrotische Funktion ein Überschießen der Fibrogenese (Wynn et al., 2004).

Mit dem Beginn der Eiablage nach vier bis sechs Wochen verändert sich die Immunreaktion (Ignatius & Burchard, 2020). Die Th1-Immunkomponente nimmt dabei ab und es folgt eine Phase der Th2-Zell-Dominanz (Colley & Secor, 2014). Diese ist charakterisiert durch eine verstärkte Produktion von Interleukin-13 (IL-13), Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-5 (IL-5), durch eine Vermehrung von basophilen und eosinophilen Granulozyten, einen Immunglobulin-Isotypwechsel zu Immunglobulin E (IgE) und IgG1 sowie durch eine Polarisierung von Makrophagen hin zu einem alternativ aktivierten Typ (Pearce & MacDonald, 2002; Schwartz & Fallon, 2018). Auslöser dieses Immunswitches sind die Eier der Schistosomen sowie Komponenten des SEA (Vella et al., 1992). Hierbei zu nennen ist insbesondere Omega-1 (ω 1), das an Mannose-Rezeptoren auf Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen (DCs) bindet und daraufhin von diesen aufgenommen wird (Schwartz & Fallon, 2018). Anschließend ist ω 1 über eine Ribonuklease-Domäne in der Lage, ribosomale RNA und mRNA abzubauen und somit eine verringerte Produktion des Th1-Zell-fördernden Zytokins IL-12 herbeizuführen (Everts et al., 2009; Everts et al., 2012). Als Reaktion auf ω 1 werden DCs so konditioniert, dass sie in naiven CD4⁺ Zellen die Entwicklung eines Th2-Phänotypes begünstigen (Everts et al., 2009; Fitzsimmons et al., 2005; Steinfelder et al., 2009). Kürzlich entdeckten Almeida et al. einen weiteren Signalweg, über den Glykoproteine des SEA DCs befähigen, eine Th2-Immunantwort auszulösen (Almeida et al., 2024). Dieser beinhaltet die Bindung an Dectin-1 und Dectin-2 auf DCs sowie eine im Anschluss hochregulierte De-Novo-Synthese von Prostaglandin E2 durch die Cyclooxygenasen 1 und 2, welches im Anschluss autokrin auf die DCs wirkt (Almeida et al., 2024).

Das IL-4-induzierende Prinzip (IPSE) aus *S. mansoni*-Eiern scheint eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der etablierten Th2-Immunantwort zu spielen (Mathieson & Wilson, 2010), indem es basophile Granulozyten zur Sekretion von IL-4 und IL-13 veranlasst (Schramm et al., 2003). Eine Kernlokalisierungssequenz im C-Terminus von IPSE vermittelt eine Infiltrin-Aktivität, ermöglicht also die Infiltration von IPSE durch die

Zellmembran und die Translokation in den Zellkern, wo es seine Funktion entfaltet (Kaur et al., 2011; Pennington et al., 2017).

Das Th2-charakteristische IL-4 gilt als wichtigstes Zytokin bei der Entwicklung der Granulome und die IL-4-Konzentration korreliert mit dem Durchmesser der Portalvene als Korrelat der portalen Hypertension aufgrund der fibrotischen Obstruktion (Elsammak et al., 2008; Zheng et al., 2020). Eine Blockierung des IL-4-Rezeptors führt entsprechend zu einer minimalen Formation hepatischer Granulome und Fibrosierung (Jankovic et al., 1999). Außerdem dominieren in IL-4-Knockout-Mäusen proinflammatorische Zytokine wie $TNF\alpha$ (La Flamme et al., 2001). Dies verdeutlicht die Relevanz von IL-4 für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Th2-Dominanz (La Flamme et al., 2001).

Ebenfalls an der Induktion der granulomatösen Entzündungsreaktion und der Fibrose sowie an der Entstehung der Gewebe-Eosinophilie beteiligt ist IL-13 (Ignatius & Burchard, 2020; Hams et al., 2013). Hohe Konzentrationen des Zytokins korrelieren dabei mit einer schweren Erkrankung (Chiaramonte et al., 2001). Seine Funktion übt IL-13 über den IL-13-Rezeptor $\alpha 1$ (13R1) und den IL-13-Rezeptor $\alpha 2$ (13R2) aus (Roeb, 2023; Wynn et al., 2004). Wird 13R1 alleine exprimiert, bindet dieser IL-13 mit einer geringen Affinität (Wynn et al., 2004). In Kombination jedoch mit dem IL-4R α bildet er einen hochaffinen Signalkomplex, der sowohl auf nicht-lymphoiden als auch auf lymphoiden Zellen vorhanden ist (Wynn et al., 2004). Der Signalkomplex wird durch IL-13 und IL-4 aktiviert, was die funktionelle Überschneidung der beiden Zytokine erklärt (Wynn et al., 2004). Beim 13R2 scheint es sich um einen Decoy-Rezeptor (Graham et al., 2010) zu handeln, der IL-13 zwar mit hoher Affinität bindet, jedoch kein Signal weiterleitet (Wynn et al., 2004). Der Rezeptor ist somit an der Regulierung der Fibrose, der granulomatösen Entzündung und der portalen Hypertension beteiligt (Wynn et al., 2004). IL-13 gilt als einer der Hauptfaktoren bei der Auslösung der Fibrogenese im Rahmen der Schistosomiasis, indem das Zytokin beispielsweise die Transdifferenzierung der hepatischen Sternzellen in Myofibroblasten induziert (Anthony et al., 2012). Daher äußert sich ein Defizit des regulatorischen Decoy-Rezeptors in einer deutlichen Zunahme der durch IL-13 ausgelösten Leberfibrose und der Ausbildung einer hepato-splenischen Verlaufsform (Wynn et al., 2004).

Die Funktion von IL-10 beinhaltet das Verhindern einer überschießenden und pathologischen Th2-Reaktion, indem es diese regulatorisch rückkoppelt (Hoffmann et al., 2000). Darüber hinaus sorgt das Zytokin für eine Stabilisierung der Th2-Antwort (Stadecker et al., 2004). Daher weisen IL-10-Knockout-Tiere einen stark Th1-polarisierten Phänotyp auf, der sich in einer akuten Hepatotoxizität äußert (Hoffmann et al., 2000; Wynn et al., 1998). Eine wichtige Quelle für dieses schützende Zytokin stellen

M2-Makrophagen dar, deren alternative Aktivierung durch IL-4 und IL-13 induziert wird (Anthony et al., 2012). M2-Makrophagen verfügen über das Enzym Arginase-1, das die Th1-assoziierte Immunpathologie mindert, und über das Molekül *Resistin-Like Molecule-alpha* (RELM- α), welches als negativer Regulator der Th2-Immunantwort fungiert (Costain et al., 2018).

Zusammenfassend bietet die Th2-induzierte granulomatöse Entzündungsreaktion einerseits eine Schutzfunktion, da die Eier der Schistosomen im Lebergewebe eingekapselt werden und eine normale Funktion des umgebenden Parenchyms ermöglicht wird (Hams et al., 2013). Andererseits führt die anhaltende Expression der Th2-Mediatoren bei einigen Patienten zu einer schweren Fibrose und portalen Hypertension (Wynn et al., 2004). Aus diesem Grund entwickeln sich parallel zur Th2-Immunantwort regulatorische und immunmodulatorische Zellnetzwerke (Lundy & Lukacs, 2013). Regulatorische T- und B-Zellen sowie B-Lymphozyten begrenzen die granulomatöse Pathologie, indem sie die potenziell schädliche Funktion der CD4⁺ Zellen unterdrücken (Costain et al., 2018). Die Folge ist eine deutliche Abnahme der Th2-Immunantwort nach ungefähr drei Monaten und die Etablierung eines Zustandes der Hyporesponsivität (Hams et al., 2013).

Eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Ausprägung der Organschäden durch die Schistosomiasis ist ein Ungleichgewicht zwischen der Th1- und Th2-Immunantwort (Hoffmann et al., 2000). Eine übermäßige Th1-Polarisation führt in Tiermodellen zu einem kachektischen Zustand und einer ausgeprägten Hepatotoxizität der Versuchstiere, die in einer Mortalitätsrate von 100% resultiert (Hoffmann et al., 2000). Ein pathologisches Überwiegen der Th2-Immunantwort verursacht eine verstärkte Fibrogenese und erhöhte Sterblichkeit in der chronischen Erkrankungsphase (Hoffmann et al., 2000).

Die immunologische Reaktion auf *S. mansoni* führt bei chronisch infizierten Erwachsenen in Endemiegebieten zu einer Art der Resistenz gegen oder Minimierung von Reinfektionen (McManus et al., 2018). Der Schutz entwickelt sich langsam über zehn bis 15 Jahre und ist wahrscheinlich auf eine immunologische Reaktion auf sterbende Würmer im Wirt und die damit verbundene Freilegung antigener Strukturen zurückzuführen (Fitzsimmons et al., 2012; McManus et al., 2018). Adulte Schistosomen können jahrelang im Blutkreislauf ihres Wirtes persistieren, da sie verschiedene Mechanismen entwickelt haben, durch die sie sich dem Immunsystem entziehen können (Colley et al., 2014). Hierzu gehören eine ständige Erneuerung des äußeren Tegumentes durch somatische Stammzellen, Mimikry mit Wirtsproteinen und die Ausschüttung von Proteasen, die Komplementfaktoren und gebundene Antikörper

inaktivieren (Colley et al., 2014). Nach dem Tod der Parasiten gehen diese Fähigkeiten verloren, sodass die Entwicklung einer immunologischen Resistenz ermöglicht wird (Colley et al., 2014). Diese steht vornehmlich mit dem Vorhandensein von IgE in Verbindung, das die Erkennung und Abtötung von Schistosomula durch Mastzellen und Makrophagen vermittelt (Löscher & Burchard, 2010). Dagegen scheint IgG4 mit einer Neigung zur Reinfektion zusammenzuhängen (Colley et al., 2014). Die Neigung von Erwachsenen und Kindern, IgE oder IgG4 zu entwickeln, spiegelt dabei deren Anfälligkeiten für erneute Infektionen mit *S. mansoni* wider (Grogan et al., 1996).

2.2.6 Oxidativer Stress

Als oxidativer Stress wird im Allgemeinen eine Situation definiert, in der die Balance zwischen Antioxidantien und Oxidantien zugunsten der letzteren verschoben ist (Sies et al., 2017). Hauptquelle dieser Stressoren im menschlichen Organismus sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxidanionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxyl-Radikale (OH^\cdot) (Aguiar et al., 2013). Dabei handelt es sich um eine Gruppe hochreaktiver, kurzlebiger Moleküle, die durch die unvollständige Reduktion von Sauerstoff entstehen (Srinivas et al., 2019; Włodarski et al., 2020). Die Produktion erfolgt zum großen Teil in den Mitochondrien, in denen Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor während der Zellatmung fungiert (Srinivas et al., 2019). Darüber hinaus werden die reaktiven Moleküle auch durch die NADPH-Oxidase in der Zellmembran während der Pathogenabwehr oder durch verschiedene Enzyme in den Peroxisomen im Zuge der Entgiftung gebildet (Srinivas et al., 2019). In geringer Menge sind ROS wichtig für den Organismus und an verschiedenen Wegen der Signalübertragung oder an der Abwehr von Mikroorganismen beteiligt (Matés et al., 1999). Übersteigt ihre Konzentration jedoch ein physiologisches Maß, überwiegen ihre schädigenden Wirkungen an Biomolekülen wie die peroxidative Veränderung von Membranen und oxidative DNA-Schäden (Matés et al., 1999). Als Folge der Akkumulation dieser Veränderungen kommt es zum Ausbruch oder zum Fortschreiten unterschiedlicher Erkrankungen wie Karzinomen, kardiovaskulärer oder neurodegenerativer Erkrankungen (Oliveira Fraga et al., 2010). Diese Ambivalenz der ROS verdeutlicht die Relevanz antioxidativer Mechanismen im Organismus, die im Zusammenspiel ein Gleichgewicht herbeiführen (Matés et al., 1999; Sies et al., 2017).

Teil dieses Gegenwirkungssystems sind sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische Faktoren (Sies et al., 2017). Auf der enzymatischen Seite spielen unter anderem die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase (Kat) und die Glutathion-

Peroxidase (GPX) eine wichtige Rolle (Kelly et al., 1998). Die SOD ist ein Mangan- oder Kupfer- und Zink-haltiges Enzym (Kelly et al., 1998), das die Dismutation des hochreaktiven O_2^- katalysiert (Matés et al., 1999). Diese Reaktion erfolgt in zwei Schritten, in denen das Enzym zunächst das überschüssige Elektron des Radikals auf sich überträgt und somit reduziert wird (Kelly et al., 1998). Mithilfe eines zweiten O_2^- und Wasserstoff (H^+) erfolgt anschließend in einem zweiten Reaktionsschritt die Regeneration und Oxidation des Enzyms sowie die Herstellung von H_2O_2 (Kelly et al., 1998). Dieses kann anschließend über die Kat oder die GPX weiter entschärft werden (Matés et al., 1999). Die Mangan- oder Häm-haltige Kat kommt in den Peroxisomen der Zellen und in besonders hoher Konzentration in der Leber vor, wo das Enzym die Reaktion von H_2O_2 in Wasser (H_2O) und Sauerstoff (O_2) katalysiert (Kelly et al., 1998). Die GPX besitzt als Coenzym Selen und setzt ebenfalls H_2O_2 in H_2O um, indem das Enzym ein Elektron von Glutathion auf H_2O_2 überträgt (Kelly et al., 1998; Ozden et al., 2002). Die anschließende Reduktion und Wiederherstellung von Glutathion wird durch das Enzym Glutathion-Reduktase gewährleistet (Kelly et al., 1998; Turgeon et al., 2018).

Ein vielfältiges Spektrum niedermolekularer, nicht-enzymatischer Antioxidantien komplettiert das Gegenwirkungssystem (Kelly et al., 1998). Zu nennen ist hier insbesondere das lipidlösliche Vitamin E, das seine antioxidative Funktion ausübt, indem es die durch Radikale ausgelöste Lipidperoxidation in biologischen Membranen stoppt (Kelly et al., 1998). Außerdem fängt es eine Vielzahl von ROS ab (Kelly et al., 1998).

Das Vorhandensein von *S. mansoni* in unterschiedlichen Entwicklungsstufen führt zur Einwanderung inflammatorischer Zellen, um die Parasiten zu bekämpfen (El-Sokkary et al., 2002). Ein frühes Ereignis der Pathogenabwehr ist die Einwanderung phagozytischer Zellen wie Makrophagen, neutrophiler Granulozyten und Monozyten (El-Sokkary et al., 2002). Diese besitzen in ihren Zellmembranen den NADPH-Oxidase-Komplex, der einen Prozess vermittelt, welcher als *respiratory burst* bezeichnet wird (DeLeo & Quinn, 1996). Der Enzymkomplex katalysiert die Reduktion von O_2 mittels NADPH, um so ein Superoxidanion zu produzieren (Meng et al., 2002). Mithilfe der SOD oder durch eine nachfolgende Protonierung entsteht aus dem Superoxidanion H_2O_2 (Thelen et al., 1993). Durch die Produktion großer Mengen dieser ROS können beispielsweise Parasiten bekämpft werden (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Außerdem spielen eosinophile Granulozyten eine wichtige Rolle in der Parasitenabwehr (Abdallahi et al., 1999). In *in vitro* Experimenten wurde die Fähigkeit der eosinophilen Granulozyten gezeigt, Schistosomula direkt durch einen fortschreitenden Abbau ihrer Larvenoberfläche abzutöten (Abdallahi et al., 1999). An diesem Prozess waren ebenfalls ROS wie O_2^- beteiligt und wurde insbesondere durch die Eosinophilen Peroxidase (EPO)

vermittelt (Abdallahi et al., 1999). Die EPO nutzt H_2O_2 , um Halogenide unter der Bildung langlebiger Oxidationsspezies zu oxidieren, welche ebenfalls in den Prozess involviert zu sein scheinen (Abdallahi et al., 1999).

Ein weiterer Teil des H_2O_2 /Eosinophilen-Peroxidase-Systems sind neutrophile Granulozyten, die ihre mikrobizide Wirkung über das Enzym Myeloperoxidase (MPO) entfalten (El-Sokkary et al., 2002). Diese katalysiert die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) und OH^- (El-Sokkary et al., 2002). Die Zytotoxizität des häufig unter Oxidationsstress und Entzündungsbedingungen produzierten NO ist vor allem auf die nachfolgende Umwandlung in Peroxynitrit ($ONOO^-$) zurückzuführen (El-Sokkary et al., 2002). Bei diesem handelt es sich um ein toxisches Oxidationsmittel, das durch die Reaktion von NO mit O_2^- entsteht (El-Sokkary et al., 2002). Erhöhte Konzentrationen von NO wurden in verschiedenen Organen wie der Leber, der Milz oder den Nieren *S. mansoni*-infizierter Mäuse nachgewiesen (El-Sokkary et al., 2002).

Gleichzeitig zu dieser auf der Basis von ROS beruhenden Mikrobenabwehr zeigten unterschiedliche Studien eine Herunterregulation der antioxidativen Abwehr in den Lebern *S. mansoni*-infizierter Versuchstiere (Gharib et al., 1999). So waren sämtliche Aktivitäten der SOD, Kat und der GPX sowie die zellulären Glutathion- und Vitamin E-Speicher reduziert (El-Sokkary et al., 2002).

Eine protektive Rolle im Zuge der verstärkten Bildung von ROS scheint IL-4 zu spielen, indem es die hepatische Produktion dieser kontrolliert (La Flamme et al., 2001). Diese Funktion übt IL-4 beispielsweise über die Förderung der Entwicklung IL-10-produzierender Th2-Zellen aus (La Flamme et al., 2001). In verschiedenen Zellen wie Makrophagen und Kupffer-Zellen konnte IL-10 die ROS-Produktion in *S. mansoni*-infizierten Tieren verringern (La Flamme et al., 2001). Die Relevanz von IL-4 verdeutlicht auch ein Knockout-Modell, das den Zusammenhang zwischen IL-4-Mangel und vermehrten Leberschäden aufgedeckt hat, die auf die vermehrte Produktion von O_2^- , NO und $ONOO^-$ zurückzuführen sind (La Flamme et al., 2001).

Insgesamt handelt es sich bei der Dysbalance von Oxidantien und Antioxidantien im Rahmen einer *S. mansoni*-Infektion per definitionem um oxidativen Stress. Dieser Zustand trägt wesentlich zur Pathologie der Infektion bei, die in diesem Fall aus wirttschädigenden Reaktionen der ROS resultiert (El-Sokkary et al., 2002).

2.2.7 Replikationsstress

Der Begriff DNA-Replikation bezeichnet die Verdopplung der genetischen Information (Rassow et al., 2022). Dies geschieht während der S-Phase des Zellzyklus und ermöglicht während der anschließenden Mitose die Entstehung zweier identischer Tochterzellen (Rassow et al., 2022).

Da dieser Prozess sehr vulnerabel ist, stellen verschiedene Regulations- und Kontrollmechanismen die exakte Durchführung der Replikation sicher (Gaillard et al., 2015). So ist die DNA-Synthese beispielsweise in einem zweistufigen Prozess aufgebaut (Taylor & Lindsay, 2016). An tausenden möglichen Replikationsursprüngen werden zunächst präreplikative Komplexe gebildet, von denen in der S-Phase nur eine Untergruppe aktiviert wird (Taylor & Lindsay, 2016). An diesen wird anschließend die Replikationsmaschinerie zusammengebaut und die Ausbildung der Replikationsgabel eingeleitet (Taylor & Lindsay, 2016). Somit wird gewährleistet, dass das gesamte Genom genau einmal repliziert wird (Taylor & Lindsay, 2016).

Eine Reihe endogener und exogener Agenzien kann eine Schädigung der DNA herbeiführen, die die Koordination der Replikation stört (Gaillard et al., 2015). Eine wichtige Quelle der endogenen Schäden sind ROS, die einen Zustand erzeugen, der als Replikationsstress bezeichnet wird (Gaillard et al., 2015). Mit dem Ziel der Überwachung dieses genotoxischen Stresses und der korrekten Weitergabe der genetischen Information haben die Zellen den *DNA Damage Response*-Signalweg entwickelt (Gaillard et al., 2015). Die beiden Schlüsselenzyme *Ataxia telangiectasia mutated*- (ATM-) und *Ataxia telangiectasia and Rad3-related*- (ATR-) Kinasen agieren dabei als Hauptsensoren für DNA-Schäden (Maréchal & Zou, 2013; Yang et al., 2004). In der Folge halten sie den Zellzyklusprogress an, leiten erforderliche Reparaturmechanismen ein oder lösen bei irreparablen Schäden den Zelltod aus (Maréchal & Zou, 2013). Wichtiger Teil dieser Schadenskontrolle ist das Tumorsuppressorgen p53 (Rassow et al., 2022). Dieses kann durch ATM oder ATR phosphoryliert werden, wodurch der unter physiologischen Bedingungen ständige Abbau durch *Mouse double minute 2 homolog* (Mdm2) verhindert wird (Rassow et al., 2022). Daraufhin kann p53 die Expression verschiedener Gene hochregulieren, die wie der Cyclin-abhängige Kinasen- (CDK-) Inhibitor *p21* den Eintritt in die S-Phase verhindern oder wie *Bax* oder *Apoptotic Protease-activating Factor 1* (Apaf-1) die Apoptose einleiten (Rassow et al., 2022).

Insgesamt besteht durch den Replikationsstress ein Zustand der genomischen Instabilität, der eine Basis für verschiedene Krankheiten, insbesondere für die Karzinogenese bildet (Macheret & Halazonetis, 2015). Maligne Zellen zeichnen sich

durch die Fähigkeit aus, unkontrolliert zu proliferieren und durchlaufen trotz ihrer Transformation keine Reparaturmechanismen oder enden nicht in der Apoptose (Rassow et al., 2022). Zu Beginn der Krebsentwicklung steht die anhaltende Proliferation, die häufig durch Mutationen in Tumorsuppressor- und/oder Onkogenen ermöglicht wird (Macheret & Halazonetis, 2015). Sie beeinflussen beispielsweise die Lizenzierung der Replikationsursprünge, führen zu einer Überwindung von Kontrollen, die den Beginn der S-Phase überwachen, und reduzieren die Vorbereitungszeit der Zellen auf die Zellteilung in der G1-Phase (Macheret & Halazonetis, 2015). Aus der verstärkten Proliferation resultieren Selektionsvorgänge, die das Überleben der schnell wachsenden Zellgruppe trotz Replikationsfehlern begünstigen (Macheret & Halazonetis, 2015). In diesem Zusammenhang bieten vor allem Mutationen im *p53*-, *Mdm2*- oder *Atm*-Gen Vorteile und führen letztendlich zu einer Progression der Karzinogenese (Macheret & Halazonetis, 2015).

2.2.8 Fibrose

Bei der Fibrose kommt es zu einer verstärkten Produktion fibrillärer extrazellulärer Matrixproteine, die anschließend im hepatischen Dissé-Raum abgelegt werden (Chen et al., 2019; Hemmann et al., 2007; Hernandez-Gea & Friedman, 2011). Bei diesen Proteinen handelt es sich vornehmlich um die Kollagene I und III (Wynn et al., 2004). In der Folge kommt es zu einer sogenannten Kapillarisation der lebersinusoidalen Epithelzellen, die durch einen Verlust der Fenestra und durch die Ausbildung einer Basalmembran gekennzeichnet ist (Ni et al., 2017). Aufgrund dieser pathophysiologischen Veränderungen wird der Nährstofftransport zwischen dem Blut in den Sinusoiden und den umgebenden hepatischen Zellen beeinträchtigt (Chen et al., 2019; Ni et al., 2017). Zu Beginn sind von der Fibrosierung vor allem kleine Pfortaderverzweigungen betroffen, die zunehmend verstopfen und vernarben (Löscher & Burchard, 2010). Im weiteren Verlauf weitet sich die Fibrose auf die größeren Abgänge der Pfortader und auf den Hauptstamm aus (Löscher & Burchard, 2010). Dies führt letztendlich zu einer fortschreitenden Reduktion der Kapazität des portalen Gefäßnetzes und zu einer portalen Hypertension (Löscher & Burchard, 2010).

Im Rahmen der Schistosomiasis wird die progressive Fibrose als Ursache einer fortgeschrittenen hepatosplenischen Erkrankung als Tonpfeifenstielfibrose nach Symmers bezeichnet (Löscher & Burchard, 2010). Ursprung dieses Namens ist das dichte, weiße Bindegewebe um die intrahepatisch gelegenen Pfortaderäste innerhalb des erhaltenen rötlich erscheinenden Lebergewebes auf der histologischen

Schnittfläche (Löscher & Burchard, 2010). Dieses makroskopische Bild wirkt „als ob eine Anzahl weißer Tonpfeifenstiele in verschiedene Richtungen durch das Organ gestoßen wurde“ (Löscher & Burchard, 2010).

Komplikationen der Fibrose, die in einem zeitlichen Abstand von fünf bis 15 Jahren nach Erstinfektion auftreten können, beinhalten die Ausbildung portosystemischer Kreisläufe inklusive Magenfundus- und Ösophagusvarizen, Aszites und eine hypertensive Gastropathie (Colley et al., 2014; Löscher & Burchard, 2010). Im Gegensatz zur Pathophysiologie anderer hepatischer Fibroseerkrankungen kommt es bei der Infektion durch *S. mansoni* nicht zu einem Übergang in die Zirrhose und die Funktion des Leberparenchyms bleibt lange erhalten (Chatterji et al., 2024; Löscher & Burchard, 2010).

Als Hauptquelle für die Deposition der Kollagene in der Leber spielen die hepatischen Sternzellen oder Ito-Zellen (HSC) eine entscheidende Rolle bei der Umgestaltung der Extrazellulärmatrix (EZM) (Anthony et al., 2010; Anthony et al., 2012). Im gesunden Organ befinden sich die HSC in einem ruhenden und nicht-proliferativen Zustand (Tsuchida & Friedman, 2017). Sie sind sternförmig geformt und speichern über das Ansammeln von Lipidtropfen Vitamin A (Tsuchida & Friedman, 2017). Im Falle akuter oder chronischer Leberschädigungen kommt es zu einer Transdifferenzierung dieser Zellen in Myofibroblasten (MFB) (Dewidar et al., 2019). Diese verlieren ihre Fähigkeit zur Speicherung von Vitamin A, nehmen eine fibroblastenähnliche Form an und entwickeln einen proliferativen, kontraktilen und migratorischen Phänotyp (Tsuchida & Friedman, 2017).

Der Prozess der Transdifferenzierung wird durch verschiedene Signale wie dem *Transforming Growth Factor-β*- (TGF-β-) Signalweg ausgelöst (Dewidar et al., 2019). Das Zytokin wird als Reaktion auf Leberschädigungen durch verschiedene Zelltypen exprimiert und freigesetzt (Dewidar et al., 2019). Über die Bindung an den TGF-β-Rezeptor II (TbRII) und die anschließende Rekrutierung des TGF-β-Rezeptors I (TbRI) an die Zellmembran wird eine Trans-Phosphorylierung ausgelöst (Dewidar et al., 2019). Der TbRI phosphoryliert daraufhin die Signalproteine *Mothers Against DPP Homolog 2* und 3 (Smad 2 und Smad 3), die sich mit Smad 4 verbinden und in den Zellkern translozieren (Dewidar et al., 2019). Hier lösen sie die Transkription einer Reihe profibrogener Zielgene wie *α-smooth muscle actin* (*αSma*), *Kollagen 1* und *connective tissue growth factor* (*Ctgf*) aus (Dewidar et al., 2019). Im Falle des letzteren ist ein TGF-β-responsives Element im *Ctgf*-Promotor identifiziert worden (Carson et al., 2018). Im Zusammenhang mit *S. mansoni* stellten Chen et al. in einem Trans-Well-Modell dar,

dass SEA in PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) die Sekretion von TGF- β induzieren konnte (Chen et al., 2023).

Verschiedene Studien haben zudem gezeigt, dass IL-13 und in einem geringeren Maße IL-4 relevante Stimuli bei der Auslösung der bilharziotischen Fibrose sind (Chiaramonte et al., 1999). Die Interleukine gehören zu den Hauptprodukten Th2-polarisierter Zellen, die nach dem Beginn der Eiablage die inflammatorische Reaktion in der Leber dominieren (Wynn et al., 2004). In einem Rattenmodell wurde ermittelt, dass IL-13 ruhende HSC zur Produktion des profibrogenen Zytokins CTGF veranlassen konnte (Liu et al., 2011). In diesem Falle löst IL-13 eine TGF- β -unabhängige Smad-Signalisierung aus (Liu et al., 2011). Hohe CTGF-Spiegel wurden zuvor mit der durch Schistosomen ausgelösten Fibrose in Verbindung gebracht (Anthony et al., 2012). Darüber hinaus zeigten *in vitro* Studien eine direkte Stimulierbarkeit der Kollagenproduktion menschlicher HSC-Zelllinien durch IL-13 (Sugimoto et al., 2005). Hierbei scheint IL-13 insbesondere für die Synthese der Kollagene I, III und V notwendig zu sein, die in der Abwesenheit des Interleukins kaum induziert wurden (Sandler et al., 2003). Eine weitere profibrogene Funktion von IL-13 besteht in der Auslösung der alternativen Aktivierung von Makrophagen in lokalen Kupffer-Zellen oder zirkulierenden Makrophagen (Hams et al., 2013). Diese M2-Polarisierung geht mit einer verstärkten Expression des Enzyms Arginase einher (Hesse et al., 2001). Dieses stellt L-Ornithin aus L-Arginin her, welches in einem weiteren Schritt von der Ornithin-Aminotransferase in Prolin umgewandelt wird, einer entscheidenden Aminosäure für die Synthese der Kollagene (Hesse et al., 2001). Außerdem fördern M2-Makrophagen über FIZZ-1 direkt die Transdifferenzierung von MFB aus HSC (Liu et al., 2004). Sie sind zudem an der Produktion von IL-10 beteiligt, welches die Th1- und Th2-Antworten reguliert und somit die pathophysiologischen Veränderungen begrenzt (Hoffmann et al., 2000).

2.2.9 Klinisches Bild

Die klinische Erscheinung der Schistosomiasis reflektiert im Allgemeinen das Invasions- und Migrationsverhalten der Parasiten in verschiedenen Abschnitten ihres Lebenszyklus (Barsoum et al., 2013). Dabei hängt die Intensität der Symptome vom Grad des Wurmbefalls, vom Ort sowie der Häufigkeit der Eiablage und der darauffolgenden granulomatösen Entzündung ab (Bülow et al., 2021). Den ersten Kontakt hat ein Patient mit dem infektiösen Zerkarien-Stadium. Das Eindringen dieser kann nach sechs bis 48 Stunden am Ort der kutanen Penetration zu einer ein bis drei Zentimeter großen, juckenden, makulopapulösen und erythematösen Hauterscheinung führen (Barsoum et

al., 2013; RKI, 2011). Durch abgestorbene Larven kommt es zu einer lokalen Überempfindlichkeitsreaktion, die insbesondere dann auftritt, wenn Patienten den Zerkarien das erste Mal ausgesetzt sind (McManus et al., 2018).

Die initialen Lungeninfiltrate während der Passage der Schistosomula äußern sich durch unproduktiven Husten (El Ridi, 2013). Im Regelfall klingen die Symptome spontan nach zwei bis zehn Wochen ab (Ross et al., 2007). In einigen Fällen entwickelt sich jedoch eine anhaltende schwere und chronische Erkrankung (Ross et al., 2007).

Eine weitere akute Erscheinungsform der Schistosomiasis ist das sogenannte Katayama-Syndrom (Ross et al., 2007). Dieses tritt in einem Zeitraum von zwei Wochen bis drei Monaten nach Exposition auf (Ross et al., 2007). Betroffen sind vornehmlich Reisende oder Einwanderer in Endemiegebiete, die im Vergleich zu den Einheimischen der Endemiegebiete in einem höheren Alter zum ersten Mal mit den Antigenen der Parasiten in Kontakt treten (Colley et al., 2014). Außerdem kann auch eine besonders schwere Re-Infektion durch das Eindringen vieler Zerkarien das Syndrom hervorrufen (Ross et al., 2007). Bei dem Syndrom handelt es sich um eine systemische Überempfindlichkeitsreaktion, die durch das gleichzeitige Vorhandensein zirkulierender schistosomaler Antigene und hoher IgM-Spiegel und die daraus resultierende Immunkomplexformation hervorgerufen wird (Löscher & Burchard, 2010). Klinisch kommt es nach einem variablen akuten oder schleichenden Beginn zu uncharakteristischen Erscheinungen wie Fieber, Myalgien, Kopf-, Glieder- und Nackenschmerzen, Abgeschlagenheit und Urtikaria (Löscher & Burchard, 2010). Gastrointestinale Symptome umfassen Oberbauchschmerzen, Übelkeit und breiige Durchfälle (Löscher & Burchard, 2010). Oft imponiert die Leber vergrößert und druckdolent und neigt zu Superinfektionen, die meist durch *Staphylococcus aureus* ausgelöst werden und einen Abszess zur Folge haben können (Löscher & Burchard, 2010). Auffällig ist das seltene Vorkommen des Katayama-Syndroms bei chronisch Exponierten (McManus et al., 2018). Dies ist möglicherweise auf eine Desensibilisierung *in utero* und auf ein Priming der T- und B-Lymphozyten-Reaktion zurückzuführen, das eine verminderte Immunreaktion auf Antigene verursacht (Eloi-Santos et al., 1989; King et al., 1998).

Die in den Endemiegebieten dominierende chronische Verlaufsform der Schistosomiasis wird durch den zunehmenden Verschluss des Kapillarsystems durch die abgelegten Eier sowie durch die entzündliche Reaktion des Organismus auf diese verursacht (RKI, 2011). Im Laufe der Zeit verkalken die Eigranulome und heilen narbig aus, wodurch die Gefäße stenosieren und der intravasale Druck ansteigt (RKI, 2011). Im Intestinalsistem imponieren die pathologischen Veränderungen durch Schistosomeneier und Granulome

als Polypen, Stauungen und Ulzerationen (Barsoum et al., 2013). Klinisch manifestiert sich die intestinale Schistosomiasis durch chronisch intermittierende Bauchschmerzen und Diarrhoen, Appetitlosigkeit und rektale Blutabgänge (Gryseels et al., 2006). Aufgrund des zunehmenden Eiweiß- und Blutverlustes entwickeln die Patienten Ödeme und eine Anämie (Löscher & Burchard, 2010).

Fünf bis zehn Prozent der Patienten mit intestinaler Schistosomiasis weisen eine unzureichende Immunregulation gegen die Schistosomeneier auf, woraufhin sie eine ausgedehnte Fibrose und eine anschließende hepatosplenische Erkrankung entwickeln (Colley et al., 2014; Stadecker et al., 2004). Der fibrotische Verschluss der Pfortader führt zu einer portalen Hypertension und im fortgeschrittenen Stadium zur Ausbildung portosystemischer Kollateralkreisläufe (Löscher & Burchard, 2010). Diese äußern sich beispielsweise als periumbilikale Varikose oder als Ösophagusvarizen, wobei letztere die häufigste Todesursache der Schistosomiasis darstellen (Löscher & Burchard, 2010). Darüber hinaus führen portale Hypertension und intestinale Eiweißverluste zur Ausbildung eines Aszites (Löscher & Burchard, 2010). Ursprung diverser Oberbauchbeschwerden ist eine zunehmend derbe und höckrige Leber, die narbig retrahiert, wobei vor allem der rechte Leberlappen betroffen ist (Löscher & Burchard, 2010). In diesem Stadium können die Patienten ebenfalls an einer hepatischen Enzephalopathie leiden (Schwartz & Fallon, 2018). Die fortschreitende Splenomegalie führt zu einem Hypersplenismus und einer Panzytopenie, die die Infektanfälligkeit beispielsweise für chronische, persistierende Salmonelleninfektionen erhöht (Löscher & Burchard, 2010).

Aufgrund der ausgebildeten portokavalen Shunts werden einige Schistosomeneier in verschiedene Regionen des Körpers gespült (Löscher & Burchard, 2010). Im perialveolären Kapillarsystem verursachen sie eine granulomatöse pulmonale Arteriitis (Colley et al., 2014). Die Patienten leiden an einer zunehmenden Dyspnoe bei Belastung und später auch in Ruhe, an rascher Ermüdung und an pulmonaler Hypertonie (Löscher & Burchard, 2010). Mit ansteigendem Druck im kleinen Kreislauf wird das rechte Herz zunehmend belastet (Löscher & Burchard, 2010). Dies äußert sich in symptomatischen Palpitationen und gipfelt letztendlich im Cor pulmonale mit Rechtsherzinsuffizienz (Löscher & Burchard, 2010).

Eine weitere vor allem durch *S. mansoni*-Eier adressierte Region ist das Rückenmark (Ferrari & Moreira, 2011). Die transversale Myelitis betrifft die thorakalen Segmente unterhalb von T6, insbesondere T11-L1 (Ferrari & Moreira, 2011). Teilweise sind jedoch auch die höheren thorakalen sowie zervikale Segmente erkrankt (Ferrari & Moreira, 2011). Bei der Neuroschistosomiasis werden drei klinische Formen unterschieden: beim

medullären Syndrom überwiegt die Beteiligung des Rückenmarks, das myeloradikuläre Syndrom bezieht die Nervenwurzeln und das Rückenmark mit ein und das Conus-Cauda-Equina-Syndrom verzeichnet pathologische Veränderung insbesondere in diesen Regionen (Ferrari & Moreira, 2011). Klinische Erscheinungen sind Schmerzen in der Lendenwirbelsäule, die in die Beine ausstrahlen, Lähmungen, Sensibilitätsverlust und Muskelschwäche (Ferrari & Moreira, 2011). Das Conus-Cauda-Equina-Syndrom kann darüber hinaus auch eine Blasen- und Mastdarmschwäche verursachen (Ferrari & Moreira, 2011).

Die anhaltende Entzündung im Rahmen der Infektion wirkt sich außerdem auf das Wachstum, den Eisenstoffwechsel, die körperliche Leistungsfähigkeit sowie auf die kognitive Entwicklung aus und führt in diesen Bereichen zu teilweise schweren Einbußen (Colley et al., 2014).

Insgesamt fällt eine große Variation der klinischen Ausprägung auf (Stadecker et al., 2004). Während einige Patienten lediglich leichte Darmbeschwerden haben, leiden andere an der schweren hepatosplenischen Verlaufsform (Stadecker et al., 2004). Endemische Studien untersuchen daher den Zusammenhang der unterschiedlichen Manifestationen und genetischen Grundlagen (Stadecker et al., 2004).

2.2.10 Diagnostik

Im Rahmen der Diagnostik muss zwischen Patienten, die erstmalig in Kontakt mit Zerkarien getreten sein könnten, und wiederholt exponierten Menschen unterschieden werden. Bei ersteren sollte ein Routine-Screening eingeleitet werden, wenn sie anamnestisch von Reisen in Endemiegebiete und von einem dortigen Kontakt zu Binnengewässern berichten (Auswärtiges Amt, 2022; Ross et al., 2007). Ein zusätzlicher Hinweis auf eine Zerkarien-Exposition ist das Auftreten urtikarieller Hauterscheinungen in Form erythematöser Läsionen von einem bis drei Zentimetern Größe (McManus et al., 2018). Dieses Screening erfolgt idealerweise drei bis sechs Monate nach dem letzten Wasserkontakt (Ross et al., 2007) und beinhaltet als Goldstandard die mikroskopische Untersuchung von mindestens drei Stuhlproben (Gryseels et al., 2006; Löscher & Burchard, 2010). Diese werden ausgestrichen auf das Vorhandensein von Eiern oder lebendigen Mirazidien untersucht, die aufgrund ihrer pulsierenden Ausscheidungszellen und beweglichen Flimmerhärchen auffallen (Gryseels et al., 2006). Anhand der typischen Form und Lokalisation des – im Falle von *S. mansoni* seitlich lokalisierten – Stachels der Eier kann darüber hinaus eine Aussage über die Spezies getroffen werden

(Gryseels et al., 2006). Eine geringe Empfindlichkeit bei erstmaliger Infektion leichter Intensität sorgt jedoch für Einschränkungen dieser Methode (McManus et al., 2018).

Aus diesem Grund können bei Erstinfektionen ergänzende Antikörperuntersuchungen eingesetzt werden (Löscher & Burchard, 2010). Die Produktion der Antikörper gegen lösliches Wurm-Antigen oder rohes Ei-Antigen beginnt im Durchschnitt vier bis sieben Wochen nach der Exposition (Gryseels et al., 2006; McManus et al., 2018). Somit können diese bereits während der ein- bis dreimonatigen Präpatenzzeit der Stuhluntersuchung nachgewiesen werden, in der noch keine Eier ausgeschieden werden (Löscher & Burchard, 2010). Die produzierten Serum-IgG, -IgM und -IgE können in 95% der Fälle mittels indirekter Hämagglutination, Immunfluoreszenz oder durch ELISA nachgewiesen werden (Gryseels et al., 2006; Löscher & Burchard, 2010). Von Nachteil sind sowohl die Kreuzreaktivität zwischen den verschiedenen Schistosomen-Arten als auch die Tatsache, dass die Serologie trotz erfolgreicher Therapie lebenslang positiv bleibt (Löscher & Burchard, 2010; Ross et al., 2007). Daher eignen sich serologische Diagnoseverfahren nicht für Personen, die einem wiederholten Kontakt ausgesetzt sind (Löscher & Burchard, 2010; Ross et al., 2007).

Alternativ können ELISAs oder der *Point-of-Contact Circulating Cathodic Antigen-Assay* für den Nachweis von Wurmantigenen im Serum oder im Urin eingesetzt werden (Colley & Secor, 2014; van Dam et al., 2013). Bei diesen Antigenen handelt es sich um regurgitierte Abfallprodukte der Würmer, die als anodische (CAA) oder kathodische (CCA) Proteoglykane zirkulieren (Deelder et al., 1980; van Dam et al., 2013). Von einem positiven Testergebnis kann auf eine aktive Infektion und auf das Vorhandensein lebender Würmer geschlossen werden (van Dam et al., 1996). Zudem liefern diese Tests bereits positive Ergebnisse, bevor die Eiproduktion begonnen hat (van Dam et al., 1996).

Laborchemisch liegt im Falle einer aktiven Infektion bei über 80% der Patienten eine Eosinophile vor (McManus et al., 2018). Das Gerinnungsprofil kann ebenfalls im Sinne einer verlängerten Prothrombinzeit auffällig sein (McManus et al., 2018). Ist die Infektion weiter fortgeschritten und hat das chronische Stadium erreicht, können zudem eine Anämie und eine Thrombozytopenie auftreten (McManus et al., 2018). Die hepatosplenische Verlaufsform der Schistosomiasis kann sich labordiagnostisch durch eine Hypalbuminämie, eine Verringerung der Cholinesterase und eine Hypergammaglobulinämie äußern (Löscher & Burchard, 2010). Zusätzlich können leicht erhöhte Serumwerte der Transaminasen, der Laktatdehydrogenase und der Cholestaseparameter Bilirubin, γ -Glutamyltransferase und Alkalische Phosphatase auffallen (Löscher & Burchard, 2010).

Besteht trotz initial negativer Diagnostik weiterhin ein hoher Infektionsverdacht, kann die bildgebende Diagnostik hinzugezogen werden (Drudge-Coates & Turner, 2013). Insbesondere die frühe Invasionsphase der Parasiten kann sich röntgenologisch in Form schnell wechselnder und sich spontan zurückentwickelnder pulmonaler Infiltrate äußern, die als Löffler-Infiltrate bezeichnet werden (Löscher & Burchard, 2010).

Darüber hinaus kommt die Sonografie auch bei der Diagnostik chronisch infizierter Patienten zum Einsatz (DTG, 2017). Bei der Symmers-Fibrose imponiert eine charakteristische Verdickung der Portalwand (DTG, 2017). Diese breitet sich flächig im Leberparenchym aus und ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Echogenität (DTG, 2017). Bei der asiatischen Bilharziose erinnert das Fibrosebild dagegen eher an ein Netzwerk (DTG, 2017). Hier erstrecken sich echogene Septen wie ein Maschendraht durch das Leberparenchym und weisen dabei keinen Zusammenhang zu den Portalgefäßen auf (DTG, 2017). Aus der Fibrose resultiert eine portale Hypertension, die einen erhöhten Strömungswiderstand in der Portalvene und einen vergrößerten Durchmesser dieser zur Folge hat (McManus et al., 2018). Darauf folgend kommt es zur Ausbildung portokavaler Kollateralkreisläufe, gastrointestinaler Varizen und zu einer Splenomegalie (Gryseels et al., 2006). Die Sonografie ermöglicht in diesem Zusammenhang die Abschätzung des Risikos einer Blutung aus den Ösophagusvarizen und gibt Auskunft über das Ausmaß der portalen Hypertension (Löscher & Burchard, 2010). Eine genauere Einstufung der Varizen ermöglicht die Gastroskopie (Gryseels et al., 2006).

S. mansoni befällt im zentralen Nervensystem hauptsächlich das Rückenmark (Ferrari & Moreira, 2011). Der Nachweis entsprechender Läsionen gelingt am besten mittels MRT (Ferrari & Moreira, 2011). Die Läsionen weisen eine Signalhyperintensität in den T2-gewichteten Bildern, eine Vergrößerung des unteren Rückenmarks sowie des Conus medullaris und verdickte Rückenmarkswurzeln vor allem der Cauda equina auf (Ferrari & Moreira, 2011). In der T1-Wichtung stellen sich die Läsionen im Kontrastverhalten heterogen dar (Ferrari & Moreira, 2011). Außerdem gelingt über die MRT der Nachweis intramedullärer Granulome und Ödeme (DTG, 2017; Ferrari & Moreira, 2011).

Ein weiteres in der Bildgebung zum Einsatz kommendes diagnostisches Mittel ist die Echokardiografie (Löscher & Burchard, 2010). Im Falle ausgeprägter portosystemischer Shunts kann es zu einer zunehmenden pulmonalen Hypertonie und Rechtsherzbelastung kommen (Löscher & Burchard, 2010). Echokardiografisches Korrelat sind eine Verschlechterung der rechtsventrikulären Funktion sowie eine schwere Trikuspidalinsuffizienz im Endstadium (Barsoum et al., 2013).

Zu beachten ist, dass viele der genannten diagnostischen Maßnahmen in den westlichen Ländern zur Verfügung stehen, der Zugang in den Endemiegebieten jedoch oft erschwert ist (McManus et al., 2018).

2.2.11 Therapie

Das Medikament Praziquantel ist ein acyliertes Chinolin-Pyrazin und wirkt gegen alle Schistosomen-Spezies (Gryseels et al., 2006). Vermutlich löst Praziquantel einen massiven Kalziumeinstrom in das Tegument und in die Muskulatur adulter Würmer aus (Löscher & Burchard, 2010). In der Folge verlieren diese den Halt über ihre Saugnäpfe am Endothel der Venen (Löscher & Burchard, 2010). Außerdem legt die Schädigung des Teguments Antigene frei, sodass die Würmer wieder vom Immunsystem erkannt und bekämpft werden können (McManus et al., 2018). Neben dem Kalziumeinstrom wird auch ein therapeutischer Effekt durch die muskuläre Aufnahme von Adenosin oder durch die Beeinträchtigung der Funktion der Myosin-regulatorischen Leichtketten der Würmer vermutet (Angelucci et al., 2007; Gnanasekar et al., 2009).

Aktuell empfiehlt die WHO eine Dosis von 40 mg pro kg Körpergewicht, die über einen Zeitraum von drei Tagen verteilt werden sollte (DTG, 2017). Zu beachten ist die geringe bis nicht vorhandene Wirkung gegen junge Würmer und Eier im Gewebe (Gryseels et al., 2006). Eine wiederholte Gabe des Medikamentes ermöglicht das Erreichen ursprünglich noch resistenter Jungwürmer und verbessert den Therapieerfolg (Colley et al., 2014). Die gängigen Nebenwirkungen wie Bauchschmerzen, Schwindel, Kopfschmerzen und Blutaustritt mit dem Stuhl erreichen nach zwei bis vier Stunden ihren Höhepunkt und sind anschließend selbstlimitierend (Colley et al., 2014). Aufgrund der plötzlichen Freisetzung vieler adressierbarer Wurmantigene kommt es jedoch teilweise zu einer akuten pseudoallergischen Reaktion, die sich in Fieber und Urtikaria äußert und den Einsatz von Kortikosteroiden und Antihistaminika erfordert (Löscher & Burchard, 2010). Insgesamt ist die Therapie mit Praziquantel jedoch sicher und kann auch bei Kindern über vier Jahren und Schwangeren nach dem ersten Trimenon eingeleitet werden (Colley et al., 2014; McManus et al., 2018).

Aufgrund der langjährigen und häufigen Anwendung von Praziquantel als Monotherapie besteht zunehmend Sorge vor einer Resistenzbildung gegen das Medikament (Colley et al., 2014). Berichten zufolge wurden im Norden Senegals sowie in Ägypten bereits zurückgehende Heilungsraten beobachtet (Botros et al., 2005; Gryseels et al., 2001). Zudem gelang die experimentelle Züchtung von Schistosomen-Stämmen, die lediglich gegenüber hohen Dosen sensibel waren (Löscher & Burchard, 2010). Hinzukommend

wurden bei arzneimitteltoleranten Stämmen erhöhte Mengen des P-Glykoproteins aus der Familie der ATP-Bindungskassetten-Superfamilie beobachtet, das im Zusammenhang mit einer Multidrug-Resistenz in Tumorzellen steht (Messerli et al., 2009). Zusammengenommen muss vor dem Hintergrund der weiterhin massenhaften Verabreichung des Medikamentes von der Gefahr einer natürlichen Resistenzentwicklung der Parasiten gegenüber Praziquantel ausgegangen werden (Löscher & Burchard, 2010). Aus diesem Grund werden derzeit Studien zur therapeutischen Wirksamkeit und Sicherheit einer Kombinationstherapie von Praziquantel mit Artemisinin, Dihydroartemisinin oder Moxidectin durchgeführt (Chatterji et al., 2024).

Ergänzend zur kurativen Therapie mit Praziquantel kommt auch eine symptomatische zum Einsatz (Löscher & Burchard, 2010). Die Zerkariendermatitis ist über die Verabreichung von topischen Antihistaminika und gegebenenfalls Kortikosteroiden zu beherrschen (Löscher & Burchard, 2010). Letztere stellen in hochdosierter Form ebenfalls eine geeignete Therapie des Katayama-Syndroms dar (Löscher & Burchard, 2010). Die Symptome der Neuroschistosomiasis werden durch eine akute allergische Reaktion mit daraus resultierenden Masseneffekten des zentralen Nervensystems hervorgerufen (Ross et al., 2007). Daher kann die Gabe von Kortikosteroiden in Kombination mit Antikonvulsiva erwogen werden (Löscher & Burchard, 2010).

Im chronischen Stadium der Erkrankung können nicht-selektive β -Rezeptor-Antagonisten wie Propranolol den portalen Druck senken (DTG, 2017). Interventionelle Maßnahmen beinhalten die Sklerosierung oder die Bandligatur von Ösophagusvarizen und in therapierefraktären Fällen der portalen Hypertension ein transjugulärer portosystemischer Stent-Shunt (DTG, 2017).

Die Therapie mit Praziquantel führt in 76,7% der *S. mansoni*-Infektionen zu einer parasitären Heilung (McManus et al., 2018). Im Jahr 2011 machte die WHO auf eine immense Lücke aufmerksam zwischen der Anzahl therapiebedürftiger Patienten, die auf 243 Millionen geschätzt wurde, und den 28,1 Millionen Personen, die sich von denen tatsächlich einer Therapie unterzogen (Drudge-Coates & Turner, 2013). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Tatsache, dass von 60% der symptomatischen Patienten lediglich 10% an einer schweren Erkrankung leiden, die sie einen Arzt aufsuchen lassen (Barsoum et al., 2013).

2.2.12 Prävention

Die Empfehlung der WHO zur Bekämpfung der Schistosomiasis umfasst eine massenhafte präventive Chemotherapie mit Praziquantel in Gemeinden oder Schulen in Endemiegebieten (WHO, 2003). Das Kontrollprogramm zielt auf die Reduktion der Morbidität und der Infektionsintensität ab und betrifft insbesondere Kinder im Alter zwischen fünf und 14 Jahren (Gryseels et al., 2006; WHO, 2006). Je nach Risiko einer Gemeinde werden die sogenannten *school-aged-children* (SAC) alle drei Jahre (SAC-Basisprävalenz unter 10%), alle zwei Jahre (SAC-Basisprävalenz 10-50%) oder jährlich (SAC-Basisprävalenz über 50%) vorsorglich mit Praziquantel behandelt (WHO, 2006). Ab einer SAC-Basisprävalenz von 10% umfasst die Chemoprävention auch bestimmte Risikogruppen innerhalb der erwachsenen Bevölkerung (WHO, 2006). Ein Hauptproblem dieser Präventionsstrategie ist jedoch die Erfassung lediglich einer Minderheit der Kinder in vielen Ländern (Tchuenté et al., 2017). Da der Zugang zum Medikament hauptsächlich in Schulen erfolgt, bleiben die Kinder, die sich außerhalb der Schule aufhalten oder diese möglicherweise gar nicht besuchen, unversorgt (Tchuenté et al., 2017). Im Jahr 2015 erreichten daher nur neun afrikanische Länder das Ziel, mindestens 75% der Kinder im Schulalter zu behandeln (Tchuenté et al., 2017).

Entscheidende weitere Komponenten von Präventionsprogrammen sind die Bereitstellung von sauberem Wasser sowie geeigneten sanitären Einrichtungen und eine optimierte Abwasserentsorgung (Tchuenté et al., 2017). Letztere soll vor allem die Kontamination des Wassers mit Urin und Fäkalien verhindern (Tchuenté et al., 2017). Zudem kann eine Hygieneerziehung Verhaltensänderungen herbeiführen, die die offene Defäkation verhindern und den vorsichtigen Umgang mit potenziell kontaminiertem Wasser beinhalten (Turner et al., 2020).

In vielen Gebieten wurde ergänzend eine Bekämpfung der Schneckenpopulationen durchgeführt, indem das Molluskizid Niclosamid direkt in die verseuchten Gewässer gegeben wurde (Colley et al., 2014). Dieses ist bereits in niedrigen Konzentrationen giftig für die Schnecken und tötet diese ab (Colley et al., 2014). Obwohl Niclosamid für den Menschen unbedenklich ist, greift das Molluskizid stark in das Ökosystem ein und ist für Fische und Amphibien toxisch (Colley et al., 2014). Weitere Herausforderungen der Schneckenbekämpfung umfassen begrenzte finanzielle Mittel und technische Kapazitäten, die eine Wiederholung der Strategie alle zwei Jahre erfordern (Tchuenté et al., 2017). Außerdem stellt sich die Identifikation von Gewässern mit infizierten Schneckenwirten als schwierig heraus, da oft nur ein sehr geringer Teil der Schnecken infiziert ist (Boissier et al., 2016).

Insgesamt erfordert der zukünftige Kampf gegen die Schistosomiasis den Aufbau effizienter und leistungsfähiger Gesundheitssysteme sowie die Umsetzung kosteneffizienter, integrierter und langfristig tragbarer Maßnahmen (McManus et al., 2018). Insbesondere ärmere Länder wie Subsahara-Afrika zeigten in der Vergangenheit Schwierigkeiten der Aufrechterhaltung solcher Strukturen nach dem Enden der Auslandshilfe (Chitsulo et al., 2000; Gryseels et al., 2006; WHO, 2003).

2.3 Hepatozelluläre Karzinogenese bei einer Infektion mit *S. mansoni*

Für das Jahr 2022 wurde die weltweite Belastung durch Karzinome auf 20 Millionen Neuerkrankungen sowie auf 9,7 Millionen karzinombedingte Todesfälle geschätzt (Bray et al., 2024). Ein Fünftel der Tumorerkrankungen kann auf Infektionen durch Viren, Bakterien oder Parasiten zurückgeführt werden (Howley, 2015; Martel et al., 2012). So berichten diverse Studien über einen Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *S. mansoni* und dem Auftreten von Tumoren wie dem HCC, dem CRC, dem Blasenkarzinom, dem Prostatakarzinom sowie follikulären Lymphomen (El-Tonsy et al., 2013; Palumbo, 2007).

2.3.1 *S. mansoni* agiert als Ko-Faktor bei der hepatozellulären Karzinogenese

Die meisten dieser *S. mansoni*-assoziierten HCCs entstanden in der Gegenwart primärer Hepatokarzinogene wie einer chronischen HCV- oder HBV-Infektion oder einer Exposition gegenüber Aflatoxin B1 (Abruzzi et al., 2016). In diesen Konstellationen agiert *S. mansoni* vermutlich als Ko-Faktor, indem es beispielsweise die virale Pathologie potenziert (Abruzzi et al., 2016; Jain, 2024).

Eine gleichzeitige Infektion mit dem HCV und *S. mansoni* äußerte sich in hohen HCV-RNA-Titern, einer erhöhten Entzündungsaktivität sowie einem raschen Fortschreiten der Pathologie in Richtung Zirrhose und HCC (Kamal et al., 2000). Die Karzinome präsentierten sich häufiger multifokal und mit einem aggressiven Charakter, der eine deutlich höhere Sterblichkeitsrate zur Folge hatte (El-Serag & Rudolph, 2007; El-Tonsy et al., 2016).

Darüber hinaus verstärkt die Schistosomiasis die Effekte von Umweltkarzinogenen wie dem AFB1. Durch *S. mansoni* ausgelöste enzymatische Veränderungen wurden mit

einem Anstieg der Metabolite des AFB1 um 300% in Verbindung gebracht (Vennervald & Polman, 2009). Die häufigste HCC-Mutation in AFB1-exponierten Bevölkerungsgruppen betrifft das *p53*-Gen (Habib et al., 2006). Es besteht ebenfalls ein Zusammenhang zwischen *S. mansoni*-Infektionen und Mutationen im *p53*-Gen (Liu et al., 2002). Dies lässt vermuten, dass *S. mansoni*-Infektion und AFB1-Exposition synergistisch die Inzidenz von *p53*-Mutationen steigern, wodurch das Auftreten von HCCs in einem jüngeren Alter verursacht wird (Habib et al., 2006).

2.3.2 *S. mansoni* aktiviert den Transkriptionsfaktor STAT3

Unsere Arbeitsgruppe konnte in Zellkulturversuchen eine Aktivierung des Onkogens c-Jun und des Transkriptionsfaktors STAT3 in primären Hepatozyten und in Huh7-Zellen nach Stimulation mit SEA nachweisen (Roderfeld et al., 2020). Beim STAT3 handelt es sich um einen zytoplasmatischen Transkriptionsfaktor, der die Signale verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren an den Zellkern vermittelt (Murray, 2007; Stark & Darnell, 2012). In einem Großteil von HCC-Proben wurde STAT3 als konstitutiv aktiviert identifiziert und korreliert mit einem aggressiven Charakter und einer schlechten Prognose der Karzinome (He et al., 2010). Im Gegensatz dazu wies das umliegende gesunde Lebergewebe keine STAT3-Aktivierung auf (Calvisi et al., 2006; Lin et al., 2009). In einem Mausmodell führte ein STAT3-Knockout zu einer sechsfach geringeren HCC-Belastung und zum Auftreten kleinerer Karzinome (He & Karin, 2011). In nicht stimulierten Zellen bilden STAT3-Proteine antiparallele Dimere, die zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma pendeln (Svinka et al., 2014). Verschiedene Stimuli wie insbesondere IL-6 (He & Karin, 2011), aber auch IFN (Liu et al., 2017), oxidativer Stress (He et al., 2010), der Hepatozyten-Wachstumsfaktor und andere lösen eine Aktivierung von STAT3 aus (He & Karin, 2011). Janus-Kinasen wie die JAK2 phosphorylieren als Reaktion auf diese Stimuli ihre intrazellulären Rezeptordomänen und schaffen somit Andockstellen für die STAT3-Proteine (Svinka et al., 2014). Daraufhin wird STAT3 ebenfalls an einem Tyrosin-Rest phosphoryliert und aktiviert (He & Karin, 2011). Es erfolgt eine Umordnung der Proteine zu parallelen Dimeren, woraus eine Beschleunigung des Kern-Shuttles resultiert (Svinka et al., 2014).

Negative Rückkopplungsschleifen durch *Suppressor of Cytokine Signaling 3* (SOCS3) oder SHP-Phosphatasen gewährleisten eine vorübergehende Aktivierung in gesunden Zellen (He & Karin, 2011; Kubo et al., 2003). In Karzinomen wurden jedoch positive Rückkopplungen sowie eine Herunterregulierung von SOCS1, 2, 3 und SHP1 beobachtet, die die konstitutive Aktivierung von STAT3 ermöglichen (Calvisi et al., 2006).

Außerdem wiesen 60% der inflammatorischen HCCs Mutationen im Bereich des IL-6-Rezeptorkomplexes auf, in denen eine Signalübertragung auch in Abwesenheit des Liganden erfolgte (Svinka et al., 2014). Protumorgene Zielgene von STAT3 zielen auf das Überleben, die Proliferation, die Invasivität und die Angiogenese von Tumorzellen ab (Svinka et al., 2014). STAT3 blockiert die *Immunosurveillance* von inflammatorischen Zellen im Paranchym, indem es die Reifung von DCs blockiert und die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IFN und IL-12 hemmt (Kortylewski et al., 2010; O'Shea & Plenge, 2012). Dagegen erfolgt eine Stimulation der Expression der immunsuppressiven Zytokine IL-10 und IL-23 (Kortylewski et al., 2010; O'Shea & Plenge, 2012). Ein weiteres Zielmolekül von STAT3 ist c-myc (Hirano et al., 2000). Bei diesem handelt es sich um einen entscheidenden Regulator des Zellzyklus, der für den Übergang der G1- in die S-Phase verantwortlich ist (Hirano et al., 2000). Anti-apoptotische Zielgene von STAT3 sind beispielsweise Proteine der Bcl-Familie wie Bcl-xl und Bcl-2 (Liu et al., 2017).

2.3.3 *S. mansoni* induziert das Onkogen c-Jun

Die C-Jun-N-terminale-Kinase (JNK) ist eine Serin/Threonin-Kinase, die auch als stressaktivierte Proteinkinase bekannt ist (Wang & Tai, 2016). Die Signale verschiedener Stressoren wie ROS, Pathogene, metabolische Veränderungen oder die Zytokine $TNF\alpha$, TGF- β und IL-1 werden in ein breites Spektrum an zellulären Reaktionen übersetzt (Wang & Tai, 2016). Diese umfassen Vorgänge wie die Zellproliferation, das Zellüberleben, die Differenzierung, Migration, Invasion sowie die Fibrogenese, Inflammation und die Karzinogenese (Wang & Tai, 2016).

Die JNK1 ist die primäre Kinase, die c-Jun/AP-1 phosphoryliert und aktiviert (Wang & Tai, 2016). Im Rahmen einer akuten Hepatitis fördert c-Jun das Überleben der Hepatozyten und agiert als Onkogen in chemisch induzierten Karzinogenese-Modellen (Trierweiler et al., 2016). C-Jun scheint ein inflammatorisches Umfeld zu schaffen, in dem die verstärkte Expression der proinflammatorischen Zytokine $TNF\alpha$ und IL-6 zu einer kompensatorischen Proliferation der Hepatozyten beiträgt (Das et al., 2011; Wang & Tai, 2016). Insbesondere bei HBV-assoziiertem HCC scheint eine JNK-Aktivierung eine wichtige Rolle zu spielen (Guo et al., 2005). Im Gegensatz zum angrenzenden Tumor-freien Gewebe fiel in 70% der isolierten Gewebe eine positive Kernfärbung für die phosphorylierte JNK auf (Guo et al., 2005). Dagegen reduzierte ein Mangel an c-Jun in Hepatozyten die Anzahl und Größe von chemisch induzierten HCCs (Machida et al., 2010). Eine ebenfalls verstärkte nukleäre c-Jun-Färbung in der Umgebung von

S. mansoni-Eiern wurde auch durch unsere Arbeitsgruppe festgestellt (Roderfeld et al., 2020). Die Intensität der Färbung korrelierte dabei mit der Anzahl an abgelegten Eiern pro Granulom (Roderfeld et al., 2020). Des Weiteren war die Aktivierung von c-Jun im Rahmen der *S. mansoni*-Infektion konstitutiv, da diese auch um bereits fibrotische, dystrophische und verkalkte Eier in humanen Biopsieproben nachgewiesen wurde (Roderfeld et al., 2020).

3 Ziel der Arbeit

Das Ziel der im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Studie ist es, Erkenntnisse über die Pathophysiologie der parasitären Infektionskrankheit durch *S. mansoni* im Hinblick auf die hepatische Karzinogenese zu erlangen. Zahlreiche klinische Fallstudien und Ergebnisse aus Tierstudien legen die Vermutung nahe, dass *S. mansoni* insbesondere in der Gegenwart primärer Hepatokarzinogene – wie einer Infektion mit Hepatitis B oder C Viren, Aflatoxin B1 oder Alkohol – die Entstehung von HCCs begünstigen kann. Aus diesem Grund liegt zum einen der spezielle Fokus auf einer möglichen karzinomfördernden Pathologie durch den Parasiten. Zum anderen wird untersucht, ob die *S. mansoni*-Infektion die toxisch-induzierte Karzinogenese im murinen DEN-Modell für die hepatozytäre Karzinogenese verstärkt. Vor diesem Hintergrund wurden molekulare Marker für eine verstärkte hepatozelluläre Karzinogenese in Serum- und Leberproben DEN-behandelter und gleichzeitig *S. mansoni*-infizierter Mäuse und entsprechender Kontrollen untersucht. Im Detail wurden Marker für eine Leberschädigung, die Inflammation, oxidativen Stress, Proliferation, Fibrose und onkogene Signalwege analysiert. Daraus leitetet sich folgende Arbeitshypothese ab:

H₁: „Die beobachtete Leberschädigung ist in der kombiniert mit DEN + *S. mansoni* behandelten Gruppe schwerwiegender als in den alleinig mit DEN oder *S. mansoni* behandelten Mausgruppen.“

4 Methoden

4.1 Mauslinie und Behandlung

Im Rahmen dieser Studie wurden männliche C57/BL6 Mäuse untersucht. Diese stammen aus der zentralen Versuchstierhaltung der Justus-Liebig-Universität, Schubertstraße 81, 35392 Gießen. Das Geschäftszeichen des zugehörigen Tierversuchsantrages lautet: V 54 – 19 c 20 15 h 01 GI 20/10 Nr. G44/2019. Die Studie wurde gemäß dem Leitfaden für Haltung und Pflege von Versuchstieren des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG 2015) und nach Zustimmung des Ethik-Ausschusses für Tierexperimente des Regierungspräsidiums Gießen durchgeführt.

Das Mausmodell umfasst vier verschiedene Gruppen, wobei die Jungtiere eines Wurfes randomisiert den verschiedenen Interventionen zugewiesen wurden (Abbildung 3). Sechs Mäuse erhielten im Alter von zwei Wochen eine intraperitoneale Injektion des Karzinogens Diethylnitrosamin (DEN) in 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung in einer Dosis von 25 mg/kg Körpergewicht. DEN ist ein Prokarzinogen, welches in den Hepatozyten in reaktive Metabolite umgewandelt wird, die als DNA-Alkylanzien wirken (Tolba et al., 2015). Diese Aktivierung ist abhängig von Cytochrom-P450-Enzymen und involviert das CYP2E1 (Tolba et al., 2015). Im Zuge der Zellproliferation werden einige der auf diesem Wege formierten DNA-Addukte zu dauerhaften genetischen Veränderungen fixiert (Tolba et al., 2015). Diese können beispielsweise Regionen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen betreffen, deren Aktivität im Sinne einer protumorigenen Aktivierung oder Deaktivierung modifiziert wird (Tolba et al., 2015). Eine intraperitoneale Injektion gewährleistet hierbei die annähernd gleiche DEN-Dosierung pro Versuchstier (Tolba et al., 2015). Im Säuglingsalter sind die Lebern von Mäusen am anfälligsten für die Karzinogenese (Tolba et al., 2015). Darüber hinaus nimmt die enzymatische Kompetenz im Sinne einer DEN-dealkylierenden Aktivität mit dem Alter zu (Tolba et al., 2015). Aus diesen Gründen hat sich eine einmalige Injektion im Lebensalter von zwei Wochen bewährt (Tolba et al., 2015). Zu beachten ist zudem eine variierende hepatokarzinogene Wirkung von Nitrosaminen abhängig vom genetischen Hintergrund der Tiere, ihrem Alter, ihrem Geschlecht und anderen Faktoren (Tolba et al., 2015). Beispielsweise wurde in mehreren Studien eine weitestgehende Resistenz weiblicher Mäuse gegen die DEN-provozierte Hepatokarzinogenese gezeigt (Tolba et al., 2015). Ursächlich ist in diesem Fall vermutlich eine protektive Funktion der Östrogene, die sich

unter anderem in einer reduzierten IL-6-Produktion in Kupffer-Zellen in weiblichen Tieren äußert (Tolba et al., 2015). Aus diesem Grund wurden nur männliche Tiere verwendet.

Zwölf weitere Mäuse wurden zusätzlich zu der DEN-Injektion im Alter von 20 Wochen mit *S. mansoni* infiziert. Die Infektion erfolgte standardisiert über eine Badeinfektion. In ein 30°C-temperiertes Wasserbad wurden 100 Zerkarien pro Maus gegeben, um ein perkutanes Eindringen der Zerkarien während des Bads zu provozieren. Darüber hinaus wurden acht Mäuse ohne DEN ausschließlich auf diese Weise mit *S. mansoni* infiziert. Eine Super-Kontrollgruppe umfasst sechs unbehandelte Tiere.

Im Alter von 29 Wochen wurden die Mäuse durch die Inhalation von Isofluran sediert und anschließend per Genickbruch getötet. Die Mitarbeiter, die in die tierexperimentellen Maßnahmen involviert waren, hatten zuvor einen Lehrgang zum Umgang mit den Versuchstieren absolviert. Die Lebern der Mäuse wurden reseziert und es wurde venöses Blut aus der Vena cava inferior entnommen. Im Anschluss wurden die gewonnenen Proben in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C aufbewahrt. Das histopathologische *Grading* und *Staging* erfolgte durch Herrn AOR Dr. Kernt Köhler aus dem Institut für Veterinär-Pathologie, Frankfurter Straße 96, 35392 Gießen.

Das Mausmodell

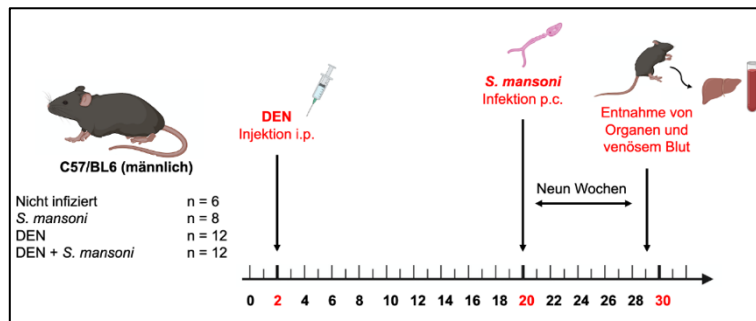


Abbildung 3: Das Mausmodell umfasst acht Mäuse, die im Alter von 20 Wochen mit *S. mansoni* infiziert wurden, zwölf Mäuse, die im Alter von zwei Wochen eine DEN-Injektion erhalten haben, zwölf Mäuse, die sowohl im Alter von zwei Wochen mit DEN als auch im Alter von 20 Wochen mit *S. mansoni* behandelt wurden und sechs Super-Kontroll-Mäuse. Im Alter von 29 Wochen wurden die Proben aller Mäuse gewonnen, sodass die Dauer der Infektion mit *S. mansoni* neun Wochen betrug und DEN für 27 Wochen gewirkt hat. Erstellt mit Biorender.com.

4.2 Serumparameter

Klinische Bedeutung

Die Alanin-Aminotransferase (ALT) – auch Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) genannt – gehört zur Enzymklasse der Transaminasen (Kohse, 2019). Durch den Transfer von Aminogruppen katalysiert sie die Umwandlung von Aminosäuren zu ihren entsprechenden alpha-Ketosäuren (Kohse, 2019). Die ALT weist im Vergleich zur Herz- oder Skelettmuskulatur eine zehnfach höhere Konzentration in den Hepatozyten auf und wird als spezifisches Enzym für die Leberzellen angesehen (Kohse, 2019). In diesen kommt das Enzym vorwiegend zytoplasmatisch gelöst, aber auch in den Mitochondrien lokalisiert vor (Kohse, 2019). Als insgesamt zellgebundenes Enzym können von einem Anstieg in Extrazellulärmedien wie dem Serum Rückschlüsse auf eine Zellschädigung gezogen werden (Kohse, 2019).

Durchführung der Tests

Mithilfe der Reflotron-Pipette wurden 32 μL des Mäuseserums auf die Auftragezone des Reagenzträgers gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Pipettenspitze das Testfeld nicht berührt und dass keine Luftblasen entstehen. Anschließend wurde der Reagenzträger waagrecht in die Führungsschiene des Reflotron Plus-Gerätes geschoben, bis das Einrasten spürbar war. Das Gerät bestätigte das korrekte Schließen der Klappe sowie die Aufnahme der Probe mit der Anzeige des zu bestimmenden Enzyms. Nach Ablauf der Reaktionen wurde die Enzymkonzentration in U/L angezeigt.

Testprinzip

Nach dem Auftragen der Serumprobe auf den Reagenzträger floss diese unter Abtrennung der Erythrozyten in die Reaktionszone des Reflotron Plus-Gerätes. In Anwesenheit der ALT erfolgte die Umwandlung von alpha-Ketoglutarat und Alanin in Glutamat und Pyruvat. In einer folgenden Reaktion wurde das entstandene Pyruvat durch die Pyruvat-Oxidase in Acetylphosphat, H_2O_2 und Kohlendioxid gespalten. Endogen enthaltenes Pyruvat wurde in einer Vorreaktion eliminiert. Das H_2O_2 überführte den Indikator in seine oxidierte blaue Form. Bei 37°C erfolgte die kinetische Messung bei 567 nm. Da die Produktion des blauen Farbstoffes mit der im Serum enthaltenen Enzymmenge korreliert, wurde diese durch das Reflotron Plus-Gerät nach ca. 120 Sekunden in der Einheit U/L angezeigt (Graumann et al., 2015).

4.3 Kaliumhydroxid-Verdau der Leberproben

Die Durchführung des Kaliumhydroxid-Verdau der Leberproben erfolgte nach der Methode von Cheever (Bülow et al., 2024; Cheever, 1968). Durch die Zugabe von Kaliumhydroxid (KOH) zu einer Gewebeprobe wird diese verdaut. Im Falle einer Infektion mit *S. mansoni* bleiben die im Gewebe festgesetzten Eier jedoch stabil, sodass sie anschließend gezählt werden können. Auf diese Weise können Rückschlüsse auf die Eilast in der Leberprobe gezogen werden. Am ersten Tag des Experimentes wurden 25-30 mg schwere Brocken des gefrorenen Lebergewebes auf Trockeneis eingewogen. Nach Zugabe von 500 μL 5%iger KOH-Lösung erfolgte die Inkubation der Proben für 16 Stunden bei 37°C. Im Anschluss wurden die Eppendorf-Gefäße zum Homogenisieren dreimal invertiert. Mit einer Pipette erfolgte die Überführung von je 50 μL der Proben in zwei Wells einer 96-Well-Platte. Mit der 40-fachen Vergrößerung des Mikroskops wurden die Eier pro Well durch zwei unabhängige Mitarbeiter gezählt und die Eilast im Gewebe ausgewertet.

4.4 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

In der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) werden Nukleinsäuren wie DNA und RNA in einem Gewebe nachgewiesen und quantifiziert (Rassow et al., 2022). Um Aussagen über das Expressionsverhalten von Genen treffen zu können, wird die transkribierte mRNA durch reverse Transkription in eine komplementäre cDNA übersetzt und anschließend in der qRT-PCR amplifiziert (Rassow et al., 2022). Die einzelnen Versuchsschritte sind detailliert im Anhang dieser Arbeit im Kapitel 9.1.1 beschrieben und erfolgten gemäß (Bülow et al., 2024).

4.5 Proteinbiochemische Methoden

4.5.1 Proteinbestimmung mithilfe des Western Blot

Die Methode des Western Blots dient der Identifikation von Proteinen durch eine Übertragung dieser auf eine Trägermembran (Rassow et al., 2022). Hierbei erfolgt die Auftrennung eines Proteingemisches mittels SDS-Page (Rassow et al., 2022). In einem elektrischen Feld wandern Proteine entsprechend ihrer molaren Masse unterschiedlich weit in einem Polyacrylamid-Gel (Rassow et al., 2022). Nachfolgend wird ein weiteres elektrisches Feld erzeugt, das senkrecht zum Gel ausgerichtet ist (Rassow et al., 2022). Auf diese Weise werden die separierten Proteine auf die Membran übertragen (Rassow

et al., 2022). Mithilfe verschiedener anschließender Reaktionen erfolgt der spezifische Nachweis der Proteine (Bülow et al., 2023; Rassow et al., 2022). Die einzelnen Versuchsschritte sind detailliert im Anhang dieser Arbeit im Kapitel 9.1.2 beschrieben.

4.5.2 *Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)*

Im *Enzyme-linked immunosorbent Assay* wird sich die Eigenschaft von Antikörpern zunutze gemacht, mit ihrem Fab-Fragment spezifisch an bestimmte Antigene zu binden (Rassow et al., 2022). Dabei skizziert die Unterkategorie des Sandwich-ELISAs das Bild des gesuchten Antigens, das von zwei Seiten von Antikörpern, dem *Capture Antibody* und dem *Detection Antibody*, erkannt wird (Graumann et al., 2015).

Der *Capture Antibody* adhäriert nach mehrstündiger Inkubation mit seinem Fc-Fragment auf dem Boden der Wells. Nach anschließender Zugabe der Probe mit dem zu untersuchenden Antigen bindet dieses spezifisch an das Fab-Fragment des *Capture Antibodys*. Erfolgt in einem weiteren Schritt die Zugabe des *Detection Antibodys*, detektiert dieser ebenfalls spezifisch das Antigen und bindet dieses mit seinem Fab-Fragment. Das Fc-Fragment des *Detection Antibodys* ist mit dem Enzym *Horseradish Peroxidase* (HRP) gekoppelt. Dieses katalysiert nach der Zugabe des Substrates Tetramethylbenzidin (TMB) eine Reaktion, die den Farbumschlag eines zuvor farblosen Eduktes in ein gefärbtes Produkt zur Folge hat. Diese Reaktion wird nach einer vom Hersteller vorgegebenen Inkubationszeit durch die Zugabe von 1M Schwefelsäure gestoppt. Aufgrund der Abnahme des pH-Wertes durch die Säure erfolgt ein erneuter Farbumschlag von Blau ($\lambda = 630 \text{ nm}$) zu Gelb ($\lambda = 450 \text{ nm}$). Aus einer gleichzeitig untersuchten Standardreihe wird anschließend eine Standardkurve ermittelt, die eine Einordnung der untersuchten Proben ermöglicht. Dies erlaubt quantitative Rückschlüsse auf die darin enthaltene Proteinkonzentration.

4.6 Histologische Methoden

Mithilfe der Immunhistochemie können Proteine in ihrem Gewebeverband gefärbt und somit sichtbar gemacht werden (Ulfig, 2019). Auf diese Weise können Rückschlüsse auf das Vorhandensein dieser Proteine in einem Gewebe sowie über die Lokalisation in den Zellkompartimenten gezogen werden (Ulfig, 2019). Hierzu wird ein Primärantikörper auf einen Gewebeschnitt pipettiert, der spezifisch das gesuchte Protein als Epitop bindet. In einem weiteren Schritt wird dieser Primärantikörper durch einen Sekundärantikörper erkannt. Dieser detektiert spezifisch das Fc-Fragment von Antikörpern der Spezies des

Primärantikörpers. Zudem ist der Sekundärantikörper an ein Detektionssystem gekoppelt, dessen Aktivierung die enzymatische Freisetzung von farbigen Endprodukten zur Folge hat. Die Immunhistochemien erfolgen gemäß (Roderfeld et al., 2020).

4.6.1 Einbettung der Leberproben in Paraffin

Für immunhistochemische Färbungen wurden die Leberproben im ersten Schritt über Nacht in 1% Paraformaldehyd fixiert und im Anschluss mit *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen. Daraufhin erfolgte die Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Nach der Einbettung in Paraffin konnten die Leberproben mittels Mikrotom in 3-5 μm dünne Schnitte geteilt werden. Diese wurden zur Glättung kurz in ein 40°C erwärmtes Wasserbad gegeben und in einem weiteren Schritt auf Objektträger übertragen. Das Trocknen der Schnitte erfolgte bei 40°C auf einer beheizten Platte. Nachfolgend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur aufbewahrt.

4.6.2 Immunhistochemie mit Paraffinschnitten

Die Immunhistochemie ermöglicht eine Darstellung von gesuchten Epitopen in einem Gewebezusammenhang mithilfe spezifischer Antikörper (Ulfig, 2019). Zur Vorbereitung auf die Färbung wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe mittels Xylol entparaffinisiert sowie mittels Ethanol und Wasser rehydriert:

Xylol 2 x 10 Minuten, 1 x 5 Minuten

Ethanol abs. 99,6% 2 x 5 Minuten

Ethanol abs. 96% 1 x 5 Minuten

Ethanol abs. 70% 1 x 5 Minuten

Leitungswasser 1 x 5 Minuten

Während der zuvor erfolgten Fixierung der Schnitte kam es zu Quervernetzungen der Proteine, wodurch einige Epitope ihre spezifischen Eigenschaften verloren. Zur Wiederherstellung dieser defizitären Immunreaktivität erfolgte eine Antigen-Demaskierung in der Mikrowelle. In dieser wurden die Schnitte in einer Plastikkuvette 2 x 3 Minuten in 1x Citratpuffer bei 730 Watt erhitzt und danach für ca. 20-30 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Daraufhin wurden die Schnitte fünf Minuten in Leitungswasser gewässert und 3 x 2 Minuten mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte das Blockieren beziehungsweise Absättigen unspezifischer Bindungsstellen. Hierzu

wurden *Normal Horse Serum* (NHS) und 10% BSA in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und auf die Schnitte pipettiert. Es folgte die Inkubation in einer abgedunkelten Feuchtkammer für eine Stunde. Daraufhin wurden die Schnitte dekantiert und 2 x 3 Minuten mit PBS gewaschen. Der Primärantikörper richtet sich spezifisch gegen die zu färbenden Epitope und wurde entsprechend der Herstellerangaben in 10% BSA verdünnt auf die Leberschnitte pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Kühlschrank bei 4°C in der abgedunkelten Feuchtkammer. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte ca. 20-30 Minuten bei Raumtemperatur aufgewärmt, dekantiert und 4 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Als Nächstes erfolgte die einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur in der abgedunkelten Feuchtkammer. Der Sekundärantikörper bindet speziesspezifisch an das Fc-Fragment des Primärantikörpers. Daraufhin wurden die Schnitte erneut dekantiert und 4 x 5 Minuten gewaschen. Das Färben erfolgte mithilfe des *Permanent AP Red Kits* der Firma Zytomed. Die Reaktion wurde hinsichtlich ihrer Intensität laufend unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und mit Leitungswasser abgestoppt. Folgend wurden die Schnitte für eine Minute mit der Lösung Gill-1 gegengefärbt. Dieser Schritt förderte die Abgrenzbarkeit der gefärbten Epitope gegenüber dem umliegenden Gewebe. Das Abstoppen dieser Reaktion erfolgte ebenfalls mit Leitungswasser. Im Anschluss daran wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe erneut dehydriert:

Ethanol 96% 1 x 2 Minuten

Isopropanol 2 x 5 Minuten

Xylol 3 x 5 Minuten

Daraufhin erfolgte das Eindecken mit Pertex® und Deckgläschen sowie das Trocknen der Schnitte. Die histologische Begutachtung fand am Folgetag unter dem Lichtmikroskop statt. Bei den aufgenommenen Bildern wurde ein Kontrastabgleich durchgeführt, um die Darstellung zu optimieren. Die Ergebnisse der Immunhistochemie wurden hierdurch jedoch nicht verändert. Die Aufarbeitung der Bilder erfolgte im Anschluss mittels Microsoft PowerPoint.

4.7 Kolorimetrische und fluorometrische Methoden

4.7.1 Kolorimetrische Messung von Malondialdehyd

Malondialdehyd ist ein Endprodukt der Lipidperoxidation (Ayala et al., 2014). Diese bezeichnet die Degradierung von Fettsäuren im Falle eines Überschusses reaktiver

Sauerstoffspezies (Ayala et al., 2014). Besonders anfällig für diesen Angriff sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Ayala et al., 2014).

Durch die Zugabe von Thiobarbitursäure-Lösung (TBA) bilden sich Addukte aus den Molekülen TBA und MDA, wobei ein rosa Farbstoff entsteht, der ein kolorimetrisches Absorptionsmaximum bei 532 nm hat. Mithilfe der Einordnung der Messwerte in eine Standardreihe lässt sich das Ausmaß des oxidativen Stresses in einem Organ abschätzen. Das Experiment wurde gemäß der Methode nach Gutteridge und Halliwell ausgeführt (Bülow et al., 2023; Gutteridge & Halliwell, 1990).

Zur Quantifizierung der MDA-Konzentrationen in den Leberproben wurde zunächst eine Standardreihe hergestellt. Hierfür wurden in einem ersten Schritt 5 μL der 4,17 M MDA-Standardlösung mit 814 μL destilliertem Wasser vermischt, woraus eine 0,025 M MDA-Lösung resultierte. Außerdem wurden zu 20 μL dieser Lösung 980 μL destilliertes Wasser hinzugegeben. Die entstandene 0,5 mM MDA-Lösung diente als Basis der Standardreihe. Damit diese eine MDA-Konzentration von 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16 und 20 nmol/Well darstellten, wurden 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 μL des 0,5 mM MDA-Standards mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 200 μL aufgefüllt.

Zur Herstellung der Proben wurden bei 0°C 300 μL Lysepuffer zu 10 mg Lebergewebe pipettiert, wobei das Volumen entsprechend der Einwaage von 9-10 mg Lebergewebe angepasst wurde. Das Homogenisieren erfolgte mithilfe des Precellys Homogenisators für 2 x 20 Sekunden bei 5.500 G. Zwischen den beiden Durchgängen lag eine Pause von 30 Sekunden. Im Anschluss wurden die Proben sofort auf 0°C heruntergekühlt. Nach dem Zentrifugieren der Proben für zehn Minuten bei 13.000 G wurden 110 μL des Überstandes zügig in neue 1,5 mL Eppendorf-Gefäße überführt. Sowohl zum Standard als auch zu den Proben wurden 1,1 μL Butylhydroxytoluol und 330 μL TBA gegeben. Anschließend wurden diese für 60 Minuten bei 95°C auf dem Heizblock gekocht und für zehn Minuten auf Eis gekühlt. Im weiteren Schritt folgte die Zentrifugation für fünf Minuten bei 13.000 G. Jeweils 200 μL Standard beziehungsweise Probe wurden für Doppelbestimmungen in eine 96-Well-Platte pipettiert. Mithilfe des Infinite Plattenlesegerätes wurde im Anschluss die kolorimetrische Absorption bei einer Wellenlänge von 532 nm gemessen.

4.7.2 Fluorometrische Analyse der Myeloperoxidase

Das Enzym Myeloperoxidase (MPO) kommt vornehmlich in neutrophilen Granulozyten, in geringerem Maße auch in den Lysosomen von Monozyten vor (Aratani, 2018). In der

Gegenwart von Wasserstoffperoxid und Halogeniden katalysiert das Enzym die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies wie hypochloriger Säure (Aratani, 2018). Bei dieser handelt es sich um ein starkes Halogenierungs- und Oxidationsmittel, das mit der DNA und anderen Biomolekülen interagieren und diese schädigen kann (Yang et al., 2014). Die MPO leistet somit einerseits einen Beitrag zur Abwehr von Pathogenen, führt jedoch in diesem Zuge auch zu lokalen Gewebeschäden (Aratani, 2018).

Das *MPO Activity Fluorometric Assay Kit MAK069* basiert auf der physiologischen Funktion der MPO. Im Anschluss an die Katalyse hypochloriger Säure durch die MPO reagiert diese weiter mit Aminophenyl Fluorescein, wobei Fluorescein bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 525 nm entsteht. Eine Einheit der MPO ist definiert als Enzymmenge, die das Substrat so oxidiert, dass 1 μmol Fluorescein pro Minute bei Raumtemperatur entsteht. Die Durchführung des Experiments erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

Auf Trockeneis wurden 9-10 mg Lebergewebe pro Tier in Schraubröhrchen eingewogen. Die anschließenden Schritte erfolgten auf *Crushed Ice*. Zu jeder Probe wurden 15 Bulk Beads sowie 40 μL *MPO Assay Buffer* pro 10 mg Lebergewebe hinzugefügt. Mithilfe des Precellys Homogenisators wurden die Proben 2 x 20 Sekunden bei 5.500 G homogenisiert. Zwischen den beiden Durchgängen lag eine Pause von 30 Sekunden. Im Anschluss wurden die Proben erneut auf *Crushed Ice* gestellt. Nach dem Zentrifugieren der Proben für zehn Minuten bei 13.000 G wurde der Überstand abpipettiert und mit dem *MPO Assay Buffer* auf ein Endvolumen von 50 μL pro Probe ergänzt. Dieses Volumen wurde für Einzelbestimmungen in die Wells einer 96-Well-Platte gegeben. Darüber hinaus wurde eine Positiv-Kontrolle mitgeführt. Hierfür wurden 10 μL der *MPO Positive Control* mit 40 μL des *MPO Assay Buffers* vermischt und ebenfalls in ein Well pipettiert.

Zu Beginn der Herstellung der Standardreihe wurden 5 μL der 1 mM Fluorescein *Standard Solution* zu 995 μL *MPO Assay Buffer* gegeben. Von dieser Lösung wurden 0, 2, 4, 6, 8 und 10 μL in Wells pipettiert und mit dem *MPO Assay Buffer* auf ein Endvolumen von 100 μL ergänzt. Dies entspricht Konzentrationen von 0, 10, 20, 30, 40 und 50 pmol/Well Standard.

Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 50 μL des Master Mixes zu den Proben und zur Positiv-Kontrolle. Die fluorometrische Absorption wurde erstmals nach zwei Minuten mittels Infinite Plattenlesegerätes bei einer Wellenlänge von 485 nm Extinktion und 525 nm Emission gemessen. Alle fünf Minuten erfolgte eine Wiederholung der Messung bis

zu dem Zeitpunkt, an dem die stärkste Probe den stärksten Standard überschritt. Die Messung vor diesem Zeitpunkt wurde ausgewertet.

4.7.3 Kolorimetrische Quantifizierung von Hydroxyprolin

Im Rahmen der Kollagen-Biosynthese wird Hydroxyprolin (Hyp) enzymatisch aus der Aminosäure Prolin synthetisiert (Stegemann & Stalder, 1967). Aufgrund des spezifischen Vorkommens im Kollagengewebe können anhand des Hydroxyprolin-Gehaltes in einer Probe Rückschlüsse auf den korrelierenden Kollagengehalt gezogen werden (Stegemann & Stalder, 1967). Auf diesem Zusammenhang beruht die Methode des Hydroxyprolin-Assays. Mittels Säurehydrolyse werden hierbei Proteine einer Gewebeprobe in ihre Aminosäure-Bestandteile zerlegt. Anschließend kann der Hydroxyprolin-Gehalt bestimmt und daraus die Kollagenmenge errechnet werden. Die Ermittlung der Hydroxyprolin-Konzentration erfolgt mithilfe einer spezifischen Färbereaktion, bei der in einem ersten Schritt Hydroxyprolin schrittweise durch Chloramin T zu Pyrrol oxidiert wird. Nach Zugabe von p-Dimethylaminbenzaldehyd kommt es anschließend zur Bildung eines Chromophors, welches ein Absorptionsmaximum bei 565 nm hat. In einem Photometer erfolgte die kolorimetrische Messung, anhand derer auf den Hydroxyprolin-Gehalt geschlossen werden kann.

Das ursprüngliche Verfahren von Woessner wurde von Stegemann und Stalder modifiziert, um die Methode auch auf Proben mit niedriger Hydroxyprolin-Konzentration anwenden zu können (Helmrich et al., 2022; Stegemann & Stalder, 1967; Woessner, 1961).

Pro Maus wurden 50 mg gemörserte Leber in ein Duran-Verkochungsröhrchen eingewogen und in 1 mL 6 N Salzsäure (HCl) aufgenommen. Die Menge der Säure wurde hierbei an das Gewicht der Leberproben angepasst. Nach dem Homogenisieren mit einem Ultra TURRAX T3 erfolgte die Inkubation der Proben über Nacht bei 110°C im Wärmeschrank. Am folgenden Tag wurden die Proben fünf Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert und über einen 0,45 µm PES-Filter gefiltert. Aus dem Überstand wurden 2 x 15 µL des Homogenisates in 1,5 mL Eppendorf-Gefäße pipettiert. Hierbei waren in 15 µL 0,75 mg Lebergewebe enthalten. Als Nächstes wurden je 15 µL Ethanol hinzugefügt und es erfolgte die vollständige Einengung mithilfe von Stickstoff bei 50°C.

Zur Herstellung einer Standard-Reihe diente eine Stammlösung, in der Hydroxyprolin in 50% Isopropanol gelöst wurde, sodass die Lösung eine Hydroxyprolin-Konzentration von 100 µg/mL enthielt. Diese Stammlösung wurde mit 50% Isopropanol weiter

verdünnt, sodass eine Standardreihe von 640, 320, 160, 80 und 40 ng/50 μ L pipettiert werden konnte.

Nach dem Einengen unter Stickstoff und der nachfolgenden Zugabe von 50 μ L 50% Isopropanol zu dem Kristallat wurde die Lösung gevortext. Anschließend wurden zu 50 μ L Standard oder Probe 100 μ L 0,6% Chloramin T-Lösung gegeben, erneut gevortext und die Proben zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 100 μ L frisch zubereiteter Ehrlich-Reagenz-Lösung. Die Proben wurden gevortext und eine Stunde bei 50°C inkubiert. Durch die nachfolgende Zwischenlagerung der Eppendorf-Gefäße auf *Crushed ice* wurden alle Reaktionen gestoppt. Danach erfolgte das Überführen von 200 μ L Standard beziehungsweise Probe als Doppelwerte in eine 96-Well-Platte. Mit dem Infinite Plattenlesegerät wurde die Absorption von 570 nm gegen einen Leerwert gemessen.

Die Errechnung des Hydroxyprolin-Gehaltes erfolgte anhand folgender Formel:

$$C_{\text{Hyp}} = A / K \times F$$

C_{Hyp} = Hyp in μ g pro g Lebergewebe

A = Adsorption der gemessenen Probe

K = Regressionskoeffizient der Standardkurve

F = Verdünnungsfaktor

4.8 Statistische Analyse

Zunächst wurden die experimentellen Daten mithilfe des Computerprogrammes Microsoft Excel dargestellt. Die gemessenen Werte aus der qRT-PCR wurden hierzu als *Fold Change* berechnet. Dieser beschreibt die x-fache Änderung der quantitativen Genexpression zwischen zwei oder mehreren Versuchsgruppen. Die densitometrische Auswertung der Western Blots erfolgte vorab mittels der Software ImageJ. Die hieraus abgeleiteten Zahlenwerte wurden in Microsoft Excel eingepflegt und normiert, indem Quotienten aus den Mittelwerten einer Versuchsgruppe mit der Summe aller berechneten Mittelwerte gebildet wurden.

Anschließend wurden die Daten in IBM SPSS Statistics Version 22.0 übertragen und graphisch in Box-Plot-Diagrammen veranschaulicht. Innerhalb einer dieser Boxen kennzeichnet eine durchgehende Linie den Median der Versuchsgruppe. Die Box beinhaltet 50% der Daten und wird durch das obere und untere Quartil begrenzt, die den Interquartilsabstand bilden.

Im ersten Schritt wurde der Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Hierbei werden die Mediane mehrerer nicht-normalverteilter Stichproben verglichen. Mit diesem Schritt wurde zunächst geprüft, ob sich die Mediane von mindestens zwei der Versuchsgruppen unterscheiden und ob somit die globale Nullhypothese abgelehnt werden kann. Die globale Nullhypothese lautet dabei:

$$H_{0\text{Global}}: \text{Median}_{\text{Nicht infiziert}} = \text{Median}_{S. \text{mansoni}} = \text{Median}_{\text{DEN}} = \text{Median}_{\text{DEN} + S. \text{mansoni}}$$

Im Falle von Unterschieden der Mediane wurde im Anschluss der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben angeschlossen. Dieser vergleicht nun paarweise die zentralen Tendenzen jeweils zweier Versuchsgruppen. Da es sich hierbei um eine explorative Datenanalyse handelt, wurde kein Signifikanzniveau festgelegt und auch nicht für multiples Testen korrigiert. Stattdessen war es das Ziel der Arbeit, Parameter mit möglichst kleinen Irrtumswahrscheinlichkeiten aufzudecken. Bei diesem Wert handelt es sich um die Wahrscheinlichkeit eines Wertes unter Annahme der Nullhypothese, ab der man diese nicht mehr annehmen kann; also die Wahrscheinlichkeit, bei der sich der beobachtete Unterschied der Mediane durch den Zufall erklären lässt. Die aufgestellte und zur Nullhypothese gegensätzliche Arbeitshypothese lautet dabei:

H_1 : „Die beobachtete Leberschädigung ist in der kombiniert mit DEN + *S. mansoni* behandelten Gruppe schwerwiegender als in den alleinig mit DEN oder *S. mansoni* behandelten Mausgruppen.“

Auf diese Weise wurden verschiedene Parameter der Lebererkrankung beleuchtet, inklusive Leberschädigung, Inflammation, oxidativer Stress, Proliferation, Fibrose und onkogene Signalwege. Am Beispiel der Leberschädigung und des damit verbundenen Anstiegs der ALT im Serum veranschaulicht würde die konkrete Hypothese lauten:

„Der Anstieg des ALT-Wertes ist in der kombiniert mit DEN + *S. mansoni* behandelten Gruppe höher als in den alleinig mit DEN oder *S. mansoni* behandelten Mausgruppen.“

5 Ergebnisse

5.1 *S. mansoni* verursacht eine Schädigung der Leberzellen

Der Nachweis einer Hepatozytenschädigung durch die Infektion mit *S. mansoni* (Kapitel 5.1) sowie die Identifizierung dysplastischer Leberveränderungen durch DEN (Kapitel 5.2) sind wichtige Voraussetzungen für die weiteren Analysen in dieser Studie. Die spezifischen Auswirkungen der beiden Interventionen im Sinne einer granulomatösen hepatischen Fibrose durch *S. mansoni* und eines hepatokarzinogenen Effektes durch DEN ist eine Grundvoraussetzung für die anschließende Frage nach additiven Wirkungen in dem für diese Studie genutzten Mausmodell.

5.1.1 Anstieg der Alanin-Aminotransferase-Konzentration im Serum

Das Enzym Alanin-Aminotransferase (ALT), oder Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), übt seine Funktion vor allem im Zytosol der Hepatozyten aus (Kohse, 2019). Bei einer Schädigung oder dem Untergang von Hepatozyten wird die ALT in die Zirkulation freigesetzt (Kohse, 2019). Daher korreliert die extrazellulär im Serum gemessene Konzentration des Enzyms positiv und spezifisch mit dem Ausmaß des Zellunterganges bei einer Hepatozytenschädigung (Kohse, 2019).

Die *S. mansoni*-Infektion führt zu einem Anstieg der Alanin-Aminotransferase-Konzentration im Serum

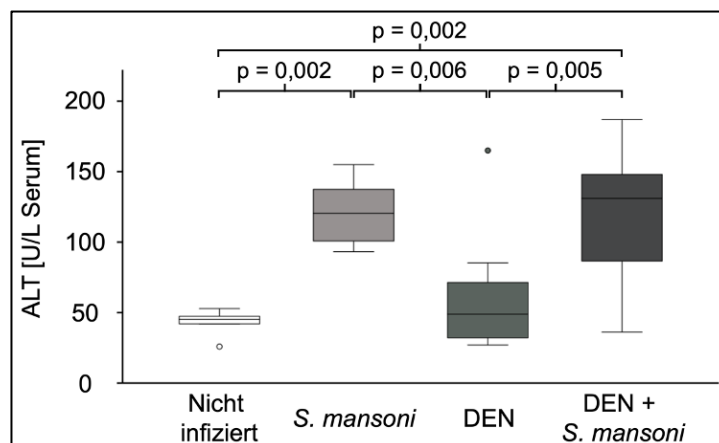


Abbildung 4: Die *S. mansoni*-Infektion führt zu einem Anstieg der Alanin-Aminotransferase-Konzentration im Serum. Dargestellt ist der ALT-Spiegel im Serum in U/L Serum (Ordinate) der Gruppen Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=12) (Abszisse). Versuchstiere, deren Messwerte über die 1,5-fache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als milde Ausreißer mit einem Punkt gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.

In der DEN- und der Kontroll-Gruppe lagen die ALT-Konzentrationen mit 48,9 U/L und 45,3 U/L im Bereich des murinen Normwertes von 25-60 U/L (Sher & Hung, 2013). In den *S. mansoni*-Mäusen war die ALT-Konzentration mit 120,5 U/L im Vergleich zur Kontroll-Gruppe 2,66-fach ($p = 0,002$) und zur DEN-Gruppe 2,46-fach ($p = 0,006$) gesteigert (Abbildung 4). In den DEN + *S. mansoni*-Tieren wurde eine ALT-Konzentration von 131 U/L ermittelt. Diese war gegenüber den Kontroll-Mäusen 2,89-fach ($p = 0,002$) und gegenüber den DEN-Mäuse 2,67-fach ($p = 0,005$) erhöht. Die Versuchstiere der beiden infizierten Gruppen wiesen untereinander vergleichbare ALT-Konzentrationen auf. Insgesamt sprechen die vorliegenden Ergebnisse für eine Schädigung der Hepatozyten im Rahmen der Infektion mit *S. mansoni*, aber nicht durch die einmalige Gabe von DEN in den zwei Wochen alten Tieren.

5.1.2 Zunahme des Lebergewichtes und der LW/BW-Ratios

Im Rahmen verschiedener Lebererkrankungen kommt es zu pathophysiologischen Veränderungen wie beispielsweise einem Ödem, einer Inflammation oder einer Lipid-Deposition, die sich in einer Zunahme des Lebergewichtes äußern (Abbildung 5A). Dies spiegelt sich auch in einem erhöhten Verhältnis von Lebergewicht (LW) zum Körpergewicht (BW) wider (Abbildung 5B).

Die *S. mansoni*-Infektion führt zu einer Zunahme des Lebergewichtes in g und zu einem Anstieg des Verhältnisses von Lebergewicht zu Körpergewicht in %

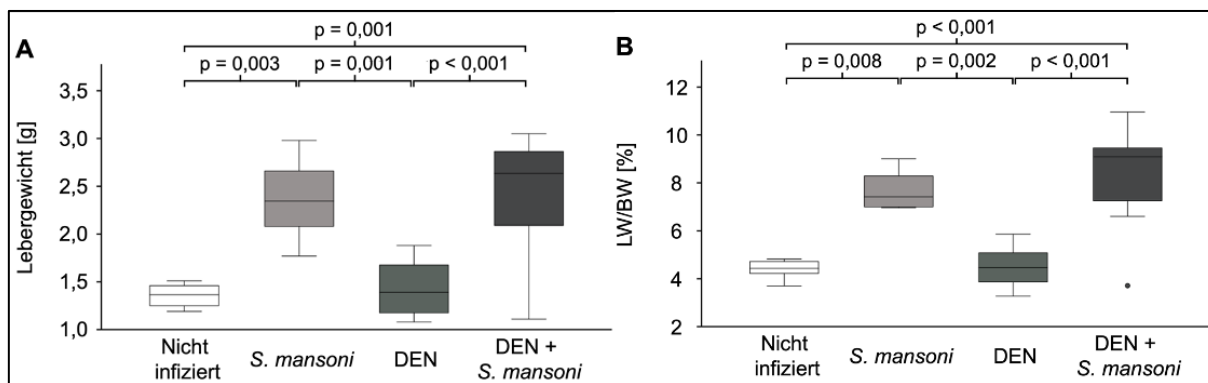


Abbildung 5: Die *S. mansoni*-Infektion führt (A) zu einer Zunahme des Lebergewichtes in g und (B) zu einem Anstieg des Verhältnisses von Lebergewicht zu Körpergewicht (LW/BW) in %. Dargestellt sind Lebergewicht oder LW/BW (Ordinate) der Gruppen Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=12) (Abszisse). Versuchstiere, deren Messwerte über die 1,5-fache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als milde Ausreißer mit einem Punkt gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.

Die Lebern der Kontroll-Tiere wogen im Median 1,37 g und machten einen Anteil von 4,43% des Körpergewichtes aus. Mit einem LW von 1,39 g sowie einem Anteil von 4,47% am Gesamtkörpergewicht wurden in der DEN-Gruppe vergleichbare Werte beobachtet.

Die Infektion mit *S. mansoni* führte zu einem Anstieg des Lebergewichtes auf 2,35 g sowie des Verhältnisses von LW/BW auf 7,42% im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen ($p = 0,003$; $p = 0,008$). Gegenüber den DEN-Mäusen waren LW und LW/BW-Ratio in der *S. mansoni*-Gruppe näherungsweise 1,7-fach erhöht ($p = 0,001$; $p = 0,002$). In den DEN + *S. mansoni*-Mäusen erhöhte sich das Lebergewicht auf 2,64 g und bildete einen Anteil von 9,09% des Körpergewichtes. Im Vergleich zu den Kontroll- und DEN-Tieren waren die Werte somit näherungsweise auf das Doppelte erhöht ($p = 0,001$). Für die Mäuse der infizierten Gruppen konnten vergleichbare Lebergewichte und LW/BW-Verhältnisse ermittelt werden.

Zusammenfassend führte die Infektion mit *S. mansoni* zu einer Schädigung der Leberzellen, die sich in den Gruppen *S. mansoni* und DEN + *S. mansoni* in einem Anstieg der ALT-Konzentration, einem erhöhten Lebergewicht und einem erhöhten Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht äußerte.

5.2 Diethylnitrosamin führt zu hepatischen Dysplasien

5.2.1 Alpha-Fetoprotein im Serum

Das Glykoprotein Alpha-Fetoprotein ist ein etablierter Tumormarker in der Diagnostik und Verlaufskontrolle des hepatozellulären Karzinoms (Kohse, 2019; Samman et al., 2022). Allerdings wird das AFP nur von der Hälfte der HCCs exprimiert (Kohse, 2019). Erhöhte Werte kommen zudem auch im Rahmen diverser anderer hepatologischer Erkrankungen wie Virushepatitiden, Zirrhose oder toxischen Lebererkrankungen vor (Kohse, 2019; Samman et al., 2022).

In der Kontroll- und der *S. mansoni*-Gruppe wurden AFP-Konzentrationen von 42,9 ng/mL beziehungsweise 35,7 ng/mL Serum gemessen (Abbildung 6). Die DEN-Injektion erhöhte die AFP-Konzentration auf 116,67 ng/mL Serum. Die in der DEN-Gruppe ermittelten Werte waren im Vergleich zur Kontroll-Gruppe 2,72-fach ($p = 0,064$) sowie zur *S. mansoni*-Gruppe 3,27-fach ($p < 0,001$) erhöht. Die kombinierte Behandlung mit DEN + *S. mansoni* führte zu einer Zunahme des AFP-Wertes auf 134,3 ng/mL Serum. Gegenüber der Kontroll-Gruppe war das AFP somit 3,13-fach ($p = 0,009$) und gegenüber der *S. mansoni*-Gruppe 3,76-fach gesteigert ($p < 0,001$). Zusammenfassend hatte die Intervention mit dem Hepatokarzinogen DEN in beiden Gruppen einen Anstieg des etablierten Tumormarkers AFP zur Folge.

Die DEN-Injektion ohne Infektion erhöht die Alpha-Fetoprotein-Konzentration im Serum

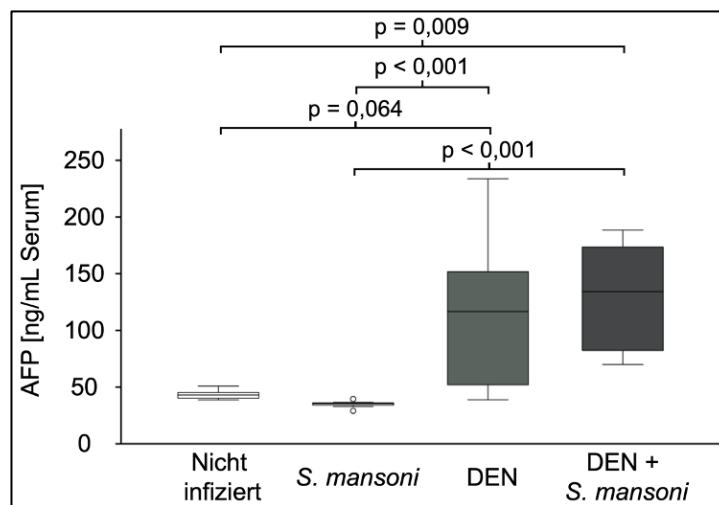


Abbildung 6: Die DEN-Injektion ohne Infektion erhöht die Alpha-Fetoprotein-Konzentration im Serum. Dargestellt ist der AFP-Spiegel in ng/mL Serum (Ordinate) der Gruppen Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=12) (Abszisse). Versuchstiere, deren Messwerte über die 1,5-fache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als milde Ausreißer mit einem Punkt gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.

5.2.2 Histopathologischer Grad der Dysplasie

Der Grad der Dysplasie wurde histopathologisch im Gewebeverband evaluiert. Dies ermöglicht die Identifikation der Art der Zellveränderung sowie die Verteilung und das Ausmaß dieser in den Lebern der verschiedenen Versuchsgruppen. Anhand des Dysplasiegrads lässt sich das Risiko einer malignen Transformation und Karzinomentwicklung durch die Interventionen abschätzen. In diesem Zusammenhang wurde das Vorhandensein von Zelltypen wie Zytomegalie, Anisokaryose, Karyomegalie und somit mutmaßlicher Polyploidie berücksichtigt (Percy et al., 2016). Histologische Bilder verschiedener Zelltypen sind exemplarisch im Anhang der Arbeit in Kapitel 9.1.3 dargestellt.

In den DEN-Mäusen war der hepatische Grad der Dysplasie im Vergleich zu den drei anderen Gruppen mit einem Wert von 2 erhöht ($p < 0,001$; Abbildung 7). Untereinander unterschied sich der Grad der Dysplasie in den Kontroll-, *S. mansoni*- und DEN + *S. mansoni*-Mäusen nicht. In diesen Gruppen lag der Grad der Dysplasie jeweils bei 1.

Bei der Analyse hepatischer Dysplasien wurde einerseits der HCC-Tumormarker AFP und andererseits das Vorhandensein atypischer Zellen im Lebergewebe analysiert. Während in beiden DEN-behandelten Gruppen erhöhte AFP-Konzentrationen ermittelt

wurden, wurde nur in der DEN-Gruppe ein höherer histopathologischer Grad der Dysplasie gezeigt.

Die DEN-Injektion ohne Infektion erhöht den hepatischen Grad der Dysplasie

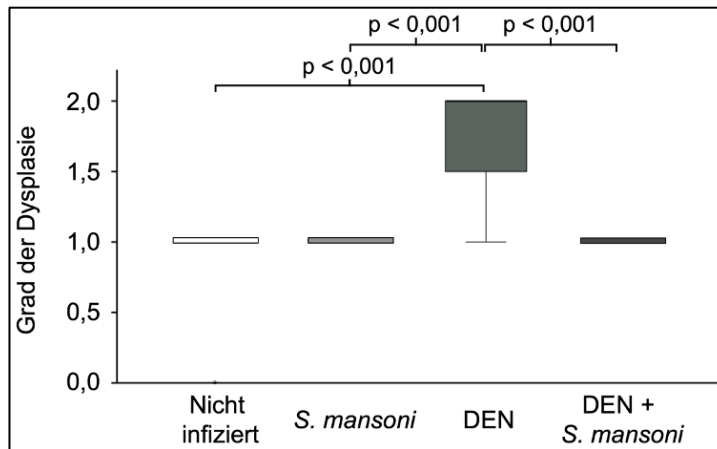


Abbildung 7: Die DEN-Injektion ohne Infektion erhöht den hepatischen Grad der Dysplasie. Dargestellt ist der histopathologische Dysplasiegrad (Ordinate) der Gruppen Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=12) (Abszisse). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.

5.3 Diethylnitrosamin beeinflusst nicht die Menge an Parasiteneiern in den Lebern *S. mansoni*-infizierter Mäuse

Die Zahl der *S. mansoni*-Eier pro Granulom oder pro mg Lebergewebe entspricht der Menge an metabolisch aktiven Pathogenitätsfaktoren, die mit dem Lebergewebe interagieren können (Abbildung 8).

Die DEN-Injektion beeinflusst nicht die Menge der Parasiteneier in den Lebern *S. mansoni*-infizierter Mäuse

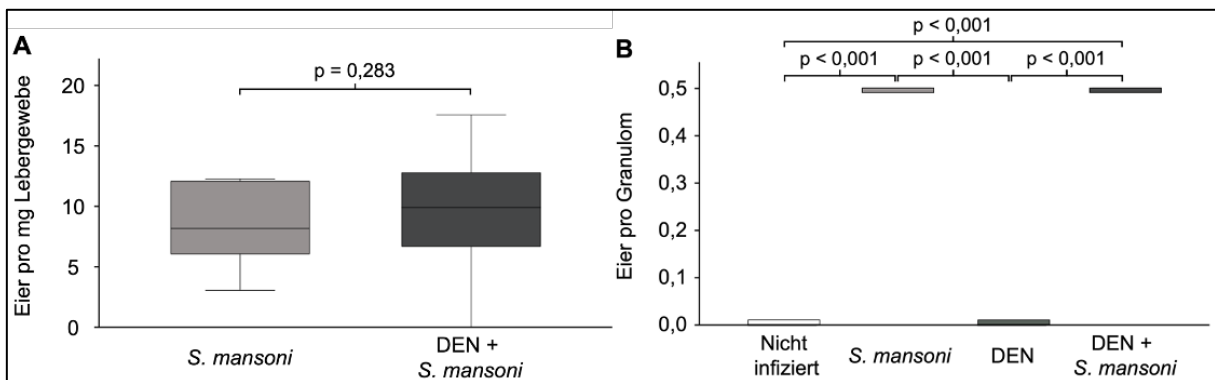


Abbildung 8: Die DEN-Injektion beeinflusst nicht die Menge der Parasiteneier in den Lebern *S. mansoni*-infizierter Mäuse (A) pro mg Lebergewebe nach dem Kaliumhydroxid-Verdau und (B) pro Granulom. Dargestellt sind Zahl der Eier pro mg Lebergewebe oder pro Granulom (Ordinate) der Gruppen Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=12) (Abszisse). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.

Im Lebergewebe der *S. mansoni*- und der DEN + *S. mansoni*-Tiere lag die Anzahl der Eier bei 8,17 und 9,91 Eiern pro mg Lebergewebe ($p = 0,283$). Histopathologisch wurde in beiden Gruppen ein halbes Ei pro Granulom gezählt. Die Lebern der Kontroll- und DEN-Tiere enthielten naturgemäß keine Parasiteneier. Das Vorhandensein von Dezimalzahlen in diesem Zusammenhang erklärt sich durch den Größenunterschied von Granulom zu Parasitenei, sodass bei einem nicht zentralen histologischen Schnitt oft kein Ei sichtbar ist, sondern nur anteilig das Granulom. Daher erscheinen die Granulome in den histologischen Schnitten je nach Anschnitt des Granuloms mit, ohne oder mit teilweise vorhandenem Parasitenei.

Insgesamt war die hepatische Eilast in den beiden *S. mansoni*-infizierten Gruppen vergleichbar und wurde nicht durch die Injektion von Diethylnitrosamin beeinflusst. Dies legt die Vermutung nahe, dass die im weiteren Verlauf gemessenen Unterschiede zwischen den infizierten Gruppen nicht durch eine unterschiedliche Menge an parasitären Pathogenitätsfaktoren, sondern durch ein Zusammenwirken der Interventionen DEN-Injektion und *S. mansoni*-Infektion hervorgerufen wurden.

5.4 *S. mansoni* induziert eine granulomatöse hepatische Inflammation

Um Einblicke in das hepatische Inflammationsgeschehen zu erhalten, wurden in einem ersten Schritt die Leberschnitte histopathologisch auf das Vorhandensein von Entzündungszellen analysiert. Die Unterteilung in eine portale und lobuläre Inflammation lässt in diesem Zusammenhang zudem Rückschlüsse auf die hepatische Lokalisation inflammatorischer Zellen zu. Anhand einer qRT-PCR und eines Western Blots des Pan-Leukozyten-Markers CD45 aus den Leberlysaten kann auf das Ausmaß der hepatischen Infiltration mit Leukozyten geschlossen werden. Aus der Literatur geht hervor, dass an der Entzündungsreaktion auf Parasiten wie *S. mansoni* hauptsächlich CD4⁺ T-Helferzellen beteiligt sind, die anhand charakteristischer Zytokine weiter in die Subtypen Th1- und Th2-Zellen unterteilt werden können (Zheng et al., 2020). Daher erfolgte die semiquantitative Analyse ebendieser Zytokine mittels qRT-PCR.

5.4.1 Histopathologischer Grad der Inflammation

Aufschluss über das Ausmaß der Inflammation im Lebergewebe lieferte das histopathologische *Grading* nach Kleiner und Goodman (Goodman, 2007; Kleiner, 2018). In der Kontroll- und der DEN-Gruppe wurde keine Inflammation identifiziert.

Dagegen war der Grad der Inflammation in den Lebern der *S. mansoni*-Mäuse im Vergleich zu den Kontroll- und DEN-Mäusen auf 4,5 gesteigert ($p < 0,001$; Abbildung 9). In der Versuchsgruppe DEN + *S. mansoni* wurde ein Grad der Inflammation von 4,0 beobachtet, der somit ebenfalls gegenüber den beiden nicht-infizierten Versuchsgruppen erhöht war ($p < 0,001$).

Die *S. mansoni*-Infektion induziert eine hepatische Inflammation

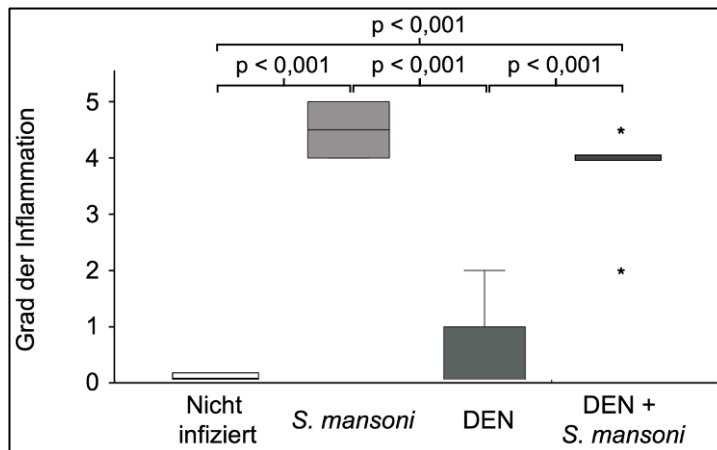


Abbildung 9: Die *S. mansoni*-Infektion induziert eine hepatische Inflammation. Dargestellt ist der histopathologische Grad der Inflammation (Ordinate) der Gruppen Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=12) (Abszisse). Versuchstiere, deren Messwerte über die dreifache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als extreme Ausreißer mit einem Stern gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.

Mit dem Ziel der weiteren Differenzierung und Lokalisation des Entzündungsgeschehens wurde zudem zwischen einer lobulären und einer portalen Inflammation unterschieden (Abbildung 10). Histopathologische Beispielbilder für die Werte 0-3 der lobulären oder der portalen Inflammation sind im Anhang dieser Arbeit im Kapitel 9.1.3 zu finden.

Im Bereich der Leberläppchen führte die *S. mansoni*-Infektion mit einem Wert von 1,5 zu einem erhöhten Entzündungsgeschehen im Vergleich zu den Kontroll- ($p = 0,002$) und den DEN-Mäusen ($p = 0,009$). Vergleichbare Verhältnisse wurden in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe dargestellt, deren Mäusen ein lobulärer Entzündungsscore von 2,0 zugeordnet wurde ($p < 0,001$). In den Kontroll- und DEN-Mäusen wurde keine lobuläre Entzündung beobachtet. Innerhalb der *S. mansoni*- und der DEN-Gruppe fiel zudem eine Streuung der Werte auf. Insbesondere in der DEN-Gruppe zeigte diese die Tendenz in Richtung eines stärkeren lobulären Inflammationsgeschehens.

In den Portalbereichen der Leber war erneut weder in der Kontroll- noch in der DEN-Gruppe ein Entzündungsgeschehen zu ermitteln. Die *S. mansoni*-Infektion provozierte ein portales Inflammationsgeschehen, das einem Zahlenwert von 3,0 entsprach. Dieses war gegenüber der Kontroll- und der DEN- ($p < 0,001$) sowie gegenüber der

DEN + *S. mansoni*-Gruppe erhöht ($p = 0,035$). Der portalen Entzündung der DEN + *S. mansoni*-Mäuse wurde ein Zahlenwert von 2,0 zugeordnet, der ebenfalls gegenüber der Kontroll- und DEN-Gruppe erhöht war ($p = 0,004$; $p < 0,001$).

Die *S. mansoni*-Infektion verursacht eine lobuläre und portale Inflammation

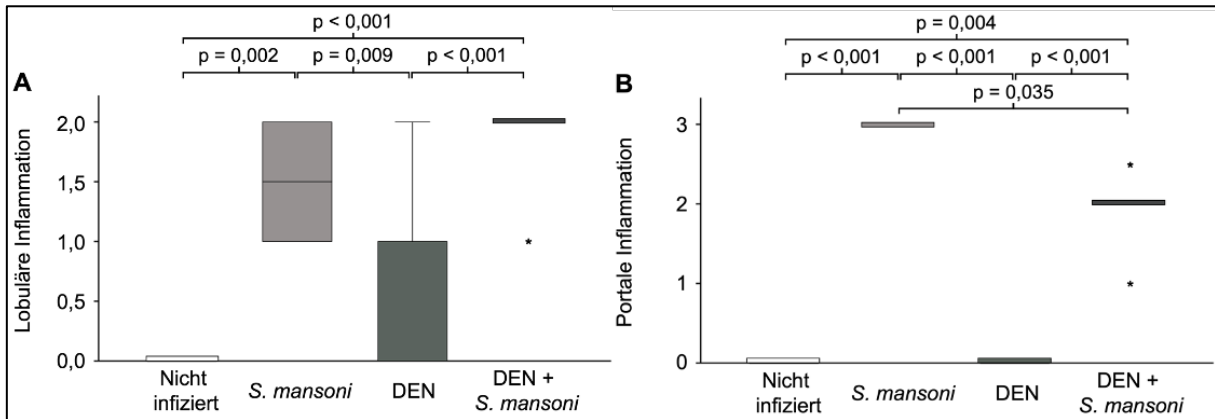


Abbildung 10: Die *S. mansoni*-Infektion verursacht eine lobuläre und portale Inflammation. Dargestellt ist der histopathologische Grad der lobulären oder portalen Inflammation (Ordinate) pro Versuchstier der Gruppen Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=12) (Abszisse). Versuchstiere, deren Messwerte über die dreifache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als extreme Ausreißer mit einem Stern gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.

Im Rahmen der histopathologischen Analyse wurde in den *S. mansoni*-infizierten Versuchstieren ein hepatisches Entzündungsgeschehen beobachtet, das sich über die Bereiche der Leberläppchen sowie der Portalfelder erstreckt. Insbesondere in den Regionen der Leberläppchen führte die DEN-Injektion zu einer Streuung der ermittelten Werte in Richtung einer stärkeren lobulären Inflammation. Zudem wurde in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe eine tendenziell noch ausgeprägtere lobuläre Inflammation identifiziert als in der *S. mansoni*-Gruppe.

5.4.2 Migration von Leukozyten

Die Tyrosinphosphatase CD45 ist als Transmembranprotein auf der Oberfläche von Leukozyten lokalisiert (Gressner & Arndt, 2019). Somit dient das Protein als Pan-Leukozyten-Marker und erlaubt Rückschlüsse auf das Ausmaß leukozytärer Infiltration in einem Gewebe.

In der qRT-PCR wurde in den *S. mansoni*-Mäusen eine im Vergleich zu den Kontroll- ($p = 0,007$) und den DEN-Tieren ($p = 0,011$) 3,31-fach gesteigerte *Cd45*-Expression beobachtet (Abbildung 11A). Diese war ebenfalls tendenziell gegenüber den DEN + *S. mansoni*-Mäusen erhöht ($p = 0,080$), bei denen ein Anstieg der mRNA auf das

2,34-Fache ermittelt wurde. Die DEN-Injektion führte zu einer vergleichbaren *Cd45*-Expression wie in den unbehandelten Tieren.

Mittels Western Blot-Analyse wurde in der *S. mansoni*-Gruppe eine Steigerung der CD45-Proteinmenge auf das Zehn- bis Zwölfwache gegenüber den Kontroll- ($p = 0,009$) und den DEN-Mäusen ($p = 0,024$) identifiziert (Abbildung 11B). In den beiden letztgenannten Gruppen war die hepatische CD45-Konzentration auf einem ähnlichen Niveau. Die kombinierte Intervention mit DEN + *S. mansoni* steigerte die CD45-Proteinmenge auf das näherungsweise Neunfache gegenüber der Kontroll-Gruppe ($p = 0,070$). Zusammenfassend führte die *S. mansoni*-Infektion in beiden infizierten Versuchsgruppen zu einer erhöhten hepatischen Leukozyten-Infiltration. Diese war in den *S. mansoni*-Tieren tendenziell stärker ausgeprägt als in den DEN + *S. mansoni*-Mäusen.

Die *S. mansoni*-Infektion erhöht die hepatische *Cd45*-Expression und CD45-Proteinmenge

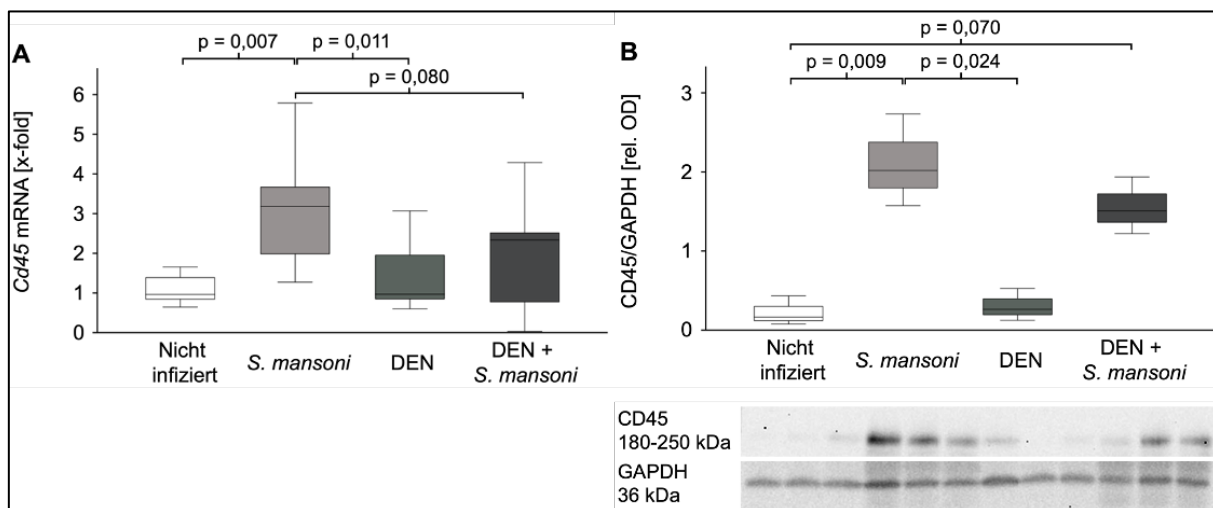


Abbildung 11: Die *S. mansoni*-Infektion erhöht (A) die hepatische *Cd45*-Expression und (B) die hepatische CD45-Proteinmenge. (A) Semiquantitative Darstellung der Regulation von *Cd45* in der qRT-PCR (Ordinate) der vier Gruppen: Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=11) (Abszisse). (B) Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse CD45-positiver Zellen (Ordinate) aus vier experimentellen Gruppen: Nicht infiziert (n=3), *S. mansoni* (n=3), DEN (n=3) und DEN + *S. mansoni* (n=3) (Abszisse), gemessen anhand der Signalintensität der Banden. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot aus drei technischen Replikaten. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Darstellung als Box-Plots, deren Boxen den Median sowie die mittleren 50% der Daten enthalten und durch das erste und dritte Quartil begrenzt werden.

5.4.3 Verstärkung der Th1-Immunantwort

Bei einer Infektion mit *S. mansoni* kommt es zu einer zweiphasigen Immunantwort. Zu Beginn der Infektion dominiert eine Th1-Reaktion, die sich insbesondere gegen die

Parasiten und Wurmantigene richtet (Zheng et al., 2020). Aus diesem Grund erfolgte eine quantitative Messung der für diese Th1-Antwort charakteristischen Zytokine wie *Ifn γ* , *Tnf α* , *Il-1 β* und *Il-6* mittels qRT-PCR im Lebergewebe der Versuchstiere und somit eine Analyse der lokalen Th1-Reaktion (Zheng et al., 2020).

Die *S. mansoni*-Infektion verstärkt die hepatische Genexpression Th1-spezifischer Zytokine

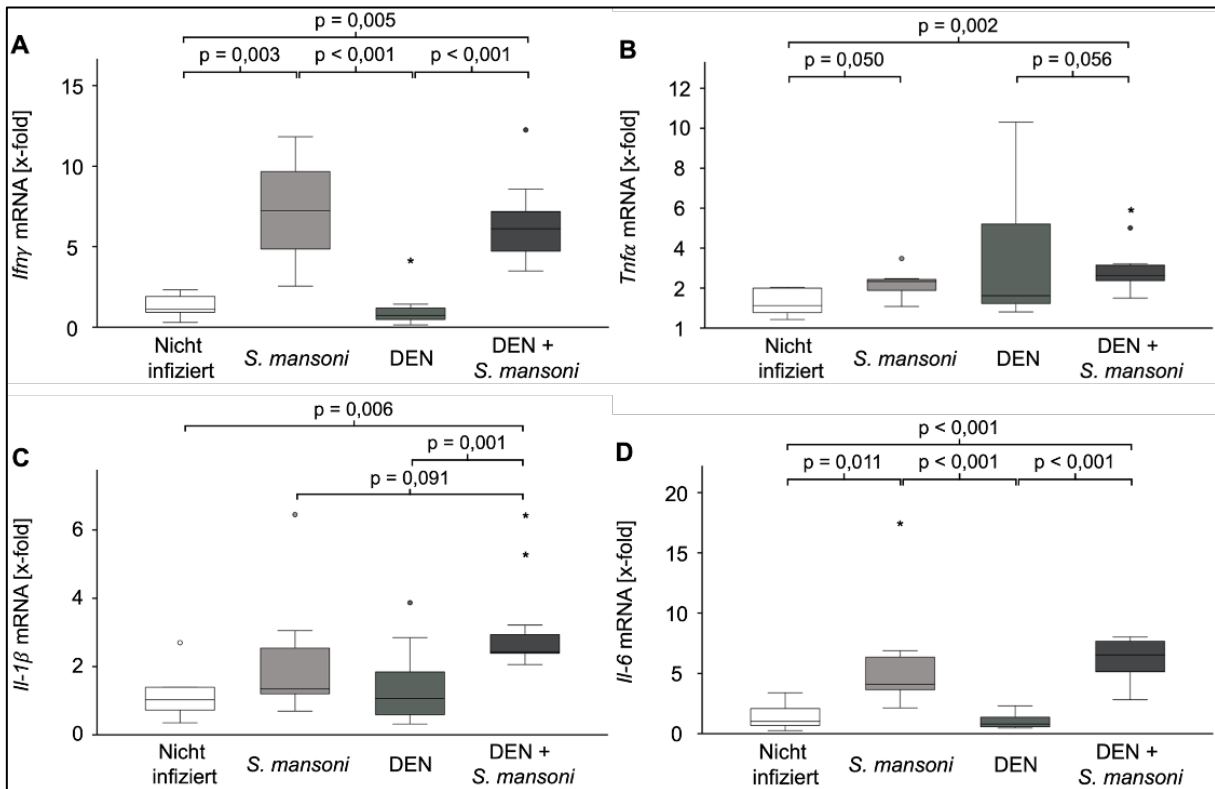


Abbildung 12: Die *S. mansoni*-Infektion verstärkt die hepatische Genexpression Th1-spezifischer Zytokine. Dargestellt ist die semiquantitative Regulation von (A) *Ifn γ* , (B) *Tnf α* , (C) *Il-1 β* und (D) *Il-6* in der qRT-PCR (Ordinate) der Gruppen Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=11) (Abszisse). Versuchstiere, deren Messwerte über die 1,5-fache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als milde Ausreißer mit einem Punkt gekennzeichnet. Versuchstiere, deren Messwerte über die dreifache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als extreme Ausreißer mit einem Stern gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.

In den DEN-behandelten Mäusen war die *Ifn γ* -Expression vergleichbar mit der Kontroll-Gruppe (Abbildung 12A). Die *S. mansoni*-Infektion steigerte die *Ifn γ* -Expression im Vergleich zu den Kontroll- (p = 0,003) und den DEN-Tieren (p < 0,001) auf das Sechsfache bzw. Zehnfache. Auch in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe war die *Ifn γ* -Expression gegenüber der Kontroll- (p = 0,005) sowie der DEN-Gruppe (p < 0,001) auf das Fünf- bis Achtfache erhöht. In den beiden infizierten Versuchsgruppen war die Genexpression von *Ifn γ* auf einem ähnlichen Niveau.

Die *S. mansoni*-Infektion steigerte die *Tnf α* -Expression auf das Doppelte im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen (p = 0,050; Abbildung 12B). In der Gruppe DEN + *S. mansoni*

wurde eine gegenüber den Kontroll-Tieren 2,4-fach erhöhte *Tnf α* -Expression ermittelt ($p = 0,002$). Diese war ebenfalls im Vergleich zur DEN-Gruppe auf einem tendenziell höheren Niveau ($p = 0,056$). In den DEN-Mäusen zeichnete sich eine starke Streuung in Richtung höherer Werte ab.

Die Expression der *IL-1 β* -mRNA war in den DEN-, Kontroll- und *S. mansoni*-Mäusen vergleichbar (Abbildung 12C). In der DEN + *S. mansoni*-Gruppe wurde eine gesteigerte *IL-1 β* -Expression gegenüber den Kontroll- ($p = 0,006$) und DEN-Tieren beobachtet ($p = 0,001$). Darüber hinaus war *IL-1 β* in dieser Gruppe tendenziell auch im Vergleich zur *S. mansoni*-Gruppe erhöht ($p = 0,091$).

Die Infektion mit *S. mansoni* führte zu einer erhöhten hepatischen *IL-6*-Expression (Abbildung 12D). Diese war gegenüber der Kontroll- ($p = 0,011$) sowie der DEN-Gruppe ($p < 0,001$) näherungsweise vierfach gesteigert. In der Gruppe DEN + *S. mansoni* war die *IL-6*-Expression im Vergleich zu den Kontroll- und den DEN-Mäusen auf das näherungsweise Sechsfache angestiegen ($p < 0,001$). Insgesamt war das *IL-6* sowohl unter den nicht-infizierten als auch zwischen den infizierten Gruppen vergleichbar.

5.4.4 Aktivierung der Th2-Immunantwort

Mit dem Beginn der parasitären Eiablage durch die Würme verändert sich die Immunreaktion, sodass eine vor allem Th2-geleitete Reaktion dominiert (Zheng et al., 2020). Entsprechend wurde die hepatische Genexpression Th2-typischer Interleukine wie *IL-4*, *IL-13* und *IL-10* analysiert (Zheng et al., 2020).

In der DEN-Gruppe war die hepatische *IL-4*-Expression vergleichbar mit den Kontroll-Mäusen (Abbildung 13A). Die *S. mansoni*-Infektion führte zu einem 81,5-fachen Anstieg der *IL-4*-Expression im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ($p = 0,007$). In Gegenüberstellung mit den DEN-Tieren war das *IL-4* der *S. mansoni*-Tiere 294,7-fach gesteigert ($p < 0,001$). Auch innerhalb der DEN + *S. mansoni*-Gruppe wurde das *IL-4* im Vergleich zu den Kontroll- (41,5-fach; $p = 0,030$) und den DEN-Tieren (153,4-fach; $p < 0,001$) verstärkt exprimiert. In den beiden infizierten Versuchsgruppen war die *IL-4*-Expression insgesamt auf einem ähnlichen Niveau.

Ein vergleichbares Expressionsmuster wurde für das *IL-13* beobachtet (Abbildung 13B). In den DEN-Mäusen war die *IL-13*-Expression vergleichbar mit den Kontroll-Tieren. Die *S. mansoni*-Infektion erhöhte das *IL-13* im Vergleich zu den Kontroll-Tieren 94-fach ($p = 0,002$) sowie zu den DEN-Tieren 343-fach ($p = 0,006$). In der DEN + *S. mansoni*-Gruppe wurde ein 76- respektive 276-fach erhöhtes *IL-13* im Vergleich zur Kontroll-

($p = 0,008$) und DEN-Gruppe ($p = 0,019$) ermittelt. Untereinander war das *Il-13* in den beiden infizierten Gruppen vergleichbar, streute jedoch stark um den Median.

Die Expression des immunregulatorischen *Il-10* war in den DEN- und Kontroll-Mäusen auf einem ähnlichen Niveau (Abbildung 13C). Die *S. mansoni*-Infektion erhöhte die *Il-10*-Expression um das beinahe Sechsfache gegenüber den Kontroll- ($p = 0,001$) und den DEN-Mäusen ($p = 0,001$). Auch in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe wurde ein näherungsweise fünffach gesteigertes *Il-10* im Vergleich zu den Kontroll- ($p < 0,001$) und den DEN-behandelten Mäusen ($p = 0,001$) gezeigt.

Die *S. mansoni*-Infektion erhöht die hepatische Genexpression Th2-spezifischer Zytokine

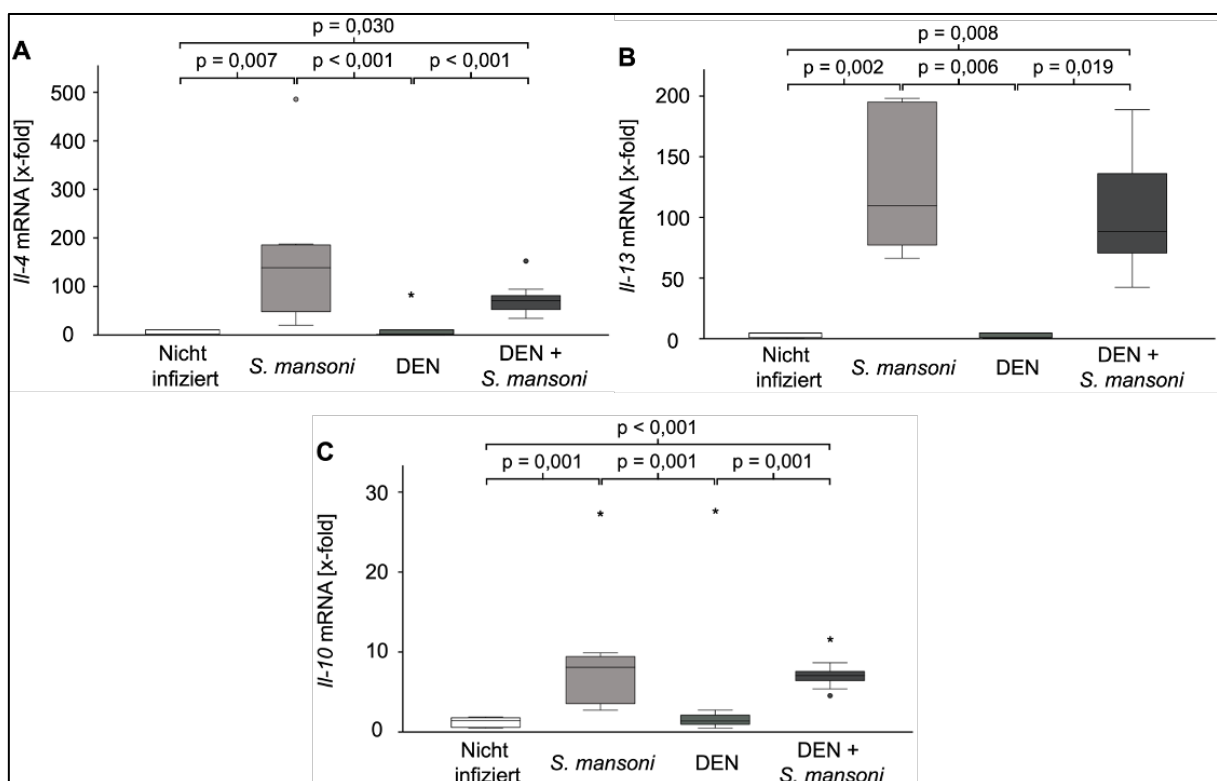


Abbildung 13: Die *S. mansoni*-Infektion erhöht die hepatische Genexpression Th2-spezifischer Zytokine.

Dargestellt ist die semiquantitative Regulation von (A) *Il-4*, (B) *Il-13* und (C) *Il-10* in der qRT-PCR (Ordinate) der Gruppen Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=11) (Abszisse). Versuchstiere, deren Messwerte über die 1,5-fache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als milde Ausreißer mit einem Punkt gekennzeichnet. Versuchstiere, deren Messwerte über die dreifache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als extreme Ausreißer mit einem Stern gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.

Insgesamt führte die *S. mansoni*-Infektion zu einer hepatischen Infiltration von Leukozyten sowie zu einer erhöhten lokalen Genexpression Th1- sowie Th2-spezifischer Zytokine. Die zusätzliche Injektion von DEN erhöhte die lokale Expression des Th1-Zytokins *Il-1 β* tendenziell noch weiter. Histopathologisch wurde ein tendenziell additives

Wirken von DEN + *S. mansoni* in den Regionen der Leberläppchen lokalisiert (Abbildung 10A).

5.5 *S. mansoni* verursacht oxidativen Stress

Um das Ausmaß des oxidativen Stresses in den Lebern der Versuchsgruppen zu evaluieren, erfolgte zunächst die Analyse von Malondialdehyd, eines Produktes der durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verursachten Lipidperoxidation (Ayala et al., 2014). In einem weiteren Schritt wurde die Genexpression der Enzyme *SOD1*, *Kat* und *GPX3* ermittelt, deren Funktion in einer Beseitigung reaktiver Oxidantien besteht (Kelly et al., 1998). Im Zuge der Pathogenabwehr katalysiert die Myeloperoxidase ROS und leistet daher einen Beitrag zur oxidativen Dysbalance (Yang et al., 2014). Aus diesem Grund wurde ihre Konzentration sowie Aktivität mittels qRT-PCR, Western Blot, *Activity Assay* und Immunhistochemie dargestellt.

5.5.1 Steigerung der hepatischen Malondialdehyd-Konzentration

Bei oxidativem Stress handelt es sich um einen Überschuss an Oxidantien in einem Gewebe mit entsprechender Schädigung (Sies et al., 2017). In den Zellen reagieren ROS mit Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen ungesättigter Fettsäuren (Ayala et al., 2014). In dieser als Lipidperoxidation (LPO) bezeichneten Reaktion kommt es zur Abstraktion eines der Wasserstoff-Atome und zum Einfügen eines Sauerstoff-Atoms (Ayala et al., 2014). Malondialdehyd (MDA) ist eines der Reaktionsprodukte der LPO und besitzt unter diesen die stärksten mutagenen Eigenschaften (Ayala et al., 2014). Die Bestimmung der MDA-Konzentration erlaubt Rückschlüsse auf das Ausmaß des oxidativen Stresses in einem Gewebe (Ayala et al., 2014).

In den Gruppen der Kontroll-, *S. mansoni*- und DEN-Mäuse waren die MDA-Konzentrationen in nmol/mg Lebergewebe vergleichbar (Abbildung 14). In der Versuchsgruppe DEN + *S. mansoni* wurde ein 1,4-facher Anstieg des MDA-Gehaltes gegenüber den Kontroll- ($p = 0,018$), den DEN- ($p = 0,011$) sowie den *S. mansoni*-Mäusen ($p = 0,002$) ermittelt.

Die Kombination aus DEN-Injektion + *S. mansoni*-Infektion steigert die hepatische Malondialdehyd-Konzentration

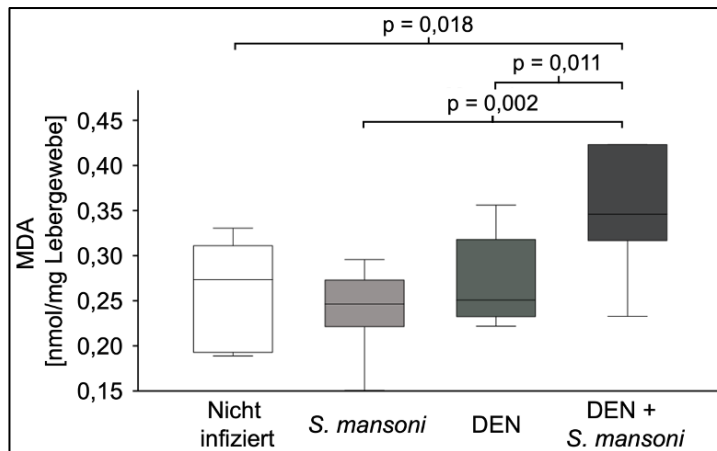


Abbildung 14: Die Kombination aus DEN-Injektion + *S. mansoni*-Infektion steigert die hepatische Malondialdehyd-Konzentration. Dargestellt ist der MDA-Spiegel in nmol/mg Lebergewebe (Ordinate) der Gruppen Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=12) (Abszisse). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.

5.5.2 Reduktion der hepatischen *Superoxiddismutase 1*-Expression

Das kupfer- und zinkhaltige Enzym Superoxiddismutase 1 (SOD1) katalysiert die Umsetzung von O_2^- zu H_2O_2 und O_2 und dient somit der Entfernung reaktiver Sauerstoffspezies (Huang et al., 2012). Um die antioxidative Kapazität im Lebergewebe zu analysieren, erfolgte die Messung der mRNA des Enzyms mittels qRT-PCR (Abbildung 15). In der *S. mansoni*-Gruppe war die Enzymexpression gegenüber der Kontroll- ($p = 0,005$) sowie der DEN-Gruppe ($p = 0,014$) näherungsweise um die Hälfte reduziert. Ebenfalls wurde in den DEN + *S. mansoni*-Mäusen eine im Vergleich zu den Kontroll- und den DEN-Tieren näherungsweise 2,8-fach herunterregulierte *Sod1* gezeigt ($p < 0,001$). Die DEN-Injektion führte zu einer vergleichbaren *Sod1*-Expression wie in den unbehandelten Mäusen.

Die *S. mansoni*-Infektion reduziert die hepatische *Superoxiddismutase 1*-Expression

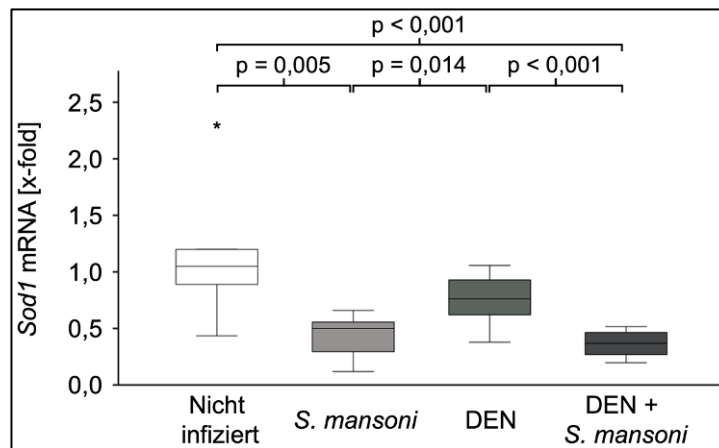


Abbildung 15: Die *S. mansoni*-Infektion reduziert die hepatische *Superoxiddismutase 1*-Expression. Dargestellt ist die semiquantitative Regulation der *Sod1* in der qRT-PCR (Ordinate) der Gruppen Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=11) (Abszisse). Versuchstiere, deren Messwerte über die dreifache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als extreme Ausreißer mit einem Stern gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.

5.5.3 Verringerung der hepatischen *Katalase*-Expression

Für die weitere Umsetzung des in der *Sod1*-Reaktion entstandenen H_2O_2 ist unter anderem das Enzym Katalase verantwortlich. Die Katalase spaltet pro Reaktion zwei Moleküle H_2O_2 in H_2O und O_2 und ist somit ebenfalls an der Beseitigung von Sauerstoffradikalen beteiligt (Matés et al., 1999). Aus diesem Grund wurde eine qRT-PCR der *Kat* im Lebergewebe der Versuchstiere durchgeführt (Abbildung 16). Die *S. mansoni*-Infektion reduzierte die *Kat* im Vergleich zur Kontroll- ($p < 0,001$) und zur DEN-Gruppe ($p = 0,003$) näherungsweise auf ein Drittel. In den DEN + *S. mansoni*-Mäusen war die Expression der *Kat* auf ein Fünftel der Kontroll- und DEN-Gruppe verringert ($p < 0,001$). Sowohl zwischen den beiden infizierten als auch zwischen den beiden nicht-infizierten Gruppen war das Expressionsmuster der *Kat* vergleichbar. Zusammenfassend führte die *S. mansoni*-Infektion in beiden Gruppen zu einer reduzierten Expression der antioxidativen Enzyme *Sod1* und *Kat*. Die DEN-Injektion hatte dagegen keinen Einfluss auf die Enzymexpression.

Die *S. mansoni*-Infektion verringert die hepatische *Katalase*-Expression

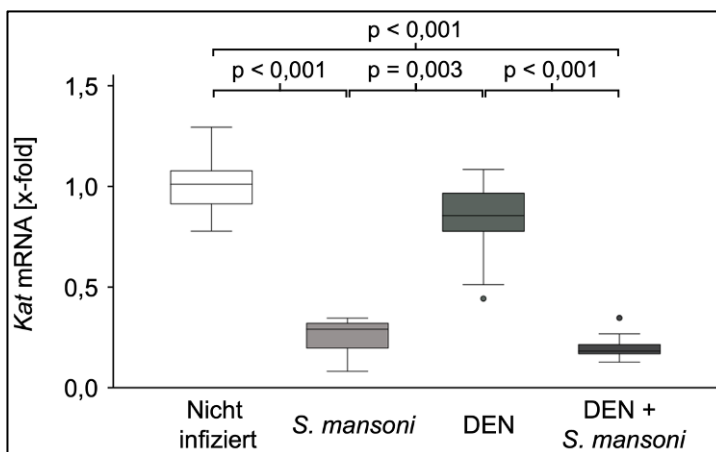


Abbildung 16: Die *S. mansoni*-Infektion verringert die hepatische *Katalase*-Expression. Dargestellt ist die semiquantitative Regulation der *Kat* in der qRT-PCR (Ordinate) der Gruppen Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=11) (Abszisse). Versuchstiere, deren Messwerte über die 1,5-fache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als milde Ausreißer mit einem Punkt gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.

5.5.4 Anstieg der hepatischen *Glutathion-Peroxidase 3*-Expression

Einen weiteren Schutzmechanismus der Zellen vor oxidativem Stress bietet die *Glutathion-Peroxidase 3*, die H_2O_2 auf eine andere Weise zu H_2O reduziert (Taylor et al., 2009). Die qRT-PCR der Leberproben zeigte, dass die DEN-Injektion keinen Einfluss auf die *Gpx3*-Expression hatte (Abbildung 17).

Die *S. mansoni*-Infektion steigert die hepatische *Glutathion-Peroxidase 3*-Expression

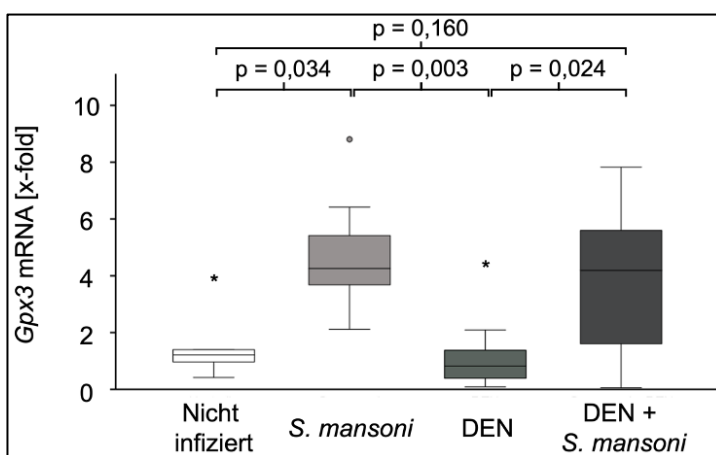


Abbildung 17: Die *S. mansoni*-Infektion steigert die hepatische *Glutathion-Peroxidase 3*-Expression. Dargestellt ist die semiquantitative Regulation der *Gpx3* in der qRT-PCR (Ordinate) der Gruppen Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=11) (Abszisse). Versuchstiere, deren Messwerte über die 1,5-fache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als milde Ausreißer mit einem Punkt gekennzeichnet. Versuchstiere, deren Messwerte über die dreifache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als extreme Ausreißer mit einem Stern gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.

Die *S. mansoni*-Infektion führte zu einer gesteigerten hepatischen *Gpx3* gegenüber der Kontroll- (3,5-fach; $p = 0,034$) und der DEN-Gruppe (5,19-fach; $p = 0,003$). In der DEN + *S. mansoni*-Gruppe wurde eine näherungsweise 3,46-fach respektive 5,1-fach erhöhte *Gpx3* im Vergleich zur DEN- ($p = 0,024$) und Kontroll-Gruppe ($p = 0,160$) ermittelt. Somit war die *Gpx3*-Expression in den beiden infizierten Versuchsgruppen auf einem ähnlichen Niveau. Im Vergleich zu den zuvor analysierten antioxidativen Enzymen *Sod1* und *Kat* hatte die *S. mansoni*-Infektion in Bezug auf die *Gpx3*-Expression gegensätzliche Effekte und führte in beiden infizierten Gruppen zu einer Steigerung.

5.5.5 Verstärkte Aktivität und Konzentration der Myeloperoxidase

Das Enzym Myeloperoxidase setzt im Zuge der Pathogenabwehr radikale Sauerstoffspezies frei (Yang et al., 2014). Es erfolgte die semiquantitative Messung der MPO als wichtige Quelle zellschädigender Radikale mittels qRT-PCR und Western Blot sowie die Analyse der Aktivität des Enzyms mittels ELISA.

In der qRT-PCR wurde eine durch die *S. mansoni*-Infektion hochregulierte *Mpo* identifiziert (Abbildung 18A). Diese war im Vergleich zur Kontroll-Gruppe 51,9-fach ($p = 0,025$) sowie zur DEN-Gruppe 73,43-fach ($p < 0,001$) erhöht. Ebenso wurde in den DEN + *S. mansoni*-Mäusen eine gegenüber den Kontroll-Tieren 143,7-fach gesteigerte *Mpo* ermittelt ($p = 0,002$). Im Vergleich zu den DEN-Tieren war die *Mpo* in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe um das 203,07-Fache angestiegen ($p < 0,001$). In einer Gegenüberstellung der beiden infizierten Gruppen war die *Mpo* in der Gruppe DEN + *S. mansoni* 2,77-fach höher als in der Gruppe *S. mansoni*, jedoch insgesamt auf einem ähnlichen Niveau. Die DEN-Injektion führte zu vergleichbaren Werten mit der Kontroll-Gruppe.

In den Leberlysaten der *S. mansoni*-Mäuse wurde eine 16-fach höhere MPO-Proteinmenge im Vergleich zu den Kontroll-Tieren ermittelt ($p = 0,002$; Abbildung 18B). In der DEN + *S. mansoni*-Gruppe stieg diese im Vergleich zu den Kontroll-Tieren um den Faktor 25,29 ($p < 0,001$). Außerdem war die MPO in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe tendenziell gegenüber den DEN-Tieren erhöht ($p = 0,087$). In einer Gegenüberstellung der beiden infizierten Gruppen war die MPO vergleichbar. Die DEN-Injektion führte ebenfalls zu einem Anstieg der MPO auf das 3,14-Fache gegenüber den Kontroll-Mäusen ($p = 0,012$).

Die *S. mansoni*-Infektion steigert die hepatische *Myeloperoxidase*-Expression und -
Proteinkonzentration

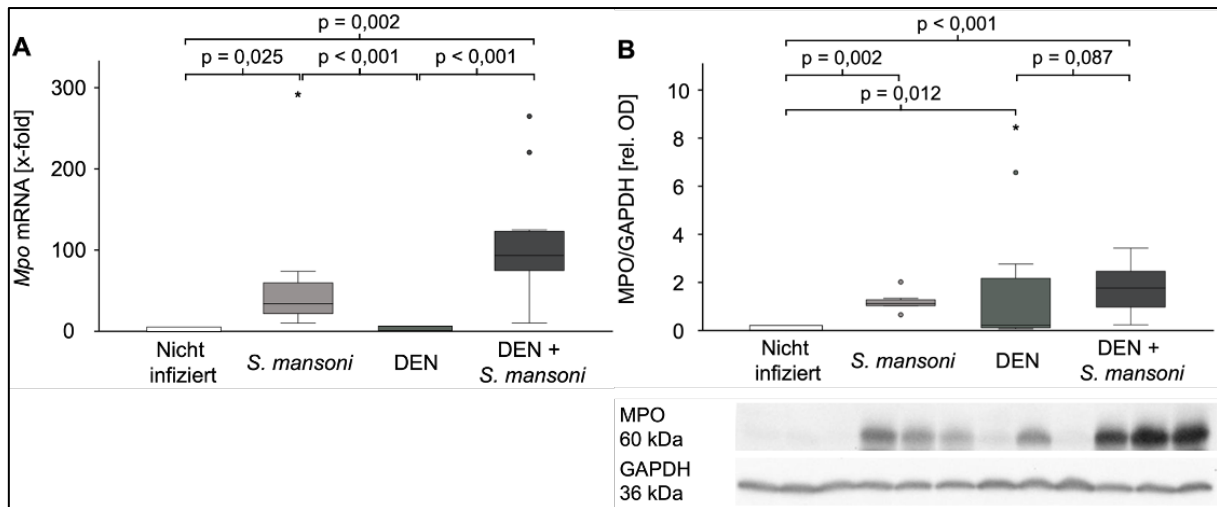


Abbildung 18: (A) Die *S. mansoni*-Infektion steigert die hepatische *Myeloperoxidase*-Expression und (B) der Myeloperoxidase-Proteinkonzentration. (A) Semiquantitative Darstellung der Regulation der *Mpo* in der qRT-PCR (Ordinate) der vier Gruppen: Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=11) (Abszisse). (B) Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse MPO-positiver Zellen (Ordinate) aus vier experimentellen Gruppen: Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=12) (Abszisse), gemessen anhand der Signalintensität (rel. OD) der Banden. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot aus drei technischen Replikaten. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Darstellung als Box-Plots, deren Boxen den Median sowie die mittleren 50% der Daten enthalten und durch das erste und dritte Quartil begrenzt werden. Versuchstiere, deren Messwerte über die 1,5-fache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als milde Ausreißer mit einem Punkt gekennzeichnet. Versuchstiere, deren Messwerte über die dreifache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als extreme Ausreißer mit einem Stern gekennzeichnet.

Mittels MPO-ELISA wurde eine stärkere Aktivität der MPO in den *S. mansoni*-Tieren im Vergleich zu den Kontroll- (3,73-fach; $p = 0,003$) sowie zu den DEN-Mäusen (2,75-fach; $p = 0,004$) gezeigt (Abbildung 19). Ebenfalls wurde in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe eine gegenüber der Kontroll-Gruppe 5,9-fach und gegenüber der DEN-Gruppe 4,34-fach gesteigerte MPO-Aktivität ermittelt ($p < 0,001$). In der DEN + *S. mansoni*-Gruppe wurde zudem eine Streuung der Werte in Richtung einer höheren MPO-Aktivität im Vergleich zur *S. mansoni*-Gruppe beobachtet. Die Aktivität der MPO in den DEN-behandelten Mäusen war vergleichbar mit den Kontroll-Tieren.

Die *S. mansoni*-Infektion verstärkt die hepatische Aktivität der Myeloperoxidase

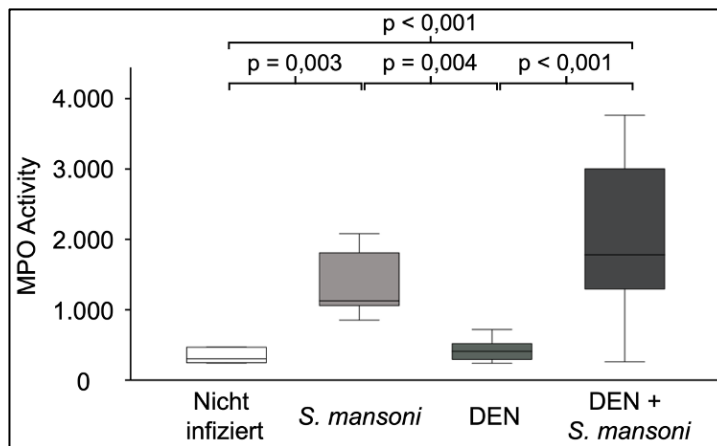


Abbildung 19: Die *S. mansoni*-Infektion verstärkt die hepatische Aktivität der Myeloperoxidase. Eine Einheit ist definiert als Enzymmenge, die das Substrat so oxidiert, dass 1 μmol Fluorescein pro Minute bei Raumtemperatur entsteht. Dargestellt ist die MPO-Aktivität (Ordinate) der Gruppen Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=12) (Abszisse). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.

Eine Immunhistochemie der Leberschnitte ermöglicht die Lokalisation der MPO-Quelle im Gewebeverband und erlaubt Rückschlüsse auf das Ausmaß der Infiltration dieser Zellen als Reaktion auf eine mögliche Chemotaxis (Abbildung 20). Im Vergleich der vier Gruppen wurde eine erhöhte Anzahl rot gefärbter und somit MPO-positiver Zellen in den Gruppen *S. mansoni* und DEN + *S. mansoni* dargestellt. In der *S. mansoni*-Gruppe fokussierten sich diese Zellen auf die Granulome und waren in den Portalfeldern lokalisiert. Im Leberparenchym der DEN + *S. mansoni*-Tiere schien die Verteilung MPO-positiver Zellen eher diffus. In dieser Gruppe waren die Zellen ebenfalls auf das Granulom fokussiert, jedoch erstreckte sich die Infiltration auf den gesamten histologischen Schnitt und umfasste auch die Leberläppchen. Außerdem formierten sich in dieser Gruppe MPO-positive Zellen zu Zellverbänden. Zudem war die Rotfärbung stellenweise deutlich intensiver als in der *S. mansoni*-Gruppe. Insgesamt fiel eine Variabilität der Größe der gefärbten Zellen auf.

Zusammenfassend wurde bei der Analyse des oxidativen Stresses eine erhöhte MDA-Konzentration im Lebergewebe der DEN + *S. mansoni*-Mäuse ermittelt. Die *S. mansoni*-Infektion führte zu einer Herabregulation der Enzyme *Sod1* und *Kat* sowie zu einer Steigerung der *Gpx3*-Expression, wobei alle drei Enzyme Teil der antioxidativen Abwehr sind. Die *S. mansoni*-Infektion steigerte Expression, Protein-Konzentration sowie -Aktivität der MPO, eines pro-oxidativen Enzyms und ROS-Produzenten. Darüber hinaus waren in der Gruppe DEN + *S. mansoni* insbesondere *Mpo*-Expression und MPO-Aktivität tendenziell stärker ausgeprägt als in den *S. mansoni*-Mäusen. Die Immunhistochemie MPO-positiver Zellen unterstreicht diese Tendenz.

Die *S. mansoni*-Infektion erhöht die Konzentration Myeloperoxidase-positiver Zellen in den Leberschnitten der Mäuse

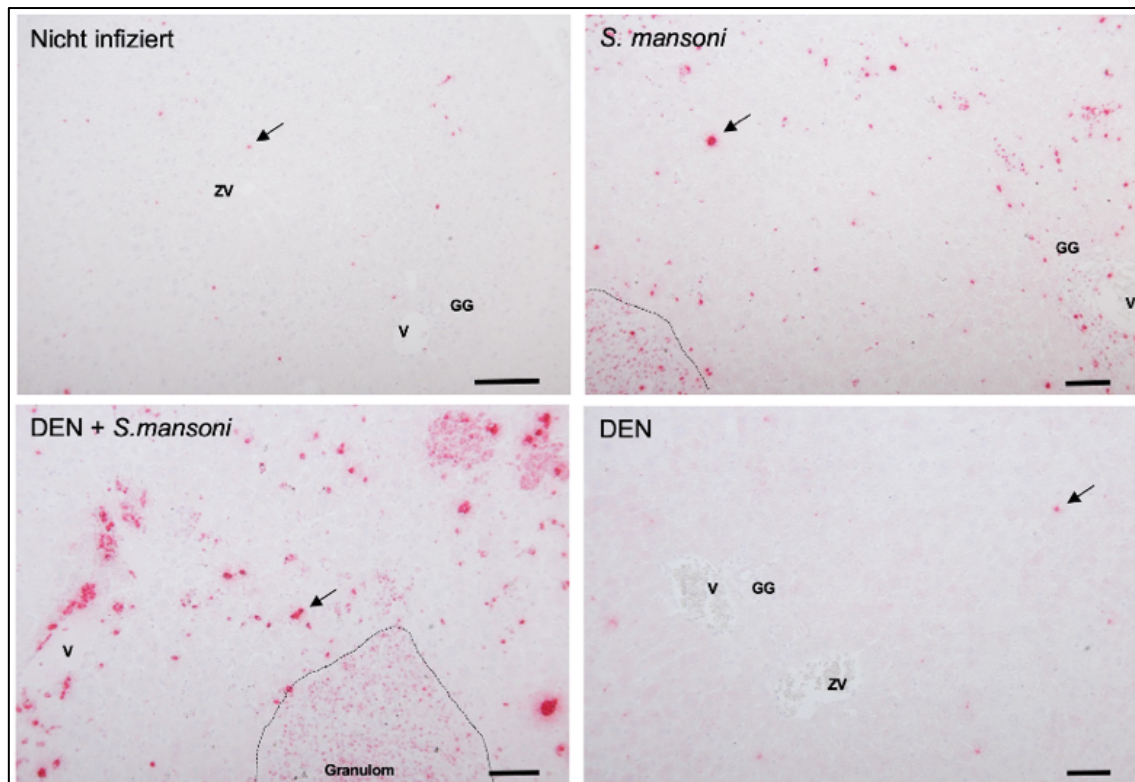


Abbildung 20: Die *S. mansoni*-Infektion erhöht die Konzentration Myeloperoxidase-positiver Zellen in den Leberschnitten der Mäuse. Gezeigt ist eine Immunhistochemie gegen die MPO. 200x Vergrößerung, der Balken entspricht 100 μ m. Von links oben nach rechts unten: Nicht infiziert, *S. mansoni*, DEN + *S. mansoni* und DEN. MPO rot eingefärbte Zellen, ZV = Zentralvene, V = Portalvene, GG = Gallengang, Pfeil = MPO-positive Zelle, --- = Granulom.

5.6 Aktivierung der DNA-Replikationsmarker MCM2 und PCNA

Als Reaktion auf Leberschädigungen durch eine inflammatorische Mikroumgebung oder das Wirken von ROS proliferieren Leberzellen, um das Gewebe regenerativ zu ersetzen (Porta et al., 2011). Darüber hinaus vermehren sich Entzündungszellen am Ort der Läsion durch beispielsweise Pathogene, um diese effektiv bekämpfen zu können. Die Proteine MCM2 aus dem *Minichromosome Maintenance-Complex* und das *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) üben ihre Funktion während der Replikation eukaryotischer Zellen aus (Rassow et al., 2022). Daher lassen sich anhand der Konzentration dieser Proteine Rückschlüsse auf die Menge der Zellen in einem Gewebe ziehen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden.

Die *S. mansoni*-Infektion führte zu einer 5,8- beziehungsweise 3,31-fach erhöhten MCM2-Proteinmenge im Vergleich zu den Kontroll- ($p = 0,002$) und den DEN-Tieren

($p = 0,030$; Abbildung 21). Die Konzentration des MCM2 war in den beiden letztgenannten Gruppen vergleichbar. In den DEN + *S. mansoni*-Mäusen wurde eine im Vergleich zur Kontroll-Gruppe 8,6-fach und eine zur DEN-Gruppe 4,91-fach gesteigerte MCM2-Konzentration beobachtet ($p < 0,001$). In einer Gegenüberstellung der beiden infizierten Gruppen wurde eine tendenziell noch höhere Menge des Proteins in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe als in der *S. mansoni*-Gruppe detektiert ($p = 0,108$).

Die *S. mansoni*-Infektion aktiviert den DNA-Replikationsmarker MCM2 in der Leber

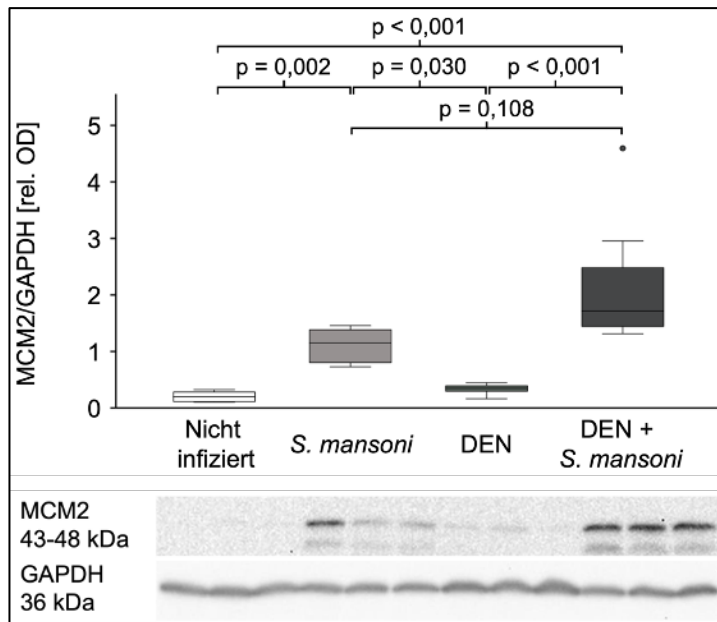


Abbildung 21: Die *S. mansoni*-Infektion aktiviert den DNA-Replikationsmarker MCM2 in der Leber. Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse MCM2-positiver Zellen (Ordinate) aus vier experimentellen Gruppen: Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=12) (Abszisse), gemessen anhand der Signalintensität (rel. OD) der Banden. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot aus drei technischen Replikaten. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Darstellung als Box-Plots, deren Boxen den Median sowie die mittleren 50% der Daten enthalten und durch das erste und dritte Quartil begrenzt werden. Versuchstiere, deren Messwerte über die 1,5-fache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als milde Ausreißer mit einem Punkt gekennzeichnet.

Die Tendenz in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe zu noch höheren MCM2-Werten im Vergleich zur *S. mansoni*-Gruppe wurde ebenfalls in einer Immunhistochemie der Leberschnitte beobachtet (Abbildung 22). Die Identifikation der replizierenden Zellen im Zellverband lässt Rückschlüsse auf die Art der Zellen zu, die diesen Replikationsmarker verstärkt exprimiert. In den nicht-infizierten Tieren wurden vereinzelt rot gefärbte und daher MCM2-positive Zellkerne beobachtet. In den beiden infizierten Gruppen konzentrierten sich MCM2-positive Zellen vor allem um die Granulome. In den DEN + *S. mansoni*-Mäusen waren die replizierenden Zellen außerdem disseminiert im Leberparenchym und auch in den Regionen zwischen den Granulomen lokalisiert. In dieser Gruppe waren zum einen deutlich mehr Zellen angefärbt als in der *S. mansoni*-Gruppe, zum anderen war die Intensität der Färbung in dieser Gruppe stärker. In beiden

infizierten Gruppen variierte die Größe der angefärbten Zellkerne. In der DEN + *S. mansoni*-Gruppe formierten sich vereinzelt größere MCM2-positive Zellen zu Zellverbänden von schätzungsweise 40-50 Zellen.

Die *S. mansoni*-Infektion führt zu einem Anstieg des DNA-Replikationsmarkers MCM2 in den Leberschnitten der Mäuse

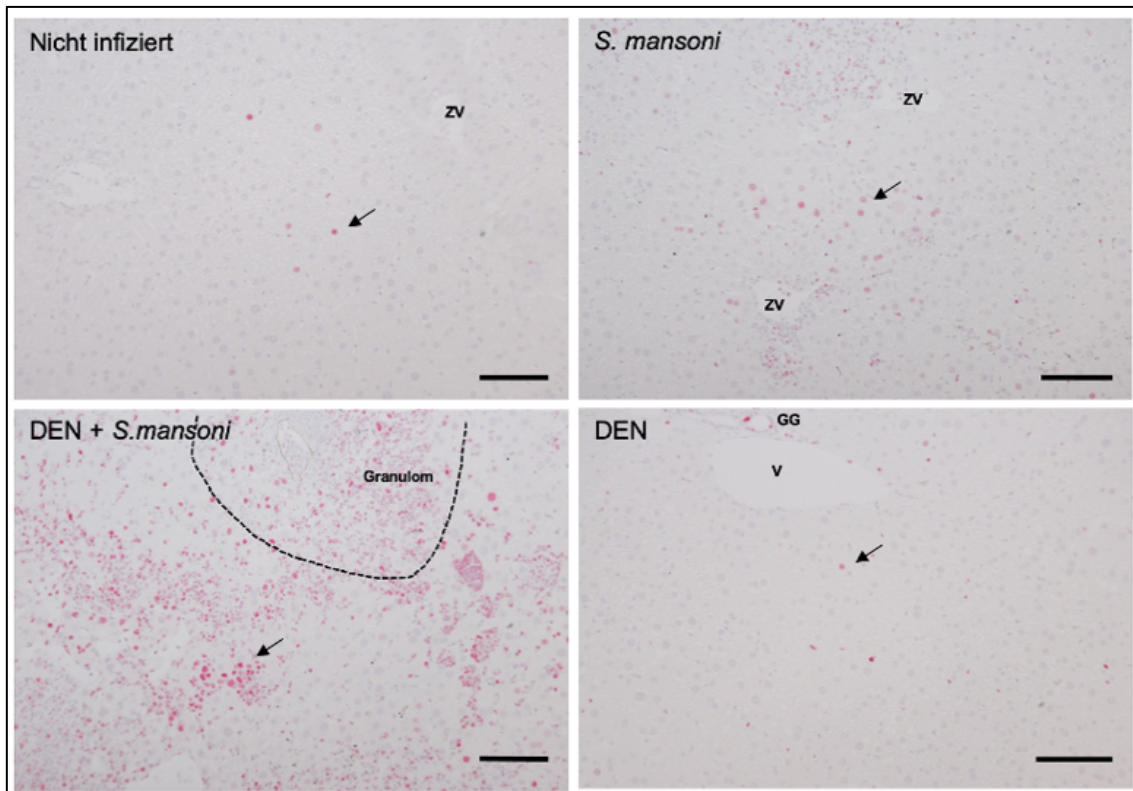


Abbildung 22: Die *S. mansoni*-Infektion führt zu einem Anstieg des DNA-Replikationsmarkers MCM2 in den Leberschnitten der Mäuse. Gezeigt ist eine Immunhistochemie gegen MCM2. 200x Vergrößerung, der Balken entspricht 100 μm . Von links oben nach rechts unten: Nicht infiziert, *S. mansoni*, DEN + *S. mansoni* und DEN. Rot eingefärbte Zellen = MCM2-positive Zelle, ZV = Zentralvene, V = Portalvene, GG = Gallengang, Pfeil = MCM2-positive Zelle, --- = Granulom.

Mithilfe der Western Blot-Analyse wurde in den *S. mansoni*-Tieren ein 4,97- respektive 5,3-facher Anstieg des PCNA im Vergleich zu den Kontroll- ($p = 0,003$) und den DEN-Mäusen ($p < 0,001$) gezeigt (Abbildung 23). Außerdem führte die zusätzliche DEN-Injektion zu einer 5,47-fachen Zunahme des Replikationsmarkers im Vergleich zu den Kontroll-Tieren ($p < 0,001$). Gegenüber den DEN-Versuchstieren war das PCNA in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe 5,8-fach erhöht ($p < 0,001$). Die Mäuse der beiden infizierten Versuchsgruppen wiesen vergleichbare PCNA-Konzentrationen auf. Ebenso verhielt es sich zwischen der Kontroll- und der DEN-Gruppe.

Die *S. mansoni*-Infektion aktiviert den DNA-Replikationsmarker PCNA in der Leber

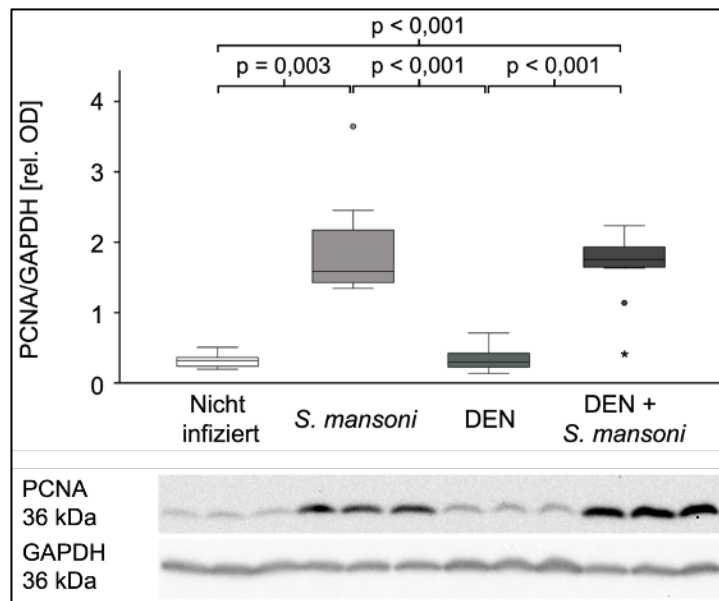


Abbildung 23: Die *S. mansoni*-Infektion aktiviert den DNA-Replikationsmarker PCNA in der Leber. Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse PCNA-positiver Zellen (Ordinate) aus vier experimentellen Gruppen: Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=12) (Abszisse), gemessen anhand der Signalintensität (rel. OD) der Banden. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot aus drei technischen Replikaten. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Darstellung als Box-Plots, deren Boxen den Median sowie die mittleren 50% der Daten enthalten und durch das erste und dritte Quartil begrenzt werden. Versuchstiere, deren Messwerte über die 1,5-fache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als milde Ausreißer mit einem Punkt gekennzeichnet. Versuchstiere, deren Messwerte über die dreifache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als extreme Ausreißer mit einem Stern gekennzeichnet.

Mit dem Ziel der Lokalisation der replizierenden Zellen im Gewebeverband und um mögliche Rückschlüsse auf die Art ebendieser Zellen ziehen zu können, wurde eine Immunhistochemie gegen das PCNA ergänzt. In den Kontroll- und DEN-Mäusen wurden vereinzelt PCNA-positive Zellkerne im Parenchym identifiziert (Abbildung 24). In den infizierten Gruppen wurde erneut eine Fokussierung der Replikationsmarker-positiven Zellen auf die Granulome festgestellt. Außerdem wurde in beiden infizierten Gruppen eine diffuse Färbung von Zellen im Leberparenchym zwischen den Granulomen beobachtet. Innerhalb eines Gewebeschnittes variierte die Intensität der Färbung. Außerdem waren unterschiedlich große Zellkerne angefärbt.

Beide DNA-Replikationsmarker – MCM2 und PCNA – wurden vornehmlich in den Zellkernen der Zellen aktiviert, die sich in der Umgebung der Granulome befanden oder an der Granulom-Formation beteiligt waren. Durch die zusätzliche DEN-Injektion wurde insbesondere in der MCM2-Färbung ein darüber hinaus disseminiertes Verteilungsmuster der gefärbten Zellkerne und somit der sich replizierenden Zellen beobachtet.

Insgesamt führte die *S. mansoni*-Infektion in beiden Gruppen zu einer erhöhten Konzentration der DNA-Replikationsmarker MCM2 und PCNA. Insbesondere das MCM2 war in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe gegenüber der *S. mansoni*-Gruppe tendenziell weiter verstärkt nachweisbar.

Die *S. mansoni*-Infektion führt zu einem Anstieg des DNA-Replikationsmarkers PCNA in den Leberschnitten der Mäuse

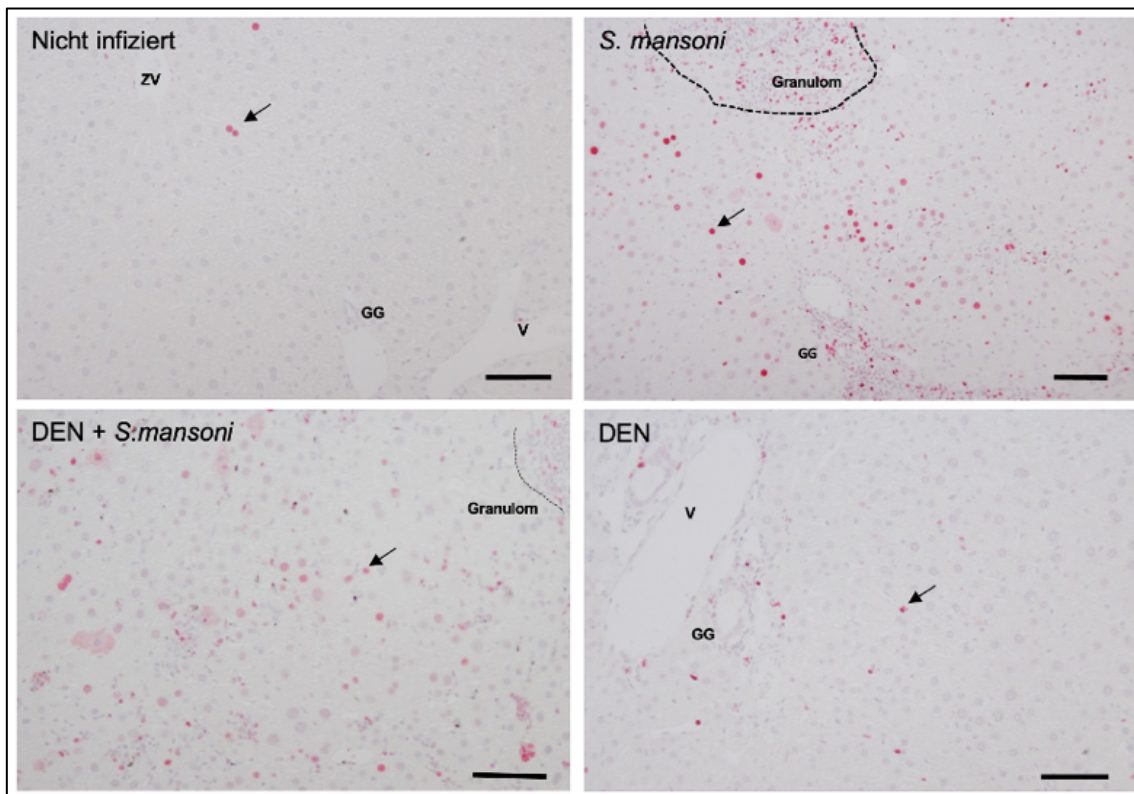


Abbildung 24: Die *S. mansoni*-Infektion verursacht einen Anstieg des DNA-Replikationsmarkers PCNA in den Leberschnitten der Mäuse. Gezeigt ist eine Immunhistochemie gegen PCNA. 200x Vergrößerung, der Balken entspricht 100 µm. Von links oben nach rechts unten: Nicht infiziert, *S. mansoni*, DEN + *S. mansoni* und DEN. Pfeil = PCNA-positive Zelle, ZV = Zentralvene, V = Portalvene, GG = Gallengang, --- = Granulom.

5.7 *S. mansoni* induziert eine Leberfibrose

Neben der Hyperplasie der Leberzellen, quantifiziert durch die Messung der DNA-Replikationsmarker, ist die Deposition extrazellulärer Matrixbestandteile und die daraus resultierende Fibrose ein weiterer Aspekt regenerativer Leberveränderungen (Porta et al., 2011). In diesem Zusammenhang erfolgte die qRT-PCR des Zytokins *Tgf-β*, das die Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen (HSC) in Myofibroblasten (MFB) induziert (Carson et al., 2018). Nach der Transdifferenzierung exprimieren letztere Desmin (Lemoine et al., 2013) und beginnen mit der Synthese und Ablage insbesondere der Kollagene-1 und -3 (Dewidar et al., 2019). Goldstandard in der

Fibrose-Diagnostik ist die Analyse von Hydroxyprolin, einer Aminosäure, die spezifisch im Kollagengewebe vorkommt (Stegemann & Stalder, 1967). Eine Zusammenschau der Ergebnisse bietet der histopathologische Grad der Fibrose.

5.7.1 Anstieg der *Tgf-β*-Expression

Im Rahmen der hepatischen Fibrogenese gilt TGF-β als stärkster fibrogener Agonist (Koyama & Brenner, 2017). Das Zytokin induziert die Transdifferenzierung von HSC in MFB, welche das Material der EZM produzieren und sezernieren (Carson et al., 2018). Aufgrund der zentralen Rolle von TGF-β bei der Induktion der Fibrose erfolgte eine qRT-PCR des Zytokins aus dem Lebergewebe, um Einblicke in die lokale Genexpression zu erhalten (Abbildung 25). Die hepatische *Tgf-β*-Expression war unter den Kontroll-, DEN- und *S. mansoni*-Tieren vergleichbar. Die Intervention mit DEN + *S. mansoni* steigerte die *Tgf-β*-Expression auf das näherungsweise Doppelte im Vergleich zu den Kontroll- ($p = 0,003$), DEN- ($p < 0,001$) und zu den *S. mansoni*-Mäusen ($p = 0,007$).

Die Kombination aus DEN-Injektion + *S. mansoni*-Infektion steigert die hepatische *Tgf-β*-Expression

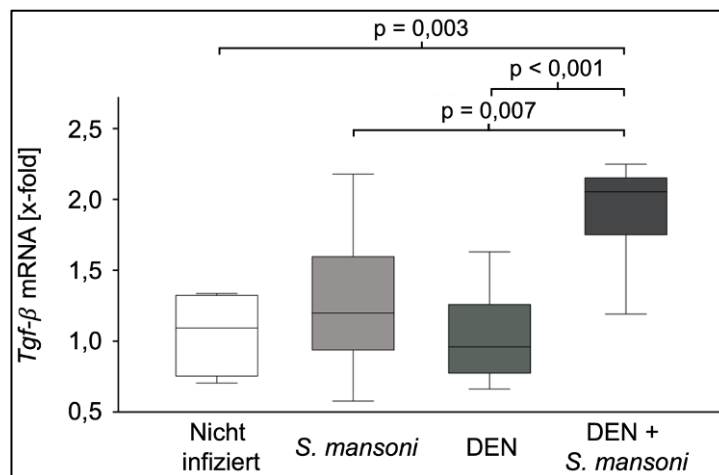


Abbildung 25: Die Kombination aus DEN-Injektion + *S. mansoni*-Infektion steigert die hepatische *Tgf-β*-Expression. Dargestellt ist die semiquantitative Regulation von *Tgf-β* in der qRT-PCR (Ordinate) der Gruppen Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=11) (Abszisse). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.

5.7.2 Erhöhung der Desmin-Konzentration

Nach der Transdifferenzierung von HSC in MFB exprimieren diese Desmin (Lemoine et al., 2013). Ballardini et al. vermuten eine Relevanz des Intermediärfilaments bei der

Aktivierung eines speziell regulierten Kontraktilitätsprogrammes in den HSC, da Desmin kontraktile Aktinbündel miteinander verbindet und sie an der Plasmamembran befestigt (Ballardini et al., 1988). In der Proteinanalyse aus den Leberlysaten der Tiere mittels Western Blot wurde eine näherungsweise 1,7-fache Steigerung der Desmin-Konzentration in den *S. mansoni*-Tieren im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen ermittelt ($p = 0,054$; Abbildung 26). In der DEN + *S. mansoni*-Gruppe wurde ein näherungsweise 1,8-fach erhöhtes Desmin gegenüber den Kontroll- ($p = 0,013$) sowie den DEN-Tieren ($p = 0,031$) beobachtet. Unter den beiden infizierten Versuchsgruppen war die Desmin-Konzentration vergleichbar. Die DEN-Injektion führte zu einer vergleichbaren Proteinkonzentration wie in der Kontroll-Gruppe.

Zusammenfassend führte insbesondere die DEN + *S. mansoni*-Intervention zu einer gesteigerten *Tgf- β* -Expression sowie zu einer erhöhten Desmin-Proteinkonzentration im Vergleich zu den drei anderen Gruppen. Während in der DEN-Gruppe weder ein Anstieg von *Tgf- β* noch Desmin beobachtet wurde, wurde in den *S. mansoni*-Mäusen eine erhöhte hepatische Desmin-Konzentration ermittelt.

Die *S. mansoni*-Infektion erhöht die hepatische Desmin-Konzentration

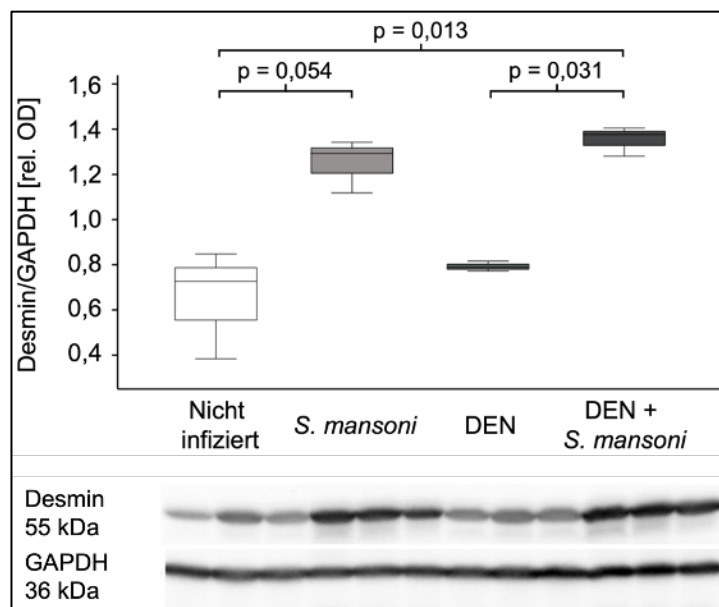


Abbildung 26: Die *S. mansoni*-Infektion erhöht die hepatische Desmin-Konzentration. Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse Desmin-positiver Zellen (Ordinate) aus vier experimentellen Gruppen: Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=12) (Abszisse), gemessen anhand der Signalintensität (rel. OD) der Banden. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot aus drei technischen Replikaten. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Darstellung als Box-Plots, deren Boxen den Median sowie die mittleren 50% der Daten enthalten und durch das erste und dritte Quartil begrenzt werden.

5.7.3 Steigerung der *Kollagen*-Expression und -Ablage

Im Zuge der Fibrogenese werden hauptsächlich die Matrix-Bestandteile Kollagen- (Kol) 1 und -3 exprimiert (Dewidar et al., 2019). Im Zusammenhang mit *S. mansoni* wurde beschrieben, dass sich durch die Infektion das Verhältnis von Kol-1 zu Kol-3 von 2:1 in gesunden Mauslebern zunehmend zu einem Verhältnis von 1:1 in den fibrotischen Lebern verschiebt (Wu et al., 1982). Aus diesem Grund erfolgte die Messung der beiden Kollagene mittels qRT-PCR, um Erkenntnisse einerseits über die Expression, aber auch über das Verhältnis von Kol-1 zu Kol-3 zu gewinnen (Abbildung 27).

Die *Kol-1*-Expression war in den DEN- und Kontroll-Mäusen vergleichbar (Abbildung 27A). Die *S. mansoni*-Infektion steigerte die *Kol-1*-Expression um das 39,5-Fache im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen ($p = 0,008$). Gegenüber der DEN-Gruppe war das *Kol-1* in der *S. mansoni*-Gruppe 46,2-fach erhöht ($p < 0,001$). In der DEN + *S. mansoni*-Gruppe war das *Kol-1* im Vergleich zu den Kontroll-Tieren 46,2-fach und zu den DEN-Tieren 54,1-fach exprimiert ($p < 0,001$). In den beiden infizierten Gruppen war das *Kol-1* auf einem ähnlichen Niveau.

Eine gesteigerte Ablage von Kol-1 in den Lebern infizierter Mäuse wurde ebenfalls immunhistochemisch beobachtet (Abbildung 28). Kol-1-positive Bereiche wurden in allen Versuchsgruppen perivasal in den Periportal- und in den zentrilobulären Regionen angefärbt. In den Leberschnitten *S. mansoni*-infizierter Tiere fiel eine deutlich intensivere Kol-1-Färbung auf, die sich insbesondere auf die Granulome konzentrierte. Darüber hinaus wurden in diesen Schnitten Kollagen-Straßen zwischen den Granulomen sowie zwischen Granulomen und Gefäßregionen dargestellt. Diese Bildung von Kollagen-Septen war in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe stärker ausgeprägt als in den *S. mansoni*-Tieren.

Ein ähnliches Expressionsmuster wurde für das *Kol-3* gezeigt (Abbildung 27B). Die *S. mansoni*-Infektion erhöhte die *Kol-3*-Expression im Vergleich zur Kontroll-Gruppe auf das 11,9-Fache ($p = 0,003$) und im Vergleich zur DEN-Gruppe auf das 16-Fache ($p < 0,001$). In den DEN + *S. mansoni*-Mäusen wurde ein 12- und 16,1-fach gesteigertes *Kol-3* gegenüber der Kontroll- ($p = 0,004$) respektive der DEN-Gruppe ($p < 0,001$) beobachtet. Das Expressionsmuster von *Kol-3* war sowohl zwischen den beiden infizierten als auch zwischen den beiden nicht-infizierten Gruppen vergleichbar.

Insgesamt führte die *S. mansoni*-Infektion zu einer Steigerung der *Kol-1*- und *Kol-3*-Expression im Lebergewebe. Im Vergleich der Kollagene untereinander war der infektionsbedingte Anstieg von *Kol-1* bezogen auf die Werte der Kontroll-Gruppe stärker ausgeprägt als der infektionsbedingte Anstieg von *Kol-3*.

Die *S. mansoni*-Infektion steigert die hepatische Kollagen-1- und -3-Expression

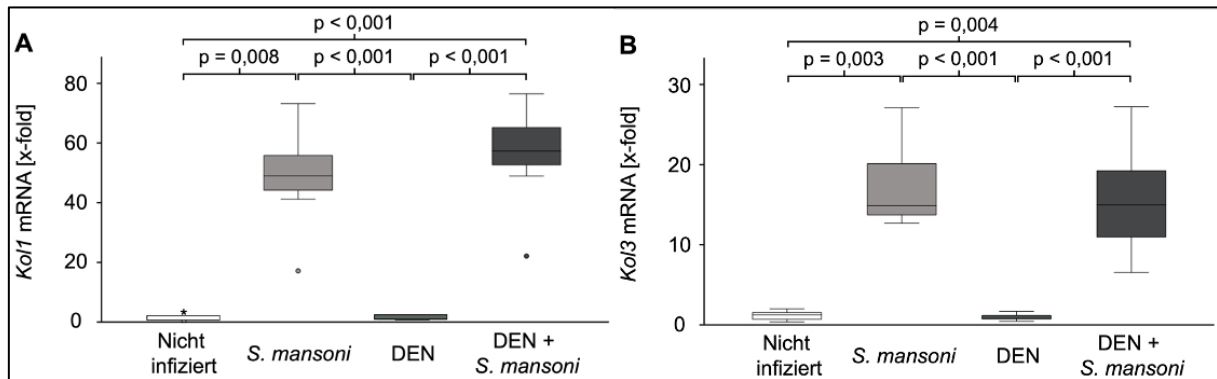


Abbildung 27: Die *S. mansoni*-Infektion steigert die hepatische Kollagen-1- und -3-Expression. Dargestellt ist die semiquantitative Regulation (A) des *Kol-1* und (B) des *Kol-3* in der qRT-PCR (Ordinate) der Gruppen Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=11) (Abszisse). Versuchstiere, deren Messwerte über die 1,5-fache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als milde Ausreißer mit einem Punkt gekennzeichnet. Versuchstiere, deren Messwerte über die dreifache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als extreme Ausreißer mit einem Stern gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.

Die *S. mansoni*-Infektion erhöht die hepatische Ablage von Kollagen-1

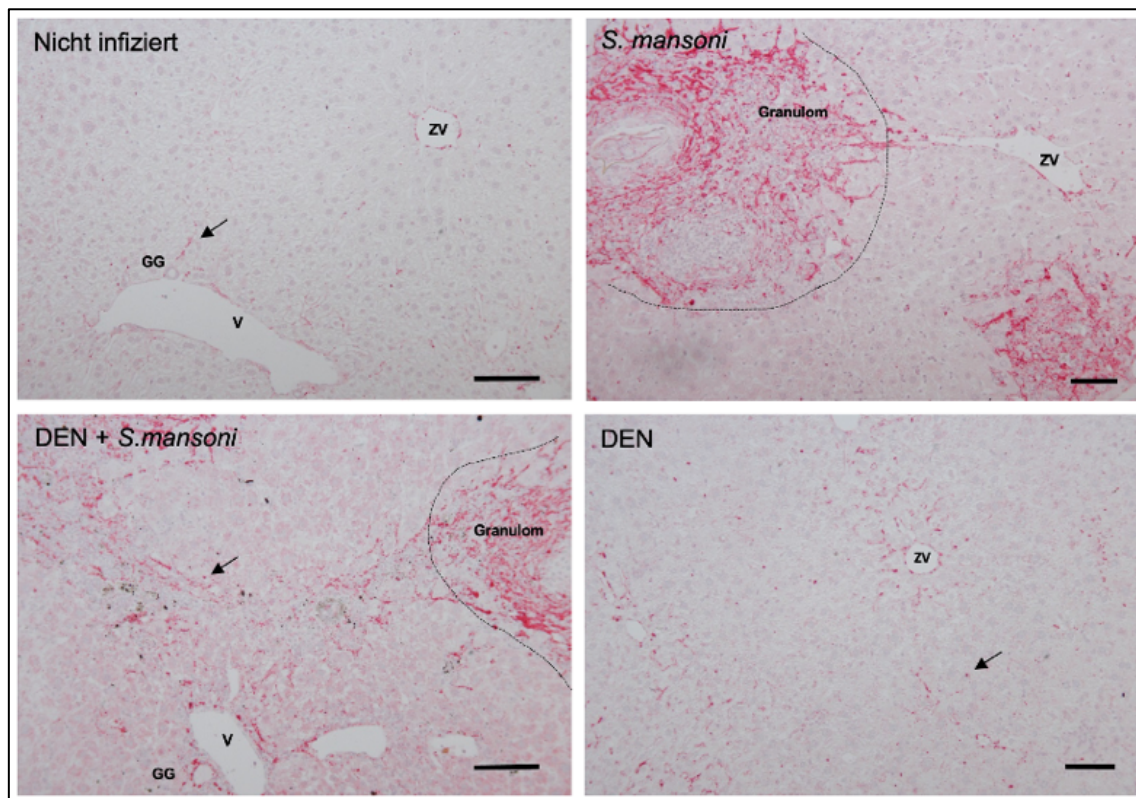


Abbildung 28: Die *S. mansoni*-Infektion erhöht die hepatische Ablage von Kollagen-1. Gezeigt ist eine Immunhistochemie gegen Kol-1. 200x Vergrößerung, der Balken entspricht 100 µm. Von links oben nach rechts unten: Nicht infiziert, *S. mansoni*, DEN + *S. mansoni* und DEN. Pfeil = Kol-1-positive Zelle, ZV = Zentralvene, V = Portalvene, GG = Gallengang, --- = Granulom.

5.7.4 Zunahme der hepatischen Hydroxyprolin-Konzentration

Im Zuge einer fortschreitenden Leberfibrose kommt es zu einer zunehmenden Ablage von Kollagen im Gewebe. Hydroxyprolin ist in diesem Zusammenhang eine spezifisch im kollagenhaltigen Gewebe vorkommende Aminosäure, deren Konzentration mit dem Ausmaß der Fibrose korreliert (Stegemann & Stalder, 1967).

Die DEN-Injektion führte mit 149,5 µg/g zu vergleichbaren hepatischen Hydroxyprolin-Konzentrationen wie in der Kontroll-Gruppe mit 138,25 µg/g Lebergewebe (Abbildung 29). In den *S. mansoni*-Mäusen wurde eine Zunahme der Aminosäure auf 329,95 µg/g Lebergewebe ermittelt. Das Hydroxyprolin war somit auf das 2,39-Fache im Vergleich zu den Kontroll- ($p = 0,004$) und auf das 2,21-Fache im Vergleich zu den DEN-Tieren ($p = 0,005$) gesteigert. In den DEN + *S. mansoni*-Tieren wurde eine Hydroxyprolin-Menge von 505,6 µg/g Lebergewebe gemessen. Dies entspricht einem 3,66-fachen Anstieg gegenüber den Kontroll- und einem 3,38-fachen Anstieg gegenüber den DEN-Mäusen ($p < 0,001$). In einer Gegenüberstellung der beiden infizierten Gruppen wurde somit ein 1,53-fach erhöhter Hydroxyprolin-Gehalt in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe beobachtet. Insgesamt führte die Infektion mit *S. mansoni* zu einer Zunahme der Hydroxyprolin-Konzentration im Lebergewebe. Durch die zusätzliche DEN-Injektion stieg der Hydroxyprolin-Gehalt tendenziell noch weiter.

Die *S. mansoni*-Infektion führt zu einer Zunahme der hepatischen Hydroxyprolin-Konzentration

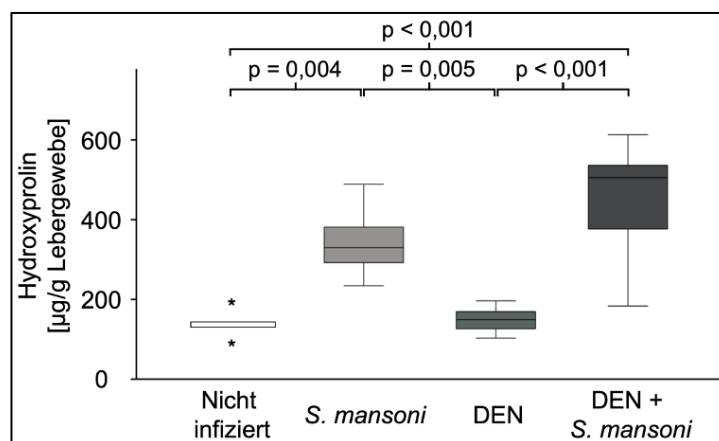


Abbildung 29: Die *S. mansoni*-Infektion führt zu einer Zunahme der hepatischen Hydroxyprolin-Konzentration. Dargestellt ist der Hydroxyprolin-Spiegel in µg/g Lebergewebe (Ordinate) der Gruppen Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=12) (Abszisse). Versuchstiere, deren Messwerte über die dreifache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als extreme Ausreißer mit einem Stern gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.

5.7.5 Histopathologischer Grad der Fibrose

Die Evaluation des histopathologischen Grades der Fibrose erfolgte in Anlehnung an Ishak et al. (Ishak et al., 1995). Hierbei wurde den Kontroll- und DEN-Mäusen ein Grad der Fibrose von 0 zugeordnet (Abbildung 30). Die Lebern der *S. mansoni*-Gruppe erreichten Fibrose-Scores von 1-1,5 und wurden somit fibrotischer eingestuft als die Lebern der Kontroll- ($p = 0,018$) und der DEN-Mäuse ($p = 0,005$). Der hepatische Grad der Fibrose der DEN + *S. mansoni*-Gruppe war mit Werten von 2,5-3 gegenüber dem der Kontroll- ($p < 0,001$), der DEN- ($p < 0,001$) und auch der *S. mansoni*-Gruppe ($p = 0,047$) erhöht.

Zusammenfassend spiegelt der histopathologische hepatische Grad der Fibrose die zuvor ermittelte Induktion der Fibrose und die verstärkte Ablage extrazellulärer Matrixbestandteile in den infizierten Versuchsgruppen wider. Durch die zusätzliche Injektion von DEN war der Grad der Fibrose noch höher, entsprechend der gesteigerten *Tgf- β* -Expression sowie Hydroxyprolin-Konzentration in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe im Vergleich zur *S. mansoni*-Gruppe.

Die Kombination aus DEN-Injektion + *S. mansoni*-Infektion steigert den hepatischen

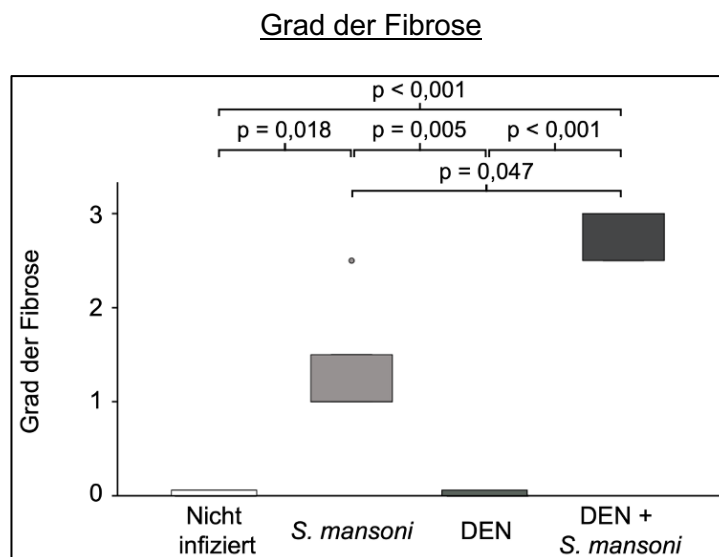


Abbildung 30: Die Kombination aus DEN-Injektion + *S. mansoni*-Infektion steigert den hepatischen Grad der Fibrose. Dargestellt ist der histopathologische Grad der Fibrose (Ordinate) der Gruppen Nicht infiziert ($n=6$), *S. mansoni* ($n=8$), DEN ($n=12$) und DEN + *S. mansoni* ($n=12$) (Abszisse). Versuchstiere, deren Messwerte über die 1,5-fache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als milde Ausreißer mit einem Punkt gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.

5.8 *S. mansoni* aktiviert onkogene Signalwege

Der Transkriptionsfaktor STAT3 und das Proto-Onkogen c-Jun stehen im Zusammenhang mit der hepatozellulären Karzinogenese und eine Aktivierung von

STAT3 und c-Jun durch *S. mansoni* wurde beschrieben (He et al., 2010; Trierweiler et al., 2016). Um die Aktivität dieser beiden Proteine im Kontext unseres DEN - *S. mansoni*-Karzinogenese-Modells zu untersuchen, wurde in einem ersten Schritt jeweils die nicht-phosphorylierte und inaktive und in einem zweiten Schritt die phosphorylierte und aktive Form mittels Western Blot quantifiziert. Auf diese Weise lassen sich bei höheren Werten der phosphorylierten Proteine Rückschlüsse ziehen, ob dies die Folge einer verstärkten Aktivierung oder einer generell erhöhten Konzentration des Proteins im Gewebe ist.

5.8.1 Verstärkte Phosphorylierung und Aktivierung von STAT3

Der Transkriptionsfaktor STAT3 ist während der Tumorgenese des hepatozellulären Karzinoms konstitutiv aktiviert (Liu et al., 2017). In diesem Zusammenhang leistet STAT3 einen Beitrag zur Tumorzellproliferation, zum Überleben sowie zur Invasivität der Zellen (Svinka et al., 2014). In physiologischen Zellen befindet sich STAT3 in Abwesenheit von aktivierenden Wachstumsfaktoren oder Zytokinen in seiner inaktiven nicht-phosphorylierten Form (Svinka et al., 2014).

Die Kombination aus DEN-Injektion + *S. mansoni*-Infektion verstärkt die hepatische Phosphorylierung und Aktivierung von STAT3

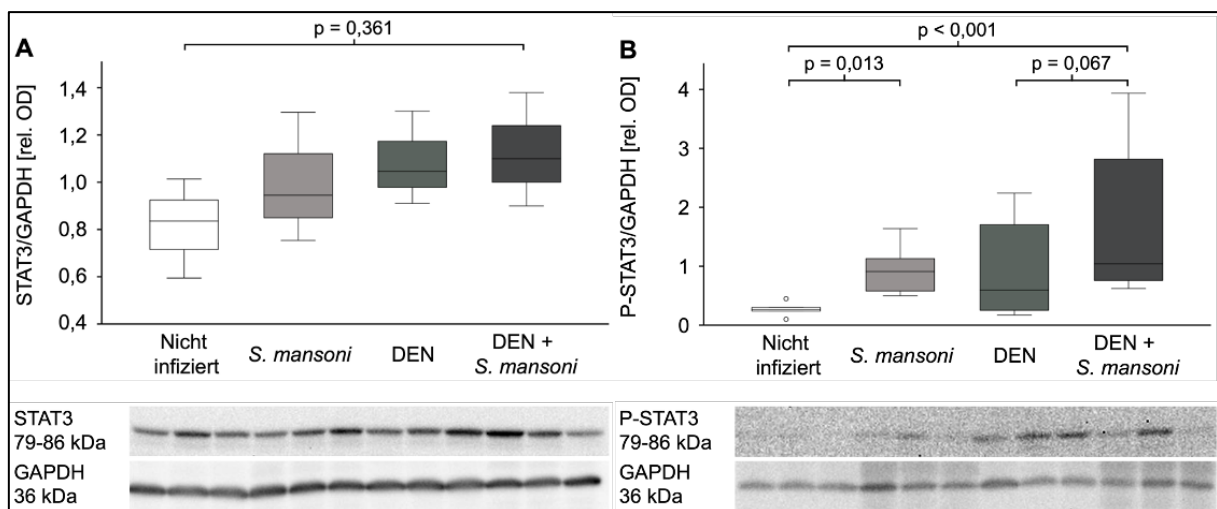


Abbildung 31: Die Kombination aus DEN-Injektion + *S. mansoni*-Infektion verstärkt die hepatische Phosphorylierung und Aktivierung von STAT3. Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse von (A) STAT3-positiven und (B) Phospho-STAT3-positiven Zellen (Ordinate) aus vier experimentellen Gruppen: Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=12) (Abszisse), gemessen anhand der Signalintensität (rel. OD) der Banden. Abgebildet sind repräsentative Blots aus jeweils drei technischen Replikaten. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Darstellung als Box-Plots, deren Boxen den Median sowie die mittleren 50% der Daten enthalten und durch das erste und dritte Quartil begrenzt werden. Versuchstiere, deren Messwerte über die 1,5-fache Breite der Box vom Median entfernt sind, sind als milde Ausreißer mit einem Punkt gekennzeichnet.

Unter den vier Versuchsgruppen war die Konzentration dieses nicht-phosphorylierten STAT3 vergleichbar ($p = 0,361$; Abbildung 31A). Kommt es zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors, wird dieser aktiv (Svinka et al., 2014). Die *S. mansoni*-Infektion führte zu einer 3,5-fach höheren Phosphorylierung und somit Aktivierung des Transkriptionsfaktors im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen ($p = 0,013$). In den DEN-Tieren wurde ein im Vergleich zur Kontroll-Gruppe 2,3-fach erhöhtes Phospho-STAT3 (P-STAT3) ermittelt. Innerhalb der DEN-Gruppe fiel eine Streuung der Werte in Richtung höherer P-STAT3-Konzentrationen auf. Insgesamt blieb das P-STAT3 in dieser Gruppe jedoch vergleichbar mit der Kontroll-Gruppe. In den DEN + *S. mansoni*-Mäusen wurde eine Steigerung des aktivierten STAT3 auf das Vierfache der Kontroll-Tiere beobachtet ($p < 0,001$). Auch gegenüber der DEN-Gruppe war das P-STAT3 in den DEN + *S. mansoni*-Tieren tendenziell erhöht ($p = 0,067$). In den DEN + *S. mansoni*-Mäusen streuten die gemessenen Werte in Richtung höherer P-STAT3-Konzentrationen.

5.8.2 Erhöhte Konzentration von c-Jun und Phospho-c-Jun

Die c-Jun-N-terminale-Kinase gehört zur Gruppe der MAP-Kinasen und spielt als solche eine Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion (Wang & Tai, 2016). In der Leber reguliert das Proto-Onkogen das Überleben der Hepatozyten sowie die Proliferation dieser im Zuge der Zellregeneration (Wang & Tai, 2016). Die *S. mansoni*-Infektion führte zu einer 5,67-fach gesteigerten Konzentration des nicht-phosphorylierten c-Jun gegenüber der Kontroll- ($p = 0,024$) sowie der DEN-Gruppe ($p = 0,031$; Abbildung 31). Eine 5,37-fach erhöhte c-Jun-Konzentration wurde ebenfalls in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe im Vergleich zur Kontroll- ($p = 0,054$) und zur DEN-Gruppe ($p = 0,070$) dargestellt. Das c-Jun war sowohl zwischen den beiden infizierten als auch zwischen den beiden nicht-infizierten Gruppen vergleichbar.

Des Weiteren wurde in der *S. mansoni*-Gruppe ein 4,57-fach erhöhtes P-c-Jun im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen beobachtet ($p = 0,024$). In den DEN + *S. mansoni*-Mäusen war P-c-Jun näherungsweise auf das Fünffache der Kontroll-Gruppe gestiegen ($p = 0,017$). Untereinander war die Menge des P-c-Jun sowohl in den nicht-infizierten als auch in den infizierten Versuchsgruppen vergleichbar. Im Fall von P-c-Jun unterschieden sich die Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Tests. Während die Schlussfolgerung des Kruskal-Wallis-Tests eine Beibehaltung der Nullhypothese war ($p = 0,055$), unterschieden sich im Mann-Whitney-U-Test die zentralen Tendenzen der infizierten Gruppen von der Kontroll-Gruppe.

Die *S. mansoni*-Infektion erhöht die hepatische Konzentration von c-Jun und Phospho-

c-Jun

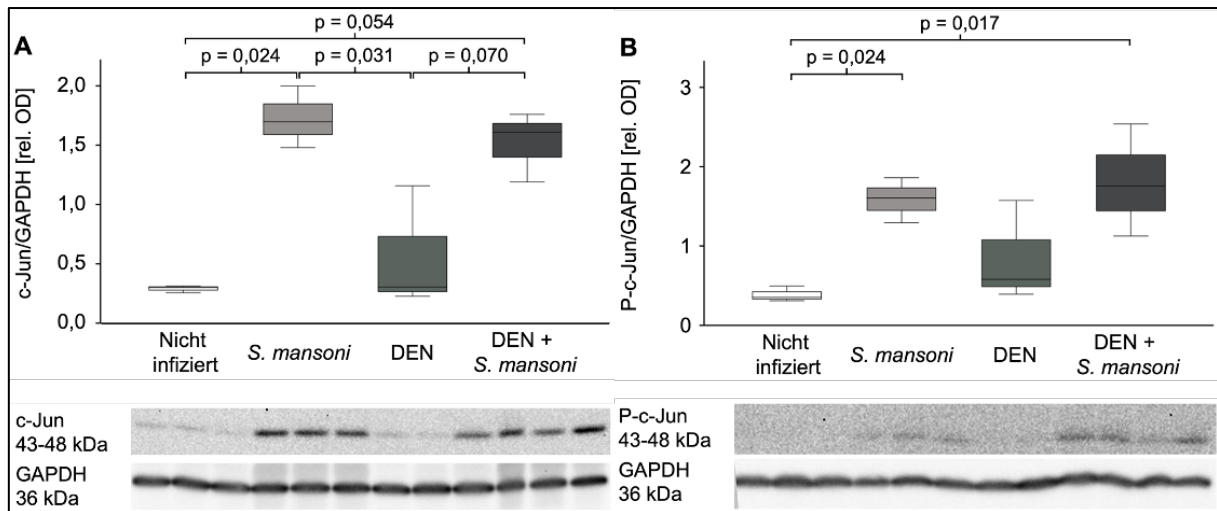


Abbildung 32: Die *S. mansoni*-Infektion erhöht die hepatische Konzentration von c-Jun (A) und Phospho-c-Jun (B). Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse von (A) c-Jun-positiven und (B) Phospho-c-Jun-positiven Zellen (Ordinate) aus vier experimentellen Gruppen: Nicht infiziert (n=6), *S. mansoni* (n=8), DEN (n=12) und DEN + *S. mansoni* (n=12) (Abszisse), gemessen anhand der Signalintensität (rel. OD) der Banden. Abgebildet sind repräsentative Blots aus jeweils drei technischen Replikaten. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Darstellung als Box-Plots, deren Boxen den Median sowie die mittleren 50% der Daten enthalten und durch das erste und dritte Quartil begrenzt werden.

Zusammenfassend wurde in allen vier Versuchsgruppen eine vergleichbare Konzentration des inaktiven Transkriptionsfaktors STAT3 gezeigt. In der *S. mansoni*- und insbesondere in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe wurde anschließend eine gesteigerte P-STAT3-Konzentration beobachtet. Dies legt die Vermutung nahe, dass es durch die *S. mansoni*-Infektion und noch stärker durch die DEN + *S. mansoni*-Intervention zu einer verstärkten Aktivierung des Transkriptionsfaktors gekommen ist. Außerdem wurde in den beiden infizierten Versuchsgruppen eine erhöhte Konzentration des inaktiven Proto-Onkogens c-Jun ermittelt. Gleichmaßen bestand in den beiden Gruppen *S. mansoni* und DEN + *S. mansoni* die Tendenz zu einer gesteigerten Konzentration des aktiven P-c-Jun.

6 Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Arbeit zunächst im Hinblick auf die durch *S. mansoni* hervorgerufene Pathologie diskutiert. Der besondere Fokus der Arbeit liegt jedoch auf der Auswirkung der kombinierten Intervention aus DEN + *S. mansoni* im Vergleich zu den jeweils alleinigen Behandlungen der Mäuse. Anschließend wird der Zusammenhang der vorliegenden Ergebnisse diskutiert und auf dieser Basis ein Fazit zur Beteiligung einer Infektion mit *S. mansoni* bei DEN-induzierter Leberpathologie gezogen.

6.1 Granulomatöse Inflammation durch *S. mansoni* und Modifikation durch Diethylnitrosamin

6.1.1 Die Th1- und Th2-Immunreaktionen

Der Fortbestand humanpathogener Parasiten wie *S. mansoni* umfasst aus Parasitensicht fünf essentielle Aspekte: Das Überleben im menschlichen Wirt, die Entwicklung zur adulten Form, das Umgehen von Eliminierungstaktiken des Wirtes, die Vermehrung in großer Zahl sowie die Übertragung zum nächsten Wirt (Masamba & Kappo, 2021). Im Gegensatz dazu stehen die Bestrebungen des Wirtes, eine Heilung der Infektion oder zumindest eine Begrenzung der durch die Infektion ausgelösten pathologischen Befunde (Masamba & Kappo, 2021). Aus diesen gegensätzlichen Bestrebungen resultiert eine Art homöostatisches Gleichgewicht der Immunreaktion, das zu einer maximalen Resistenz, aber auch zu einer minimalen Morbidität führt (Abath et al., 2006).

In der Literatur wird über eine Th1-dominante Phase als Reaktion auf migrierende Parasitenstufen, gefolgt von einer Th2-dominanten nach Beginn der Eiablage berichtet (Masamba & Kappo, 2021). Dieser Switch setzt fünf bis sechs Wochen nach Parasiteninfektion ein und ist unter anderem durch einen deutlichen Rückgang der IFN γ -Konzentration gekennzeichnet (Masamba & Kappo, 2021).

In der vorliegenden Studie zeigten mRNA-Analysen typischer Th1- und Th2-Zytokine sowohl eine Induktion von *Ifn γ* , *Tnf α* , *Il-1 β* und *Il-6* als auch der Zytokine *Il-4* und *Il-13* in den *S. mansoni*-infizierten Tieren neun Wochen nach der Infektion. Ursache dieser gemischten Th1- und Th2-Immunantwort könnte ein späteres Erreichen des Übergangsstadiums zwischen Th1- und Th2-Immunantwort in C57/BL6-Mäusen sein. In

diesem Stadium überlappen Th1- und Th2-Antwort, ehe es zu einem Rückgang der Th1-Zytokine kommt (Oliveira Fraga et al., 2010). Darüber hinaus gibt es Gründe zur Annahme einer höheren Komplexität der initialen Immunantwort als eine alleinige Th1-Dominanz (Oliveira Fraga et al., 2010). Das Katayama-Syndrom als klinischer Ausdruck der Th1-Immunantwort ist von Beginn an von einer Serum-Eosinophilie begleitet (Oliveira Fraga et al., 2010). Eine verstärkte Eosinopoese wird jedoch klassischerweise durch IL-5, ein Th2-Zytokin, vermittelt (Oliveira Fraga et al., 2010). Oliveira et al. konnten darstellen, dass auch die Würmer und nicht nur SEA die Expression von Th2-Zytokinen systemisch sowie am Ort der Antigenablagerung induzieren (Oliveira Fraga et al., 2010).

Die DEN-Injektion führte weder zur Migration CD45-positiver Leukozyten in das Gewebe, noch zu einem Anstieg der Expression der Th-Zytokine. Die schädliche Wirkung der DEN-Applikation beruht auf einer direkten DNA-alkylierenden Wirkung nach metabolischer Aktivierung des Hepatokarzinogens (Tolba et al., 2015). Da die durch DEN ausgelöste Karzinogenese also durch einen direkten Angriff auf das Erbgut und nicht durch eine inflammationsbedingte Zellschädigung hervorgerufen wird, war auch nicht mit einer Induktion von inflammatorischen Markern durch DEN zu rechnen. Insofern entspricht das hier verwandte Tiermodell den Erwartungen bezüglich Inflammation für die Parasiteninfektion auf der einen und die Tumorinduktion auf der anderen Seite.

Die pathologischen Vorgänge der Infektion mit *S. mansoni* induzierten ein Inflammationsgeschehen in der Leber, welches sich in einem erhöhten Lebergewicht der Tiere und einem erhöhten Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht äußerte. Darüber hinaus wurde eine entzündungsbedingte Schädigung der Leberzellen, also Hepatozyten, durch einen Anstieg der ALT im Serum der infizierten Tiere nachgewiesen. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu bedenken, dass die ALT-Werte eine Gewebeverletzung nur ungenau widerspiegeln. In einer Untersuchung von HCV-Patienten fiel beispielsweise auf, dass 60% der Patienten trotz normaler ALT-Werte eine zum Teil mäßige Entzündungsaktivität aufwiesen (Shakil et al., 1995).

Eine potenzierende Wirkung der *S. mansoni*-Infektion und der DEN-Injektion wurde dagegen im Hinblick auf die Expression der *Il-1 β* -mRNA gezeigt. Im Falle einer Verletzung von Hepatozyten setzen diese Gefahrensignale in Form von ATP oder Harnsäure frei und aktivieren auf diesem Wege Inflammasomen in Immunzellen (Carson et al., 2018; Koyama & Brenner, 2017). Diese Proteinkomplexe beinhalten z.B. Caspase-1, die in der Folge *Il-1 β* aktiviert (Strowig et al., 2012). Anschließend leistet das Zytokin einen Beitrag zur Aufrechterhaltung der lokalen Entzündungsreaktion oder zur Fibrogenese (Carson et al., 2018; Meng et al., 2016). Die erhöhten *Il-1 β* -Werte in der mit DEN + *S. mansoni* behandelten Mausgruppe im Vergleich zu den Kontrollen legen die

Vermutung nahe, dass es durch die Kombination der beiden Noxen zu einer verstärkten Hepatozytenschädigung und als Reaktion darauf zu einer ausgeprägteren Inflammation-Aktivierung gekommen ist. Die DEN-Injektion führte nicht zu einer erhöhten Eilast und somit nicht zu einer verstärkten Infektion in der kombiniert behandelten Gruppe. Parasitäre Pathogenitätsfaktoren scheinen daher nicht die Ursache für die in dieser Studie beobachteten additiven Wirkungen von DEN + *S. mansoni* zu sein. Stattdessen ist von sich ergänzenden Effekten beider Noxen auf die hepatische Zellschädigung auszugehen.

6.1.2 Immunmodulation durch *S. mansoni*

Auf die Etablierung der Th2-dominanten Immunantwort folgt eine Phase der Immunmodulation (Belkaid et al., 2006). Diese soll einerseits eine inflammationsbedingte Schädigung des Wirtes verzögern und andererseits weitere Immunreaktionen auf den Parasiten verhindern (Belkaid et al., 2006). Im Abstand von zwölf Wochen nach der Infektion kommt es zu einer Abschwächung der Th2-Antwort in Form einer geringeren Neigung zur Zytokinproduktion als Reaktion auf SEA bei gleichbleibender Th2-Zellzahl (Chuah et al., 2014; Costain et al., 2022). Diese führt zu einer abnehmenden Größe neugebildeter Granulome (Chuah et al., 2014). Mit diesem Zustand der Hyporesponsivität oder Erschöpfung der Immunzellen wurden verschiedene Signalwege in Verbindung gebracht. Unter anderem steht das *Gene related to anergy in lymphocytes (Grail)*-Gen, das für eine E3-Ubiquitin-Ligase kodiert, in Zusammenhang mit der Abnahme der Reaktionsfähigkeit der Th2-Immunzellen im Kontext einer chronischen Schistosomiasis (Taylor et al., 2009). Eine Unterdrückung der *Grail*-Expression konnte die Entwicklung der Hyporeaktivität reduzieren (Taylor et al., 2009).

Innerhalb der Immunmodulation nehmen CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (Tregs) eine zentrale Position ein (Belkaid et al., 2006). Als Hauptproduzenten des immunregulatorischen und anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 hemmen sie die Entwicklung von Th1-Zellen (McKee & Pearce, 2004) und begrenzen die entzündungsbedingte Pathologie (Hesse et al., 2004). Auf diese Weise regulieren parasitäre Filarien über eine gezielte Induktion dieser Tregs die Effektor-T-Zell-Antworten und fördern ihr eigenes Überleben im Wirt (Taylor et al., 2005). In peripheren Leukozyten von Filariose-Patienten wurden erhöhte Konzentrationen des IL-10 und Treg-Populationen beschrieben (Taylor et al., 2005). Die Relevanz für die Bekämpfung der Parasiten wurde verdeutlicht, indem neutralisierende Antikörper gegen IL-10 *in vitro*

die Fähigkeit der Leukozyten wiederherstellen, Filarien-spezifische proliferative Reaktionen aufzubauen (Taylor et al., 2005).

Bei einer Infektion mit dem Fadenwurm *Nippostrongylus brasiliensis* vermittelten $CD4^+CD25^+$ Tregs über die Expression des *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4* (CTLA-4) eine Ausschaltung der Effektor-T-Zell-Antworten (Taylor et al., 2005). Die Blockade des CTLA-4 führte zu einer beschleunigten und verstärkten T-Zell-Antwort, einer gesteigerten Produktion von Th2-Zytokinen und somit zu einer frühzeitigen Beendigung der Eiproduktion und Reduktion der Anzahl adulter Würmer (McCoy et al., 1997).

In den Mäusen dieser Arbeit rief die Infektion mit *S. mansoni* einen Anstieg der *Il-10*-Expression in der neunten Infektionswoche hervor. In Anbetracht der ebenfalls erhöhten Th1- und Th2-Zytokinwerte sprechen diese Ergebnisse für ein frühes Stadium der Etablierung immunmodulatorischer Netzwerke. Die Ergebnisse bisheriger Forschungsarbeiten weisen auf das Einsetzen einer relevanten Hyporesponsivität ab der zwölften Infektionswoche bei *S. mansoni* (Chuah et al., 2014). Aus diesen Gründen ist zum Zeitpunkt der Probengewinnung noch nicht von einer endgültigen beziehungsweise abschließenden Entwicklung der Immunmodulation inklusive der Folgen für die generelle Immunüberwachung des Organismus auszugehen.

Insgesamt beeinflusst die Infektion durch *S. mansoni* das Immunsystem des Wirtes auf verschiedene Arten. Dies kann mit pathologischen Konsequenzen verbunden sein. Die SEA-induzierte Th2-Dominanz in Verbindung mit einer Herunterregulation der Th1-Zytokine wie $IFN\gamma$ begünstigt bei Ko-Infektionen mit z.B. dem HCV dessen Persistenz inklusive der Entwicklung entsprechender Komplikationen (Porta et al., 2011; Yuan et al., 2020). Die virale Clearance ist mit der Notwendigkeit eines Th1-Zytokin-Profiles inklusive der Expression von $IFN\gamma$ verbunden (Yuan et al., 2020). Die *S. mansoni*-bedingte Th2-Umgebung fördert daher das Fortschreiten der chronischen HCV-Erkrankung in Richtung der Hepatokarzinogenese (Porta et al., 2011). In diesem Zusammenhang ermittelten Shousha et al. ein reduziertes Ansprechen auf eine HCV-Therapie mit direkt antiviralen Medikamenten sowie einen geringeren Erhalt des Ansprechens im Falle einer vorherigen *S. mansoni*-Infektion in einer Beobachtungsstudie an ägyptischen Patienten (Shousha et al., 2022).

Sowohl die Th2-Dominanz als auch die Immunmodulation stehen mit dem HCC in Verbindung (Budhu et al., 2006; Shen et al., 2010). So wurde eine signifikante Zunahme von $CD4^+CD25^+$ Zellen parallel zum Fortschreiten eines HCCs vom Frühstadium hin zu einem fortgeschrittenen Karzinom beobachtet (Shen et al., 2010). Im Zusammenhang

mit der Immunmodulation durch die Parasiten beeinträchtigt die Etablierung einer Antigen-unabhängigen Hyporesponsivität die globale Immunüberwachung des Wirtes (Porta et al., 2011). Auf diese Weise wird die klonale Expansion maligne transformierter Zellen gefördert (Porta et al., 2011).

6.1.3 Inflammation und Karzinogenese

Milde Entzündungen des Lebergewebes, die in ihrer Intensität begrenzt und zum Abklingen bestimmt sind, sind hepatoprotektiv und tragen zur Gewebereparatur und zur anschließenden Wiederherstellung der Homöostase bei (Brenner et al., 2013). Eine dauerhafte und in ihrer Intensität unverhältnismäßige Inflammation kann dagegen zu einem gravierenden Verlust von Hepatozyten führen und das Ausmaß der Schädigung vieler Lebererkrankungen potenzieren (Brenner et al., 2013). Absterbende Hepatozyten setzen schadensassoziierte molekulare Muster frei, die das angeborene Immunsystem aktivieren, welches daraufhin eine weitere Entzündungsreaktion stimuliert (Brenner et al., 2013). Auf diese Weise wird ein hochgradig hepatotoxischer Kreislauf in Gang gesetzt (Brenner et al., 2013).

Dies hat zur Folge, dass schätzungsweise 25% aller Karzinomerkrankungen auf chronische Infektionen oder andere chronische Inflammationsgeschehen zurückzuführen sind (Schetter et al., 2010). Beispiele sind die Entstehung von Adenokarzinomen des Kolons auf dem Boden der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, die Entwicklung eines Adenokarzinoms des Pankreas in einer chronisch entzündeten Bauchspeicheldrüse oder das Fortschreiten eines Barrett-Ösophagus im Rahmen einer gastroösophagealen Refluxkrankheit (Schetter et al., 2010).

Eine schwelende *cancer-related inflammation* (CRI) ist ein typisches Kennzeichen der Mikroumgebung der meisten Neoplasien und trägt durch verschiedene Mechanismen zur Karzinomentwicklung bei (Porta et al., 2011). Diese beinhalten die Induktion genomischer Instabilität und die Veränderung epigenetischer Ereignisse mit anschließender Dysregulation der Genexpression (Porta et al., 2011). Außerdem findet sich eine verstärkte Proliferation in Verbindung mit einer Resistenz gegenüber Apoptose, die Induktion einer Angiogenese, Immunsuppression und Gewebeumbau (Porta et al., 2011). In Verbindung mit dem beständigen Replikationspotenzial der Hepatozyten und dem permanenten Versuch, das abgestorbene Parenchym wiederherzustellen, erhöht eine chronische Entzündung das Risiko der Hepatokarzinogenese erheblich (Brenner et al., 2013). Der Zusammenhang und die Relevanz einer inflammatorischen

Mikroumgebung und der Entstehung eines Karzinoms wird durch eine Studie von He et al. unterstrichen. Die Autoren verwendeten isolierte HCC-Vorläuferzellen (HcPCs) aus verschiedenen Maus-HCC-Modellen (He et al., 2013). Trotz ähnlichem Transkriptom entwickelten sich die HcPCs erst nach Transplantation in eine chronisch geschädigte Leber mit kompensatorischer Proliferation zu Karzinomen (He et al., 2013). Interessanterweise wird die CRI auch in der Umgebung von Neoplasien beobachtet, die ätiologisch nicht in Zusammenhang mit Infektionen stehen (Porta et al., 2011).

Das Hepatokarzinogen DEN wird durch das CYP2E1 aktiviert, welches insbesondere in den Hepatozyten der Zone 3 eines Leberazinus vorkommt (Abbildung 33; He & Karin, 2011). Diese Zone befindet sich im Bereich der Zentralvene, wohingegen sich die Zone 1 zwischen den Portalfeldern erstreckt (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Getrennt sind die beiden Zonen durch die Zone 2 (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Eine durch DEN-ausgelöste CRI im Bereich der Zone 3 erklärt somit die erhöhte histopathologische lobuläre Inflammation, die zu einer starken Streuung innerhalb der DEN-Gruppe und zu einer besonders starken lobulären Inflammation in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe geführt hat. Im Einklang mit der vornehmlichen Expression des CYP2E1 in der Zone 3 führte die DEN-Injektion zu keiner gesteigerten portalen Inflammation in Zone 1 (He & Karin, 2011).

Die Zonen des Leberazinus

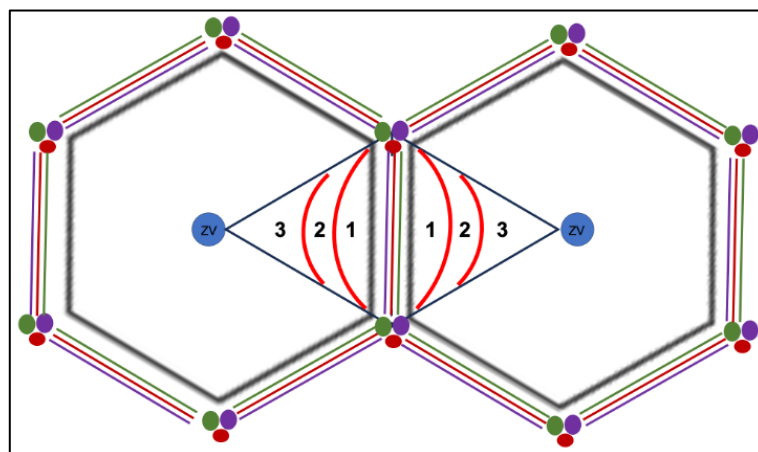


Abbildung 33: Die Zonen des Leberazinus. Darstellung von zwei hexagonalen Zentralvenenläppchen mit jeweils mittig gelegener Zentralvene (blau, ZV). An den sechs Ecken des Läppchens befinden sich die Portalfelder, bestehend aus Pfortader (lila), Arterie (rot) und Gallengang (grün), und ihre terminalen Verzweigungen. Der Leberazinus ist mit seinen drei Zonen als Raute dargestellt, deren Ecken von zwei Zentralvenen und zwei Portalfeldern gebildet werden. Modifiziert nach (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019) und erstellt mit Power Point.

6.2 Induktion von hepatischem oxidativem Stress durch *S. mansoni* und Diethylnitrosamin

6.2.1 Ursachen des oxidativen Stresses

Ein Großteil der in den Mesenterialvenen abgelegten Eier gelangt mit dem Mesenterialstrom in die Leber, wo die Eier aufgrund ihrer Größe steckenbleiben und eine granulomatöse Immunreaktion provozieren (Löscher & Burchard, 2010). In diesem Zuge kommt es zu einer Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, die daraufhin ein komplexes Spektrum chemisch reaktiver Spezies zur Bekämpfung der eingedrungenen Parasiten und Eier produzieren (Yang et al., 2014). Einige dieser ROS verfügen über ein ungepaartes Elektron in ihrer Valenzelektronenschale und sind aufgrund ihres Bestrebens, sich durch ein weiteres Elektron zu stabilisieren, hoch reaktiv (Masamba & Kappo, 2021). Aus dem Vorhandensein dieser ROS in einem Gewebe resultiert eine Art Kettenreaktion, bei der instabile Moleküle mit benachbarten reagieren und ihnen ein Elektron entziehen, mit dem sie sich stabilisieren (Masamba & Kappo, 2021). Die oxidierten Moleküle werden daraufhin jedoch selbst instabil und reaktiv (Masamba & Kappo, 2021). Auf diesem Wege schädigen ROS verschiedene Zellkomponenten wie Lipide, Proteine und die DNA (Afrifa et al., 2024).

Bei einem dieser kurzlebigen Radikale handelt es sich um NO, das an der Pathogenabwehr beteiligt ist (Reuter et al., 2010). Synthetisiert wird NO in einer komplexen Reaktion, die eine Umwandlung des terminalen Guanidinstickstoffs der Aminosäure L-Arginin zu NO und Citrullin beinhaltet (Jaiswal et al., 2001). Katalysiert wird diese Reaktion neben der MPO auch durch die NO-Synthasen (NOS), welche in drei Isoformen existieren (Reuter et al., 2010). Die konstitutiv exprimierten neuronalen und endothelialen NOS produzieren Stickstoffmonoxid in geringen Mengen, die als Neurotransmitter respektive Vasodilatator wirken (Reuter et al., 2010). Als Reaktion auf entzündliche oder immunologische Stimuli in Form von $IFN\gamma$ oder $TNF\alpha$ kommt es zu einer Induktion der Genexpression der induzierbaren (i)NOS (Reuter et al., 2010). An diesem Signalweg sind unter anderem die Transkriptionsfaktoren $NF\kappa B$, die STAT-Proteine und c-Jun beteiligt (Jaiswal et al., 2001). Die iNOS ist in der Lage, besonders große Mengen an NO zu produzieren, welche für die Konsequenzen einer chronischen Entzündung mitverantwortlich gemacht werden (Reuter et al., 2010).

Die schistosomale Infektion und das von den Eiern sezernierte SEA führen zu einer Infiltration diverser Entzündungszellen, die ROS freisetzen. Hanna et al. beobachteten, dass praktisch das gesamte Granulom der Ort einer H_2O_2 -Produktion über das NADPH-Oxidase-System ist (Hanna et al., 2005). Für die von den Eiern sezernierten Antigene

als entsprechenden verantwortlichen Stimulus spricht ein zusätzlich beobachteter Gradient dieser Produktion, der in der unmittelbaren Nähe der Eier seinen Höhepunkt erreicht (Hanna et al., 2005).

Verschiedene Autoren berichteten über eine gleichzeitig stattfindende Abnahme der antioxidativen Kapazitäten der Zellen im Sinne einer Herabmodulation der Enzyme Kat, SOD oder der GPX sowie einer Reduktion des Glutathions (Al-Olayan et al., 2016). Sowohl die Reduktion dieser Gegenwirkungssysteme als auch die Intensität der LPO korrelierten mit der Parasitenbelastung (Cunha et al., 2012). In der im Rahmen dieser Promotion untersuchten Tierstudie führte die Infektion mit *S. mansoni* ebenfalls zu einer verringerten Expression der antioxidativen Enzyme *Kat* und *Sod1*. Die mRNA-Menge der *Gpx3* wurde dagegen durch die Infektion gesteigert. Außerdem beeinflussten die DEN-Injektionen in der kombiniert behandelten Gruppe die Regulation dieser drei Enzyme nicht zusätzlich. In verschiedenen Theorien wird über eine Abnahme der Enzymexpression als direkte Wirkung durch die ROS oder durch eine gezielte Beeinflussung der Genexpression durch SEA spekuliert (El-Sokkary et al., 2002; Kelly et al., 1998). Gegen einen gezielten Effekt durch SEA spricht jedoch die Tatsache, dass die in den Eiern heranreifenden Mirazidien über keine eigenen antioxidativen Abwehrsysteme verfügen und zum Schutz vor den schädlichen Sauerstoffradikalen auf die Wirtsenzyme angewiesen sind (Huang et al., 2012). Auf der anderen Seite entkräftet eine gegenüber den anderen Mausgruppen signifikant gesteigerte MDA-Konzentration in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe die Theorie der Enzyminaktivierung durch ROS. Da in den DEN + *S. mansoni*-Tieren ein signifikant höherer Stress als in den Lebern der *S. mansoni*-Mäuse herrscht, müsste demnach die Enzymreduktion in der kombinierten Gruppe ebenfalls stärker ausgeprägt sein. Die Reduktion der Enzymexpression erfolgte jedoch gleichermaßen in den infizierten Gruppen. Letztendlich erfordert die Suche nach der Ursache dieser Verminderung der antioxidativen Gegenwirkungssysteme durch die Parasiten weitere Analysen.

Weiterhin wurde eine erhöhte Konzentration und Aktivität der MPO in den Lebern der beiden *S. mansoni*-infizierten Versuchsgruppen gezeigt. Auf Proteinebene wurde auch in der DEN-Gruppe ein Anstieg der MPO beobachtet. In diesem Zusammenhang beschrieben Tolba et al. eine ausgeprägte Infiltration neutrophiler Granulozyten als wichtige Quelle der MPO in DEN-behandelten Mäusen (Tolba et al., 2015). In der DEN + *S. mansoni*-Gruppe streuten die Werte für die MPO-Proteinmenge und die -Aktivität stark in Richtung höherer Werte im Vergleich zur *S. mansoni*-Gruppe. Immunhistochemisch wurde eine diffuse Ausbreitung MPO-positiver Zellen im Leberparenchym der DEN + *S. mansoni*-Gruppe demonstriert. Zusätzlich fokussierten

sich MPO-positive Zellen auf die Region um und auf die Granulome. Dies lässt vermuten, dass Fraktionen des SEA die Infiltration MPO-positiver Zellen induziert haben könnten.

Interessanterweise wurde in der DEN-Gruppe keine und in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe keine verstärkte Migration CD45-positiver Leukozyten beobachtet. Die MPO wird vornehmlich in neutrophilen Granulozyten und Monozyten gebildet, die den Leukozyten zugeordnet werden (Aratani, 2018). Daher ist fraglich, woher die gesteigerte MPO in den Gruppen DEN und DEN + *S. mansoni* stammt. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte MPO-Menge und/oder -Aktivität in ebendiesen Gruppen ist eine hochregulierte Proteinbiosynthese in neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Dies könnte zur Folge haben, dass bei vergleichbarer Leukozyteninfiltration die MPO-Konzentration erhöht ist. Insgesamt legen die Ergebnisse die Vermutung nahe, dass es bei längerem Wirken der beiden Interventionen *S. mansoni* und DEN zu einem additiven Effekt in Bezug auf die MPO als Teil der oxidativen Abwehr und als wichtigen inflammatorischen Ursprung der ROS kommen könnte (Aratani, 2018). Somit demonstrieren die vorliegenden Ergebnisse das Potenzial von *S. mansoni*, die oxidative Aktivität der MPO durch andere Pathogenitätsfaktoren wie in diesem Falle DEN zu verstärken. Aus dieser Feststellung resultiert die Annahme, dass die doppelte Belastung der Mäuse (DEN + *S. mansoni*) zu einer Aggravation des oxidativen Stresses im Lebergewebe geführt hat.

6.2.2 Schädigung von Biomolekülen durch oxidativen Stress

Das mutagene Potenzial von ROS resultiert unter anderem aus ihrer Fähigkeit, oxidative Schäden an Biomolekülen wie Lipiden, Proteinen oder direkt an der DNA zu verursachen (Afrifa et al., 2024; Nijhuis et al., 2009).

Ein Ziel verschiedener ROS wie Peroxynitrit oder der durch die MPO generierten Radikale stellen die Lipide der Zelle dar (Bartsch & Nair, 2006). Hier wird ein Prozess ausgelöst, der als Lipidperoxidation bezeichnet wird (Bartsch & Nair, 2006). Endprodukte dieses Prozesses, wie MDA, Trans-4-Hydroxy-2-Nonenal (HNE) oder 4-Hydroperoxy-2-Nonenal (HPNE), modifizieren DNA-Basen durch die Bildung von Addukten (Bartsch & Nair, 2006). Auf diese Weise formt beispielsweise MDA ein angelagertes Desoxyguanosin-Derivat im Erbgut (Bartsch & Nair, 2006). Werden diese Modifikationen nicht durch zelluläre Reparatursysteme behoben, können sie zu Basenübergangs- und Punktmutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen führen, die das Risiko der malignen Transformation einer Zelle erhöhen (Schetter et al., 2010; Seril et al., 2003). Das maligne Potenzial dieser Basenmodifikationen wird durch eine Studie von Bartsch

et al. unterstrichen. Die Autoren beobachteten eine progressive Zunahme dieser von der LPO abgeleiteten DNA-Addukte in präneoplastischen Läsionen und Zielorganen in Nagetiermodellen und krebsanfälligen Patienten (Bartsch & Nair, 2006). Außerdem spielt die Produktion freier Radikale aus Lipiden eine entscheidende Rolle während der Initiierung der Hepatokarzinogenese durch DEN (Yamada et al., 2006). Die ROS entstehen vermutlich während der metabolischen Aktivierung des Hepatokarzinogens durch die CYP450-Enzyme (Yamada et al., 2006). Unterstützend zu dieser Theorie wurde die DEN-induzierte LPO durch den CYP450-Inhibitor SKF-525A gehemmt und die Verabreichung von Antioxidantien zeigte eine protektive Wirkung gegen DEN-verursachte Karzinome (Yamada et al., 2006).

In diesem Zusammenhang ist die Messung charakteristischer Endprodukte der LPO eine validierte Methode zur Evaluation des in einem Gewebe vorherrschenden oxidativen Stresses und daraus abgeleitet zur Risikoabschätzung ROS-bedingter mutagener Zellschäden. Aus diesem Grund erfolgte die Durchführung eines MDA-Assays an den Leberproben der vier Mausgruppen. Die Ergebnisse zeigten eine signifikant verstärkt ablaufende LPO in den Lebern der DEN + *S. mansoni*-Mäuse gegenüber den Kontrollgruppen. Diese Ergebnisse bieten einen weiteren Hinweis auf die potenzierenden Effekte von *S. mansoni* beim Vorliegen karzinogener Faktoren wie DEN, die eine Leberschädigung über die Produktion von ROS verursachen.

Neben den durch die LPO-Produkte ausgelösten DNA-Addukten können ROS die genetische Information auch direkt chemisch oder physikalisch so verändern, dass die Interpretation und die Übertragung dieser beeinträchtigt ist (Srinivas et al., 2019). Sowohl die Basen als auch das Zucker-Phosphat-Rückgrat bieten Angriffspunkte für oxidative Reaktionen, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidantien mit den Basen fünfmal größer ist (Kelly et al., 1998). Aufgrund ihres niedrigen Redoxpotentials ist Guanin unter den DNA-Basen am anfälligsten für die Oxidation (Aguilar et al., 2013). Eine entstehende mutagene Läsion 8-Oxo-7,8-Dihydroguanin (8-OxoG) paart in der nächsten Replikation mit Adenin anstelle von Cytosin und erzeugt auf diese Weise Transversionsmutationen (Aguilar et al., 2013). Durch oxidativen Stress modifizierte Guanin-Basen wurden bereits in verschiedene Karzinogenese-Modelle verwickelt. So wurde bei Mammakarzinomen berichtet, dass 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG) in Primärkarzinomen der Brust acht- bis 17-fach erhöht ist im Vergleich zum umgebenden nicht-malignen Brustgewebe (Reuter et al., 2010). Außerdem demonstrierten Salim et al. einen erhöhten 8-OHdG-Spiegel sowie eine gesteigerte *inos*-Expression in *S. haematobium*-assoziierten Plattenepithel- und Urothelkarzinomen im Gegensatz zu Tumoren ohne Bilharziose (Salim et al., 2008). Insbesondere Hydroxylradikale greifen jedoch auch das Zucker-

Phosphat-Rückgrat an und verursachen auf diesem Weg eine Vielzahl von Läsionen (Kelly et al., 1998). Die oxidative Entfernung von Basen führt beispielsweise zu apurinischen oder basenfreien Stellen (Kelly et al., 1998). Aus der Abstraktion eines Wasserstoff-Atoms der C4-Position resultiert eine Oxidation der Zuckerkomponente, aus der im weiteren Verlauf Einzelstrangbrüche entstehen (Kelly et al., 1998). Ist diese Läsion mit einer weiteren auf dem komplementären DNA-Strang verbunden, kann dies Doppelstrangbrüche verursachen (Kelly et al., 1998). Auf eine erfolglose Reparatur dieser folgen Brüche in oder Fragmentierungen sowie Translokationen von Chromosomen (Kelly et al., 1998; Morgan et al., 1998).

Eine auf diese Weise hervorgerufene Verkürzung der endständigen Telomerregion, die vom entzündeten Epithel über die Dysplasie bis zum Karzinom progressiv zunimmt, wurde in Kolonepithelzellen von Patienten mit Colitis ulcerosa beobachtet (Seril et al., 2003). Darüber hinaus begünstigt das Auftreten von Doppelstrangbrüchen als Folge von oxidativem Stress die Integration des HB-Virus in das Wirtsgenom (Dandri et al., 2002). So wurde die Einbaurate der Virus-DNA in eine HCC-Zelllinie durch die Behandlung mit H₂O₂ um 50% gesteigert (Dandri et al., 2002). Die Relevanz der Doppelstrangbrüche für dieses Ereignis wurde durch die Erkenntnis verdeutlicht, dass eine Hemmung der Reparatur dieser durch den Einsatz eines PARP-1-Inhibitors zu einer weiteren Steigerung der Integrationen führte (Dandri et al., 2002). Der Einbau der Virus-DNA resultiert in einer genomischen Instabilität, die einer der Hauptmechanismen der HBV-induzierten Hepatokarzinogenese ist (Kremsdorf et al., 2006). Der durch *S. mansoni* ausgelöste oxidative Stress ist mit einer höheren Wahrscheinlichkeit des Auftretens von DNA-Doppelstrangbrüchen verbunden. Dies bietet eine mögliche Erklärung für die additive Wirkung dieser beiden Pathogenitätsfaktoren bei den in den Endemiegebieten regelmäßig beobachteten ko-infizierten Patienten (HBV + *S. mansoni*).

Insgesamt scheint der oxidative Stress durch *S. mansoni* durch die DEN-induzierten Effekte potenziert zu werden, sodass von einer höheren Rate mutagener Ereignisse in den Zellen der kombiniert behandelten Gruppe auszugehen ist.

6.2.3 Replikationsstress als direkte Folge der oxidativen Schädigungen

Im Zusammenhang mit ROS-bedingten Genomschädigungen existieren sechs wichtige DNA-Reparaturwege, die die Stabilität des Genoms aufrechterhalten sollen: die Basen-Exzisionsreparatur, die Nukleotid-Exzisionsreparatur, die *Mismatch*-Reparatur, die

homologe Rekombination, die nicht-homologe *Endjoining*-Reparatur und die Transläsions-DNA-Synthese (Chung, 2013). Oxidative DNA-Schäden werden vor allem durch die Basen-Exzisionsreparatur behoben (Jaiswal et al., 2000). Verschiedene Glykosylasen spalten nach Erkennung der Läsionen die N-glykosidische Bindung, wodurch die beschädigte Base herausgeschnitten wird (Jaiswal et al., 2000). Eine apurinische oder apyrimidische Endonuklease entfernt anschließend die entstandene abasische Stelle (Jaiswal et al., 2000). Problematisch wird es, wenn die Reparaturenzyme selbst Angriffspunkt für reaktive Sauerstoffspezies werden (Jaiswal et al., 2001). Die 8-Oxodeoxyguanosin-DNA-Glykosylase 1 (hOgg1) ist maßgeblich an der Korrektur von 8-OxoG beteiligt (Jaiswal et al., 2001). Das Enzym enthält kritische Thiolanteile in Cysteinresten seiner Zinkfinger motive im aktiven Zentrum, die durch NO oder Peroxynitrit in Form einer Nitrosylierung modifiziert werden können (Jaiswal et al., 2001). Diese Reaktion führt zu einer Freisetzung des Zink-Metalls und einer darauffolgenden irreversiblen Denaturierung des Proteins (Jaiswal et al., 2001).

Ein weiteres Beispiel für die oxidative Modifikation von Cysteinen in katalytischen Zentren von Enzymen liefern die Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP1 und SHP2 (Kapitel 2.3; He & Karin, 2011). Die Oxidation führt zu einer Beeinträchtigung ihrer enzymatischen Aktivität und daraus resultiert eine Akkumulation von aktiviertem, phosphoryliertem JAK2 und STAT3 (He & Karin, 2011). Konstitutiv aktiviertes STAT3 wurde bereits mit der Karzinogenese verschiedener Organe einschließlich der Leber in Verbindung gebracht (Buettner et al., 2002; Subramaniam et al., 2013). Der hier diskutierte Zusammenhang bietet eine mögliche Erklärung für die gehäuft beobachtete Entstehung von Karzinomen auf dem Boden chronischer Infektionen, die durch erhöhten oxidativen Stress charakterisiert sind.

Viele als Klasse 1 Karzinogene klassifizierte Infektionserreger induzieren oxidativen Stress. Das HCV erhöht die Produktion von ROS in den Mitochondrien, indem sich Nukleo-Kapsid-Proteine an den Kontaktpunkten des endoplasmatischen Retikulums und der mitochondrialen Außenmembran lokalisieren (Korenaga et al., 2005). Auf diese Weise wird der Elektronenfluss durch den Komplex I der Atmungskette gestört (Korenaga et al., 2005). So wurden im Zusammenhang mit einer humanen HCV-Infektion erhöhte Leberwerte des 8-OxoG sowie der LPO-Produkte HNE und MDA festgestellt (Maki et al., 2007). Gleichzeitig fielen erschöpfte Glutathionspeicher (Dryden et al., 2005) und eine HCV-induzierte Herabregulierung antioxidativer Enzyme auf (Abdalla et al., 2004; Elsammak et al., 2008).

Der Leberegel *O. viverrini* ist insbesondere in Thailand mit dem Auftreten von Cholangiokarzinomen in Verbindung gebracht worden (Ohshima & Bartsch, 1994). Als

Risikofaktor dieser parasitären Erkrankung wurde die endogene Produktion von NO durch die iNOS postuliert, wodurch einzelsträngige, doppelsträngige oder oxidative DNA-Läsionen verursacht werden (Jaiswal et al., 2000). Hinzukommend wurde im Zusammenhang mit NO eine globale Beeinträchtigung der DNA-Reparaturaktivität beobachtet (Jaiswal et al., 2000).

Der Zellzyklusstillstand ist ein wichtiger Aspekt der *DNA Damage Response* (DDR), damit DNA-Schäden erkannt und repariert werden können und die korrekte Weitergabe der genetischen Information sichergestellt wird (Srinivas et al., 2019). Im Kontrast zu dieser grundlegenden Voraussetzung für die DDR imponiert in der hier durchgeführten Studie ein erhöhter Gehalt der DNA-Replikationsmarker MCM2 und PCNA. Insbesondere die MCM2-Konzentration war in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe signifikant gesteigert gegenüber der *S. mansoni*-Infektion allein. Diese Ergebnisse implizieren einerseits eine parallel zum Inflammationsgeschehen und dem damit verbundenen oxidativen Stress gesteigerte Zellzyklusinduktion durch die Infektion mit *S. mansoni*. Zusätzlich wird diese durch die gleichzeitige Exposition gegenüber DEN noch weiter gesteigert. Immunhistochemisch wurde dieses Ergebnis untermauert. In den MCM2-gefärbten Schnitten der DEN + *S. mansoni*-Tiere fokussierten sich zum einen viele kleine positiv-gefärbte Zellen um die Granulome. Diese Zellen spiegeln am ehesten die replizierenden Immunzellen wider, die die Pathogenitätsfaktoren im Parenchym bekämpfen. Außerdem fielen viele größere rot gefärbte Zellen im Gewebe zwischen den Granulomen auf. Bei diesen handelt es sich am ehesten um die Kerne der Hepatozyten, die MCM2 exprimieren und somit replizieren und sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden. In diesem Kontext demonstrierte unsere Arbeitsgruppe kürzlich die Induktion von Lizenzierungsfaktoren des Zellzyklus – MCM4, 6 und 7 – durch eine Infektion mit *S. mansoni* in Hamstern (Bülow et al., 2024). Darüber hinaus gelang es, eine SEA-ausgelöste Proliferation humaner Hepatoma-Zellen nachzuweisen (Bülow et al., 2024). Die Ursache dieser durch *S. mansoni* induzierten Replikation bietet einen interessanten Fokus anschließender Forschungsarbeiten. Ansatzpunkte liefern Kenntnisse über die Aktivierung von Proteinkinasen durch ROS, die das Tumorsuppressorprotein Retinoblastoma 1 über eine Phosphorylierung inaktivieren und so zu einer gesteigerten Zellteilung beitragen (Ying et al., 2007). Auch die Serin/Threonin-Kinase Akt wird durch oxidativen Stress aktiviert (Reuter et al., 2010). In diesem Zusammenhang ist sowohl eine Herunterregulation der antioxidativen Abwehr als auch eine verstärkte Replikation über die Stabilisierung von c-Myc, Cyclin D1 oder die Induktion des Abbaus von Inhibitoren der CDKs beschrieben (Reuter et al., 2010).

Wiederholte physische Schäden durch die Parasiten, ihre Eier oder die sezernierten Produkte derselben führen zu einer regenerativen Hyperplasie des geschädigten Gewebes (Porta et al., 2011). Auf diese Weise können sich genotoxisch geschädigte Zellen, in denen prä-maligne Veränderungen stattgefunden haben, leicht vermehren und zusätzliche Mutationen akkumulieren, die letztendlich zur malignen Transformation führen (Porta et al., 2011). Aus diesem Grund entwickeln sich Karzinome im Zusammenhang mit Infektionen durch *S. haematobium*, *C. sinensis* oder *O. viverrini* häufig in der Umgebung der Eier oder der Parasiten in den jeweils befallenen Organen (Porta et al., 2011).

In unserer Studie wurde gezeigt, dass die Infektion durch *S. mansoni* zu einer verstärkten oxidativen Abwehr durch die MPO führte, die mit einer Generation von ROS verbunden ist. Als direkte Folge des oxidativen Stresses wurde eine verstärkte LPO beobachtet, die durch die doppelte Noxe aus DEN + *S. mansoni* gegenüber den anderen Gruppen gesteigert war. Eine gleichzeitige Abnahme der Expression antioxidativer Enzyme im Lebergewebe legt die Vermutung nahe, dass die oxidativen Vorgänge unkontrolliert abliefen, da die entsprechenden Gegenregulationssysteme unterbunden wurden. Gleichzeitig wurde ein gesteigertes Replikationsverhalten in der *S. mansoni*-, jedoch noch stärker in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe gezeigt. Insgesamt schaffen die identifizierten Zellreaktionen ideale Voraussetzungen für eine Deregulierung der Zellhomöostase und für das Fortschreiten in Richtung Malignität.

6.3 Auslösung einer hepatischen Fibrose durch *S. mansoni* und Intensivierung derselben durch Diethylnitrosamin

6.3.1 Fibrogenese durch *S. mansoni* und Diethylnitrosamin

Die Pathologie der Leberfibrose wird als Wundheilungsprozess angesehen, der auf die Wiederherstellung der Organintegrität nach Verletzungen des Gewebes abzielt (Kamdem et al., 2018). Findet die Auslösung dieses Prozesses unkontrolliert statt, ist die Fibrose pathologisch und damit Merkmal verschiedener Erkrankungen wie der hepatosplenischen Schistosomiasis (Kamdem et al., 2018). Hierbei ist die chronische Leberfibrose progressiver Treiber der Mortalität und Morbidität der Erkrankung (Kamdem et al., 2018).

Im Zuge der Granulomformation werden anfänglich Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten rekrutiert, die eine Entzündungsreaktion gegen das

Schistosomen-Ei auslösen (Carson et al., 2018). Diese Reaktion beinhaltet die Sekretion des stärksten fibrogenen Agonisten, TGF- β (Koyama & Brenner, 2017). Aktivierte MFB produzieren einen Ring aus Kollagen, mit dem sie den Kern des Granuloms einschließen (Carson et al., 2018). Daraufhin infiltriert eine erneute Welle aus neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Makrophagen sowie Lymphozyten das Granulom und bildet eine weitere periphere Schicht inflammatorischer Zellen (Carson et al., 2018).

Neben der Fibrosierung des Lebergewebes leisten die aktivierten HSCs auch durch ihre kontraktile Eigenschaften als hepatische Perizyten einen Beitrag zur portalen Hypertension (Rockey, 2001). Auf diese Weise regulieren sie mittels sinusförmiger Kontraktionen den intrahepatischen Widerstand des portalen Blutflusses (Rockey, 2001). Aufgrund der resultierenden portalen Hypertension kommt es zu einer Drosselung des portalvenösen Blutflusses (Andrade, 2009). Kompensatorisch hypertrophiert das Netzwerk der hepatischen Leberarterien, die das Parenchym stärker vom arteriellen Blutstrom abhängig macht (Andrade, 2009). Aus diesem Grund kann es nach Blutungen aus Magen- oder Ösophagusvarizen zu einem akuten Blutdruckabfall mit resultierenden ischämischen Parenchymnekrosen kommen (Andrade, 2009). Dies hat zur Folge, dass das Organ bei ursprünglich trotz starker Fibrose erhaltener Leberfunktion dekompenziert und in seiner Funktion versagt (Andrade, 2009).

Im Rahmen dieser Studie erfolgte die Betrachtung verschiedener Aspekte der Fibrogenese. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass eine Infektion mit *S. mansoni* zu einer erhöhten hepatischen Expression von Tgf- β führte. Die kombinierte Intervention durch DEN + *S. mansoni* verstärkte die Expression gegenüber der alleinigen Infektion oder der alleinigen DEN-Injektion noch weiter. Das Zytokin wird als Reaktion auf Zellschädigungen freigesetzt und induziert anschließend die Fibrogenese (Dewidar et al., 2019). Daraus lässt sich ableiten, dass es durch die kombinierte Schädigung durch Parasiten und Hepatokarzinogen zu einer potenzierten Leberschädigung gekommen ist, die eine Fibrose zur Folge hat. Außerdem wurde in den infizierten Gruppen eine erhöhte Konzentration des Intermediärfilaments Desmin ermittelt, das im Zuge der Transdifferenzierung von aktivierten HSC exprimiert wird (Lemoinne et al., 2013). Ausschließlich in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe erreichte die Desmin-Konzentration das 5%-Signifikanzniveau gegenüber den Kontroll- und DEN-Mäusen. Hieraus lassen sich ebenfalls additive Wirkungen bei der Aktivierung der HSC vermuten. Die aktivierten MFB synthetisieren anschließend Kol-1 und -3 und bauen auf diese Weise das extrazelluläre Gewebe der Leber um (Dewidar et al., 2019). Die Infektion mit *S. mansoni* führte im Mausmodell zu einer gesteigerten Expression beider Proteine, wobei die Expression von Kol-1 im Vergleich zu Kol-3 ausgeprägter anstieg.

Im Zuge der Infektion verschiebt sich das Verhältnis von Kol-1 zu Kol-3 von 2:1 in gesunden Mäusen zunehmend zu einem Verhältnis von 1:1 in fibrotischen Lebern (Wu et al., 1982). In unserem Mausmodell ist daher zum Zeitpunkt der Organentnahme von einem frühen Stadium der Fibrogenese auszugehen. Darüber hinaus erfolgte die Quantifizierung des Hydroxyprolin-Gehaltes in den Leberproben, anhand dessen sich Rückschlüsse auf das Ausmaß der abgelagerten Kollagenmenge ziehen lassen. Auch die Hydroxyprolin-Konzentration war durch die *S. mansoni*-Infektion erhöht. Des Weiteren wurden Tendenzen einer darüber hinaus verstärkten Kollagenablagerung in den Lebern der DEN + *S. mansoni*-Mäuse dargestellt. Insgesamt legen diese Ergebnisse die Vermutung nahe, dass es durch die doppelte Belastung zu einer gesteigerten Hepatozytenschädigung, Transdifferenzierung der HSCs und Kollagenablagerung in den Lebern gekommen ist und dass sich die Fibrose in einem frühen progressiven Stadium befindet.

Auch in den Leberschnitten der DEN + *S. mansoni*-Mäuse war die Kollagenablagerung um die Granulome stärker ausgeprägt. Darüber hinaus führte die Kombinationsbehandlung zu einer deutlicheren fibrotischen Brückenbildung zwischen Portalregionen und Granulomen. Diese Befunde wurden durch das histopathologische Scoring des Fibrosegrades unterstrichen. Während den Tieren der *S. mansoni*-Gruppe ein Fibrosegrad von 1-1,5 zugeteilt wurde, erhielten die DEN + *S. mansoni*-Tiere Scoring-Werte von 2,5-3. Somit bestärkte das histopathologische Scoring des Gewebes die Annahme einer potenzierten Leberschädigung durch die doppelte Belastung der Tiere, die eine verstärkte Fibrose zur Folge hat.

Die Intensität der hepatosplenischen Pathologie weist unter den *S. mansoni*-infizierten Patienten eine enorme Variabilität auf (Farah et al., 2000). Verschiedene Faktoren wie die Dauer und Intensität der Infektion oder Ko-Infektionen mit Hepatitisviren wurden hierfür verantwortlich gemacht (Farah et al., 2000). Darüber hinaus scheint ein schwerer Erkrankungsverlauf familiär gehäuft aufzutreten (Dessein et al., 1999). Epidemiologische Studien zeigten eine Korrelation der Fibrosegrade zwischen Kindern und Eltern, jedoch ein Fehlen dieser beispielsweise unter den Ehepartnern (Dessein et al., 1999). Im Zusammenhang mit *S. japonicum* wurde bereits ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (rs1800925T) des *Il-13*-Promotors mit einer erhöhten *Il-13*-Expression in der Leber und einem erhöhten Risiko einer pathologischen Leberfibrose aufgedeckt (Long et al., 2015). Polymorphismen mit ähnlichen profibrogenen Folgen wurden ebenfalls für das *Ctgf*- und das *Ifn γ* -Gen vorgeschlagen (Kamdem et al., 2018).

6.3.2 Der High Mobility Group Box 1-Signalweg

Für zukünftige Forschungsprojekte stellt der *High Mobility Group Box 1*- (HMGB1-) Signalweg im Zusammenhang mit der durch *S. mansoni* ausgelösten Fibrose einen interessanten Fokus dar. Beim HMGB1 handelt es sich um ein physiologisch nukleär lokalisiertes Protein, das über eine A- und eine B-Box die Fähigkeit zur DNA-Bindung besitzt (Zhong et al., 2022). Auf diesem Weg löst HMGB1 entweder entzündungsfördernde (B-Box) oder antagonistische *Downstream*-Effekte (A-Box) aus (Zhong et al., 2022). Im Fall einer Zellschädigung wird HMGB1 acetyliert, aus dem Zellkern in das Zytoplasma transloziert und anschließend in den Extrazellularraum sezerniert (Vicentino et al., 2018). Zusätzlich wird HMGB1 durch verschiedene Immunzellen aktiv freigesetzt (Vicentino et al., 2018; Zhong et al., 2022). Im extrazellulären Milieu fungiert HMGB1 als multifunktionales Alarmin und induziert über die Bindung an *Toll-like* Rezeptoren TLR4/9 und an den Rezeptor für *advanced glycation end products* (RAGE) auf den Zielzellen eine Zytokinproduktion, Chemotaxis, Proliferation und Differenzierung von Immunzellen und HSC (Vicentino et al., 2018).

In einem Tetrachlorkohlenstoff-induzierten Fibrosemodell stieg der HMGB1-Serumwert proportional zur Erhöhung des TGF- β -Wertes sowie zur Kollagendeposition an (Zhong et al., 2022). Darüber hinaus stimulierte HMGB1 die Proliferation von HSCs, die Synthese des MFB-Markers α -SMA und die Phosphorylierung von Smad 2 über den TGF- β -Signalweg *in vitro* (Zhong et al., 2022).

Im Serum *S. mansoni*-infizierter Patienten wurden sowohl im akuten als auch im chronischen Krankheitsstadium erhöhte HMGB1-Konzentrationen festgestellt (Vicentino et al., 2018). In murinen Lebern war HMGB1 ebenfalls durch *S. mansoni* hochreguliert und wies zudem eine zytoplasmatische Lokalisation auf, die für eine Sekretion des Alarmins als Reaktion auf eine Zellschädigung spricht (Vicentino et al., 2018). Außerdem scheint der HMGB1-Signalweg eine Rolle bei der Leberfibrose im Rahmen einer Hepatitis B zu spielen, da Serumwerte bei diesen Patienten ebenfalls signifikant erhöht waren (Albayrak et al., 2010).

Vicentino et al. adressierten den HMGB1-Signalweg in *S. mansoni*-infizierten Mäusen mithilfe der synthetischen 3-Chlor-5-(4-pyridyl)-4,5-dihydroisoxazol-Verbindung (DIC) und des natürlichen Triterpen Glycyrrhizin (GZR) aus der Süßholzwurzel (Vicentino et al., 2018). Beide Substanzen antagonisieren die entzündungsfördernde Signalgebung, indem GZR an die Boxen des HMGB1 bindet (Vicentino et al., 2018). In der Folge der Behandlung wurde eine nukleäre Lokalisation des HMGB1 sowie eine Herabmodulation der beiden wichtigsten profibrogenen Zytokine – IL-13 und TGF- β – beobachtet

(Vicentino et al., 2018). Dies führte zu einer Verringerung der Leberfibrose um 50% und zu einem Anstieg der Überlebensrate (Vicentino et al., 2018). Neben den fibrogenen Zytokinen wurden ebenfalls IL-6, IL-5 und IL-17 α herabreguliert (Vicentino et al., 2018). Insgesamt ist der therapeutische Ansatz von Vicentino et al., der auf eine Begrenzung der hepatischen Fibrose als Ausdruck einer schweren hepatosplenischen Verlaufsform bei *S. mansoni*-Infektion abzielt, sehr vielversprechend.

6.4 Verstärkung Diethylnitrosamin-aktivierter onkogener Signalwege durch *S. mansoni*

6.4.1 Karzinogene Mechanismen von Parasiten

Unter den sechs am häufigsten zum Tode führenden Karzinomerkrankungen – dem Lungen-, Leber-, Darm-, Magen-, Speiseröhren- und Brustkrebs – stehen vier dieser Malignome, darunter jene in der Leber, im Darm, im Magen oder in der Speiseröhre, häufig in Verbindung mit verschiedenen Infektionskrankheiten (van Tong et al., 2017). In diesem Zusammenhang klassifizierte die IARC die Parasiten *S. haematobium*, *O. viverrini* und *C. sinensis* bereits als Klasse 1 und somit als gesicherte Karzinogene, die Neoplasien in der Blase beziehungsweise in den Gallengängen hervorrufen (IARC & WHO, 2012). Die Karzinogenität dieser Parasiten ist auf ihre längere Persistenz im Wirt und die damit verbundene chronische Entzündung sowie auf die Freisetzung von ROS zurückzuführen (Palumbo, 2007). Eine für die maligne Transformation ebenfalls relevante Pathophysiologie ist eine verringerte Immunüberwachung aufgrund einer durch die Parasiten gezielt hervorgerufenen Immunsuppression (Palumbo, 2007).

S. haematobium löst die urogenitale Form der Schistosomiasis aus (Palumbo, 2007). Als Reaktion auf Fallberichte über eine Korrelation der Infektion mit Plattenepithelkarzinomen der Harnblase folgten diverse Studien, die zur Sicherung der Schistosomen-Spezies als Klasse 1 Karzinogen führten (Palumbo, 2007). Dem Parasiten wurde eine fünffache Steigerung des Karzinomrisikos zugeschrieben (Palumbo, 2007). Im Zusammenhang mit der Pathophysiologie durch *S. haematobium* wurden zahlreiche östrogenähnliche Metabolite und die vermehrte Produktion von ROS identifiziert (Gouveia et al., 2015). Diese wirken genotoxisch und führen zum vermehrten Auftreten oxidierter Guanosin-Basen und zu somatischen Mutationen der Gene *Hras*, *Kras* und *Bcl-2* (Roderfeld et al., 2020; van Tong et al., 2017). Außerdem wurde eine gestörte Expression des Tumorproteins p53, des Retinoblastoma-Proteins und des epidermalen Wachstumsfaktors beobachtet (van Tong et al., 2017). Zusätzlich zeigt der

Parasit sowie die aus dessen Eiern sezernierten Antigene das Potenzial, die Proliferation der genotoxisch geschädigten Zellen zu induzieren (Jaiswal & Sandeep, 2015; van Tong et al., 2017).

Das Auftreten des Cholangiokarzinoms als vorherrschende Art der Lebermalignome in Nordostthailand ist insbesondere auf die karzinogenen Mechanismen durch *O. viverrini* und *C. sinensis* zurückzuführen, die in diesen Regionen endemisch sind (Ohshima & Bartsch, 1994). Die Egel provozieren eine chronische Entzündung, induzieren metabolischen und oxidativen Stress und schädigen das Wirtsgewebe im Zuge der Parasitenentwicklung (van Tong et al., 2017). Dies und die daraufhin ablaufenden aktiven Wundheilungsprozesse sowie die induzierte Immunsuppression wurden für die Initiierung der Karzinogenese verantwortlich gemacht (van Tong et al., 2017).

Der Prozess der malignen Transformation kann in die drei Phasen der Initiation, Promotion und der Progression unterteilt werden (He et al., 2010). Die Tumoringitiation bezeichnet eine primäre und irreversible Veränderung des Erbgutes einer einzigen Zelle, die dieser einen Überlebens- und Wachstumsvorteil verschafft (He et al., 2010). Häufig wird diese Transformation durch DNA-Mutationen hervorgerufen, die zu einer Aktivierung von Onkogenen und/oder zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen (He et al., 2010). Diese initiierte Zelle verbleibt im Gewebe, bis sie einem zweiten Stimulus oder der Promotion ausgesetzt wird (Vennervald & Polman, 2009). Die Tumorpromotion beschreibt einen länger andauernden Prozess, bei dem es zur Interaktion zwischen der initiierten Zelle und seiner Mikroumgebung kommt (He et al., 2010). Die chronische Inflammation stellt definitiv eine tumorfördernde Mikroumgebung dar (He et al., 2010). Durch die Produktion von Chemokinen, proinflammatorischer Zytokine sowie ROS übt die chronische Inflammation konstant einen evolutionären Druck auf die initiierte Zelle aus (He et al., 2010). Im Zuge der anschließenden ebenfalls durch die Entzündung unterstützten Proliferation kommt es zur Ausbreitung von Zellpopulationen mit fixierten genetischen Veränderungen (Svinka et al., 2014). Insgesamt erhöht eine entzündliche Mikroumgebung die Wahrscheinlichkeit der Akkumulation weiterer tumorfördernder Mutationen und fördert im Sinne eines Circulus vitiosus die Entstehung von Karzinomen (Svinka et al., 2014).

Im konkreten Fall des Inflammationsprozesses durch Parasiten wie *S. mansoni* kommt eine parasitär vermittelte drastische Verringerung der Abwehrsysteme des Körpers hinzu (Jaiswal & Sandeep, 2015). Im Falle einer Ko-Infektion mit dem HCV ermöglicht diese beeinträchtigte Immunreaktion eine gesteigerte Vermehrung der Viren, die durch ihre direkte Zytotoxizität das Gewebe zusätzlich schädigen (Kamal et al., 2000).

Die Pathophysiologie der Schistosomiasis beinhaltet zudem die hepatische Fibrogenese. Im Zuge des fibrotischen Organumbaus kommt es zu einer sinusoidalen Defenestration (Lurje et al., 2020). Guidotti et al. zeigten, dass CD8⁺ T-Zellen in den Lebersinusoiden an Thrombozyten haften und sich anschließend entlang der Sinusoide bewegen (Guidotti et al., 2015). Dabei strecken sie auf ihrer Suche nach zu bekämpfenden Antigenen zelluläre Ausstülpungen durch die endothelialen Fenestrae (Guidotti et al., 2015). In einem fibrotischen Organ kommt es daher zu einer mangelnden Immunüberwachung durch Antigen-erfahrene CD8⁺ T-Effektorzellen gegenüber transformierten oder infizierten Zellen (Guidotti et al., 2015). In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Promotionsarbeit wurde ein erhöhter oxidativer Stress und ein Replikationsstress insbesondere durch die Belastung aus DEN + *S. mansoni* dargestellt. Diese pathologischen Veränderungen begünstigen das Auftreten transformierter Hepatozyten sowie die Expansion dieser. Die Pathophysiologie der Fibrose bietet einen zusätzlichen Vorteil der veränderten Zellen, da CD8⁺ T-Effektorzellen transformierte Zellen in den fibrotischen Sinusoiden nicht erkennen können.

6.4.2 Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 durch *S. mansoni* und Diethylnitrosamin

Im Hinblick auf onkogene Signalwege, die eine Rolle bei der hepatozellulären Karzinogenese spielen, erfolgte die Quantifizierung der phosphorylierten und aktivierten Formen des Proto-Onkogens c-Jun und des Transkriptionsfaktors STAT3. Auf dem Boden einer HCV-bedingten Lebererkrankung wurde die Relevanz dieser beiden Proteine für die durch das HCV-Kernprotein ausgelöste hepatozelluläre Transformation gezeigt (Machida et al., 2010). Die additive und nahezu vollständige Verhinderung von sowohl DEN-induziertem als auch spontanem HCC in HCV-Core-transgenen-Mäusen durch die duale Ablation von STAT3 und c-Jun unterstreicht die entscheidende Funktion von STAT3 und c-Jun bei der HCV-induzierten Hepatokarzinogenese (Machida et al., 2010).

In unserem Mausmodell war die karzinogene Wirkung von DEN eine grundlegende Voraussetzung für die weitere Analyse onkogener Signalwege und der Wechselwirkungen mit *S. mansoni*. In der Tat wurde ein Anstieg des HCC-Tumormarkers AFP in den DEN-Mäusen ermittelt. In der darauffolgenden Analyse der Karzinogenese-assoziierten Signalwege wurde eine gesteigerte Phosphorylierung und somit Aktivierung von c-Jun durch die Infektion der Tiere mit *S. mansoni* gezeigt.

Bei einem der wichtigsten vorgeschalteten Aktivatoren von STAT3 handelt es sich um IL-6, in dessen Rezeptorkomplex bei 60% der entzündungsbedingten hepatozellulären Adenome aktivierende Mutationen identifiziert wurden (Rebouissou et al., 2008). Außerdem gilt der IL-6-Serumspiegel als zuverlässiger Prädiktor für das Fortschreiten der HBV-bedingten Hepatitis zum HCC (Wong et al., 2009). Bei Patienten, die bereits an einem HCC oder an Lebermetastasen erkrankt waren, korrelierten erhöhte prätherapeutische IL-6-Serumwerte mit einem schlechten Ansprechen auf eine TACE und einem signifikant verringerten Gesamtüberleben (Loosen et al., 2018). Der Zusammenhang von IL-6 und Hepatokarzinogenese wird zudem dadurch verdeutlicht, dass weibliche Wildtyp-Mäuse, die im Vergleich zu männlichen Wildtyp-Mäusen weniger IL-6 produzieren, weitgehend resistent gegen die DEN-induzierte HCC-Entwicklung sind (He & Karin, 2011; Tolba et al., 2015). He et al. beobachteten den Progress von isolierten HCC-Vorläuferzellen in einem DEN-induzierten Hepatokarzinogenese-Modell in BL/6-Mäusen, bei dem DEN einmalig im Alter von 15 Tagen intraperitoneal injiziert wurde (He et al., 2013). Hierbei stellten sie fest, dass die frühe Phase der Hepatokarzinogenese von einer parakrinen Produktion von IL-6 durch Makrophagen und Kupffer-Zellen begleitet war (He et al., 2013). Zwei Wochen nach der Verabreichung von DEN nahm der IL-6-Spiegel ab und stieg Monate später erneut an (He et al., 2013). Zu diesem Zeitpunkt jedoch in Form einer autokrinen IL-6-Signalgebung durch die HcPCs selbst, welche eine Schlüsselrolle bei der STAT3-abhängigen Tumorprogression zum HCC spielen könnte (He et al., 2013). HCC-Knoten wurden erstmalig nach acht bis neun Monaten identifiziert (He et al., 2013). In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie wurde ebenfalls DEN im Alter von zwei Wochen intraperitoneal verabreicht, jedoch wurden die Tiere nach 27 Wochen getötet und die Leberproben gewonnen. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich in unserem Modell möglicherweise noch nicht die volle karzinogene Wirkung durch DEN. Einzelne Karzinome konnten in den Lebern von drei der zwölf Tiere der DEN- und von vier der zwölf Mäuse der DEN + *S. mansoni*-Gruppe histopathologisch gesichert werden. Die DEN-Injektion führte zu keinem Anstieg der IL-6-Expression und ließ diese in der *S. mansoni*-Gruppe unverändert. Übertragen auf die Studie von He et al. könnte der Zeitpunkt der Organentnahme von 27 Wochen nach DEN-Injektion in unserem Modell in den Zeitraum zwischen para- und autokriner IL-6-Signalgebung fallen, in der eine Herabmodulation der IL-6-Konzentration beobachtet wurde. Dies könnte zudem die große Streuung der P-STAT3-Proteinmenge in den beiden DEN-behandelten Gruppen erklären. Die *S. mansoni*-Infektion führte zu einer signifikant stärkeren STAT3-Phosphorylierung und Aktivierung sowohl alleine als auch in Kombination mit DEN. In den Mäusen der letztgenannten Gruppe imponierte eine große Streuung der Werte hinsichtlich einer noch stärkeren STAT3-Phosphorylierung.

Vermutlich würde diese bei längerer karzinogener Wirkung des DEN das 5%-Signifikanzniveau gegenüber der *S. mansoni*-Gruppe erreichen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse eine gesteigerte Aktivierung des in die hepatozelluläre Karzinogenese involvierten Transkriptionsfaktors STAT3. Die STAT3-Phosphorylierung war durch die zusätzliche DEN-Injektion tendenziell additiv gesteigert. Die Relevanz dieses Signalweges ist bereits im Zusammenhang mit der HBV- und HCV-induzierten malignen Transformation beschrieben. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich die Aktivierungswege des STAT3 bei Ko-Infektion mit den Hepatitis-Viren und der Infektion durch *S. mansoni* ebenso potenzieren und bei langfristiger Ko-Existenz dieser beiden Infektionen im Wirt ein schnelleres Fortschreiten zum HCC begünstigen.

Ein zukünftiger Fokus von Forschungsprojekten sollte sich in diesem Zusammenhang auf die Aktivierungswege richten und der Frage nachgehen, ob eine verstärkte IL-6-Signalgebung auch bei chronisch infizierten Patienten festzustellen ist. Eine Dominanz des männlichen Geschlechtes unter ebendiesen unterstützt diese Theorie (Löscher & Burchard, 2010). In diesem Kontext stellt eine protektive Wirkung von Ursolsäure (UA), einer natürlichen Triterpenoidverbindung in Kräutern, Pflanzen und einigen Früchten, eine interessante Fragestellung dar (Liu et al., 2017). In Leberkarzinom-Zelllinien hemmte UA die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung sowie die Koloniebildung, Zellmigration und die Überlebensfähigkeit der Zellen (Liu et al., 2017). Sollte sich ein schützender Effekt der UA-Verabreichung auf die chronische Pathologie durch *S. mansoni* alleine oder in Kombination mit weiteren Risikofaktoren herausstellen, wäre UA eine sinnvolle Ergänzung als langfristige Therapie der Schistosomiasis. Anhand des Wirkmechanismus lässt sich vermuten, dass eine regelmäßige Einnahme dieses natürlichen Produktes das Risiko der Entwicklung eines HCCs verringern könnte (Liu et al., 2017).

6.5 Limitationen der Arbeit

Ein Vorteil der Durchführung von *in vivo* Experimenten in Form eines Mausmodells ist die Abbildung des Organismus in seiner Gesamtheit. Die Infektion mit *S. mansoni* und die Injektion von DEN führen zu einer Vielzahl von Reaktionen im Körper, die die Kommunikation verschiedener Zellen beinhalten. Im Vergleich zu *in vitro* Experimenten lassen sich daher anhand eines Tiermodells besser Aussagen über die Verhältnisse im menschlichen Organismus treffen, die Inflammation, Karzinogenese und Fibrogenese umfassen. Dennoch ist eine Übertragung auf den Menschen nur eingeschränkt möglich. Aus diesem Grund ist die externe Validität eines Tierexperimentes grundsätzlich

eingeschränkt. Die hier präsentierten Ergebnisse und Schlussfolgerungen sollten daher mithilfe humaner Referenzproben oder primärer humaner Hepatozyten validiert werden. Da außerdem versuchsbedingt ausschließlich männliche Mäuse verwendet wurden, sind zudem Schlussfolgerungen nur in gleichgeschlechtlichen Individuen sinnvoll.

Darüber hinaus ist es ethisch nur zu vertreten, eine minimale Anzahl an Versuchstieren in die Experimente einzubeziehen. Aus einer geringen Stichprobengröße resultiert jedoch eine größere Streuung der Ergebnisse und eine erhöhte Standardabweichung. Zudem ist nicht von einer Normalverteilung auszugehen. Nichtsdestotrotz zeigt die Vielfalt der hier präsentierten Ergebnisse, dass auch bei limitierter Stichprobengröße sinnvolle Aussagen möglich sind.

Im Rahmen einer Infektion mit *S. mansoni* stellen die in die Leber gespülten Eier die wesentlichen Pathogenitätsfaktoren dar. Über sezernierte Antigene sowie die provozierte Immunreaktion rufen sie eine Gewebeschädigung in ihrer unmittelbaren Umgebung hervor. Das Leberparenchym in den umliegenden Bereichen bleibt in seiner Funktion uneingeschränkt. Dies führt dazu, dass sich beispielsweise bei der Herstellung von Lysaten für Western Blots oder ELISAs gesundes mit pathologischem Lebergewebe vermischt. Die Ergebnisse zeigen daher eine schwächere Pathologie im Vergleich zur direkten Umgebung der Granulome und damit einen Durchschnitt über die gesamte Leber. Obwohl dadurch bestimmte Effekte in der direkten Mikroumgebung nur abgemildert erfasst werden können, wurden in diesem Projekt relevante Aspekte der Pathologie durch *S. mansoni* sowie eine Potenzierung dieser durch DEN nachgewiesen.

Außerdem wurde im Rahmen dieser Studie versucht, die Gesamtbreite der durch die Infektion hervorgerufenen Pathologie abzubilden und hinsichtlich additiver Faktoren durch DEN zu analysieren. Jeder einzelne Aspekt der pathologischen Schädigung umfasst jedoch zahlreiche Signalmoleküle und verursacht eine Modifikation diverser Biomoleküle. Daher war es in dieser Studie lediglich möglich, einen Bruchteil dieser zu untersuchen. Auf diese Weise gelang es, einen Überblick der pathophysiologischen Auswirkungen der Kombination von *S. mansoni* mit einem Hepatokarzinogen darzustellen. Weiterführende Untersuchungen stehen noch aus. Eine wichtige Fragestellung zukünftiger Projekte richtet sich an die verstärkte Aktivierung von STAT3. Unklar ist derzeit, ob diese Aktivierung eine Folge der ROS-bedingten Inaktivierung der SHP-Proteine ist, durch eine direkte Mutation im *Stat3*-Gen oder durch eine verstärkte Aktivierung des Signalweges verursacht wurde.

DEN alkyliert nach metabolischer Aktivierung die DNA und wirkt auf diesem Wege direkt mutagen. Während einer Infektion mit *S. mansoni* leistet insbesondere die entzündliche

Mikroumgebung den Beitrag zur karzinomfördernden Pathologie. Beide Noxen wirken also unterschiedlich, überschneiden sich hinsichtlich der Pathophysiologie nur teilweise und laufen in einer gemeinsamen Endstrecke zusammen. Da die Pathophysiologie der parasitären Infektion und beispielsweise einer Hepatitis B oder C stärkere Gemeinsamkeiten aufweist, ist eine Kombination der Infektionskrankheiten ein interessantes Mausmodell. Die Ergebnisse aus dem vorliegenden Projekt führten dementsprechend zu einem bereits laufenden DFG-Folgeprojekt, in dem eine Ko-Infektion von HBV mit *S. mansoni* analysiert wird.

7 Zusammenfassung

Die parasitäre Infektionskrankheit Schistosomiasis ist eine der häufigsten weltweit und betrifft schätzungsweise 250 Millionen Menschen, insbesondere in Afrika, Asien und Südamerika. Als *Neglected tropical disease* stellt sie einen relevanten Faktor für die weltweite Morbidität und Mortalität dar. Unter den humanpathogenen Spezies kann insbesondere *S. mansoni* eine schwere Leberschädigung hervorrufen, inklusive Leberfibrose, portaler Hypertension und der Entwicklung von Varizen. Eine Blutung aus Ösophagusvarizen ist dabei die häufigste Todesursache der Patienten. Derzeit ist aufgrund des Klimawandels und der zunehmenden Globalisierung eine weltweite Ausbreitung der Parasiten auch in Europa zu beobachten. So wurden seit dem Jahr 2000 Ausbrüche der urogenitalen Schistosomiasis in Spanien, Portugal und Frankreich verzeichnet. Zudem breitet sich die Sorge bezüglich einer Resistenzentwicklung gegen das momentan einzig eingesetzte Medikament Praziquantel aus.

Derzeit wird die Spezies *S. mansoni* von der IARC als Klasse 3 Karzinogen eingestuft. Jedoch legen Fallberichte und Ergebnisse aus Tierstudien die Vermutung nahe, dass *S. mansoni* die Entstehung von Karzinomen wie dem hepatozellulären Karzinom, HCC, begünstigen kann. In der Gegenwart bekannter Hepatokarzinogene – wie HCV, HBV, Aflatoxin oder Alkohol – entwickelten sich dysplastische Veränderungen früher und zeigten einen aggressiveren Charakter.

In dieser tierexperimentellen Studie wurde in einem Modell für das toxisch induzierte HCC das Hepatokarzinogen Diethylnitrosamin verwendet und männlichen C57/BL6 Mäusen alleine und in Kombination mit einer *S. mansoni*-Infektion verabreicht. Zwei weitere Mausgruppen des Tiermodells erhielten lediglich eine Infektion mit *S. mansoni* oder dienten als Kontroll-Gruppe. Im Alter von 29 Wochen wurden Serum- und Leberproben gewonnen und unterschiedliche Aspekte der Leberpathologie analysiert, darunter zelluläre Leberschädigung, Inflammation, oxidativer Stress, Proliferation, Fibrose und onkogene Signalwege. Der Fokus der Analysen lag insbesondere auf additiven und potenzierenden Effekten durch die beiden schädigenden Faktoren.

Die Infektion mit *S. mansoni* führte zu einer hepatischen Inflammation, an deren Etablierung Th1-, Th2- sowie regulatorische Immunzellen beteiligt waren. Durch die zusätzliche Wirkung des Karzinogens DEN kam es zu einer verstärkten Leberschädigung, die sich in einer Aktivierung von Inflammasomen zeigte. Auf dem Boden chronischer Entzündungen produzieren Immunzellen eine Reihe reaktiver Sauerstoffspezies. Diese reagieren einerseits mit Pathogenen und andererseits mit

verschiedenen zellulären Biomolekülen und führen zu einer Schädigung derselben. In unserem Modell wurde eine erhöhte Aktivität der Myeloperoxidase in *S. mansoni*-infizierten Mäusen nachgewiesen. Dabei handelt es sich um ein Enzym, welches hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten exprimiert wird und maßgeblich an der Produktion von ROS im Zuge der Pathogenabwehr beteiligt ist. Entsprechend führte die Infektion zu einer gesteigerten Lipidperoxidation, die anhand des MDA quantifiziert wurde. Sowohl MPO- als auch MDA-Konzentration waren in der DEN + *S. mansoni*-Versuchsgruppe gegenüber den Kontrollen erhöht. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich DEN und *S. mansoni* im Hinblick auf die Leberschädigung durch die Produktion von ROS potenzieren und gemeinsam zu einer Aggravierung des hepatischen oxidativen Stresses führen.

Darüber hinaus haben wir eine Induktion des Zellzyklus durch *S. mansoni* demonstriert. Die Zellproliferation konnte durch die zusätzliche Exposition gegenüber DEN weiter gesteigert werden. Vor dem Hintergrund des im Lebergewebe herrschenden oxidativen Stresses durch *S. mansoni* und DEN impliziert dies Replikationsstress, insbesondere in der DEN + *S. mansoni*-Gruppe. Dieser begünstigt die Vermehrung genotoxisch geschädigter Zellen, in denen prä-maligne Veränderungen vorliegen sowie die Akkumulation weiterer Mutationen, die letztendlich zur malignen Transformation führen.

Die Neigung zur Mutagenese in den *S. mansoni*- und insbesondere in den DEN + *S. mansoni*-Mäusen wird durch die verstärkte Aktivierung des in der hepatozellulären Karzinogenese konstitutiv aktivierten Transkriptionsfaktors STAT3 untermauert.

Zusammenfassend konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Infektion von *S. mansoni* zu einer karzinomfördernden Mikroumgebung in der Leber führt, deren Ausmaß durch das zusätzliche Wirken eines Hepatokarzinogens wie DEN potenziert werden kann. Dieser Zusammenhang wurde bereits bei anderen als Klasse 1 Karzinogen klassifizierten Parasiten wie *S. haematobium* und *O. viverrini* für deren karzinogene Wirkung verantwortlich gemacht. Die vorliegende Studie demonstriert molekularbiologische Zusammenhänge, die die fördernde Funktion von *S. mansoni* während der Hepatokarzinogenese belegen. Weiterführende klinische Studien zur Assoziation von *S. mansoni* mit dem HCC könnten zusammen mit unseren Ergebnissen zu einer Neueinstufung der Karzinogenität dieser vernachlässigten Tropenkrankheit beitragen.

Die Infektion mit *S. mansoni* führt zu einer karzinomfördernden hepatischen Mikroumgebung

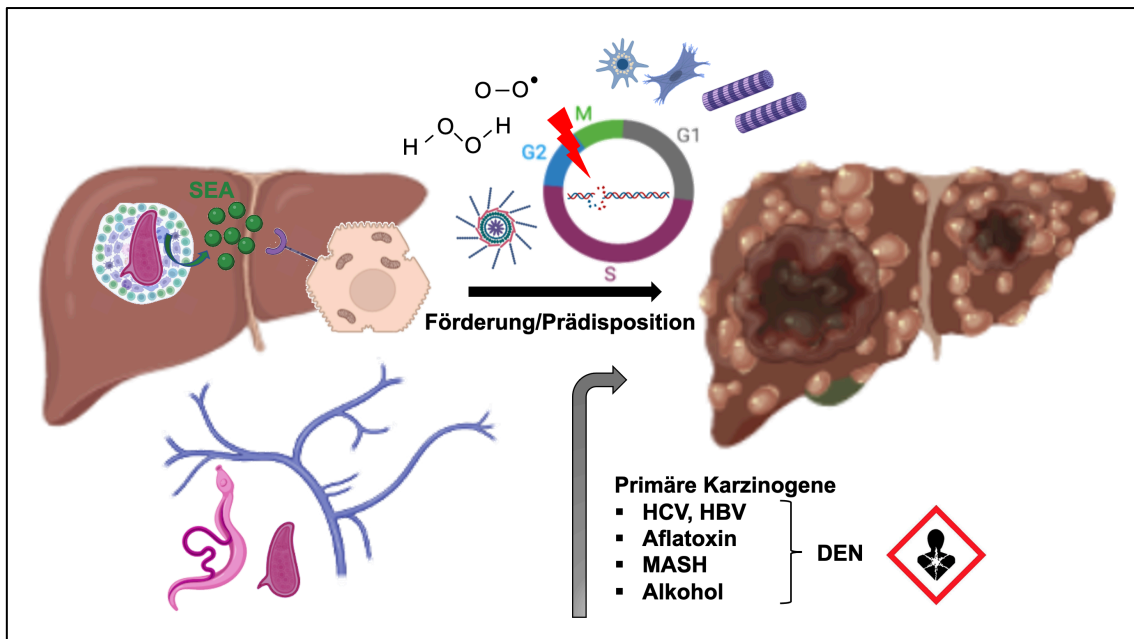


Abbildung 34: Die Infektion mit *S. mansoni* führt zu einer karzinomfördernden hepatischen Mikroumgebung. Ein Großteil der in den Mesenterialvenen gelegten Eier gelangt mit dem Blutstrom in die Leber, wo sie in den Sinusoiden stecken bleiben und eine granulomatöse Immunreaktion provozieren. Die pathologischen Vorgänge aus Immunreaktion und parasitären Faktoren resultieren über Inflammation, oxidativen Stress und Replikationsstress und die Fibrogenese in einer karzinomfördernden Mikroumgebung. Diese prädisponiert für die durch primäre Karzinogene wie DEN ausgelöste Hepatokarzinogenese und könnten die maligne Transformation der Leber fördern. Erstellt mit biorender.com

8 Summary

The parasitic infectious disease schistosomiasis is one of the most common worldwide, affecting an estimated 250 million people, particularly in Africa, Asia and South America. As a *neglected tropical disease*, it is a significant factor in mortality and morbidity among tropical diseases worldwide. Among human pathogenic species, *S. mansoni* in particular can cause severe liver damage, including hepatic fibrosis, portal hypertension, and the development of varices. Haemorrhage from varices is the most common cause of death in patients. Currently, due to climate change and increasing globalization, there is a worldwide spread of the parasites in Europe as well. For example, since 2000, outbreaks of urogenital schistosomiasis have been recorded in Spain, Portugal, and France. In addition, concern is spreading regarding the development of resistance to the only drug currently used, praziquantel.

Currently, the species *S. mansoni* is classified as a class 3 carcinogen by the IARC. However, case reports and results from animal studies suggest that *S. mansoni* may promote the development of carcinomas such as hepatocellular carcinoma, HCC. In the presence of known hepatocarcinogens – such as HCV, HBV, aflatoxin, or alcohol – dysplastic changes developed earlier and showed a more aggressive character.

In this experimental animal study, the hepatocarcinogen diethylnitrosamine was used in a model for toxically induced HCC and administered to male C57/BL6 mice alone and in combination with *S. mansoni* infection. Two other groups of mice in the animal model received only *S. mansoni* infection or served as a control group. At 29 weeks of age, serum and liver samples were obtained and different aspects of liver pathology were analyzed, including cellular liver damage, inflammation, oxidative stress, proliferation, fibrosis, and oncogenic signaling pathways. The focus of the analyses was particularly on additive and potentiating effects by the two damaging factors.

Infection with *S. mansoni* led to hepatic inflammation, in the establishment of which Th1, Th2 as well as regulatory immune cells were involved. The additional effect of the carcinogen DEN resulted in increased liver damage, which was manifested by activation of inflammasomes. On the ground of chronic inflammation, immune cells produce a number of reactive oxygen species that interact with and damage pathogens on the one hand and various cellular biomolecules on the other. In our model, increased activity of myeloperoxidase was detected in *S. mansoni*-infected mice. This is an enzyme mainly expressed in neutrophil granulocytes and is significantly involved in the production of ROS in the course of pathogen defense. Accordingly, infection led to increased

lipidperoxidation, which could be quantified by MDA. Both MPO and MDA levels were significantly increased by the additional DEN injection compared with the effects of DEN and *S. mansoni* alone. This suggests that DEN and *S. mansoni* potentiate each other in terms of liver injury through the production of ROS and together lead to aggravation of hepatic oxidative stress.

In addition, we have demonstrated cell cycle induction by *S. mansoni*. Cell proliferation was further enhanced by additional exposure to DEN. Against the background of oxidative stress by *S. mansoni* and DEN prevailing in liver tissue, this implies replication stress, especially in the combined intervened group. This favors the proliferation of genotoxically damaged cells in which premalignant alterations are present, as well as the accumulation of further mutations that ultimately lead to malignant transformation.

The propensity for mutagenesis in the *S. mansoni* and especially in the DEN + *S. mansoni* mice is underlined by the enhanced activation of the transcription factor STAT3, which is constitutively activated in hepatocellular carcinogenesis.

In summary, it has been shown for the first time that infection of *S. mansoni* leads to a carcinoma-promoting microenvironment in the liver, the extent of which can be potentiated by the additional action of a hepatocarcinogen such as DEN. This relationship has already been implicated in other parasites classified as class 1 carcinogens, such as *S. haematobium* and *O. viverrini*, for their carcinogenic effects. The present study demonstrates molecular biological associations supporting the promoting function of *S. mansoni* with respect to hepatocarcinogenesis. Further clinical studies on the association of *S. mansoni* with HCC, together with our results, could contribute to a reclassification of the carcinogenicity of this neglected tropical disease.

9 Anhang

9.1 Methoden

9.1.1 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Isolation der mRNA aus Mäuseleber

Aus dem gemörserten Lebergewebe wurde die mRNA mithilfe des RNeasy Mini Kits (250) der Firma Qiagen isoliert. Nach dem Abwiegen einer Probemenge von 20-30 mg Lebergewebe erfolgte die Lyse dieser durch die Zugabe von 600 μL RLT-Puffer/Mercaptoethanol-Gemisch. Nach dem Homogenisieren mithilfe des Ultra TURRAX T3 wurden die Proben für fünf Minuten auf *Crushed Ice* gestellt. Anschließend erfolgte das Überführen der Proben auf die lila Säulen des QIA-Shredders und die Zentrifugation bei 14.000 G für zwei Minuten. Der QIA-Shredder wurde danach verworfen. Zur isolierten RNA wurden 600 μL RNase-freier 70%iger Ethanol hinzugefügt. Die Proben wurden auf die rosa Säulen gegeben und bei 8.000 G für 20 Sekunden zentrifugiert. Danach wurde der Durchlauf erneut verworfen und der Vorgang wiederholt. Darauf folgend wurden 700 μL Waschpuffer (RW1) zum Homogenisat pipettiert und bei 8.000 G für 15 Sekunden zentrifugiert. Im Anschluss an zwei weitere Waschschriffe mit je 500 μL Ethanol-Waschpuffer (RPE) wurde bei 8.000 G für eine Minute zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und erneut für 15 Sekunden zentrifugiert. Anschließend erfolgte das Überführen der Säulen in sterile 1,5 mL Reaktionsgefäße. Zur Inaktivierung möglicherweise vorhandener DNA wurden 1 μL TURBO-DNase und 4 μL TURBO DNase-Puffer zu je 40 μL RNA-Probe gegeben und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach dem Hinzufügen von 4 μL *DNase Inactivation Reagent* erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Die Proben wurden abschließend für anderthalb Minuten bei 10.000 G zentrifugiert und in RNase-freie Eppendorf-Gefäße überführt. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -80°C.

Konzentrationsbestimmung der isolierten mRNA mittels Spektrometer

Mithilfe der Spektralphotometrie werden Informationen über die Menge sowie die Reinheit der isolierten mRNA gewonnen. Die Absorptionsmaxima der Nucleinsäuren RNA und DNA liegen bei einer Wellenlänge von 260 nm im Bereich des ultravioletten Lichtes. Proteine und andere Kontaminanten absorbieren ultraviolettes Licht maximal bei einer Wellenlänge von 280 nm respektive 230 nm. Der NanoDrop misst die optische

Dichte bei ebendiesen Wellenlängen und setzt sie in Verhältnisse zueinander. So gibt der Quotient von $A_{260/280} < 2$ Aufschluss über eine mögliche Verunreinigung der mRNA durch Proteine. Ein Wert von $A_{260/230} = 1,7-2,1$ spricht gegen eine Verunreinigung durch andere Kontaminanten.

Zudem lässt sich die Konzentration der in der Probe enthaltenen mRNA mit folgender Formel berechnen:

$$C_{RNA} = (A_{260} - A_{LW}) \times 40 \times V$$

C_{RNA} = Konzentration der RNA in [ng/ μ L]

A_{260} = Absorption der Probe bei $\lambda = 260$ nm

A_{LW} = Absorption der Leerwertprobe bei $\lambda = 260$ nm

40 = Multiplikationsfaktor, spezifisch für RNA

V = Verdünnungsfaktor

Vor Beginn der Analyse wurde der NanoDrop kalibriert, indem 1 μ L RNase-freies Wasser auf den unteren Sensor übertragen und die Messung anschließend zweimal durchgeführt wurde. Die angezeigten Werte sollten ≤ 0 sein. Im Anschluss daran wurde jeweils 1 μ L der zuvor isolierten mRNA auf die Messzelle des Gerätes pipettiert. Nach dem Herunterlassen des oberen Sensors auf die Probe wurde die Messung durchgeführt.

Qualitätskontrolle der isolierten mRNA mittels Agarosegel

Im Anschluss an die RNA-Isolation wurden die Quantität sowie Qualität dieser mithilfe eines 1,2%igen RNA-Agarosegels kontrolliert. Hierzu wurden zunächst 1,5 g Agarose und 92,5 ml MOPS in einer Mikrowelle wiederholt erhitzt und auf diese Weise gelöst. Nach dem Herunterkühlen auf 60°C wurden 7,5 ml Formaldehyd (37%) sowie 0,5 μ L Ethidiumbromid hinzugefügt und die Lösung wurde leicht geschwenkt. Anschließend wurde das Gel in eine Gelkammer gegossen, in der es 30 Minuten polymerisierte und vollständig abkühlte. Das Einschieben eines Kammes in das Gel ermöglichte hierbei die Entstehung von Taschen, die im weiteren Verlauf mit den Proben befüllt wurden. In der Zwischenzeit wurden zu je 1 μ L RNA 4 μ L *Loading Dye*-Lösung pipettiert, welche sowohl Ethidiumbromid als auch Formaldehyd enthielt. Das Gemisch wurde bei 65°C für zehn Minuten erwärmt. Darauffolgend wurden die Proben kurz anzentrifugiert und in die Taschen des Agarosegels übertragen, welches zuvor in einer Gelelektrophorese-Kammer platziert worden war. Die Elektrophorese wurde bei 65 V und 150 mA für 35

Minuten betrieben. Aufgrund der Interkalation von Ethidiumbromid in die isolierte RNA und der Fluoreszenz unter UV-Licht konnte die Auftrennung der RNA in 18S- und 28S-Untereinheiten beobachtet und dokumentiert werden. Diese Methode ermöglichte die Identifizierung eventuell bestehender Verunreinigungen.

Reverse Transkription der mRNA in cDNA

Das in der Polymerase-Kettenreaktion verwendete Enzym DNA-Polymerase benötigt DNA anstelle von RNA als Substrat (Rassow et al., 2022). Aus diesem Grund erfolgte die sogenannte reverse Transkription der isolierten mRNA, bei der diese in komplementäre cDNA umgeschrieben wird (Rassow et al., 2022). Für diesen Schritt wurde das Enzym reverse Transkriptase eingesetzt, welches aus dem *Moloney murine leukemia virus* gewonnen wurde und als RNA-abhängige DNA-Polymerase agiert. Nach dem Auftauen der mRNA und der *iScript reverse transcriptase* auf Eis, sowie des *5x reaction mix* bei Raumtemperatur, erfolgte die Herstellung des Mastermixes. In diesem waren die Nukleotide, die reverse Transkriptase, RNase-Inhibitoren, Puffer sowie Oligo-(dt-) Primer und *random-Hexamerprimer* enthalten. Die Primer sind komplementär zum Poly-A-Schwanz des 3'-Endes der mRNA und dienen während der Transkription als Startsequenz (Rassow et al., 2022). Sie ermöglichen die Bindung der reversen Transkriptase an den mRNA-Strang, welche daraufhin die Sequenz in cDNA umschreibt (Rassow et al., 2022). Neben dem Mastermix umfasste der Einsatz der mRNA eine Konzentration von 1 μg . Die hierfür benötigte Menge an mRNA wurde anhand der zuvor mittels NanoDrop bestimmten Konzentrationen errechnet. Diese wurde mit Nuklease-freiem Wasser in einem Gesamtvolumen von 15 μl gelöst. Die Tubes wurden kurz an zentrifugiert und im Biometra Thermocycler T300 platziert. Das Programm wurde gemäß dem Reaktionsprotokoll des Herstellers gestartet:

5 Minuten bei 25°C

30 Minuten bei 42°C

5 Minuten bei 85°C

Abkühlung auf 4°C

Die verschiedenen Temperaturbedingungen ergeben sich aus unterschiedlichen optimalen Milieus für die jeweiligen Reaktionsteilschritte. So hybridisieren die Primer und der mRNA-Strang bei 25°C, während bei 42°C die idealen Temperaturbedingungen für die Aktivität der reversen Transkriptase vorliegen. Nach der Synthese der cDNA erfolgte ein erneuter Temperaturanstieg auf 85°C, der zur Denaturierung der

Wasserstoffbrückenbindungen und somit zur Auftrennung der komplementären cDNA-Stränge führte. Nach Abschluss der reversen Transkription wurde die cDNA bis zum erstmaligen Gebrauch in der PCR bei -80°C eingefroren und danach bei -20°C zwischengelagert.

Prinzip der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ist eine validierte Methode zur Analyse der Genexpression in einem Gewebe (Rassow et al., 2022). Bei diesem Verfahren wird der cDNA-Doppelstrang zunächst thermisch in seine beiden Einzelstränge geteilt. Diese Denaturierung läuft bei einer Temperatur von 95°C und führt zur Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen (Rassow et al., 2022). Daraufhin wird der Versuchsansatz auf eine Temperatur von $55\text{-}65^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Dies ermöglicht das spezifische Binden der Primer über ihre komplementäre Basenabfolge jeweils an das 3'-Ende des zu untersuchenden Gens (Rassow et al., 2022). Dieser Schritt der Anlagerung der Primer wird als Annealing bezeichnet (Rassow et al., 2022). Die optimale Temperatur für diesen Teilschritt variiert je nach Nukleinsäurelänge und -sequenz der Primer. Wie auch bei der reversen Transkription fungiert der Primer als Startsequenz und liefert die Bindungsstelle für das Enzym (Rassow et al., 2022). Im Falle der qRT-PCR handelt es sich hierbei um eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, die Taq-Polymerase. Ihre maximale Wirkung entfaltet sie bei einer Umgebungstemperatur von 72°C , weshalb vor diesem Schritt der Elongation eine Temperaturerhöhung erforderlich ist. Unter diesen optimalen Bedingungen erfolgt die Synthese des komplementären DNA-Stranges mittels freier Desoxyribonukleotide. Anschließend wird die Temperatur erneut auf 95°C gesteigert, wodurch die neu entstandenen cDNA-Doppelstränge wieder gespalten werden. Durch den Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird zu Beginn eine exponentielle Amplifikation des gesuchten Genabschnittes erreicht. Auf diese Phase folgt eine lineare Amplifikation, die anschließend in einem Sättigungsniveau mündet. Im Rahmen der Elongation interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-GREEN an die DNA-Doppelstränge und erlaubt somit die Quantifizierung der amplifizierten Menge des Zielgens. Diese ist proportional zur Menge der emittierten Fluoreszenz. Anhand des *cycle threshold*- (C_T) Wertes, bei welchem die Fluoreszenz erstmals einen Schwellenwert überschritten hat, können anschließend Aussagen über das Expressionsniveau eines Gens getroffen werden.

Durchführung der qRT-PCR

Zunächst wurden die cDNA sowie der Platinum SYBR GREEN qPCR SuperMix-UDG auf Eis und die Primer bei Raumtemperatur vollständig aufgetaut. Anschließend wurde der Mastermix für den jeweiligen Primer hergestellt. Der Mastermix umfasste destilliertes Wasser, den Platinum SYBR GREEN qPCR SuperMix-UDG sowie die Primer. Letztere wurden zuvor 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und die *reverse* und *forward* Primer in einem Verhältnis von 1:1 zum Mastermix pipettiert. Einige der Primer beinhalteten sowohl den *reverse* als auch den *forward* Primer in einem Gefäß und wurden unverdünnt in einem anderen Verhältnis zum Mastermix gegeben.

Die qRT-PCR wurde aufgrund der großen Probenanzahl in Einzelbestimmungen durchgeführt. In 50 μL Tubes wurden zunächst 11,5 μL Mastermix pipettiert und anschließend 1 μL der cDNA hinzugefügt. Für jeden verwendeten Primer wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, der keine cDNA zugesetzt wurde. Anschließend wurden die Tubes kurz anzentrifugiert, um Messfehler während der qRT-PCR durch Luftblasen zu vermeiden. In einem weiteren Schritt konnte ein Primer-spezifisches Temperaturprofil erstellt und die Tubes im StepOnePlus RT-PCR-Gerät platziert werden. Nach dem Durchlauf der qRT-PCR wurden die C_T -Werte der Proben angezeigt. Dieser steht für die Anzahl an durchlaufenen Zyklen, bis es erstmalig zur Überschreitung des Hintergrundwertes durch die emittierte Fluoreszenz kam. Ein niedriger C_T -Wert deutet daher auf eine starke Expression und Transkription des gesuchten Gens in der DNA. Aufbereitet wurden die Ergebnisse mit Microsoft Excel nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode nach Livak und Schmittgen, welche die C_T -Werte der Proben sowohl mit dem Mittelwert des Housekeeping-Gens als auch mit einer mitgeführten Positivkontrolle ins Verhältnis setzt (Livak & Schmittgen, 2001). Das Housekeeping Gen bezeichnet dabei ein Gen, dessen Expression unabhängig von den Versuchsbedingungen ist, wie beispielsweise β -Actin (Livak & Schmittgen, 2001). Eine Schmelzkurve gab Aufschluss über mögliche Verunreinigungen sowie den Schmelzvorgang der Reaktionsprodukte (Livak & Schmittgen, 2001).

9.1.2 Proteinbestimmung mittels Western Blot

Herstellung der Lysate aus Gewebeproben

Von jeder Maus wurden 25-30 mg gemörseretes Leberpulver in 2 mL Mikro-Schraubröhren eingewogen, welche in liquidem Stickstoff vorgekühlt waren. Anschließend wurden diese auf Trockeneis zwischengelagert. Die Herstellung des

Lämmli-Puffers erforderte das frische Einwiegen von 15,43 mg 100 mM DTT pro 1 mL 4x Lämmli-Puffer sowie die 1+3-Verdünnung des Lämmli-Puffers mit destilliertem Wasser. Mit dem Ziel der Denaturierung sowie der Einfärbung der Proben wurde die 20-fache Menge an 1x-Lämmli Puffer zu den Leberproben pipettiert. Diese wurden anschließend auf *Crushed Ice* gestellt. In jedes Reaktionsgefäß wurden zudem 0,65 g Bulk Beads gegeben. Mithilfe des Precellys Homogenisators wurden die Proben 2 x 20 Sekunden bei 5.500 G homogenisiert, wobei zwischen den beiden Durchgängen eine Pause von 30 Sekunden lag. Im Anschluss wurden die Proben erneut auf *Crushed Ice* gestellt. Es folgte das Erhitzen der Proben für 20 Minuten bei 95°C im Heizblock. Dies führte zur Denaturierung der Proteine und zur Aufnahme dieser in den Lämmli-Puffer. Nach dem abschließenden Zentrifugieren für fünf Minuten bei 14.000 G erfolgte das Aliquotieren von 100 µL Portionen und die Lagerung bei -80°C.

Vorbereitung der Polyacrylamid-Gele und SDS-Gelelektrophorese

Zwei Glasplatten wurden gründlich mit 70%igem Ethanol gereinigt und anschließend in einer Gießvorrichtung fixiert. Den größten Teil des Polyacrylamid-Gels bildet das Trenngel, in welchem sich die Proteine während der Elektrophorese auftrennen. Das Trenngel wurde zuerst bis 2 cm von der oberen Kante zwischen die beiden Glasplatten gegossen. Das Pipettieren von Isopropanol auf das Trenngel sorgte für eine glatte und luftblasenfreien Oberfläche des Trenngels während des 20-minütigen Polymerisationsvorganges. Anschließend wurde das Isopropanol wieder abgegossen und Reste mit einem Filterpapier entfernt. In einem weiteren Schritt wurde das Sammelgel bis zur oberen Kante zwischen die beiden Glasplatten pipettiert und ein Kamm eingeschoben, dessen Zinken die Aussparung der Taschen für die Proteinlysate ermöglichten. Es folgte die 20-minütige Polymerisation des Sammelgels.

Die Glasplatten mit den Gelen wurden anschließend aus der Gießvorrichtung entfernt, mit zwei Klammern an einer Gelelektrophorese-Kammer befestigt und in einen Puffertank eingesetzt. Sowohl in den Puffertank als auch zwischen die beiden Gele in der Kammer wurde Laufpuffer gegeben, sodass dieser die Auftragetaschen des Gels abdeckte. Anschließend wurde der Kamm entfernt und in die erste Tasche 5 µL *Page Ruler* pipettiert. Das Mitführen des *Page Rulers* im Gel dient der farblichen Markierung der Laufweiten unterschiedlicher Molekulargewichte. Die Proteinlysate wurden vor dem Auftragen für zehn Minuten bei 95°C im Heizblock aufgeköcht, für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert und anschließend in einem Volumen von 10 µL in die Taschen des Sammelgels pipettiert. In den ersten zehn Minuten wurde die Gelelektrophorese-

Kammer bei 100 V und 120 mA betrieben. In dieser Zeit erfolgte eine Fokussierung der Proteine in einer Ebene im Sammelgel. Dies wurde durch unterschiedliche Anteile des Polyacrylamids in Sammel- und Trenngel ermöglicht. Anschließend wurde die Spannung auf 130 V erhöht und die Gelelektrophorese für weitere 70 Minuten fortgesetzt. Das im Trenngel enthaltene Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) bindet gleichmäßig an die aufgetragenen Proteine und verleiht ihnen eine negative Ladung, welche proportional zur Proteinmasse ist (Lee, 2007). Während der Elektrophorese wandern die negativ geladenen Proteine durch die Gelmatrix in Richtung Anode, wobei kleine Moleküle die Poren schneller und räumlich weiter durchwandern (Lee, 2007).

Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran

Die separierten Proteine wurden vom Polyacrylamid-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membran durch ein Semi-Dry-Blot-Verfahren transferiert. Die Aktivierung der Membran erfolgte vorab in Methanol für etwa zehn Sekunden. Die Membran wurde im Anschluss mit destilliertem Wasser gewaschen und in eine Schale mit Blotpuffer gegeben. Mithilfe eines Plastik-Keils wurden die Glasplatten geöffnet und das Polyacrylamid-Gel abgelöst. Das Sammelgel wurde mit einem Papiertuch abgetragen, sodass das Trenngel danach ebenfalls in eine Schale mit Blotpuffer überführt wurde. Die Whatman-Papiere wurden in Blotpuffer getränkt und der Blot in folgender Reihenfolge luftblasenfrei auf der Blotting-Kassette zusammengesetzt:

Drei Whatman-Papiere

PVDF-Membran

Polyacrylamid-Gel

Drei Whatman-Papiere

Die Kassette wurde geschlossen und für 35 Minuten bei 120 mA betrieben. Auf diese Weise wurde ein elektrisches Feld erzeugt, welches senkrecht zur Membran ausgerichtet war. Dies führte dazu, dass sich die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode und Membran bewegten.

Immunhistochemischer Nachweis spezifischer Proteine

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte eine einstündige Inkubation der Membran in 5% Milchlösung. Dieser Schritt diente dem Blockieren freier Bindungsstellen auf der Membran und ermöglichte den spezifischen Nachweis der

Proteine. Danach wurde die Membran 1 x 10 Minuten und 2 x 5 Minuten mit *Tris-buffered saline with Tween 20* (TBS-T) gewaschen. Ausgewählte Primärantikörper (Kapitel 9.2.5) wurden gemäß der Herstellerangaben in 5% Bovinem Serum Albumin (BSA) verdünnt und in einem Gesamtvolumen von 5 mL auf die Membran gegeben. Über Nacht erfolgte die Inkubation bei 4°C auf dem Schwänkgerät. Am folgenden Tag wurde die Membran erneut 1 x 10 Minuten und 2 x 5 Minuten mit TBS-T gewaschen, um unspezifisch gebundene Primärantikörper zu entfernen. Der Sekundärantikörper bindet spezifisch an das Fc-Fragment der Spezies des Primärantikörpers. Außerdem ist er an ein Enzym gekoppelt, das im weiteren Verlauf die Färbereaktion katalysiert. Die Sekundärantikörper wurden in 5% Milchlösung verdünnt und ebenfalls in einem Gesamtvolumen von 5 mL auf die Membran pipettiert. Es folgte die Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde. Anschließend wurde die Membran 1 x 10 Minuten und 2 x 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Die Entwicklung der Membran erfolgte in einer *Enhanced Chemiluminescent*-Lösung (ECL). In dieser wurde die Membran für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei kam es zur Anregung des Enzyms HRP. Die Aktivierung des Enzyms sowie die Reaktion mit dem in der Lösung enthaltenen Wasserstoffperoxid bewirkten eine Oxidation des Luminols und somit eine Emission von Licht. Diese Licht- und Farbreaktion wurde in den Banden beobachtet, in denen das zu untersuchende Protein lokalisiert war. Die Membran wurde zwischen eine durchsichtige Folie gelegt und zentral unter der Kamera in der Entwicklungskammer platziert. In dieser erfolgte die Fotografie der Membran.

Mit dem Ziel der Wiederverwertung der Membran wurde diese für 30 Minuten im *Stripping Buffer* inkubiert, wodurch die gebundenen Antikörper entfernt wurden. Nachfolgend wurde die Membran 1 x 10 Minuten und 2 x 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und eine Stunde in 5% Milchlösung blockiert. Nach einem erneuten Waschschrift konnte ein neuer Primärantikörper auf die Membran gegeben werden.

9.1.3 Histopathologisches Scoring

Die histologischen Präparate der Leber wurden mittels Hämatoxylin-Eosin oder Sirius-Rot gefärbt (Helmrich et al., 2022). Das histopathologische Scoring wurde von Herrn AOR Dr. Köhler vom Institut für Veterinär-Pathologie, Frankfurter Straße 96 in 35392 Gießen, durchgeführt.

Mithilfe der Hämatoxylin-Eosin-Färbung kann grundlegenden histologischen Fragestellungen nachgegangen werden. Hierbei führt der Bestandteil des Hämatoxylins zu einer Blaufärbung basophiler Strukturen wie der DNA in Gewebeschnitten (Suvarna

et al., 2018). Eosin dagegen färbt azidophile Strukturen wie Bestandteile des Zytoplasmas rot (Suvarna et al., 2018). In einem ersten Schritt wurden die Gewebeschnitte über Nacht bei einer Temperatur von 37°C gelagert und anschließend mit Xylol entparaffinisiert. Die Rehydrierung erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe. Darauffolgend wurde eine Hämalun-Lösung auf die Objektträger pipettiert und diese dort für fünf Minuten belassen. Es folgte ein Waschschrift mit Leitungswasser für fünf Minuten und die Färbung mit Eosin für eine Minute. Nach einem erneuten Waschschrift in Leitungswasser wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe erneut dehydriert und mit Pertex® und einem Deckgläschen eingedeckt.

Die Sirius-Rot-Färbung ermöglicht das spezifische Anfärben von Kollagenfasern vom Typ 1 im Gewebe und somit die Beurteilung des Kollagengehaltes (Junqueira et al., 1979; Suvarna et al., 2018). Hierzu wurden die Gewebeschnitte über Nacht bei 37°C aufgewärmt. Am nächsten Tag erfolgte die Entparaffinisierung sowie die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe. Darauffolgend wurden die Schnitte zunächst für 90 Minuten in der Sirius-Rot-Lösung und im Anschluss 2 x 5 Minuten in 0,5%iger Essigsäurelösung inkubiert. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte dehydriert. Nach dem Eindecken mit Pertex® sowie dem Trocknen der Schnitte waren die Kollagenfasern im polarisierten Licht als rot- oder gelbfarbene doppelbrechende Fäden zu erkennen.

Histopathologischer Grad der Dysplasie

Beim Scoring des histopathologischen Grades der Dysplasie wurde die Häufigkeit dysplastischer Zellen mit Zytomegalie, Anisokaryose, Karyomegalie und somit mutmaßlicher Polyploidie in den Geweben der Mäuse bewertet (Percy et al., 2016). Wurden diese Befunde in einem Leberschnitt häufiger als physiologisch gesichtet, wurde dem Tier ein Scoring-Wert von 1 zugeteilt. Bei einer stark vermehrten Anzahl dysplastischer Zelltypen erhielt das Tier einen Scoring-Wert von 2.

Histologische Beispielbilder dysplastischer und apoptotischer Zellen

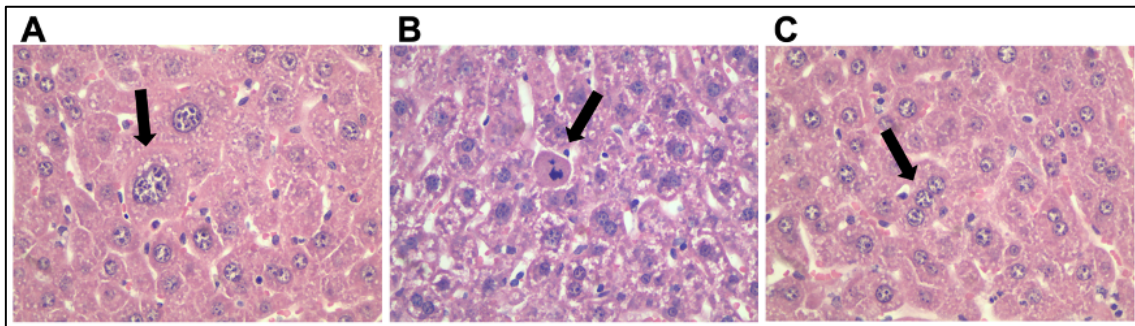


Abbildung 35: Histologische Beispielbilder dysplastischer und apoptotischer Zellen. Darstellung von Zellen mit Anisokaryose (A), Apoptose (B) und Dreikernigkeit (C).

Lobuläre und portale Inflammation

Die Beurteilung der Inflammation erfolgte in Anlehnung an Goodman und Kleiner (Goodman, 2007; Kleiner, 2018). Angepasst an das Mausmodell erfolgte hierbei die Vergabe der Scoring-Werte 0 bis 3, je nachdem ob eine Inflammation im entsprechenden Bereich als nicht bemerkt (0), geringgradig/vereinzelt (1), mittelgradig/moderat (2) oder hochgradig/massiv (3) beurteilt werden konnte. Die Abbildungen 36 und 37 zeigen exemplarisch die Zuordnung der Werte zu histopathologischen Befunden.

Histologische Beispielbilder für die Scoring-Werte 0-3 der portalen Inflammation

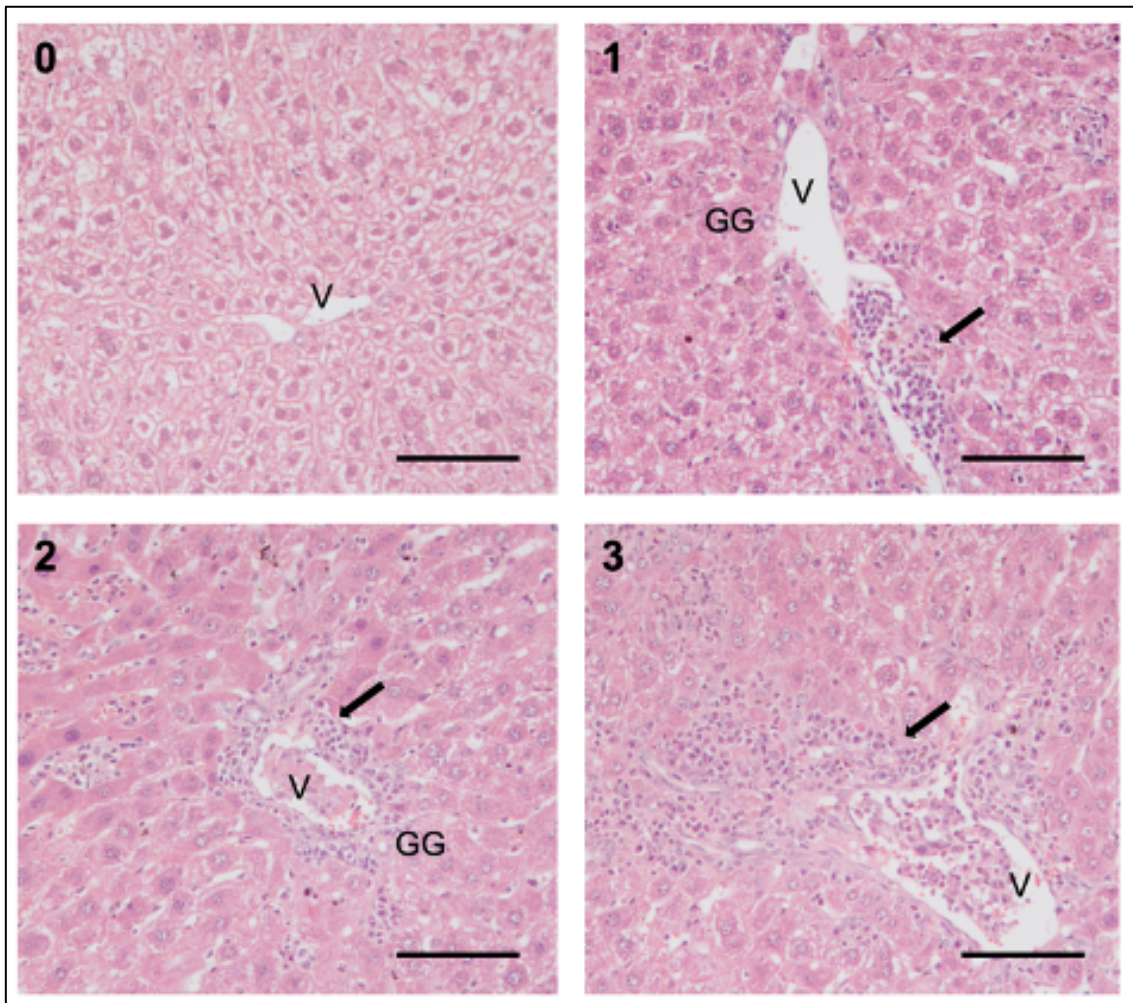


Abbildung 36: Histologische Beispielbilder für die Scoring-Werte 0-3 der portalen Inflammation. Gezeigt ist eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung. 200x Vergrößerung, der Balken entspricht 100 µm. V = Portalvene, GG = Gallengang, Pfeil = Entzündungszellen.

Histologische Beispielbilder für die Scoring-Werte 0-3 der lobulären Inflammation

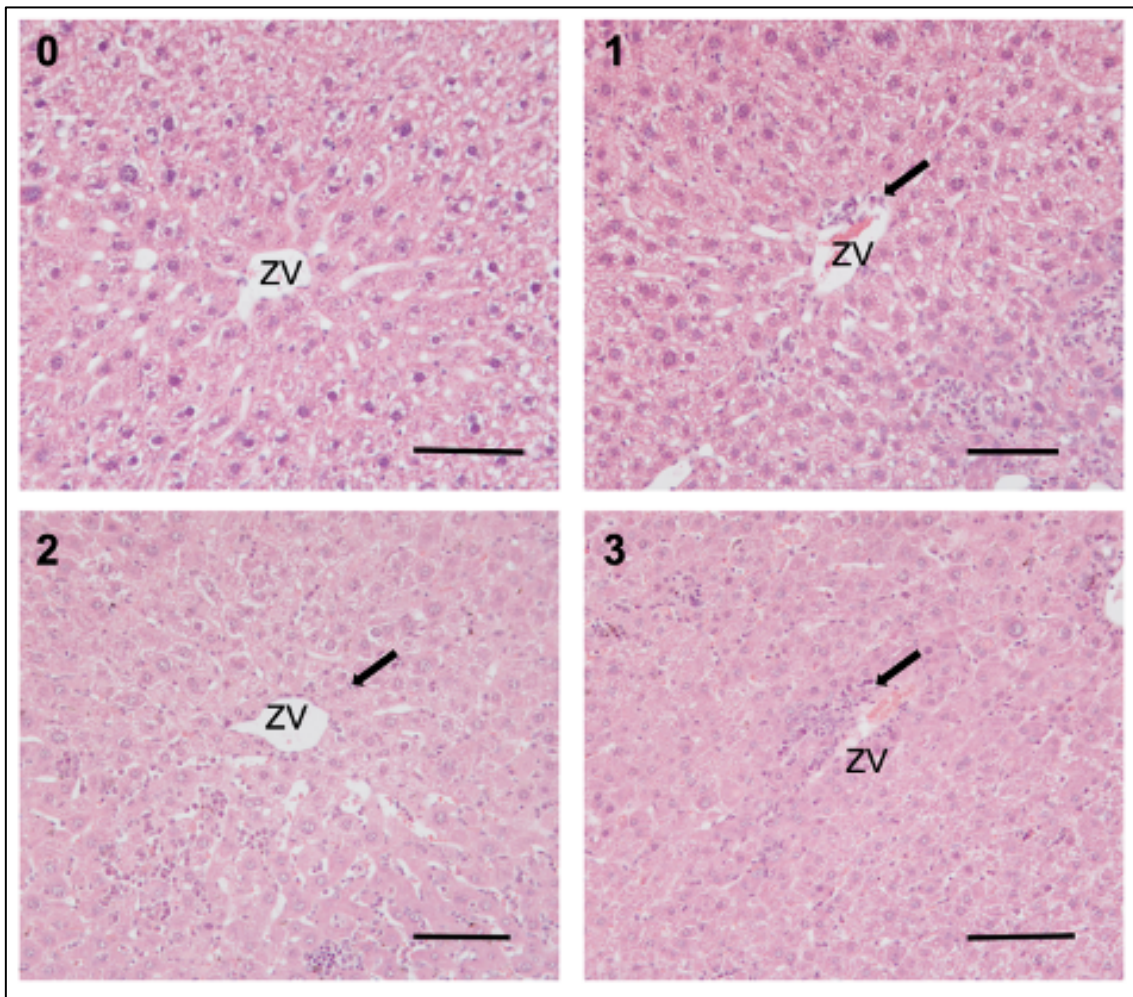


Abbildung 37: Histologische Beispielbilder für die Scoring-Werte 0-3 der lobulären Inflammation. Gezeigt ist eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung. 200x Vergrößerung, der Balken entspricht 100 µm. ZV = Zentralvene, Pfeil = Entzündungszellen.

Histopathologischer Grad der Fibrose

Das histopathologische Scoring des Grades der Fibrose erfolgte nach Ishak et al. (Ishak et al., 1995). Angepasst an das Mausmodell erfolgte hierbei die Vergabe der Scoring-Werte 0 bis 3, je nachdem ob die Fibrose als nicht bemerkt (0), geringgradig/vereinzelt (1), mittelgradig/moderat (2) oder hochgradig/massiv (3) bewertet werden konnte. Die Abbildung 38 zeigt exemplarisch die Zuordnung der Werte zu histopathologischen Befunden.

Histologische Beispielbilder für die Scoring-Werte 0-3 der Fibrose

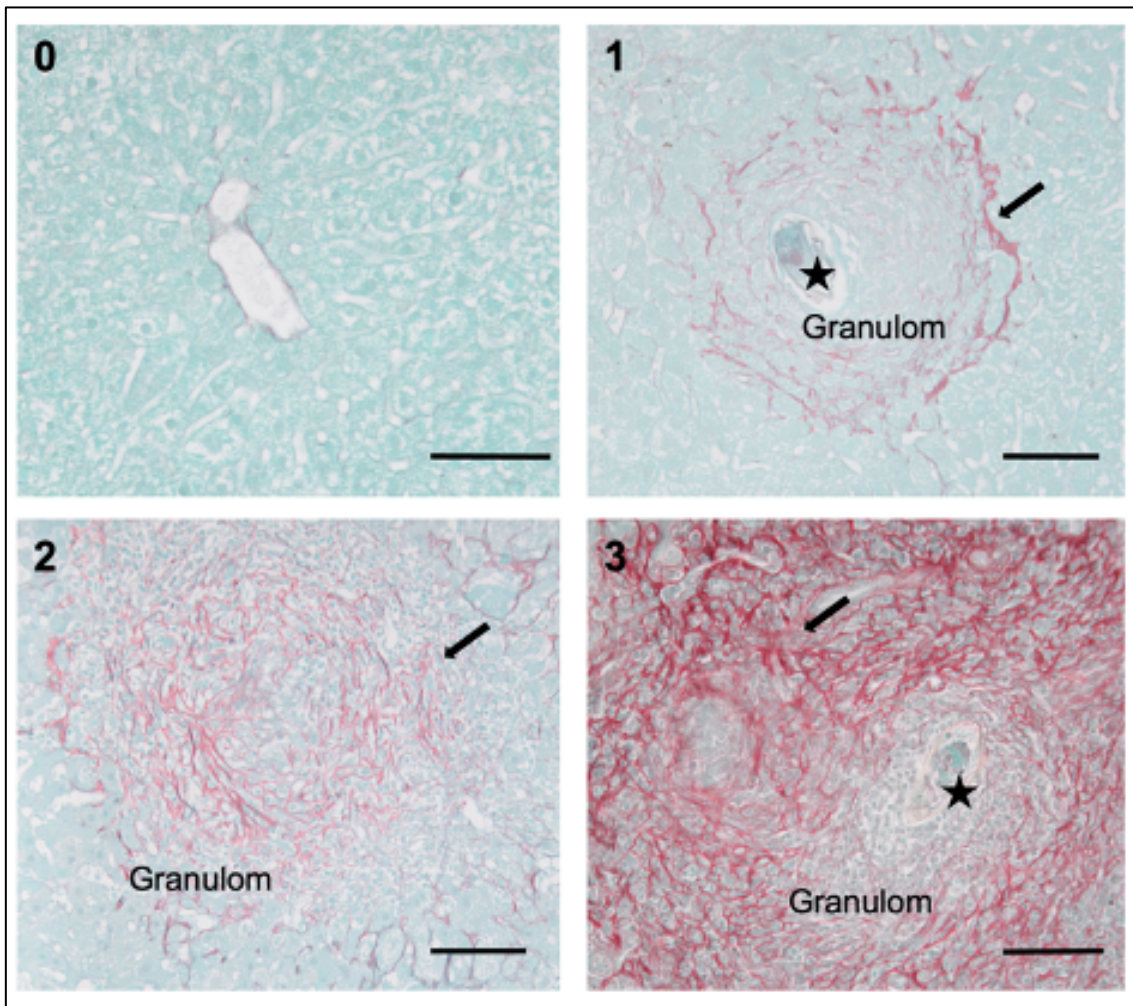


Abbildung 38: Histologische Beispielbilder für die Scoring-Werte 0-3 der Fibrose. Gezeigt ist eine Sirius-Rot-Färbung. 200x Vergrößerung, der Balken entspricht 100 µm. Pfeil = Kollagen-1, Stern = *S. mansoni*-Ei.

9.2 Materialien

9.2.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Biometra-FastblotTM #2207315	Biometra-GmbH, Göttingen
ChemoStar ECL & Fluorescence Imager	Intas Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Electrophoresis Power Supply Consort EV #243	Fisher Bioblock Scientific, Villeneuve-D'Ascq (Frankreich)

Anhang

Feinwaage	Sartorius GmbH, Göttingen
Gefrierschrank (-20°C) #GNP3376	Liebherr-Werk Biberbach, Biberbach
Gefrierschrank (-80°C) #907	Thermo Scientific, Massachusetts (USA)
Inifinte ® 200 PRO #30050303	Tecan Group Ltd., Männedorf (Schweiz)
Kamera, USB Cam 051H Reprostar 3	Phytec, Mainz
Kühlschrank Medi Line	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlschrank Profi Line	Liebherr, Ochsenhausen
Lichtmikroskop #156385	Leica Microsystems, Wetzlar
Magnetrührer #RCTB 00.084009	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikro Zentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Mikrowelle	Leica Microsystems, Wetzlar
Mini-PROTECAN ® Tetra Handcast Systems	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien (USA)
Motorisiertes inverses System Mikroskop #IX81S1F-3	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Multipipette M4	Eppendorf AG, Hamburg
Nano Drop, Spectralphotometer ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts (USA)
Pipetten Abimed	International Labmate Ltd., St. Albans (England)
Pipetten Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetus®-akku	Hischmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Precellys 24 Tissue Homogenizer	Bertin Technologies, Montigny (Frankreich)
Rocking Platform	VWR International GmbH, Darmstadt
Rüttler #444-0142	VWR International GmbH, Darmstadt
Slamed 8-Kanal Pipette 20-200 µL #451833437	Ratiolab GmbH, Dreieich

Anhang

StepOnePlus RT PCR System #4376592	Applied Biosystems, Massachusetts (USA)
Stickstofftank #CFB-160	Taylor-Wharton Harsco GmbH, Husum-Mildstedt
Thermocycler T3000 #2207315	Biometra-GmbH, Göttingen
Thermoschüttler #21T1100570	Cell Media, Zeitz
Trans-Blot Turbo System #690BR028141	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Trockenschrank T12	Heraeus Group, Hanau
Ultra TURRAX T3	IKA-Labortechnik, Staufen
Vortex-Mixer 7-2020	NeoLab, Heidelberg
Vortex-Schüttler VF2	IKA-Labortechnik, Staufen
Waage Kern #440-47	KERN & SOHN GmbH, Albstadt
Zentrifuge Micro Star 17R #41758482	VVR International, Pennsylvania (USA)
Zentrifuge Mikro 120	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

9.2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Bulk Beads #P000927-LYSKO-A	Bertin Technologies, Montigny (Frankreich)
Deckgläschen	Langenbrinck, Emmendingen
Duran Culture Tubes #261351155	Duran Group, Mainz
Filterpapier	IKA-Werke, Staufen
Imobilon®-P Transfer Membrane #IPV00010	Merck Millipore Limited, Tullagreen (Irland)
Mikro-Schraubröhren 2 mL #72.694.005	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg

Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 well solid plates #M9410-1CS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pipettenspitzen 1.000 µL blau #70.3050.020	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg
Pipettenspitzen 10 µL weiß #70.3010	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg
Pipettenspitzen 200 µL gelb #70.3030.020	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg
Reagenzgefäß 0,5 mL #72.699	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg
Reagenzgefäß 1,5 mL #72.690.001	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg
SafeSeal Reagenzgefäß 2mL #72.695.500	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg
Trockeneis	UKGM Apotheke, Gießen
Tube 15 mL #62.554.502	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg
Tube 50 mL #62.547.254	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg
Whatman Gel Blot Papier #104268921	GE Healthcare Life Sciences, Illinois (USA)

9.2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

1,4-Dithiothreit (DTT) #6908.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
2 N Schwefelsäure #DY994	R&D Systems, Inc., Minnesota (USA)
Agarose Broad Range #T846.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat #9592.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Beta-Mercaptoethanol #60242	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bovines Serum Albumin #BSA-1T	Capricon Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Bromphenolblau #15375	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Anhang

Chloramin T-Trihydrat #1.024260250	Merck Group, Darmstadt
Dimethylsulfoxid ROTIPURAN® #4720.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dodecylsulfate-Na-salt in pellets	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DPBS #P04-36500	PAN Biotech, Aidenbach
Ehrlich Reagenz #803057	Merck Group, Darmstadt
Erepedia™ Shandon™ Eosin-Y Stain #6766007	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts (USA)
Essigsäure (Eisessig) 100% #1.00063.1011	Merck Group, Darmstadt
Ethanol 96%	Otto Fischar GmbH & Co. KG
Ethanol absolut	Otto Fischar GmbH & Co. KG
Glycin PUFFERAN® #3908.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hämalaunlösung sauer nach Mayer #T865.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hydrogen peroxide 30%	Merck Group, Darmstadt
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
ImmPRESS™ AP Reagent Kit Anti-Goat IgG #MP-5405	Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim
ImmPRESS™ AP Reagent Kit Anti-Rabbit IgG #MP-5401	Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim
Isopropanol #33539-2.5L-M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumhydroxid Plätzchen #105033	Merck Group, Darmstadt
Luminol #A8511-5G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol #32213-2.5L-M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Milchpulver (Blotting grade) #T145.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Anhang

MOPS, minimum 99,5% titration #M1254-1KG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) #35925.01	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
NaOH #1.06498.1000	Merck Group, Darmstadt
Natriumacetat-Trihydrat #1062655000	Merck Group, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl) #3957.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid #6671.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
p-Cumarsäure #110M1259V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder #26619	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts (USA)
Perchlorsäure #30775	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Permanent AP-Red Kit #ZUC001-125	Zytomed Systems GmbH, Berlin
Pertex® Eindeckmedium	Medite, Burgdorf
Platinum SYBR Green qRT-PCR Super Mix	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Polyoxyethylenesorbitan #P-7949	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RNase AWAY #7002	Thermo Scientific, Dreieich
RNase-freies Wasser	Qiagen, Venlo (Niederlande)
RNeasy Minisäulen	Qiagen, Venlo (Niederlande)
Rotiphorese® Gel 30 #3029.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
RPE Buffer	Qiagen, Venlo (Niederlande)
RTL Buffer	Qiagen, Venlo (Niederlande)
RW1 Buffer	Qiagen, Venlo (Niederlande)
Salzsäure HCl, #84422-12	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Anhang

SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sirius-Rot-Farbstoff #35780	Polysciences, Europe GmbH, Eppelheim
Stickstoff	Abcam, Cambridge (England)
Tetramethylbenzidine #DY999	R&D Systems, Inc., Minnesota (USA)
Trans-4-Hydroxy-L-Prolin # 147-85-3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris base #77-86-1	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
TRIS PUFFERAN® #4855.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30% #1.072.101.000	Merck Group, Darmstadt
Xylene (mixture of isomers) #28975.325	VWR International GmbH, Darmstadt
Zitronensäure #X863.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Zitronensäure-Monohydrat #1002440500	Merck Group, Darmstadt

9.2.4 Puffer und Lösungen

Blotpuffer

Tris-gepuffert	5,82 g
Glycin	2,93 g
Destilliertes H ₂ O	800 mL
Methanol	200 mL

BSA 5%, 10%

BSA-Pulver	2,5 g, 5 g
TBS-T	50 mL

Citratpuffer

Zitronensäure 2,65 g

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 25,7 g

Auf 1.000 mL mit destilliertem H₂O auffüllen

100 mL des Citratpuffers in 900 mL destilliertem H₂O lösen

HRP-Entwicklerlösung (ECL)

Destilliertes H₂O 9.500 µL

2 M Tris Puffer (pH 8,5) 500 µL

Luminol 50 µL

Courmaric acid 25 µL

H₂O₂ 2,6 µL

Hydroxyprolin 0,6% Chloramin-T-Lösung

Chloramin-T 300 mg

Hydroxyprolin Puffer B 50 mL

Hydroxyprolin Ehrlich Reagenz-Lösung

Ehrlich Reagenz 3 g

Isopropanol 26 mL

Perchlorsäure 50% 8 mL

Hydroxyprolin Puffer A

NaOH 3,4 g

Zitronensäure-Monohydrat 3,4 g

Natriumacetat-Trihydrat 12 g

Auf 100 mL mit destilliertem H₂O auffüllen

Hydroxyprolin Puffer B

Isopropanol	60 mL
Destilliertes H ₂ O	33 mL
Hydroxyprolin Puffer A	39 mL

Lämpli-Puffer

Glycerin 40%	20 mL
0,25 M Tris HCl (pH 6,8)	6,25 mL
SDS	4 g
DTT	3,08 g
Bromphenolblau	10 mg
Destilliertes H ₂ O	10 mL

Laufpuffer

SDS	10 g
Tris	30 g
Glycin	114 g
Destilliertes H ₂ O	1.000 mL

100 mL des Laufpuffers in 900 mL destilliertem H₂O lösen

Milchlösung 5%

Milchpulver	2,5 g
TBS-T	50 mL

PBS

NaCl	80 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2,45 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g

Auf 1.000 mL mit destilliertem H₂O auffüllen

100 mL des PBS in 900 mL destilliertem H₂O lösen, auf einen pH 7,4 einstellen

Sammelgel 3%, für zwei Gele

Polyacrylamid Gel 30	330 µL
Tris Puffer (pH 6,8)	830 µL
Destilliertes H ₂ O	2.130 µL
Ammoniumperoxodisulfat	40 µL
TEMED	4 µL

Sammelgelpuffer (pH 6,8)

2 M Tris (pH 6,8)	125 mL
SDS 20%	10 mL
Destilliertes H ₂ O	365 mL

TBA-Lösung

TBA Flasche (MDA Kit)	1
Essigsäure	7,5 mL

Auf 25 mL mit destilliertem H₂O auffüllen

TBS-T

20 mM Tris (pH 7,5)	25 mL
NaCl	20 g
Destilliertes H ₂ O	2475 mL
Tween20	2,5 mL

Trenngel 10%, für zwei Gele

Polyacrylamid Gel 30	3.332 µL
SDS 10%	100 µL
2 M Tris Puffer (pH 8,8)	1.950 µL
Destilliertes H ₂ O	4.550 µL
Ammoniumperoxodisulfat	100 µL
TEMED	10 µL

Trenngelpuffer (pH 8,8)

2 M Tris/HCl	375 mL
SDS	10 mL
Destilliertes H ₂ O	115 mL

9.2.5 Antikörper

Tabelle 4: Antikörper

Primärantikörper	
c-Jun (1: 1.000 in BSA 5%) Molekulargewicht: 43-48 kDa	Rabbit monoclonal Antibody, #9165 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
CD45 (1: 1.000 in BSA 5%) Molekulargewicht: 180-250 kDa	Rabbit monoclonal Antibody, #72787 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)

Anhang

Collagen-1 (IHC 1:200 in BSA 10%)	Rabbit polyclonal Antibody, #AB765P Sigma-Aldrich Inc., Missouri (USA)
Desmin (1: 4.000 in BSA 5%) Molekulargewicht: 53-55 kDa	Rabbit polyclonal Antibody, #PA5-16705 Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts (USA)
GAPDH (1: 5.000 in BSA 5%) Molekulargewicht: 36 kDa	Mouse monoclonal Antibody, #60004-1- Ig Proteintech Group Inc., Rosemont (USA)
MCM2 (1: 500 in BSA 5%; IHC 1:100 in BSA 10%) Molekulargewicht: 125 kDa	Rabbit polyclonal Antibody, #4007 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
MPO (1: 2.000 in BSA 5%, IHC 1:500 in BSA 10%) Molekulargewicht: 11 kDa, 60 kDa	Goat polyclonal Antibody, #AF3667 R&D Systems, Inc., Minnesota (USA)
P-c-Jun (1:1.000 in BSA 5%) Molekulargewicht: 48 kDa	Rabbit monoclonal Antibody, #3270 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
P-STAT3 (1: 2.000 in BSA 5%) Molekulargewicht: 79-86 kDa	Rabbit monoclonal Antibody, #9145 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
PCNA (1: 1.000 in BSA 5%, IHC 1: 4.000 in BSA 10%) Molekulargewicht: 36 kDa	Mouse monoclonal Antibody, #2586 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
STAT-3 (1:2.000 in BSA 5%) Molekulargewicht: 79-86 kDa	Rabbit monoclonal Antibody, #4904S Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)

Sekundärantikörper	
Horse Anti-Mouse IgG (1:5.000 in Milch 5%)	#7076S Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
Goat Anti-Rabbit IgG (1:5.000 in Milch 5%)	#7074 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
Donkey Anti-Goat IgG (1:3.000 in Milch 5%)	#sc-2020 Santa Cruz Biotechnology, Texas (USA)

9.2.6 Oligonukleotide

Tabelle 5: Oligonukleotide

Gen	Annealing-Temperatur in °C	Sequenzen Forward und Reverse	Hersteller
β -Actin	59	5'-ggc-tgt-att-ccc-ctc-cat-cg-3' 5'-cca-gtt-ggt-aac-aat-gcc-atg-t-3'	Invitrogen, Massachusetts (USA)
GPX3	58	5'-ttc gga cac ctc aga cgg a-3' 5'-ggt acc act cat acc gcc at-3'	Microsynth, Balgach (Schweiz)
IFN γ	57	-	Qiagen, Venlo (Niederlande)
IL-10	58	-	Qiagen, Venlo (Niederlande)
IL-13	58	-	Qiagen, Venlo (Niederlande)

Anhang

IL-1 β	56	5'-tga cag tga tga gaa tga cct g-3' 5'-cgg gaa aga cac agg tag ct-3'	Microsynth, Balgach (Schweiz)
IL-4	57	5'-ggg ctc aac ccc cag cta gt-3' 5'-gcc gat gat ctc tct caa gtg at-3'	Invitrogen, Massachusetts (USA)
IL-6	57	-	Qiagen, Venlo (Niederlande)
Kat	56	5'-AGC GAC CAG ATG AAG CAG TG-3' 5'-TCC GCT CTC TGT CAA AGT GTG-3'	Invitrogen, Massachusetts (USA)
Kol-1	57	-	Qiagen, Venlo (Niederlande)
Kol-3	56	-	Qiagen, Venlo (Niederlande)
MPO	59	-	Invitrogen, Massachusetts (USA)
SOD1	56	5'-agt tgt gct gag ctg tat gga-3' 5'-cgg ctg ctt gaa gta aaa cag g- 3'	Microsynth, Balgach (Schweiz)
TNF α	59	-	Qiagen, Venlo (Niederlande)

9.2.7 Kommerzielle Kits

Tabelle 6: Kommerzielle Kits

RNeasy® Mini Kit (250)	Firma: Qiagen N.V., Hilden Artikelnummer: 74106
RNase-Free DNase Set 1500 Kunitz units	Firma: Qiagen N.V., Hilden Artikelnummer: 1023460
iScript cDNA Synthese Kit	Firma: Bio-Rad, Hercules (USA) Artikelnummer: #170-8890
QIAshredder (250)	Firma: Qiagen N.V., Hilden Artikelnummer: 79656
Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit	Firma: Sigma Aldrich Artikelnummer: MAK085-1KT
Myeloperoxidase (MPO) Activity Fluorometric Assay Kit	Firma: Sigma Aldrich Artikelnummer: MAK069
Mouse Alpha-Fetoprotein DuoSet ELISA	R&D Systems, Inc., Minnesota (USA) Artikelnummer: #DY5369-05

10 Abkürzungsverzeichnis

8-OxoG	8-Oxo-7,8-Dihydroguanin
8-OHdG	8-Hydroxydesoxyguanosin
AFB1	Aflatoxin B1
AFP	Alpha-Fetoprotein
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP-1	Aktivator-Protein-1
Apaf-1	<i>Apoptotic Protease-activating Factor 1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V.
ATM	<i>Ataxia teleangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia teleangiectasia and Rad3-related</i>
BCLC	Staging-System der Barcelona Clinic
BSA	Bovines Serum Albumin
BW	Körpergewicht
c-Jun	C-Jun-N-terminale-Kinase
<i>C. sinensis</i>	<i>Clonorchis sinensis</i>
CAA	Anodische Proteoglykane
CCA	Kathodische Proteoglykane
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLR	C-Typ-Lektinrezeptoren
CRC	Kolorektales Karzinom
CRI	<i>Cancer-related inflammation</i>
CT	Computertomographie
C _T	<i>Cycle threshold</i>

Abkürzungsverzeichnis

CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4</i>
CYP450	Cytochrom P450 Enzyme
DC-SIGN	DC-spezifisches ICAM-3-grabbing non-integrin
DCs	Dendritische Zellen
DDR	<i>DNA Damage Response</i>
DEN	Diethylnitrosamin
DIC	3-Chlor-5-(4-pyridyl)-4,5-dihydroisoxazol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTG	Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit
DTT	1,4-Dithiothreit
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescent-Lösung</i>
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
EPO	Eosinophilen Peroxidase
ES	Exkretorische Fraktion
EZM	Extrazellulärmatrix
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
GG	Gallengang
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GPX	Glutathion-Peroxidase
GRAIL	<i>Gene related to anergy in lymphocytes</i>
GZR	Glycyrrhizin
H ⁺	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBV	Hepatitis B Virus

Abkürzungsverzeichnis

HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HcPCs	HCC-Vorläuferzellen
HCV	Hepatitis C Virus
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HNE	4-Hydroxy-Trans-2-Nonenal
hOgg1	8-Oxodeoxyguanosin-DNA-Glykosylase 1
HPNE	4-Hydroperoxy-2-Nonenal
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSC	Hepatische Sternzellen
Hyp	Hydroxyprolin
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICAM-1	<i>Intracellular adhesion molecule 1</i>
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinasen
IL	Interleukin
IL13R	Interleukin-13-Rezeptor
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IPSE	IL-4-induzierendes Prinzip
Kat	Katalase
KOH	Kaliumhydroxid
Kol-1	Kollagen-1
Kol-3	Kollagen-3
LPO	Lipidperoxidation
LW	Lebergewicht
M2-Makrophagen	Alternativ aktivierte Makrophagen
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Abkürzungsverzeichnis

MCM2	<i>Minichromosome Maintenance-Complex</i>
MDA	Malondialdehyd
Mdm2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MFB	Myofibroblast
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MWA	Mikrowellenablation
NaCl	Natriumchlorid
NASH	<i>Nonalcoholic steatohepatitis</i>
NHS	<i>Normal Horse Serum</i>
NLR	Neutrophilen-Lymphozyten-Verhältnis
NLR	Nod-like-Rezeptoren
NO	Stickstoffmonoxid
<i>O. viverrini</i>	<i>Opisthorchis viverrine</i>
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanionen
OH [·]	Hydroxyl-Radikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
P-c-Jun	Phosphoryliertes c-Jun
P-STAT3	Phosphoryliertes STAT3
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBC	Primäre biliäre Cholangitis
PCNA	<i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PYHIN	<i>Pyrimin and hematopoietic interferon-inducible nuclear domain</i>

Abkürzungsverzeichnis

qRT-PCR	In Echtzeit gemessene quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RAGE	Rezeptor für <i>advanced glycation end products</i>
RELM- α	<i>Resistin-Like Molecule-alpha</i>
Rel. OD	<i>Relative Optical Density</i>
RFA	Radiofrequenzablation
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
<i>S. bovis</i>	<i>Schistosoma bovis</i>
<i>S. guineensis</i>	<i>Schistosoma guineensis</i>
<i>S. haematobium</i>	<i>Schistosoma haematobium</i>
<i>S. intercalatum</i>	<i>Schistosoma intercalatum</i>
<i>S. japonicum</i>	<i>Schistosoma japonicum</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
<i>S. mekongi</i>	<i>Schistosoma mekongi</i>
SAC	<i>School-aged-children</i>
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SEA	<i>Soluble egg antigens</i>
SOCS3	<i>Supressor of Cytokine Signaling 3</i>
SOD	Superoxiddismutase
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TARE	Transarterielle Radioembolisation
TBA	Thiobarbitursäurelösung
TbR	TGF- β -Rezeptor
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TERT	<i>Telomerase-Reverse-Transcriptase</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>

Abkürzungsverzeichnis

Th-Zellen	CD4 ⁺ T-Helferzellen
TierSchG	Tierschutzgesetz
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tregs	Regulatorische T-Zellen
UA	Ursolsäure
UCSF-Kriterien	<i>University of California San Fransisco</i> -Kriterien
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Portalvene
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZV	Zentralvene
α SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
ω 1	Omega-1

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Evidenzbasierter Behandlungsalgorithmus des HCCs anhand der BCLC-Stadien	11
Abbildung 2: Der Lebenszyklus von <i>S. mansoni</i>	18
Abbildung 3: Das Mausmodell.....	47
Abbildung 4: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion führt zu einem Anstieg der Alanin-Aminotransferase-Konzentration im Serum	58
Abbildung 5: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion führt zu einer Zunahme des Lebergewichtes in g und zu einem Anstieg des Verhältnisses von Lebergewicht zu Körpergewicht in %	59
Abbildung 6: Die DEN-Injektion ohne Infektion erhöht die Alpha-Fetoprotein-Konzentration im Serum.....	61
Abbildung 7: Die DEN-Injektion ohne Infektion erhöht den hepatischen Grad der Dysplasie.....	62
Abbildung 8: Die DEN-Injektion beeinflusst nicht die Menge der Parasiteneier in den Lebern <i>S. mansoni</i> -infizierter Mäuse.....	62
Abbildung 9: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion induziert eine hepatische Inflammation.....	64
Abbildung 10: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion verursacht eine lobuläre und portale Inflammation.....	65
Abbildung 11: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion erhöht die hepatische <i>Cd45</i> -Expression und CD45-Proteinmenge.....	66
Abbildung 12: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion verstärkt die hepatische Genexpression Th1-spezifischer Zytokine.....	67
Abbildung 13: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion erhöht die hepatische Genexpression Th2-spezifischer Zytokine.....	69
Abbildung 14: Die Kombination aus DEN-Injektion + <i>S. mansoni</i> -Infektion steigert die hepatische Malondialdehyd-Konzentration	71
Abbildung 15: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion reduziert die hepatische <i>Superoxiddismutase 1</i> -Expression.....	72
Abbildung 16: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion verringert die hepatische <i>Katalase</i> -Expression	73

Abbildung 17: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion steigert die hepatische <i>Glutathion-Peroxidase 3</i> -Expression.....	73
Abbildung 18: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion steigert die hepatische <i>Myeloperoxidase</i> -Expression und -Proteinkonzentration	75
Abbildung 19: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion verstärkt die hepatische Aktivität der <i>Myeloperoxidase</i>	76
Abbildung 20: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion erhöht die Konzentration <i>Myeloperoxidase</i> -positiver Zellen in den Leberschnitten der Mäuse.....	77
Abbildung 21: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion aktiviert den DNA-Replikationsmarker <i>MCM2</i> in der Leber	78
Abbildung 22: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion führt zu einem Anstieg des DNA-Replikationsmarkers <i>MCM2</i> in den Leberschnitten der Mäuse.....	79
Abbildung 23: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion aktiviert den DNA-Replikationsmarker <i>PCNA</i> in der Leber	80
Abbildung 24: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion führt zu einem Anstieg des DNA-Replikationsmarkers <i>PCNA</i> in den Leberschnitten der Mäuse	81
Abbildung 25: Die Kombination aus <i>DEN</i> -Injektion + <i>S. mansoni</i> -Infektion steigert die hepatische <i>Tgf-β</i> -Expression	82
Abbildung 26: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion erhöht die hepatische <i>Desmin</i> -Konzentration	83
Abbildung 27: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion steigert die hepatische <i>Kollagen-1</i> - und <i>-3</i> -Expression.....	85
Abbildung 28: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion erhöht die hepatische Ablage von <i>Kollagen-185</i>	86
Abbildung 29: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion führt zu einer Zunahme der hepatischen <i>Hydroxyprolin</i> -Konzentration	86
Abbildung 30: Die Kombination aus <i>DEN</i> -Injektion + <i>S. mansoni</i> -Infektion steigert den hepatischen Grad der <i>Fibrose</i>	87
Abbildung 31: Die Kombination aus <i>DEN</i> -Injektion + <i>S. mansoni</i> -Infektion verstärkt die hepatische <i>Phosphorylierung</i> und <i>Aktivierung</i> von <i>STAT3</i>	88
Abbildung 32: Die <i>S. mansoni</i> -Infektion erhöht die hepatische Konzentration von <i>c-Jun</i> und <i>Phospho-c-Jun</i>	90
Abbildung 33: Die Zonen des <i>Leberazinus</i>	96

Abbildung 34: Die Infektion mit <i>S. mansoni</i> führt zu einer karzinomfördernden hepatischen Mikroumgebung	117
Abbildung 35: Histologische Beispielbilder dysplastischer und apoptotischer Zellen .	129
Abbildung 36: Histologische Beispielbilder für die Scoring-Werte 0-3 der portalen Inflammation.....	130
Abbildung 37: Histologische Beispielbilder für die Scoring-Werte 0-3 der lobulären Inflammation.....	131
Abbildung 38: Histologische Beispielbilder für die Scoring-Werte 0-3 der Fibrose	132

12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	132
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	134
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien.....	135
Tabelle 4: Antikörper	142
Tabelle 5: Oligonukleotide.....	144
Tabelle 6: Kommerzielle Kits.....	146

13 Literaturverzeichnis

- Abath, F. G. C., Morais, C. N. L., Montenegro, C. E. L., Wynn, T. A [Thomas A.] & Montenegro, S. M. L. (2006). Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends in parasitology*, 22(2), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.12.004>
- Abdalla, M. Y., Britigan, B. E., Wen, F., Icardi, M., McCormick, M. L., LaBrecque, D. R., Voigt, M., Brown, K. E. & Schmidt, W. N. (2004). Down-regulation of heme oxygenase-1 by hepatitis C virus infection in vivo and by the in vitro expression of hepatitis C core protein. *The Journal of infectious diseases*, 190(6), 1109–1118. <https://doi.org/10.1086/423488>
- Abdallahi, O. M., Hanna, S [S.], Reggi, M. de [M.] & Gharib, B [B.] (1999). Visualization of oxygen radical production in mouse liver in response to infection with *Schistosoma mansoni*. *Liver*, 19(6), 495–500. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.1999.tb00082.x>
- Abruzzi, A., Fried, B. & Alikhan, S. B. (2016). Coinfection of *Schistosoma* Species with Hepatitis B or Hepatitis C Viruses. *Advances in parasitology*, 91, 111–231. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2015.12.003>
- Afrifa, J., Ofori, E. G., Opoku, Y. K., Asare, K. K., Sorkpor, R. D., Naveh-Fio, I. W., Armah, R., Ofori, S. & Ephraim, R. K. D. (2024). Oxidative Stress and Cancer Risk in Schistosomiasis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2024, 9701021. <https://doi.org/10.1155/omcl/9701021>
- Agné, C. & Lankisch, T. (2016). Leberzirrhose und ihre Komplikationen. In M. P. Manns & S. Schneidewind (Hrsg.), *Praxis der Hepatologie* (S. 259–266). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-41620-0_154
- Aguiar, P. H. N., Furtado, C., Repolês, B. M., Ribeiro, G. A., Mendes, I. C., Peloso, E. F., Gadelha, F. R., Macedo, A. M., Franco, G. R., Pena, S. D. J., Teixeira, S. M. R., Vieira, L. Q., Guarneri, A. A., Andrade, L. O. & Machado, C. R. (2013). Oxidative Stress and DNA Lesions: The Role of 8-Oxoguanine Lesions in *Trypanosoma cruzi* Cell Viability. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(6), e2279. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002279>
- Akinyemiju, T., Abera, S., Ahmed, M., Alam, N., Alemayohu, M. A., Allen, C., Al-Raddadi, R., Alvis-Guzman, N., Amoako, Y., Artaman, A., Ayele, T. A., Barac, A., Bensenor, I., Berhane, A., Bhutta, Z., Castillo-Rivas, J., Chittheer, A., Choi, J.-Y., Cowie, B., . . . Fitzmaurice, C. (2017). The Burden of Primary Liver

- Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA oncology*, 3(12), 1683–1691.
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.3055>
- Al Adnani, M. S. (1985). Concomitant immunohistochemical localization of fibronectin and collagen in schistosome granulomata. *The Journal of pathology*, 147(2), 77–85. <https://doi.org/10.1002/path.1711470202>
- Albayrak, A., Uyanik, M. H., Cerrah, S., Altas, S., Dursun, H., Demir, M [Mehmet] & Uslu, H. (2010). Is HMGB1 a new indirect marker for revealing fibrosis in chronic hepatitis and a new therapeutic target in treatment? *Viral immunology*, 23(6), 633–638. <https://doi.org/10.1089/vim.2010.0080>
- Almeida, L., van Roey, R., Patente, T. A., Otto, F., Veldhuizen, T., Ghorasaini, M., van Diepen, A., Schramm, G., Liu, J [Jianyang], Idborg, H., Korotkova, M., Jakobsson, P.-J., Giera, M., Hokke, C. H [Cornelis Hendrik] & Everts, B. (2024). High-mannose glycans from *Schistosoma mansoni* eggs are important for priming of Th2 responses via Dectin-2 and prostaglandin E2. *Frontiers in immunology*, 15, 1372927. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1372927>
- Al-Olayan, E. M., El-Khadragy, M. F., Alajmi, R. A., Othman, M. S., Bauomy, A. A., Ibrahim, S. R. & Abdel Moneim, A. E. (2016). *Ceratonia siliqua* pod extract ameliorates *Schistosoma mansoni*-induced liver fibrosis and oxidative stress. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 434.
<https://doi.org/10.1186/s12906-016-1389-1>
- Alwan, S. N. & Loverde, P. T. (2021). The effect of fs800 on female egg production in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and biochemical parasitology*, 245, 111412.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2021.111412>
- Andrade, Z. A. (2009). Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite immunology*, 31(11), 656–663. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01157.x>
- Angelucci, F., Basso, A., Bellelli, A., Brunori, M., Pica Mattoccia, L. & Valle, C. (2007). The anti-schistosomal drug praziquantel is an adenosine antagonist. *Parasitology*, 134(Pt 9), 1215–1221.
<https://doi.org/10.1017/S0031182007002600>
- Anstee, Q. M., Reeves, H. L., Kotsiliti, E., Govaere, O. & Heikenwalder, M. (2019). From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 16(7), 411–428.
<https://doi.org/10.1038/s41575-019-0145-7>

- Anthony, B., Allen, J. T., Li, Y. S. & McManus, D. P. (2010). Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis. *Parasites & vectors*, 3(1), 60.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-60>
- Anthony, B. J., Ramm, G. A. & McManus, D. P. (2012). Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis. *Trends in parasitology*, 28(12), 572–579.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.09.005>
- Arastéh, K., Baenkler, H.-W., Bieber, C., Brandt, R., Chatterjee, T., Dill, T. & Löwe, B. (2018). *Innere Medizin (4. Aufl.). Duale Reihe*. Thieme.
<https://doi.org/10.1055/b-005-145255>
- Aratani, Y. (2018). Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of biochemistry and biophysics*, 640, 47–52.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.004>
- Arnaoutakis, D. J., Mavros, M. N., Shen, F., Alexandrescu, S., Firoozmand, A., Popescu, I., Weiss, M., Wolfgang, C. L., Choti, M. A. & Pawlik, T. M. (2014). Recurrence patterns and prognostic factors in patients with hepatocellular carcinoma in noncirrhotic liver: a multi-institutional analysis. *Annals of surgical oncology*, 21(1), 147–154. <https://doi.org/10.1245/s10434-013-3211-3>
- Ashton, P. D., Harrop, R., Shah, B. & Wilson, R. A [R. A.] (2001). The schistosome egg: development and secretions. *Parasitology*, 122(Pt 3), 329–338.
<https://doi.org/10.1017/s0031182001007351>
- Auswärtiges Amt. (2022). *Merkblatt des Gesundheitsdienstes zur Schistosomiasis (Bilharziose)*. <https://www.auswaertiges-amt.de/de/ReiseUndSicherheit/reise-gesundheit/schistosomiasis/2562868>. (Zugriff am: 14.06.2023).
- Ayala, A., Muñoz, M. F. & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 360438.
<https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Bahardoust, M., Dehkharghani, M. Z., Ebrahimi, P., Najafirashed, M., Mousavi, S., Haghmoradi, M., Khaleghian, M. & Tizmaghz, A. (2023). Effect of ABO blood group on postoperative overall survival and recurrence-free survival rate in patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy: a multi-center retrospective cohort study. *BMC surgery*, 23(1), 324.
<https://doi.org/10.1186/s12893-023-02236-8>
- Ballardini, G., Fallani, M., Biagini, G., Bianchi, F. B. & Pisi, E. (1988). Desmin and actin in the identification of Ito cells and in monitoring their evolution to myofibroblasts in experimental liver fibrosis. *Virchows Archiv. B, Cell pathology including molecular pathology*, 56(1), 45–49. <https://doi.org/10.1007/BF02890000>

- Barsoum, R. S., Esmat, G. & El-Baz, T. (2013). Human schistosomiasis: clinical perspective: review. *Journal of advanced research*, 4(5), 433–444.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.01.005>
- Bartsch, H [Helmut] & Nair, J. (2006). Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbeck's archives of surgery*, 391(5), 499–510.
<https://doi.org/10.1007/s00423-006-0073-1>
- Belkaid, Y., Sun, C. M. & Bouladoux, N. (2006). Parasites and immunoregulatory T cells. *Current opinion in immunology*, 18(4), 406–412.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2006.05.014>
- Berry, K. & Ioannou, G. N. (2013). Serum alpha-fetoprotein level independently predicts posttransplant survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 19(6), 634–645. <https://doi.org/10.1002/lt.23652>
- Boissier, J., Grech-Angelini, S., Webster, B. L., Allienne, J.-F., Huyse, T., Mas-Coma, S., Toulza, E., Barré-Cardi, H., Rollinson, D., Kincaid-Smith, J., Oleaga, A., Galinier, R., Foata, J., Rognon, A., Berry, A., Mouahid, G., Henneron, R., Moné, H., Noel, H. & Mitta, G. (2016). Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *The Lancet. Infectious diseases*, 16(8), 971–979. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00175-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00175-4)
- Booth, M., Mwatha, J. K., Joseph, S., Jones, F. M [Frances M.], Kadzo, H., Ileri, E., Kazibwe, F., Kemijumbi, J., Kariuki, C., Kimani, G., Ouma, J. H., Kabatereine, N. B., Vennervald, B. J [Birgitte J.] & Dunne, D. W [David W.] (2004). Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN-gamma, high TNF-alpha, or low RANTES, depending on age and gender. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(2), 1295–1303. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.1295>
- Botros, S., Sayed, H., Amer, N., El-Ghannam, M., Bennett, J. L. & Day, T. A. (2005). Current status of sensitivity to praziquantel in a focus of potential drug resistance in Egypt. *International journal for parasitology*, 35(7), 787–791.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.02.005>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I. & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Brechot, C., Pourcel, C., Louise, A., Rain, B. & Tiollais, P. (1980). Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature*, 286(5772), 533–535. <https://doi.org/10.1038/286533a0>
- Bréchet, C. (1987). Hepatitis B virus (HBV) and hepatocellular carcinoma. HBV DNA status and its implications. *Journal of hepatology*, 4(2), 269–279. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(87\)80090-9](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(87)80090-9)
- Brenner, C., Galluzzi, L., Kepp, O. & Kroemer, G. (2013). Decoding cell death signals in liver inflammation. *Journal of hepatology*, 59(3), 583–594. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.033>
- Brenner, D. A [D. A.], O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M. & Karin, M [M.] (1989). Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha. *Nature*, 337(6208), 661–663. <https://doi.org/10.1038/337661a0>
- Bressac, B., Kew, M., Wands, J. & Ozturk, M. (1991). Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, 350(6317), 429–431. <https://doi.org/10.1038/350429a0>
- Bruix, J [Jordi] & Sherman, M. (2011). Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 53(3), 1020–1022. <https://doi.org/10.1002/hep.24199>
- Budhu, A., Forgues, M., Ye, Q.-H., Jia, H.-L., He, P., Zanetti, K. A., Kammula, U. S., Chen, Y., Qin, L.-X., Tang, Z.-Y. & Wang, X. W. (2006). Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer cell*, 10(2), 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.06.016>
- Buettner, R., Mora, L. B. & Jove, R. (2002). Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 8(4), 945–954. PMID: 111948098
- Bülow, V. von, Gindner, S., Baier, A., Hehr, L., Buss, N., Russ, L., Wrobel, S., Wirth, V., Tabatabai, K., Quack, T., Haeberlein, S., Kadesch, P., Gerbig, S., Wiedemann, K. R., Spengler, B., Mehl, A., Morlock, G., Schramm, G., Pons-Kühnemann, J., . . . Roderfeld, M. (2023). Metabolic reprogramming of

- hepatocytes by *Schistosoma mansoni* eggs. *JHEP reports : innovation in hepatology*, 5(2), 100625. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2022.100625>
- Bülow, V. von, Lichtenberger, J., Greveling, C. G., Falcone, F. H., Roeb, E [Elke] & Roderfeld, M. (2021). Does *Schistosoma Mansoni* Facilitate Carcinogenesis? *Cells*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/cells10081982>
- Bülow, V. von, Schneider, M., Dreizler, D., Russ, L., Baier, A., Buss, N., Lichtenberger, J., Härle, L., Müller, H., Tschuschner, A., Schramm, G., Pons-Kühnemann, J., Greveling, C. G., Roeb, E [Elke] & Roderfeld, M. (2024). *Schistosoma mansoni*-Induced Oxidative Stress Triggers Hepatocellular Proliferation. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 17(1), 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2023.08.014>
- Calvisi, D. F., Ladu, S., Gorden, A., Farina, M., Conner, E. A., Lee, J.-S., Factor, V. M. & Thorgeirsson, S. S. (2006). Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology*, 130(4), 1117–1128. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.01.006>
- Carson, J. P., Ramm, G. A., Robinson, M. W., McManus, D. P. & Gobert, G. N. (2018). Schistosome-Induced Fibrotic Disease: The Role of Hepatic Stellate Cells. *Trends in parasitology*, 34(6), 524–540. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.02.005>
- Chabasse, D., Bertrand, G., Leroux, J. P., Gauthey, N. & Hocquet, P. (1985). Bilharziose à *Schistosoma mansoni* évolutive découverte 37 ans après l'infestation [Developmental bilharziasis caused by *Schistosoma mansoni* discovered 37 years after infestation]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales*, 78(5), 643–647. French. PMID: 3936631
- Chatterji, T., Khanna, N., Alghamdi, S., Bhagat, T., Gupta, N., Alkurbi, M. O., Sen, M., Alghamdi, S. M., Bamagous, G. A., Sahoo, D. K., Patel, A., Kumar, P. & Yadav, V. K. (2024). A Recent Advance in the Diagnosis, Treatment, and Vaccine Development for Human Schistosomiasis. *Tropical medicine and infectious disease*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9100243>
- Cheever, A. W [A. W.] (1968). Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bulletin of the World Health Organization*, 39(2), 328–331. PMID: 4881073; PMC2554554.
- Cheever, A. W [A. W.] & Duvall, R. H. (1982). *Schistosoma japonicum*: migration of adult worm pairs within the mesenteric veins of mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(5), 641–645. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(82\)90231-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(82)90231-0)

- Cheever, A. W [A. W.], Williams, M. E [M. E.], Wynn, T. A [T. A.], Finkelman, F. D., Seder, R. A., Cox, T. M., Hieny, S [S.], Caspar, P [P.] & Sher, A [A.] (1994). Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *The Journal of Immunology*, 153(2), 753–759. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.153.2.753>
- Chen, C.-J., Yang, H.-I., Su, J., Jen, C.-L., You, S.-L., Lu, S.-N., Huang, G.-T. & Iloeje, U. H. (2006). Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*, 295(1), 65–73. <https://doi.org/10.1001/jama.295.1.65>
- Chen, J. Y., Thakar, D. & Chang, T. T. (Hrsg.). (2019). *Fibrosis in Disease. Liver Fibrosis: Current Approaches and Future Directions for Diagnosis and Treatment*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98143-7_15
- Chen, T. T. W., Cheng, P. C., Chang, K. C., Cao, J. P., Feng, J. L., Chen, C. C., Lam, H. Y. P. & Peng, S. Y. (2019). Activation of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes in a mouse model of *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of helminthology*, 94, e72. <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000622>
- Chen, Y.-C., Chen, I.-A., Peng, S.-Y. & Cheng, P.-C. (2023). Differential Analysis of Key Proteins Related to Fibrosis and Inflammation in Soluble Egg Antigen of *Schistosoma mansoni* at Different Infection Times. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/pathogens12030441>
- Chiaromonte, M. G., Cheever, A. W [A. W.], Malley, J. D., Donaldson, D. D. & Wynn, T. A [T. A.] (2001). Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 34(2), 273–282. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.26376>
- Chiaromonte, M. G., Donaldson, D. D., Cheever, A. W [A. W.] & Wynn, T. A [T. A.] (1999). An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *The Journal of clinical investigation*, 104(6), 777–785. <https://doi.org/10.1172/JCI7325>
- Chitsulo, L., Engels, D [D.], Montresor, A [A.] & Savioli, L [L.] (2000). The global status of schistosomiasis and its control. *Acta tropica*, 77(1), 41–51. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(00\)00122-4](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(00)00122-4)
- Chuah, C., Jones, M. K., Burke, M. L., McManus, D. P. & Gobert, G. N. (2014). Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends in parasitology*, 30(3), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.12.009>

- Chung, Y.-L. (2013). Defective DNA damage response and repair in liver cells expressing hepatitis B virus surface antigen. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(6), 2316–2327. <https://doi.org/10.1096/fj.12-226639>
- Colley, D. G [D. G.] (1976). Adoptive suppression of granuloma formation. *The Journal of experimental medicine*, 143(3), 696–700. <https://doi.org/10.1084/jem.143.3.696>
- Colley, D. G [D. G.], Montesano, M. A., Freeman, G. L. & Secor, W. E [W. E.] (1999). Infection-stimulated or perinatally initiated idiotypic interactions can direct differential morbidity and mortality in schistosomiasis. *Microbes and infection*, 1(7), 517–524. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(99\)80091-4](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(99)80091-4)
- Colley, D. G [D. G.] & Secor, W. E [W. E.] (2014). Immunology of human schistosomiasis. *Parasite immunology*, 36(8), 347–357. <https://doi.org/10.1111/pim.12087>
- Colley, D. G [Daniel G.], Bustinduy, A. L., Secor, W. E [W. Evan] & King, C. H. (2014). Human schistosomiasis. *Lancet (London, England)*, 383(9936), 2253–2264. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61949-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61949-2)
- Costain, A. H., MacDonald, A. S. & Smits, H. H. (2018). Schistosome Egg Migration: Mechanisms, Pathogenesis and Host Immune Responses. *Frontiers in immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03042>
- Costain, A. H., Phythian-Adams, A. T., Colombo, S. A. P., Marley, A. K., Owusu, C., Cook, P. C., Brown, S. L., Webb, L. M., Lundie, R. J., Smits, H. H., Berriman, M. & MacDonald, A. S. (2022). Dynamics of Host Immune Response Development During *Schistosoma mansoni* Infection. *Frontiers in immunology*, 13, 906338. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.906338>
- Cucchetti, A., Piscaglia, F., Cescon, M., Colecchia, A., Ercolani, G., Bolondi, L. & Pinna, A. D. (2013). Cost-effectiveness of hepatic resection versus percutaneous radiofrequency ablation for early hepatocellular carcinoma (Bd. 59). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.04.009>
- Cunha, G. M. M., Silva, V. M. A., Bessa, K. D. G., Bitencourt, M. A. O., Macêdo, U. B. O., Freire-Neto, F. P., Martins, R. R., Assis, C. F., Lemos, T. M. A. M., Almeida, M. G. & Freire, A. C. G. (2012). Levels of oxidative stress markers: correlation with hepatic function and worm burden patients with schistosomiasis. *Acta parasitologica*, 57(2), 160–166. <https://doi.org/10.2478/s11686-012-0026-5>
- Curley, S. A. (2001). Radiofrequency ablation of malignant liver tumors. *The oncologist*, 6(1), 14–23. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.6-1-14>

- Dandri, M., Burda, M. R., Bürkle, A., Zuckerman, D. M., Will, H., Rogler, C. E., Greten, H. & Petersen, J. (2002). Increase in de novo HBV DNA integrations in response to oxidative DNA damage or inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 35(1), 217–223. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.30203>
- Das, M., Garlick, D. S., Greiner, D. L. & Davis, R. J. (2011). The role of JNK in the development of hepatocellular carcinoma. *Genes & development*, 25(6), 634–645. <https://doi.org/10.1101/gad.1989311>
- Deelder, A. M [A. M.], Cornelis, D., van Marck, E. A., Eveleigh, P. C. & van Egmond, J. G. (1980). Schistosoma mansoni: characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster, and human infections. *Experimental parasitology*, 50(1), 16–32. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(80\)90004-1](https://doi.org/10.1016/0014-4894(80)90004-1)
- DeLeo, F. R. & Quinn, M. T. (1996). Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *Journal of leukocyte biology*, 60(6), 677–691. <https://doi.org/10.1002/jlb.60.6.677>
- Dessein, A. J., Hillaire, D., Elwali, N. E., Marquet, S., Mohamed-Ali, Q., Mirghani, A., Henri, S., Abdelhameed, A. A., Saeed, O. K., Magzoub, M. M. & Abel, L. (1999). Severe hepatic fibrosis in Schistosoma mansoni infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gamma receptor gene. *American journal of human genetics*, 65(3), 709–721. <https://doi.org/10.1086/302526>
- Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit (2017). S1-Leitlinie 042-005 „Diagnostik und Therapie der Schistosomiasis (Bilharziose). AWMF-Registernummer 042/005; https://register.awmf.org/assets/guidelines/042-005l_S1_Schistosomiasis-Bilharziose-Diagnostik-Therapie_2017-12-abgelaufen.pdf. Zugriff am: 17.01.2025.
- Dewalick, S., Hensbergen, P. J., Bexkens, M. L., Grosserichter-Wagener, C., Hokke, C. H., Deelder, A. M [André M.], Groot, P. G. de [Philip G.], Tielens, A. G. M [Aloysius G. M.] & van Hellemond, J. J [Jaap J.] (2014). Binding of von Willebrand factor and plasma proteins to the eggshell of Schistosoma mansoni. *International journal for parasitology*, 44(5), 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.12.006>
- Dewidar, B., Meyer, C., Dooley, S. & Meindl-Beinker, A. N. (2019). TGF- β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis-Updated 2019. *Cells*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/cells8111419>

- DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E. & Karin, M [M.] (1997). A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature*, 388(6642), 548–554. <https://doi.org/10.1038/41493>
- Driss, V., El Nady, M., Delbeke, M., Rousseaux, C., Dubuquoy, C., Sarazin, A., Gatault, S., Dendooven, A., Riveau, G., Colombel, J. F., Desreumaux, P., Dubuquoy, L. & Capron, M. (2016). The schistosome glutathione S-transferase P28GST, a unique helminth protein, prevents intestinal inflammation in experimental colitis through a Th2-type response with mucosal eosinophils. *Mucosal immunology*, 9(2), 322–335. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.62>
- Drudge-Coates, L. & Turner, B. (2013). Schistosomiasis-an endemic parasitic waterborne disease. *British journal of nursing (Mark Allen Publishing)*, 22(9), S10, S12-4. PMID: 23752571.
- Dryden, G. W., Deaciuc, I., Arteel, G. & McClain, C. J. (2005). Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. *Current gastroenterology reports*, 7(4), 308–316. <https://doi.org/10.1007/s11894-005-0024-y>
- Dunne, D. W [D. W.], Jones, F. M [F. M.] & Doenhoff, M. J [M. J.] (1991). The purification, characterization, serological activity and hepatotoxic properties of two cationic glycoproteins (alpha 1 and omega 1) from *Schistosoma mansoni* eggs. *Parasitology*, 103 Pt 2, 225–236. <https://doi.org/10.1017/s0031182000059503>
- El Ridi, R. (Hrsg.). (2013). *Parasitic Diseases - Schistosomiasis*. InTech. <https://doi.org/10.5772/55787>
- El-Khoueiry, A. B., Trojan, J., Meyer, T., Yau, T., Melero, I., Kudo, M [M.], Hsu, C., Kim, T.-Y [T-Y], Choo, S.-P., Kang, Y.-K., Yeo, W [W.], Chopra, A., Soleymani, S., Yao, J., Neely, J., Tschaika, M., Welling, T. H. & Sangro, B [B.] (2023). Nivolumab in sorafenib-naïve and sorafenib-experienced patients with advanced hepatocellular carcinoma: 5-year follow-up from CheckMate 040. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. Vorab-Onlinepublikation. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2023.12.008>
- Eloi-Santos, S. M., Novato-Silva, E., Maselli, V. M., Gazzinelli, G., Colley, D. G [D. G.] & Correa-Oliveira, R. (1989). Idiopathic sensitization in utero of children born to mothers with schistosomiasis or Chagas' disease. *The Journal of clinical investigation*, 84(3), 1028–1031. <https://doi.org/10.1172/JCI114225>
- Elsammak, M. Y., Al-Sharkaweey, R. M., Ragab, M. S., Amin, G. A. & Kandil, M. H. (2008). IL-4 and reactive oxygen species are elevated in Egyptian patients

- affected with schistosomal liver disease. *Parasite immunology*, 30(11-12), 603–609. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2008.01061.x>
- El-Serag, H. B. & Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7), 2557–2576. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.061>
- El-Sokkary, G. H., Omar, H. M., Hassanein, A.-F. M. M., Cuzzocrea, S. & Reiter, R. J. (2002). Melatonin reduces oxidative damage and increases survival of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Free radical biology & medicine*, 32(4), 319–332. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00753-5](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00753-5)
- El-Tonsy, M. M., Hussein, H. M [Hesham Mohammed], Helal, T. E.-S., Tawfik, R. A., Koriem, K. M. & Hussein, H. M [Hend Mohamed] (2013). *Schistosoma mansoni* infection: is it a risk factor for development of hepatocellular carcinoma? *Acta tropica*, 128(3), 542–547. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.07.024>
- El-Tonsy, M. M., Hussein, H. M [Hesham Mohammed], Helal, T. E.-S., Tawfik, R. A., Koriem, K. M. & Hussein, H. M [Hend Mohamed] (2016). Human Schistosomiasis mansoni associated with hepatocellular carcinoma in Egypt: current perspective. *Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology*, 40(3), 976–980. <https://doi.org/10.1007/s12639-014-0618-0>
- Estes, C., Razavi, H., Loomba, R., Younossi, Z. & Sanyal, A. J. (2018). Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 67(1), 123–133. <https://doi.org/10.1002/hep.29466>
- Everts, B., Hussaarts, L., Driessen, N. N., Meevissen, M. H. J., Schramm, G., van der Ham, A. J., van der Hoeven, B., Scholzen, T., Burgdorf, S., Mohrs, M., Pearce, E. J [Edward J.], Hokke, C. H., Haas, H., Smits, H. H. & Yazdanbakhsh, M [Maria] (2012). Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor. *The Journal of experimental medicine*, 209(10), 1753-67, S1. <https://doi.org/10.1084/jem.20111381>
- Everts, B., Perona-Wright, G., Smits, H. H., Hokke, C. H., van der Ham, A. J., Fitzsimmons, C. M., Doenhoff, M. J [Michael J.], van der Bosch, J., Mohrs, K., Haas, H., Mohrs, M., Yazdanbakhsh, M [Maria] & Schramm, G. (2009). Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. *The Journal of experimental medicine*, 206(8), 1673–1680. <https://doi.org/10.1084/jem.20082460>

- Fairfax, K., Nascimento, M., Huang, S. C.-C., Everts, B. & Pearce, E. J [Edward J.] (2012). Th2 responses in schistosomiasis. *Seminars in immunopathology*, 34(6), 863–871. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0354-4>
- Fallon, P. G [P. G.], Richardson, E. J., McKenzie, G. J. & McKenzie, A. N. (2000). Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(5), 2585–2591. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.5.2585>
- Farah, I. O., Mola, P. W., Kariuki, T. M., Nyindo, M., Blanton, R. E. & King, C. L [C. L.] (2000). Repeated exposure induces periportal fibrosis in *Schistosoma mansoni*-infected baboons: role of TGF-beta and IL-4. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(10), 5337–5343. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.10.5337>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A. & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*. Vorab-Onlinepublikation. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Ferrari, T. C. A. & Moreira, P. R. R. (2011). Neuroschistosomiasis: clinical symptoms and pathogenesis. *The Lancet. Neurology*, 10(9), 853–864. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70170-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70170-3)
- Filgueira, N. A. (2019). Hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation: Risk factors, screening and clinical presentation. *World journal of hepatology*, 11(3), 261–272. <https://doi.org/10.4254/wjh.v11.i3.261>
- Finn, R. S., Qin, S., Ikeda, M., Galle, P. R., Ducreux, M., Kim, T.-Y., Kudo, M., Breder, V., Merle, P., Kaseb, A. O., Li, D., Verret, W., Xu, D.-Z., Hernandez, S., Liu, J., Huang, C., Mulla, S., Wang, Y [Yulei], Lim, H. Y., . . . Cheng, A.-L. (2020). Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *The New England journal of medicine*, 382(20), 1894–1905. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1915745>
- Fitzsimmons, C. M., Jones, F. M [Frances M.], Pinot de Moira, A., Protasio, A. V., Khalife, J., Dickinson, H. A., Tukahebwa, E. M. & Dunne, D. W [David W.] (2012). Progressive cross-reactivity in IgE responses: an explanation for the slow development of human immunity to schistosomiasis? *Infection and immunity*, 80(12), 4264–4270. <https://doi.org/10.1128/IAI.00641-12>
- Fitzsimmons, C. M., Schramm, G., Jones, F. M [Frances M.], Chalmers, I. W., Hoffmann, K. F [Karl F.], Grevelding, C. G., Wuhler, M., Hokke, C. H., Haas, H., Doenhoff, M. J [Michael J.] & Dunne, D. W [David W.] (2005). Molecular characterization of omega-1: a hepatotoxic ribonuclease from *Schistosoma*

- mansonii eggs. *Molecular and biochemical parasitology*, 144(1), 123–127.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.08.003>
- Fracanzani, A. L., Conte, D., Fraquelli, M., Taioli, E., Mattioli, M., Losco, A. & Fargion, S. (2001). Increased cancer risk in a cohort of 230 patients with hereditary hemochromatosis in comparison to matched control patients with non-iron-related chronic liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 33(3), 647–651. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.22506>
- Franz C. (2001). Bilharziose - In vielen Ländern Afrikas endemisch. *Deutsches Ärzteblatt*(9), 30–31. <https://www.aerzteblatt.de/archiv/26290/Bilharziose-In-vielen-Laendern-Afrikas-endemisch>
- Freeman, A. J., Dore, G. J., Law, M. G., Thorpe, M., Overbeck, J. von, Lloyd, A. R., Marinos, G. & Kaldor, J. M. (2001). Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 34(4 Pt 1), 809–816. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.27831>
- Gabrielli, A. F. & Garba Djirmay, A. (2023). Schistosomiasis in Europe. *Current Tropical Medicine Reports*. Vorab-Onlinepublikation.
<https://doi.org/10.1007/s40475-023-00286-9>
- Gaillard, H., García-Muse, T. & Aguilera, A. (2015). Replication stress and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 15(5), 276–289. <https://doi.org/10.1038/nrc3916>
- Garner, R. C., Miller, E. C. & Miller, J. A. (1972). Liver microsomal metabolism of aflatoxin B 1 to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA 1530. *Cancer research*, 32(10), 2058–2066. PMID: 4404160.
- Gharib, B [B.], Abdallahi, O. M., Dessein, H. & Reggi, M. de [M.] (1999). Development of eosinophil peroxidase activity and concomitant alteration of the antioxidant defenses in the liver of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Journal of hepatology*, 30(4), 594–602. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(99\)80189-5](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(99)80189-5)
- Gnanasekar, M., Salunkhe, A. M., Mallia, A. K., He, Y. X. & Kalyanasundaram, R. (2009). Praziquantel affects the regulatory myosin light chain of *Schistosoma mansoni*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(3), 1054–1060.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01222-08>.
- Goodman, Z. D. (2007). Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *Journal of hepatology*, 47(4), 598–607.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.07.006>
- Gouveia, M. J., Santos, J., Brindley, P. J., Rinaldi, G., Lopes, C., Santos, L. L., Da Costa, J. M. C. & Vale, N. (2015). Estrogen-like metabolites and DNA-adducts

- in urogenital schistosomiasis-associated bladder cancer. *Cancer letters*, 359(2), 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.01.018>
- Graham, B. B., Mentink-Kane, M. M., El-Haddad, H., Purnell, S., Zhang, L., Zaiman, A., Redente, E. F., Riches, D. W. H., Hassoun, P. M., Bandeira, A., Champion, H. C., Butrous, G., Wynn, T. A [Thomas A.] & Tuder, R. M. (2010). Schistosomiasis-induced experimental pulmonary hypertension: role of interleukin-13 signaling. *The American journal of pathology*, 177(3), 1549–1561. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100063>
- Graumann, F., Churin, Y., Tschuschner, A., Reifenberg, K., Glebe, D., Roderfeld, M. & Roeb, E [Elke] (2015). Genomic Methylation Inhibits Expression of Hepatitis B Virus Envelope Protein in Transgenic Mice: A Non-Infectious Mouse Model to Study Silencing of HBV Surface Antigen Genes. *PloS one*, 10(12), e0146099. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146099>
- Gressner, A. M. & Arndt, T. (Hrsg.). (2019). *Springer Reference Medizin. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer.
- Grogan, J. L., Kremsner, P. G., van Dam, G. J [G. J.], Metzger, W., Mordmüller, B., Deelder, A. M [A. M.] & Yazdanbakhsh, M [M.] (1996). Antischistosome IgG4 and IgE responses are affected differentially by chemotherapy in children versus adults. *The Journal of infectious diseases*, 173(5), 1242–1247. <https://doi.org/10.1093/infdis/173.5.1242>
- Gryseels, B [B.], Mbaye, A., Vlas, S. J. de, Stelma, F. F., Guissé, F., van Lieshout, L [L.], Faye, D., Diop, M., Ly, A., Tchuem-Tchuente, L. A., Engels, D [D.] & Polman, K [K.] (2001). Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 6(11), 864–873. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00811.x>
- Gryseels, B [Bruno], Polman, K [Katja], Clerinx, J. & Kestens, L. (2006). Human schistosomiasis. *Lancet (London, England)*, 368(9541), 1106–1118. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69440-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69440-3)
- Guidotti, L. G., Inverso, D., Sironi, L., Di Lucia, P., Fioravanti, J., Ganzer, L., Fiocchi, A., Vacca, M., Aiolfi, R., Sammiceli, S., Mainetti, M., Cataudella, T., Raimondi, A., Gonzalez-Asequinolaza, G., Protzer, U., Ruggeri, Z. M., Chisari, F. V., Isogawa, M., Sitia, G. & Iannaccone, M. (2015). Immunosurveillance of the liver by intravascular effector CD8(+) T cells. *Cell*, 161(3), 486–500. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.005>
- Guo, L., Guo, Y., Xiao, S. & Shi, X. (2005). Protein kinase p-JNK is correlated with the activation of AP-1 and its associated Jun family proteins in hepatocellular

- carcinoma. *Life sciences*, 77(15), 1869–1878.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.03.019>
- Gutteridge, J. M. & Halliwell, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in biochemical sciences*, 15(4), 129–135. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90206-q](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90206-q)
- Habib, S. L., Said, B., Awad, A. T., Mostafa, M. H. & Shank, R. C. (2006). Novel adenine adducts, N7-guanine-AFB1 adducts, and p53 mutations in patients with schistosomiasis and aflatoxin exposure. *Cancer detection and prevention*, 30(6), 491–498. <https://doi.org/10.1016/j.cdp.2006.10.006>
- Halazun, K. J., Hardy, M. A., Rana, A. A., Woodland, D. C., Luyten, E. J., Mahadev, S., Witkowski, P., Siegel, A. B., Brown, R. S. & Emond, J. C. (2009). Negative impact of neutrophil-lymphocyte ratio on outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *ANNALS OF SURGERY*, 250(1), 141–151.
<https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181a77e59>
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 186, 1–85.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86093-b](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86093-b)
- Hams, E., Aviello, G. & Fallon, P. G [Padraic G.] (2013). The Schistosoma Granuloma: Friend or Foe? *Frontiers in Immunology*, 4.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00089>
- Hanna, S [Stéphane], Gharib, B [Bouchra], Lepidi, H., Montet, J.-C., Dumon, H. & Reggi, M. de [Max] (2005). Experimental schistosomiasis, protective aspects of granulomatous reaction in the mouse liver. *Parasitology research*, 96(1), 6–11.
<https://doi.org/10.1007/s00436-005-1319-5>
- He, G., Dhar, D., Nakagawa, H., Font-Burgada, J., Ogata, H., Jiang, Y., Shalapour, S., Seki, E., Yost, S. E., Jepsen, K., Frazer, K. A., Harismendy, O., Hatzia Apostolou, M., Iliopoulos, D., Suetsugu, A., Hoffman, R. M., Tateishi, R., Koike, K. & Karin, M [Michael] (2013). Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. *Cell*, 155(2), 384–396. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.031>
- He, G. & Karin, M [Michael] (2011). NF-κB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell research*, 21(1), 159–168.
<https://doi.org/10.1038/cr.2010.183>
- He, G., Yu, G.-Y., Temkin, V., Ogata, H., Kuntzen, C., Sakurai, T., Sieghart, W., Peck-Radosavljevic, M., Leffert, H. L. & Karin, M [Michael] (2010). Hepatocyte IKKβ/NF-κB inhibits tumor promotion and progression by preventing

- oxidative stress-driven STAT3 activation. *Cancer cell*, 17(3), 286–297.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.048>
- Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A. H., Bürgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W. & Schulzke, J. D. (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*, 129(2), 550–564.
<https://doi.org/10.1016/j.gastro.2005.05.002>
- Helmrich, N., Roderfeld, M., Baier, A., Windhorst, A., Herebian, D., Mayatepek, E., Dierkes, C., Ocker, M., Glebe, D., Christ, B., Churin, Y., Irunbam, K. & Roeb, E [Elke] (2022). Pharmacologic Antagonization of Cannabinoid Receptor 1 Improves Cholestasis in Abcb4^{-/-} Mice. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 13(4), 1041–1055.
<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.12.013>
- Hemann, S., Graf, J., Roderfeld, M. & Roeb, E [Elke] (2007). Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *Journal of hepatology*, 46(5), 955–975.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.02.003>
- Hernandez-Gea, V. & Friedman, S. L. (2011). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual review of pathology*, 6, 425–456. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130246>
- Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A. C., Schito, M., Fuentes, J. M., Cheever, A. W [A. W.], Pearce, E. J [E. J.] & Wynn, T. A [T. A.] (2001). Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines *in vivo*: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(11), 6533–6544.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6533>
- Hesse, M [Matthias], Piccirillo, C. A., Belkaid, Y., Prufer, J., Mentink-Kane, M., Leusink, M., Cheever, A. W [Allen W.], Shevach, E. M. & Wynn, T. A [Thomas A.] (2004). The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(5), 3157–3166.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.3157>
- Hiatt, R. A., Sotomayor, Z. R., Sanchez, G., Zambrana, M. & Knight, W. B. (1979). Factors in the pathogenesis of acute schistosomiasis mansoni. *The Journal of infectious diseases*, 139(6), 659–666. <https://doi.org/10.1093/infdis/139.6.659>

- Hirano, T., Ishihara, K. & Hibi, M. (2000). Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*, 19(21), 2548–2556.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203551>
- Hoffmann, K. F [K. F.], Cheever, A. W [A. W.] & Wynn, T. A [T. A.] (2000). IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(12), 6406–6416. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6406>
- Holzscheiter, M., Layland, L. E., Loffredo-Verde, E., Mair, K., Vogelmann, R., Langer, R., Wagner, H. & Da Prazeres Costa, C. (2014). Lack of host gut microbiota alters immune responses and intestinal granuloma formation during schistosomiasis. *Clinical and experimental immunology*, 175(2), 246–257.
<https://doi.org/10.1111/cei.12230>
- Hoshida, Y., Villanueva, A., Kobayashi, M., Peix, J., Chiang, D. Y., Camargo, A., Gupta, S., Moore, J., Wrobel, M. J., Lerner, J., Reich, M [Michael], Chan, J. A., Glickman, J. N., Ikeda, K., Hashimoto, M., Watanabe, G., Daidone, M. G., Roayaie, S., Schwartz, M., . . . Golub, T. R. (2008). Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *The New England journal of medicine*, 359(19), 1995–2004. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804525>
- Howley, P. M. (2015). Gordon Wilson Lecture: Infectious Disease Causes of Cancer: Opportunities for Prevention and Treatment. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 126, 117–132.
- Huang, H.-H., Rigouin, C. & Williams, D. L. (2012). The redox biology of schistosome parasites and applications for drug development. *Current pharmaceutical design*, 18(24), 3595–3611. PMID: 22607149; PMC3638776.
- Ignatius, R. & Burchard, G.-D. (2020). Trematoden. In S. Suerbaum, G.-D. Burchard, S. H. E. Kaufmann & T. F. Schulz (Hrsg.), *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (S. 895–900). Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-61385-6_86
- International Agency for Research on Cancer; Weltgesundheitsorganisation. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 100 B, biological agents: This publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 24 February - 03 March 2009.* (2012). IARC.
- Ishak, K., Baptista, A., Bianchi, L., Callea, F., Groote, J. de, Gudat, F., Denk, H., Desmet, V., Korb, G. & MacSween, R. N. (1995). Histological grading and

- staging of chronic hepatitis. *Journal of hepatology*, 22(6), 696–699.
[https://doi.org/10.1016/0168-8278\(95\)80226-6](https://doi.org/10.1016/0168-8278(95)80226-6)
- Jain, S. (2024). Is *Schistosoma mansoni* playing a part in liver carcinogenesis? *Journal of helminthology*, 98, e61. <https://doi.org/10.1017/S0022149X24000506>
- Jaiswal, M., LaRusso, N. F., Burgart, L. J. & Gores, G. J. (2000). Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer research*, 60(1), 184–190. PMID: 10646872.
- Jaiswal, M., LaRusso, N. F. & Gores, G. J. (2001). Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 281(3), G626-34. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.281.3.G626>
- Jankovic, D., Kullberg, M. C., Noben-Trauth, N., Caspar, P [Patricia], Ward, J. M., Cheever, A. W [Allen W.], Paul, W. E. & Sher, A [Alan] (1999). Schistosome-Infected IL-4 Receptor Knockout (KO) Mice, in Contrast to IL-4 KO Mice, Fail to Develop Granulomatous Pathology While Maintaining the Same Lymphokine Expression Profile. *The Journal of Immunology*, 163(1), 337–342. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.163.1.337>
- Jauréguiberry, S., Paris, L. & Caumes, E. (2010). Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(3), 225–231. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03131.x>
- Jemal, A., Ward, E. M., Johnson, C. J., Cronin, K. A., Ma, J., Ryerson, B., Mariotto, A., Lake, A. J., Wilson, R [Reda], Sherman, R. L., Anderson, R. N., Henley, S. J., Kohler, B. A., Penberthy, L., Feuer, E. J. & Weir, H. K. (2017). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(9). <https://doi.org/10.1093/jnci/djx030>
- Johnson, P. J., Berhane, S., Kagebayashi, C., Satomura, S., Teng, M., Reeves, H. L., O'Beirne, J., Fox, R., Skowronska, A., Palmer, D., Yeo, W., Mo, F., Lai, P., Iñarrairaegui, M., Chan, S. L., Sangro, B [Bruno], Miksad, R., Tada, T., Kumada, T. & Toyoda, H. (2015). Assessment of liver function in patients with hepatocellular carcinoma: a new evidence-based approach-the ALBI grade. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(6), 550–558. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.9151>
- Junqueira, L. C., Bignolas, G. & Brentani, R. R. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue

- sections. *The Histochemical journal*, 11(4), 447–455.
<https://doi.org/10.1007/BF01002772>
- Kamal, S., Madwar, M., Bianchi, L., Tawil, A. E., Fawzy, R., Peters, T. & Rasenack, J. W. (2000). Clinical, virological and histopathological features: long-term follow-up in patients with chronic hepatitis C co-infected with *S. mansoni*. *Liver*, 20(4), 281–289. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0676.2000.020004281.x>
- Kamdem, S. D., Moyou-Somo, R., Brombacher, F. & Nono, J. K. (2018). Host Regulators of Liver Fibrosis During Human Schistosomiasis. *Frontiers in immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02781>
- Kamimura, D., Ishihara, K. & Hirano, T. (2003). IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 149, 1–38. <https://doi.org/10.1007/s10254-003-0012-2>
- Kanneganti, T.-D. (2010). Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nature reviews. Immunology*, 10(10), 688–698. <https://doi.org/10.1038/nri2851>
- Kaur, I., Schramm, G., Everts, B., Scholzen, T., Kindle, K. B., Beetz, C., Montiel-Duarte, C., Blindow, S., Jones, A. T., Haas, H., Stolnik, S., Heery, D. M. & Falcone, F. H. (2011). Interleukin-4-inducing principle from *Schistosoma mansoni* eggs contains a functional C-terminal nuclear localization signal necessary for nuclear translocation in mammalian cells but not for its uptake. *Infection and immunity*, 79(4), 1779–1788. <https://doi.org/10.1128/IAI.01048-10>
- Kelly, K. A., Havrilla, C. M., Brady, T. C., Abramo, K. H. & Levin, E. D. (1998). Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental health perspectives*, 106(7), 375–384. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106375>
- Khalil, R. M., Hültner, L., Mailhammer, R., Luz, A., Moeller, J., Mohamed, A. A., Omran, S. & Dörmer, P. (1996). Kinetics of interleukin-6 production after experimental infection of mice with *Schistosoma mansoni*. *Immunology*, 89(2), 256–261. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1996.d01-737.x>
- King, C. L [Christopher L.], Malhotra, I., Mungai, P., Wamachi, A., Kioko, J., Ouma, J. H. & Kazura, J. W. (1998). B Cell Sensitization to Helminthic Infection Develops In Utero in Humans. *The Journal of Immunology*, 160(7), 3578–3584. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.160.7.3578>
- Kishimoto, T. (2005). Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annual review of immunology*, 23, 1–21. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115806>

- Kleiner, D. E [David E.] (2018). Histopathology, grading and staging of nonalcoholic fatty liver disease. *Minerva gastroenterologica e dietologica*, 64(1), 28–38.
<https://doi.org/10.23736/s1121-421X.17.02445-X>
- Kohse, K. P. (2019). Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie. Vorab-Onlinepublikation. <https://doi.org/10.1055/b-006-160376>
- Kokaliaris, C., Garba, A., Matuska, M., Bronzan, R. N., Colley, D. G [Daniel G.], Dorkenoo, A. M., Ekpo, U. F., Fleming, F. M., French, M. D., Kabore, A., Mbonigaba, J. B., Midzi, N., Mwinzi, P. N. M., N'Goran, E. K., Polo, M. R., Sacko, M., Tchuem Tchuente, L.-A., Tukahebwa, E. M., Uvon, P. A., . . . Vounatsou, P. (2022). Effect of preventive chemotherapy with praziquantel on schistosomiasis among school-aged children in sub-Saharan Africa: a spatiotemporal modelling study, 22(1), 136–149. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00090-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00090-6)
- Korenaga, M., Okuda, M., Otani, K., Wang, T., Li, Y [Yanchun] & Weinman, S. A. (2005). Mitochondrial dysfunction in hepatitis C. *Journal of clinical gastroenterology*, 39(4 Suppl 2), S162-6.
<https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000155517.02468.46>
- Kortylewski, M., Xin, H., Kujawski, M., Lee, H., Liu, Y [Yong], Harris, T., Drake, C., Pardoll, D. & Yu, H. (2010). Regulation of the IL-23 and IL-12 Balance by Stat3 Signaling in the Tumor Microenvironment. *Cancer cell*, 18(5), 536.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.004>
- Koyama, Y. & Brenner, D. A [David A.] (2017). Liver inflammation and fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 127(1), 55–64.
<https://doi.org/10.1172/JCI88881>.
- Kremsdorf, D., Soussan, P., Paterlini-Brechot, P. & Brechot, C. (2006). Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis. *Oncogene*, 25(27), 3823–3833.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209559>
- Kubo, M., Hanada, T. & Yoshimura, A. (2003). Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nature immunology*, 4(12), 1169–1176.
<https://doi.org/10.1038/ni1012>
- La Flamme, A. C., Patton, E. A., Bauman, B. & Pearce, E. J [E. J.] (2001). IL-4 plays a crucial role in regulating oxidative damage in the liver during schistosomiasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(3), 1903–1911.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.3.1903>

- Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. (2009). Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunological reviews*, 227(1), 95–105. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00730.x>
- Lang, H., Sotiropoulos, G. C., Brokalaki, E. I., Schmitz, K. J., Bertona, C., Meyer, G., Frilling, A., Paul, A., Malagó, M. & Broelsch, C. E. (2007). Survival and recurrence rates after resection for hepatocellular carcinoma in noncirrhotic livers. *Journal of the American College of Surgeons*, 205(1), 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2007.03.002>
- Laval, F. de, Savini, H., Biance-Valero, E. & Simon, F. (2014). Human schistosomiasis: an emerging threat for Europe. *Lancet (London, England)*, 384(9948), 1094–1095. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61669-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61669-X)
- Lee, C. (2007). Western blotting. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 362, 391–399. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-257-1_30
- Lee, S. H. (2015). Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intestinal research*, 13(1), 11–18. <https://doi.org/10.5217/ir.2015.13.1.11>
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome, Langversion 5.0, 2024, AWMF-Registernummer 032-053OL; <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hcc-und-biliaere-karzinome/>; Zugriff am 31.12.2024
- Lejoly-Boisseau, H., Appriou, M., Seigneur, M., Pruvost, A., Tribouley-Duret, J. & Tribouley, J. (1999). Schistosoma mansoni: *in vitro* adhesion of parasite eggs to the vascular endothelium. Subsequent inhibition by a monoclonal antibody directed to a carbohydrate epitope. *Experimental parasitology*, 91(1), 20–29. <https://doi.org/10.1006/expr.1999.4348>
- Lemoine, S., Cadoret, A., El Mourabit, H., Thabut, D. & Housset, C. (2013). Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochimica et biophysica acta*, 1832(7), 948–954. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.02.019>
- Lin, L [L.], Amin, R., Gallicano, G. I., Glasgow, E., Jogunoori, W., Jessup, J. M., Zasloff, M., Marshall, J. L., Shetty, K., Johnson, L., Mishra, L. & He, A. R. (2009). The STAT3 inhibitor NSC 74859 is effective in hepatocellular cancers with disrupted TGF-beta signaling. *Oncogene*, 28(7), 961–972. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.448>
- Linder E. (2017). The Schistosome Egg in Transit. *Ann Clin Pathol*. Vorab-Onlinepublikation. <https://doi.org/10.47739/2373-9282>

- Liu, H., Wang, Y [Yuan], Zhou, Q., Gui, S.-Y. & Li, X. (2002). The point mutation of p53 gene exon7 in hepatocellular carcinoma from Anhui Province, a non HCC prevalent area in China. *World journal of gastroenterology*, 8(3), 480–482. <https://doi.org/10.3748/wjg.v8.i3.480>
- Liu, T [Tianju], Dhanasekaran, S. M., Jin, H., Hu, B., Tomlins, S. A., Chinnaiyan, A. M. & Phan, S. H. (2004). FIZZ1 stimulation of myofibroblast differentiation. *The American journal of pathology*, 164(4), 1315–1326. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63218-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63218-X)
- Liu, T [Tianshu], Ma, H., Shi, W., Duan, J., Wang, Y [Yina], Zhang, C., Li, C., Lin, J., Li, S., Lv, J. & Lin, L [Li] (2017). Inhibition of STAT3 signaling pathway by ursolic acid suppresses growth of hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology*, 51(2), 555–562. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4035>
- Liu, X., Lu, Y. & Qin, S. (2021). Atezolizumab and bevacizumab for hepatocellular carcinoma: mechanism, pharmacokinetics and future treatment strategies. *Future oncology (London, England)*, 17(17), 2243–2256. <https://doi.org/10.2217/fon-2020-1290>
- Liu, Y [Yan], Meyer, C., Müller, A., Herweck, F., Li, Q [Qi], Müllenbach, R., Mertens, P. R., Dooley, S. & Weng, H.-L. (2011). IL-13 induces connective tissue growth factor in rat hepatic stellate cells via TGF- β -independent Smad signaling. *The Journal of Immunology*, 187(5), 2814–2823. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003260>
- Liu, Z. G., Hsu, H., Goeddel, D. V. & Karin, M [M.] (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*, 87(3), 565–576. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81375-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81375-6)
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Llovet, J. M [J. M.], Brú, C. & Bruix, J [J.] (1999). Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Seminars in liver disease*, 19(3), 329–338. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1007122>
- Llovet, J. M [Josep M.], Kelley, R. K., Villanueva, A., Singal, A. G., Pikarsky, E., Roayaie, S., Lencioni, R., Koike, K., Zucman-Rossi, J. & Finn, R. S. (2021). *Hepatocellular carcinoma. The British advance: Bd. 7. Ancestors Unlimited.* <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>

- Llovet, J. M [Josep M.], Montal, R., Sia, D. & Finn, R. S. (2018). Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nature reviews. Clinical oncology*, 15(10), 599–616. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0073-4>
- Llovet, J. M [Josep M.], Real, M. I., Montaña, X., Planas, R., Coll, S., Aponte, J., Ayuso, C., Sala, M., Muchart, J., Solà, R., Rodés, J. & Bruix, J [Jordi] (2002). Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, 359(9319), 1734–1739. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08649-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08649-X)
- Lo, C.-M., Ngan, H., Tso, W.-K., Liu, C.-L., Lam, C.-M., Poon, R. T.-P., Fan, S.-T. & Wong, J. (2002). Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 35(5), 1164–1171. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.33156>
- Long, X., Chen, Q., Zhao, J., Rafaels, N., Mathias, P., Liang, H., Potee, J., Campbell, M., Zhang, B., Gao, L., Georas, S. N., Vercelli, D., Beaty, T. H., Ruczinski, I., Mathias, R., Barnes, K. C. & Chen, X. (2015). An IL-13 promoter polymorphism associated with liver fibrosis in patients with *Schistosoma japonicum*. *PloS one*, 10(8), e0135360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135360>
- Loosen, S. H., Schulze-Hagen, M., Leyh, C., Benz, F., Vucur, M., Kuhl, C., Trautwein, C., Tacke, F [Frank], Bruners, P., Roderburg, C. & Luedde, T [Tom] (2018). IL-6 and IL-8 Serum Levels Predict Tumor Response and Overall Survival after TACE for Primary and Secondary Hepatic Malignancies. *International journal of molecular sciences*, 19(6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061766>
- Löscher, T. & Burchard, G.-D. (2010). Tropenmedizin in Klinik und Praxis. In T. Löscher & G.-D. Burchard (Hrsg.), *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-002-35722>
- Lu, X.-L., Luo, J.-Y., Tao, M., Gen, Y., Zhao, P., Zhao, H.-L., Zhang, X.-D. & Dong, N. (2004). Risk factors for alcoholic liver disease in China. *World journal of gastroenterology*, 10(16), 2423–2426. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i16.2423>
- Lüllmann-Rauch, R. & Asan, E. (2019). *Taschenlehrbuch Histologie* (6., vollständig überarbeitete Auflage). George Thieme Verlag. <https://doi.org/242529>
- Lundy, S. K. & Lukacs, N. W. (2013). Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. *Frontiers in immunology*, 4, 39. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00039>

- Lurje, I., Hammerich, L. & Tacke, F [Frank] (2020). Dendritic Cell and T Cell Crosstalk in Liver Fibrogenesis and Hepatocarcinogenesis: Implications for Prevention and Therapy of Liver Cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(19). <https://doi.org/10.3390/ijms21197378>
- Macheret, M. & Halazonetis, T. D. (2015). DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annual review of pathology*, 10, 425–448. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040424>
- Machida, K., Tsukamoto, H., Liu, J.-C., Han, Y.-P., Govindarajan, S., Lai, M. M. C., Akira, S. & Ou, J.-H. J. (2010). c-Jun mediates hepatitis C virus hepatocarcinogenesis through signal transducer and activator of transcription 3 and nitric oxide-dependent impairment of oxidative DNA repair. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(2), 480–492. <https://doi.org/10.1002/hep.23697>
- Maki, A., Kono, H., Gupta, M., Asakawa, M., Suzuki, T., Matsuda, M., Fujii, H. & Rusyn, I. (2007). Predictive power of biomarkers of oxidative stress and inflammation in patients with hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Annals of surgical oncology*, 14(3), 1182–1190. <https://doi.org/10.1245/s10434-006-9049-1>
- Malek, N. P., Schmidt, S., Huber, P., Manns, M. P. & Greten, T. F. (2014). The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Deutsches Arzteblatt international*, 111(7), 101–106. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.0101>
- Mandayam, S., Jamal, M. M. & Morgan, T. R. (2004). Epidemiology of alcoholic liver disease. *Seminars in liver disease*, 24(3), 217–232. <https://doi.org/10.1055/s-2004-832936>
- Maréchal, A. & Zou, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012716>
- Marra, M., Sordelli, I. M., Lombardi, A., Lamberti, M., Tarantino, L., Giudice, A., Stiuso, P., Abbruzzese, A., Sperlongano, R., Accardo, M., Agresti, M., Caraglia, M. & Sperlongano, P. (2011). Molecular targets and oxidative stress biomarkers in hepatocellular carcinoma: an overview. *Journal of translational medicine*, 9, 171. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-171>
- Martel, C. de, Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D. & Plummer, M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The Lancet. Oncology*, 13(6), 607–615. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70137-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70137-7)
- Martinon, F. (2010). Signaling by ROS drives inflammasome activation. *European journal of immunology*, 40(3), 616–619. <https://doi.org/10.1002/eji.200940168>

- Masamba, P. & Kappo, A. P. (2021). Immunological and Biochemical Interplay between Cytokines, Oxidative Stress and Schistosomiasis. *International journal of molecular sciences*, 22(13). <https://doi.org/10.3390/ijms22137216>
- Matés, J. M., Pérez-Gómez, C. & Núñez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*, 32(8), 595–603. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(99\)00075-2](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(99)00075-2)
- Mathieson, W. & Wilson, R. A [R. Alan] (2010). A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions. *International journal for parasitology*, 40(5), 617–628. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.10.014>
- Matsui, O., Kobayashi, S., Sanada, J., Kouda, W., Ryu, Y., Kozaka, K., Kitao, A., Nakamura, K. & Gabata, T. (2011). Hepatocellular nodules in liver cirrhosis: hemodynamic evaluation (angiography-assisted CT) with special reference to multi-step hepatocarcinogenesis. *Abdominal imaging*, 36(3), 264–272. <https://doi.org/10.1007/s00261-011-9685-1>
- McCoy, K., Camberis, M. & Gros, G. L. (1997). Protective immunity to nematode infection is induced by CTLA-4 blockade. *The Journal of experimental medicine*, 186(2), 183–187. <https://doi.org/10.1084/jem.186.2.183>
- McKee, A. S. & Pearce, E. J [Edward J.] (2004). CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(2), 1224–1231. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.1224>
- McManus, D. P., Dunne, D. W [David W.], Sacko, M., Utzinger, J., Vennervald, B. J [Birgitte J.] & Zhou, X.-N. (2018). Schistosomiasis. *Nature reviews. Disease primers*, 4(1), 13. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0013-8>
- Meng, N., Xia, M., Lu, Y.-Q., Wang, M., Boini, K. M., Li, P.-L. & Tang, W.-X. (2016). Activation of NLRP3 inflammasomes in mouse hepatic stellate cells during *Schistosoma J.* infection. *Oncotarget*, 7(26), 39316–39331. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10044>
- Meng, T.-C., Fukada, T. & Tonks, N. K. (2002). Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases *in vivo*. *Molecular cell*, 9(2), 387–399. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00445-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00445-8)
- Messerli, S. M., Kasinathan, R. S., Morgan, W., Spranger, S. & Greenberg, R. M. (2009). *Schistosoma mansoni* P-glycoprotein levels increase in response to praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel susceptibility. *Molecular and biochemical parasitology*, 167(1), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.04.007>

- Mitchell, D. G., Bruix, J [Jordi], Sherman, M. & Sirlin, C. B. (2015). LI-RADS (Liver Imaging Reporting and Data System): summary, discussion, and consensus of the LI-RADS Management Working Group and future directions. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 61(3), 1056–1065. <https://doi.org/10.1002/hep.27304>
- Morgan, W. F., Corcoran, J., Hartmann, A., Kaplan, M. I., Limoli, C. L. & Ponnaiya, B. (1998). DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability. *Mutation research*, 404(1-2), 125–128. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(98\)00104-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(98)00104-3)
- Murray, P. J. (2007). The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(5), 2623–2629. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2623>
- Mutengo, M. M., Mduluzza, T., Kelly, P., Mwansa, J. C. L., Kwenda, G., Musonda, P. & Chipeta, J. (2018). Low IL-6, IL-10, and TNF- α and High IL-13 Cytokine Levels Are Associated with Severe Hepatic Fibrosis in *Schistosoma mansoni* Chronically Exposed Individuals. *Journal of parasitology research*, 2018, 9754060. <https://doi.org/10.1155/2018/9754060>
- Nakagawa, H., Maeda, S., Yoshida, H., Tateishi, R., Masuzaki, R., Ohki, T., Hayakawa, Y., Kinoshita, H., Yamakado, M., Kato, N., Shiina, S. & Omata, M. (2009). Serum IL-6 levels and the risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients: an analysis based on gender differences. *International journal of cancer*, 125(10), 2264–2269. <https://doi.org/10.1002/ijc.24720>
- Neeshma Jaiswal, R. T. & Sandeep K, B. S. (2015). Helminth Infections Mediated DNA Damage: Mechanisms and Consequences. *Single Cell Biology*, 04(03). <https://doi.org/10.4172/2168-9431.1000117>
- Ni, Y., Li, J.-M., Liu, M.-K., Zhang, T.-T., Wang, D.-P., Zhou, W.-H., Hu, L.-Z. & Lv, W.-L. (2017). Pathological process of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases. *World journal of gastroenterology*, 23(43), 7666–7677. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i43.7666>
- Nijhuis, J., Rensen, S. S., Slaats, Y., van Dielen, F. M. H., Buurman, W. A. & Greve, J. W. M. (2009). Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 17(11), 2014–2018. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.113>
- O'Day, S. J., Hamid, O. & Urba, W. J. (2007). Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4): a novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies. *Cancer*, 110(12), 2614–2627. <https://doi.org/10.1002/cncr.23086>

- Ohshima, H. & Bartsch, H [H.] (1994). Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutation research*, 305(2), 253–264. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90245-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90245-3)
- Oken, M. M., Creech, R. H., Tormey, D. C., Horton, J., Davis, T. E., McFadden, E. T. & Carbone, P. P. (1982). Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*, 5(6), 649–656. <https://doi.org/10.1097/00000421-198212000-00014>
- Oliveira Fraga, L. A. de, Torrero, M. N., Tocheva, A. S., Mitre, E. & Davies, S. J. (2010). Induction of type 2 responses by schistosome worms during prepatent infection. *The Journal of infectious diseases*, 201(3), 464–472. <https://doi.org/10.1086/649841>
- Olveda, D. U., Olveda, R. M., McManus, D. P., Cai, P., Chau, T. N. P., Lam, A. K., Li, Y., Harn, D. A [Donald A.], Vinluan, M. L. & Ross, A. G. P. (2014). The chronic enteropathogenic disease schistosomiasis. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 28, 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.07.009>
- O'Shea, J. J. & Plenge, R. (2012). JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity*, 36(4), 542–550. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.014>
- Osuka, A., Hanschen, M., Stoecklein, V. & Lederer, J. A. (2012). A protective role for inflammasome activation following injury. *Shock (Augusta, Ga.)*, 37(1), 47–55. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318234f7ff>
- Ozden, M., Maral, H., Akaydin, D., Cetinalp, P. & Kalender, B. (2002). Erythrocyte glutathione peroxidase activity, plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in hemodialysis and CAPD patients. *Clinical biochemistry*, 35(4), 269–273. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(02\)00307-7](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(02)00307-7)
- Palumbo, E. (2007). Association Between Schistosomiasis and Cancer. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 15(3), 145–148. <https://doi.org/10.1097/01.idc.0000269904.90155.ce>
- Patz, J. A., Graczyk, T. K., Geller, N. & Vittor, A. Y. (2000). Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *International journal for parasitology*, 30(12-13), 1395–1405. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00141-7)
- Pearce, E. J [Edward J.] & MacDonald, A. S. (2002). The immunobiology of schistosomiasis. *Nature reviews. Immunology*, 2(7), 499–511. <https://doi.org/10.1038/nri843>

- Pennington, L. F., Alouffi, A., Mbanefo, E. C., Ray, D., Heery, D. M., Jardetzky, T. S., Hsieh, M. H. & Falcone, F. H. (2017). H-IPSE Is a Pathogen-Secreted Host Nucleus-Infiltrating Protein (Infiltrin) Expressed Exclusively by the *Schistosoma haematobium* Egg Stage. *Infection and immunity*, 85(12).
<https://doi.org/10.1128/IAI.00301-17>
- Percy, D. H., Barthold, S. W. & Griffey, S. M. (Hrsg.). (2016). *Pathology of laboratory rodents and rabbits* (Fourth edition). John Wiley & Sons Inc.
- Pfeil, J., Wenning, D. & Kapaun, A. (2017). Geschwister mit Fieber und Eosinophilie. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 165(8), 654–658.
<https://doi.org/10.1007/s00112-017-0341-x>
- Pisarski, K. (2019). The Global Burden of Disease of Zoonotic Parasitic Diseases: Top 5 Contenders for Priority Consideration. *Tropical medicine and infectious disease*, 4(1). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010044>
- Porta, C., Riboldi, E. & Sica, A. (2011). Mechanisms linking pathogens-associated inflammation and cancer. *Cancer letters*, 305(2), 250–262.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.10.012>
- Qian, G. S., Ross, R. K., Yu, M. C., Yuan, J. M., Gao, Y. T., Henderson, B. E., Wogan, G. N. & Groopman, J. D. (1994). A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 3(1), 3–10. PMID: 8118382.
- Rahma, O. E. & Hodi, F. S. (2019). The Intersection between Tumor Angiogenesis and Immune Suppression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 25(18), 5449–5457.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1543>
- Rassow, J., Netzker, R. & Hauser, K. (2022). *Duale Reihe Biochemie* (5. Aufl.). *Duale Reihe*. Thieme.
- Rebouissou, S., Amessou, M., Couchy, G., Poussin, K., Imbeaud, S., Pilati, C., Izard, T., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P. & Zucman-Rossi, J. (2008). Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature*, 457(7226), 200–204. <https://doi.org/10.1038/nature07475>
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free radical biology & medicine*, 49(11), 1603–1616.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>

- Ritter, D. M. & McKerrow, J. H. (1996). Intercellular adhesion molecule 1 is the major adhesion molecule expressed during schistosome granuloma formation. *Infection and immunity*, 64(11), 4706–4713.
<https://doi.org/10.1128/iai.64.11.4706-4713.1996>
- Robert Koch-Institut (Hrsg.)(2011). Steckbriefe seltener und importierter Infektionskrankheiten (Neuauf.). Robert-Koch-Inst.
- Rockey, D. C. (2001). Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Seminars in liver disease*, 21(3), 337–349.
<https://doi.org/10.1055/s-2001-17551>
- Roderfeld, M., Padem, S., Lichtenberger, J., Quack, T., Weiskirchen, R [Ralf], Longerich, T [Thomas], Schramm, G., Churin, Y., Irunbam, K., Tschuschner, A., Windhorst, A., Grevelding, C. G. & Roeb, E [Elke] (2020). Schistosoma mansoni Egg-Secreted Antigens Activate Hepatocellular Carcinoma-Associated Transcription Factors c-Jun and STAT3 in Hamster and Human Hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 72(2), 626–641.
<https://doi.org/10.1002/hep.30192>
- Roeb, E., Canbay, A., Bantel, H., Bojunga, J., de Laffolie, J., Demir, M., Denzer, U. W., Geier, A., Hofmann, W. P., Hudert, C., Karlas, T., Krawczyk, M., Longerich, T., Lüdde, T., Roden, M., Schattenberg, J. M., Sterneck, M., Tannapfel, A., Lorenz, P., Tacke, F. (März 2024). *Amendment „Neue Nomenklatur zur MASLD (Metabolic Dysfunction Associated Steatotic Liver Disease; metabolische Dysfunktion assoziierte steatotische Leber- erkrankung)“ zur S2k-Leitlinie „Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung“ (v.2.0 / April 2022) der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) [AWMF-Registernummer: 021-025]*. https://www.dgvs.de/wp-content/uploads/2023/04/LL-NAFLD-Amendment_final_06.03.2024.pdf
- Roeb, E [E.], Canbay, A., Bantel, H., Bojunga, J., Laffolie, J. de, Demir, M., Denzer, U. W., Geier, A., Hofmann, W. P., Hudert, C., Karlas, T., Krawczyk, M., Longerich, T [T.], Luedde, T [T.], Roden, M., Schattenberg, J., Sterneck, M., Tannapfel, A., Lorenz, P. & Tacke, F [F.] (2022). Aktualisierte S2k-Leitlinie nicht-alkoholische Fettlebererkrankung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) – April 2022 – AWMF-Registernummer: 021–025 [Not Available]. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 60(9), 1346–1421. <https://doi.org/10.1055/a-1880-2283>
- Roeb, E [E.], Steffen, H. M., Bantel, H., Baumann, U., Canbay, A., Demir, M., Drebber, U., Geier, A., Hampe, J., Hellerbrand, C., Pathil-Warth, A., Schattenberg, J. M., Schramm, C., Seitz, H. K., Stefan, N., Tacke, F [F.]

- Tannapfel, A., Lynen Jansen, P. & Bojunga, J. (2015). S2k-Leitlinie nicht alkoholische Fettlebererkrankungen [S2k Guideline non-alcoholic fatty liver disease]. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 53(7), 668–723.
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1553193>
- Roeb, E [Elke] (2023). Interleukin-13 (IL-13)-A Pleiotropic Cytokine Involved in Wound Healing and Fibrosis. *International journal of molecular sciences*, 24(16).
<https://doi.org/10.3390/ijms241612884>
- Rose-John, S., Jenkins, B. J., Garbers, C., Moll, J. M. & Scheller, J. (2023). Targeting IL-6 trans-signalling: past, present and future prospects. *Nature reviews. Immunology*, 23(10), 666–681. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00856-y>
- Ross, A. G., Vickers, D., Olds, G. R., Shah, S. M. & McManus, D. P. (2007). Katayama syndrome. *The Lancet. Infectious diseases*, 7(3), 218–224.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70053-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70053-1)
- Rosser, E. C. & Mauri, C. (2015). Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*, 42(4), 607–612. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.005>
- Russ, L., Bülow, V. von, Wrobel, S., Stettler, F., Schramm, G., Falcone, F. H., Grevelding, C. G., Roderfeld, M. & Roeb, E [Elke] (2024). Inverse Correlation of Th2-Specific Cytokines with Hepatic Egg Burden in *S. mansoni*-Infected Hamsters. *Cells*, 13(18). <https://doi.org/10.3390/cells13181579>
- Russell, H. J., Penney, J. M. S., Linder, C., Joekes, E. C., Bustinduy, A. L., Stothard, J. R., Rakotomampianina, D. A. L., Andriamasy, E. H., Mahary, L. R., Ranjanoro, E. P., Rahetilahy, A. M. & Spencer, S. A. (2020). A cross-sectional study of periportal fibrosis and *Schistosoma mansoni* infection among school-aged children in a hard-to-reach area of Madagascar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 114(4), 315–322.
<https://doi.org/10.1093/trstmh/traa009>
- Sadler, J. E. (1998). Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annual review of biochemistry*, 67, 395–424.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.395>
- Salim, E. I., Morimura, K., Menesi, A., El-Lity, M., Fukushima, S. & Wanibuchi, H. (2008). Elevated oxidative stress and DNA damage and repair levels in urinary bladder carcinomas associated with schistosomiasis. *International journal of cancer*, 123(3), 601–608. <https://doi.org/10.1002/ijc.23547>
- Samman, B. S., Hussein, A., Samman, R. S. & Alharbi, A. S. (2022). Common Sensitive Diagnostic and Prognostic Markers in Hepatocellular Carcinoma and Their Clinical Significance: A Review. *Cureus*, 14(4), e23952.
<https://doi.org/10.7759/cureus.23952>

- Sandler, N. G., Mentink-Kane, M. M., Cheever, A. W [Allen W.] & Wynn, T. A [Thomas A.] (2003). Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(7), 3655–3667. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.7.3655>
- Sandow, T., Pavlus, J., Field, D., Lacayo, E., Cohen, E., Lynskey, G., Caridi, T., Buckley, D., Cardella, J., Kallakury, B., Spies, J. & Kim, A. Y. (2019). Bridging Hepatocellular Carcinoma to Transplant: Transarterial Chemoembolization Response, Tumor Biology, and Recurrence after Transplantation in a 12-Year Transplant Cohort. *Journal of vascular and interventional radiology: JVIR*, 30(7), 995–1003. <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2018.12.736>
- Savioli, L [Lorenzo], Stansfield, S., Bundy, D. A. P., Mitchell, A., Bhatia, R., Engels, D [Dirk], Montresor, A [Antonio], Neira, M. & Shein, A. M. (2002). Schistosomiasis and soil-transmitted helminth infections: forging control efforts. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(6), 577–579. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(02\)90316-0](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(02)90316-0)
- Schetter, A. J., Heegaard, N. H. H. & Harris, C. C. (2010). Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*, 31(1), 37–49. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp272>
- Schramm, G., Falcone, F. H., Gronow, A., Haisch, K., Mamat, U., Doenhoff, M. J [Michael J.], Oliveira, G., Galle, J., Dahinden, C. A. & Haas, H. (2003). Molecular characterization of an interleukin-4-inducing factor from *Schistosoma mansoni* eggs. *The Journal of biological chemistry*, 278(20), 18384–18392. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300497200>
- Schulze, K., Imbeaud, S., Letouzé, E., Alexandrov, L. B., Calderaro, J., Rebouissou, S., Couchy, G., Meiller, C., Shinde, J., Soysouvanh, F., Calatayud, A.-L., Pinyol, R., Pelletier, L., Balabaud, C., Laurent, A., Blanc, J.-F [Jean-Frederic], Mazzaferro, V., Calvo, F., Villanueva, A., . . . Zucman-Rossi, J. (2015). Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nature genetics*, 47(5), 505–511. <https://doi.org/10.1038/ng.3252>
- Schwartz, C. & Fallon, P. G [Padraic G.] (2018). *Schistosoma* "Eggs-Iting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Frontiers in immunology*, 9, 2492. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02492>
- Secor, W. E [W. E.], dos Reis, M. G., Ramos, E. A., Matos, E. P., Reis, E. A., do Carmo, T. M. & Harn, D. A [D. A.] (1994). Soluble intercellular adhesion molecules in human schistosomiasis: correlations with disease severity and

- decreased responsiveness to egg antigens. *Infection and immunity*, 62(7), 2695–2701. <https://doi.org/10.1128/iai.62.7.2695-2701.1994>
- Seehawer, M., Heinzmann, F., D'Artista, L., Harbig, J., Roux, P.-F., Hoenicke, L., Dang, H., Klotz, S., Robinson, L., Doré, G., Rozenblum, N., Kang, T.-W., Chawla, R., Buch, T., Vucur, M., Roth, M., Zuber, J., Luedde, T [Tom], Sipos, B., . . . Zender, L. (2018). Necroptosis microenvironment directs lineage commitment in liver cancer. *Nature*, 562(7725), 69–75. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0519->
- Seril, D. N., Liao, J., Yang, G.-Y. & Yang, C. S. (2003). Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis*, 24(3), 353–362. <https://doi.org/10.1093/carcin/24.3.353>
- Shakil, A. O., Conry-Cantilena, C., Alter, H. J., Hayashi, P., Kleiner, D. E [D. E.], Tedeschi, V., Krawczynski, K., Conjeevaram, H. S., Sallie, R. & Di Bisceglie, A. M. (1995). Volunteer blood donors with antibody to hepatitis C virus: clinical, biochemical, virologic, and histologic features. The Hepatitis C Study Group. *Annals of internal medicine*, 123(5), 330–337. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-123-5-199509010-00002>
- Sharma, P., Welch, K., Hussain, H., Pelletier, S. J., Fontana, R. J., Marrero, J. & Merion, R. M. (2012). Incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation in the MELD era. *Digestive diseases and sciences*, 57(3), 806–812. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1910-9>
- Shen, X., Li, N., Li, H., Zhang, T., Wang, F. & Li, Q [Qiang] (2010). Increased prevalence of regulatory T cells in the tumor microenvironment and its correlation with TNM stage of hepatocellular carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 136(11), 1745–1754. <https://doi.org/10.1007/s00432-010-0833-8>
- Sher, Y.-P. & Hung, M.-C. (2013). *Blood AST, ALT and UREA/BUN Level Analysis*. <https://en.bio-protocol.org/en/bpdetail?id=931&type=0>. (Zugriff am: 17.01.2025).
- Shousha, H. I., Abdelaziz, A. O., Nabeel, M. M., Omran, D. A., Abdelmaksoud, A. H., Elbaz, T. M., Salah, A., Harb, S. T. E., Hosny, K. A., Osman, A., Atef, M., Gaber, A., Zayed, N. A., Yosry, A. A. & Leithy, R. (2022). Schistosoma mansoni infection and the occurrence, characteristics, and survival of patients with hepatocellular carcinoma: an observational study over a decade. *Pathogens and global health*, 116(2), 119–127. <https://doi.org/10.1080/20477724.2021.1975081>

- Sies, H., Berndt, C. & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A. & Jeyasekharan, A. D. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox biology*, 25, 101084. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>
- Stadecker, M. J [Miguel J.], Asahi, H., Finger, E., Hernandez, H. J., Rutitzky, L. I. & Sun, J [Jing] (2004). The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunological reviews*, 201, 168–179. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00197.x>
- Stark, G. R. & Darnell, J. E. (2012). The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*, 36(4), 503–514. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.013>
- Starley, B. Q., Calcagno, C. J. & Harrison, S. A. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(5), 1820–1832. <https://doi.org/10.1002/hep.23594>
- Stegemann, H. & Stalder, K. (1967). Determination of hydroxyproline. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 18(2), 267–273. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(67\)90167-2](https://doi.org/10.1016/0009-8981(67)90167-2)
- Steinfelder, S., Andersen, J. F., Cannons, J. L., Feng, C. G., Joshi, M., Dwyer, D., Caspar, P [Pat], Schwartzberg, P. L., Sher, A [Alan] & Jankovic, D. (2009). The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). *The Journal of experimental medicine*, 206(8), 1681–1690. <https://doi.org/10.1084/jem.20082462>
- Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M. & Utzinger, J. (2006). Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *The Lancet. Infectious diseases*, 6(7), 411–425. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70521-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70521-7)
- Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E. & Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature*, 481(7381), 278–286. <https://doi.org/10.1038/nature10759>
- Subramaniam, A., Shanmugam, M. K., Perumal, E., Li, F., Nachiyappan, A., Dai, X., Swamy, S. N., Ahn, K. S., Kumar, A. P., Tan, B. K. H., Hui, K. M. & Sethi, G. (2013). Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma. *Biochimica et biophysica acta*, 1835(1), 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.10.002>

- Sugimoto, R., Enjoji, M., Nakamuta, M., Ohta, S., Kohjima, M., Fukushima, M., Kuniyoshi, M., Arimura, E., Morizono, S., Kotoh, K. & Nawata, H. (2005). *Effect of IL-4 and IL-13 on collagen production in cultured LI90 human hepatic stellate cells* (Nr. 2). <http://arxiv.org/pdf/2005.01087v1> <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2005.01087.x>
- Sutti, S. & Albano, E. (2020). Adaptive immunity: an emerging player in the progression of NAFLD. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 17(2), 81–92. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0210-2>
- Suvarna, K. S., Layton, C. & Bancroft, J. D. (Hrsg.). (2018). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques E-Book* (8th ed.). Elsevier.
- Svinka, J., Mikulits, W. & Eferl, R. (2014). STAT3 in hepatocellular carcinoma: new perspectives. *Hepatic oncology*, 1(1), 107–120. <https://doi.org/10.2217/hep.13.7>
- Taylor, E. M. & Lindsay, H. D. (2016). DNA replication stress and cancer: cause or cure? *Future oncology (London, England)*, 12(2), 221–237. <https://doi.org/10.2217/fon.15.292>
- Taylor, J. J., Krawczyk, C. M., Mohrs, M. & Pearce, E. J [Edward J.] (2009). Th2 cell hyporesponsiveness during chronic murine schistosomiasis is cell intrinsic and linked to GRAIL expression. *The Journal of clinical investigation*, 119(4), 1019–1028. <https://doi.org/10.1172/JCI36534>
- Taylor, M. D., LeGoff, L., Harris, A., Malone, E., Allen, J. E. & Maizels, R. M. (2005). Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance *in vivo*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(8), 4924–4933. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.4924>
- Tchuem Tchuenté, L.-A., Rollinson, D., Stothard, J. R. & Molyneux, D. (2017). Moving from control to elimination of schistosomiasis in sub-Saharan Africa: time to change and adapt strategies. *Infectious diseases of poverty*, 6(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0256-8>
- Thelen, M., Dewald, B. & Baggiolini, M. (1993). Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiological reviews*, 73(4), 797–821. <https://doi.org/10.1152/physrev.1993.73.4.797>
- Tolba, R., Kraus, T., Liedtke, C., Schwarz, M. & Weiskirchen, R [R.] (2015). Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. *Laboratory animals*, 49(1 Suppl), 59–69. <https://doi.org/10.1177/0023677215570086>
- Trierweiler, C., Hockenjos, B., Zatloukal, K., Thimme, R., Blum, H. E., Wagner, E. F. & Hasselblatt, P. (2016). The transcription factor c-JUN/AP-1 promotes HBV-related liver tumorigenesis in mice. *Cell death and differentiation*, 23(4), 576–582. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.121>

- Trinchet, J.-C., Bourcier, V., Chaffaut, C., Ait Ahmed, M., Allam, S., Marcellin, P., Guyader, D., Pol, S., Larrey, D., Lédinthen, V. de, Ouzan, D., Zoulim, F., Roulot, D., Tran, A., Bronowicki, J.-P., Zarski, J.-P., Gorla, O., Calès, P., Péron, J.-M., . . . Chevret, S. (2015). Complications and competing risks of death in compensated viral cirrhosis (ANRS CO12 CirVir prospective cohort). *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *62*(3), 737–750. <https://doi.org/10.1002/hep.27743>
- Tsilimigras, D. I., Aziz, H. & Pawlik, T. M. (2022). Critical Analysis of the Updated Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Group Guidelines. *Annals of surgical oncology*, *29*(12), 7231–7234. <https://doi.org/10.1245/s10434-022-12242-4>
- Tsuchida, T. & Friedman, S. L. (2017). Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, *14*(7), 397–411. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38>
- Turgeon, M.-O., Perry, N. J. S. & Poulogiannis, G. (2018). DNA Damage, Repair, and Cancer Metabolism. *Frontiers in oncology*, *8*, 15. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00015>
- Turner, H. C., French, M. D., Montresor, A [Antonio], King, C. H., Rollinson, D. & Toor, J. (2020). Economic evaluations of human schistosomiasis interventions: a systematic review and identification of associated research needs. *Wellcome Open Research*, *5*, 45. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15754.1>
- Turner, P. C., Sylla, A., Diallo, M. S., Castegnaro, J.-J., Hall, A. J. & Wild, C. P. (2002). The role of aflatoxins and hepatitis viruses in the etiopathogenesis of hepatocellular carcinoma: A basis for primary prevention in Guinea-Conakry, West Africa. *Journal of gastroenterology and hepatology*, *17 Suppl*, S441-8. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.17.s4.7.x>
- Tzartzeva, K., Obi, J., Rich, N. E., Parikh, N. D., Marrero, J. A., Yopp, A., Waljee, A. K. & Singal, A. G. (2018). Surveillance Imaging and Alpha Fetoprotein for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis: A Meta-analysis. *Gastroenterology*, *154*(6), 1706-1718.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.01.064>
- Ulfig, N. (2019). *Kurzlehrbuch Histologie* (5., unveränderte Auflage). *Kurzlehrbuch*. Georg Thieme Verlag.
- van Dam, G. J [G. J.], Bogitsh, B. J., van Zeyl, R. J., Rotmans, J. P. & Deelder, A. M [A. M.] (1996). Schistosoma mansoni: *in vitro* and *in vivo* excretion of CAA and CCA by developing schistosomula and adult worms. *The Journal of parasitology*, *82*(4), 557–564. PMID: 8691363.
- van Dam, G. J [Govert J.], Dood, C. J. de, Lewis, M., Deelder, A. M [André M.], van Lieshout, L [Lisette], Tanke, H. J., van Rooyen, L. H. & Corstjens, P. L. A. M.

- (2013). A robust dry reagent lateral flow assay for diagnosis of active schistosomiasis by detection of Schistosoma circulating anodic antigen. *Experimental parasitology*, 135(2), 274–282.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.06.017>
- van Tong, H., Brindley, P. J., Meyer, C. G. & Velavan, T. P. (2017). Parasite Infection, Carcinogenesis and Human Malignancy. *EBioMedicine*, 15, 12–23.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.11.034>
- Vella, A. T., Hulsebosch, M. D. & Pearce, E. J [E. J.] (1992). Schistosoma mansoni eggs induce antigen-responsive CD44-hi T helper 2 cells and IL-4-secreting CD44-lo cells. Potential for T helper 2 subset differentiation is evident at the precursor level. *The Journal of Immunology*, 149(5), 1714–1722.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.149.5.1714>
- Vennervald, B. J [B. J.] & Polman, K [K.] (2009). Helminths and malignancy. *Parasite immunology*, 31(11), 686–696. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01163.x>
- Vennervald, B. J [Birgitte J.] & Dunne, D. W [David W.] (2004). Morbidity in schistosomiasis: an update. *Current opinion in infectious diseases*, 17(5), 439–447. <https://doi.org/10.1097/00001432-200410000-00009>
- Vicentino, A. R. R., Carneiro, V. C., Allonso, D., Guilherme, R. d. F., Benjamim, C. F., Dos Santos, H. A. M., Xavier, F., Pyrrho, A. D. S., Gomes, J. d. A. S., Fonseca, M. d. C., Oliveira, R. C. de, Pereira, T. A., Ladislau, L., Lambertucci, J. R. & Fantappiè, M. R. (2018). Emerging Role of HMGB1 in the Pathogenesis of Schistosomiasis Liver Fibrosis. *Frontiers in immunology*, 9, 1799. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01979>
- Villanueva, A. (2019). Hepatocellular Carcinoma. *The New England journal of medicine*, 380(15), 1450–1462. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1713263>
- Vogel, A., Cervantes, A., Chau, I., Daniele, B., Llovet, J. M [J. M.], Meyer, T., Nault, J.-C., Neumann, U., Ricke, J., Sangro, B [B.], Schirmacher, P., Verslype, C., Zech, C. J., Arnold, D. & Martinelli, E. (2018). Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 29(Suppl 4), iv238-iv255.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdy308>
- Waghray, A., Murali, A. R. & Menon, K. N. (2015). Hepatocellular carcinoma: From diagnosis to treatment. *World journal of hepatology*, 7(8), 1020–1029.
<https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i8.1020>

- Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation*, 10(1), 45–65.
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401189>
- Wang, J. & Tai, G. (2016). Role of C-Jun N-terminal Kinase in Hepatocellular Carcinoma Development. *Targeted oncology*, 11(6), 723–738.
<https://doi.org/10.1007/s11523-016-0446-5>
- Welch, H. G. & Black, W. C. (2010). Overdiagnosis in cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(9), 605–613. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq099>
- Weltgesundheitsorganisation (Hrsg.). (2003). *WHO technical report series: Bd. 912. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: Report of a WHO Expert Committee*. World Health Organization.
- Weltgesundheitsorganisation (Hrsg.). (2006). *Preventive chemotherapy in human helminthiasis: Coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions ; a manual for health professionals and programme managers*. World Health Organization.
- WHO Globocan. (2020). *All cancers*.
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>
- Włodarski, A., Strycharz, J., Wróblewski, A., Kasznicki, J., Drzewoski, J. & Śliwińska, A. (2020). The Role of microRNAs in Metabolic Syndrome-Related Oxidative Stress. *International journal of molecular sciences*, 21(18).
<https://doi.org/10.3390/ijms21186902>
- WOESSNER, J. F. (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Archives of biochemistry and biophysics*, 93, 440–447. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90291-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90291-0)
- Wong, V. W.-S., Yu, J., Cheng, A. S.-L., Wong, G. L.-H., Chan, H.-Y., Chu, E. S.-H., Ng, E. K.-O., Chan, F. K.-L., Sung, J. J.-Y. & Chan, H. L.-Y. (2009). High serum interleukin-6 level predicts future hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis B. *International journal of cancer*, 124(12), 2766–2770. <https://doi.org/10.1002/ijc.24281>
- Wu, C. H., Giambone, M. A., Howard, D. J., Rojkind, M. & Wu, G. Y. (1982). The nature of the collagen in hepatic fibrosis in advanced murine schistosomiasis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2(3), 366–371.
<https://doi.org/10.1002/hep.1840020313>
- Wu, Y. P., Lenting, P. J., Tielens, A. G. M [A. G. M.], Groot, P. G. de [P. G.] & van Hellemond, J. J [J. J.] (2007). Differential platelet adhesion to distinct life-cycle stages of the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *Journal of thrombosis*

- and haemostasis: JTH*, 5(10), 2146–2148. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02725.x>
- Wynn, T. A [Thomas A.], Cheever, A. W [Allen W.], Williams, M. E [Megan E.], Hieny, S [Sara], Caspar, P [Pat], Kühn, R., Müller, W. & Sher, A [Alan] (1998). IL-10 Regulates Liver Pathology in Acute Murine Schistosomiasis mansoni But Is Not Required for Immune Down-Modulation of Chronic Disease. *The Journal of Immunology*, 160(9), 4473–4480. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.160.9.4473>
- Wynn, T. A [Thomas A.], Thompson, R. W., Cheever, A. W [Allen W.] & Mentink-Kane, M. M. (2004). Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological reviews*, 201, 156–167. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00176.x>
- Yamada, K., Yamamiya, I. & Utsumi, H. (2006). *In vivo* detection of free radicals induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue. *Free radical biology & medicine*, 40(11), 2040–2046. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.01.031>
- Yang, H.-I., Lu, S.-N., Liaw, Y.-F., You, S.-L., Sun, C.-A., Wang, L.-Y., Hsiao, C. K., Chen, P.-J., Chen, D.-S. & Chen, C.-J. (2002). Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *The New England journal of medicine*, 347(3), 168–174. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa013215>
- Yang, J., Xu, Z.-P., Huang, Y [Yun], Hamrick, H. E., Duerksen-Hughes, P. J. & Yu, Y.-N. (2004). ATM and ATR: sensing DNA damage. *World journal of gastroenterology*, 10(2), 155–160. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i2.155>
- Yang, S.-F., Chang, C.-W., Wei, R.-J., Shiue, Y.-L., Wang, S.-N. & Yeh, Y.-T. (2014). Involvement of DNA damage response pathways in hepatocellular carcinoma. *BioMed research international*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/153867>
- Ying, L., Hofseth, A. B., Browning, D. D., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P. S. & Hofseth, L. J. (2007). Nitric oxide inactivates the retinoblastoma pathway in chronic inflammation. *Cancer research*, 67(19), 9286–9293. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2238>
- Yuan, D., Huang, S., Berger, E., Liu, L., Gross, N., Heinzmann, F., Ringelhan, M., Connor, T. O., Stadler, M., Meister, M., Weber, J., Öllinger, R., Simonavicius, N., Reisinger, F., Hartmann, D., Meyer, R., Reich, M [Maria], Seehawer, M., Leone, V., . . . Heikenwalder, M. (2017). Kupffer Cell-Derived Tnf Triggers Cholangiocellular Tumorigenesis through JNK due to Chronic Mitochondrial Dysfunction and ROS. *Cancer cell*, 31(6), 771-789.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.05.006>

- Yuan, L., Huang, Y [Yixing] & Maier, A. (2020, 2. Mai). *Projection Inpainting Using Partial Convolution for Metal Artifact Reduction*.
<http://arxiv.org/pdf/2005.00762v1>
- Zheng, B., Zhang, J., Chen, H., Nie, H., Miller, H., Gong, Q. & Liu, C. (2020). T Lymphocyte-Mediated Liver Immunopathology of Schistosomiasis. *Frontiers in immunology*, 11, 61. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00061>
- Zhong, H., Gui, X., Hou, L., Lv, R. & Jin, Y. (2022). From Inflammation to Fibrosis: Novel Insights into the Roles of High Mobility Group Protein Box 1 in Schistosome-Induced Liver Damage. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/pathogens11030289>

14 Publikationen

Originalarbeiten

von Bülow V, **Schneider M**, Dreizler D, Russ L, Baier A, Buss N, Lichtenberger J, Härle L, Müller H, Tschuschner A, Schramm G, Pons-Kühnemann J, Grevelding CG, Roeb E, Roderfeld M. Schistosoma mansoni-Induced Oxidative Stress Triggers Hepatocellular Proliferation. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2024;17(1):107-117. doi: 10.1016/j.jcmgh.2023.08.014. Epub 2023 Sep 9. PMID: 37696392; PMCID: PMC10665951.

Zitierbare Abstracts

Verena von Bülow, Pavez Ghezellou, Lukas Härle, Jonas Stöckmann, **Maryam Schneider**, Gabriele Schramm, Bernhard Spengler, Christoph G. Grevelding, Martin Roderfeld, Elke Roeb. Minichromosome maintenance (MCM) protein complex is upregulated in hepatocytes of Schistosoma mansoni-infected hamsters. Abstract, Conference: GASL 2023. Zeitschrift für Gastroenterologie 2023,61(1). DOI: 10.1055/s-0042-1760002

Maryam Schneider, Verena von Bülow, Jonas R. Stöckmann, Annette Tschuschner, Heike Müller, Christoph G. Grevelding, Martin Roderfeld, Elke Roeb. Schistosoma mansoni verstärkt die hepatozelluläre Proliferation bei Diethylnitrosamin-induzierter Karzinogenese. Abstract, Conference: GASL 2023. Zeitschrift für Gastroenterologie 2023,61(1). DOI: 10.1055/s-0042-1760004

Maryam Schneider, Verena von Bülow, Jonas R. Stöckmann, Annette Tschuschner, Heike Müller, Christoph G. Grevelding, Martin Roderfeld, Elke Roeb. *Schistosoma mansoni* potentiates hepatocellular DNA replication in a mouse model for hepatocarcinogenesis. Abstract, Conference: DGIM 2023. Inn Med 2023;64(Suppl 1):28. doi:10.1007/s00108-023-01509-x.

Nominierung für den Young Investigator Award der DGIM 2023

Jonas R. Stöckmann, Verena von Bülow, **Maryam Schneider**, Christoph G. Grevelding, Martin Roderfeld, Elke Roeb. Androgen-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion im Darmgewebe Schistosoma mansoni infizierter Mäuse. Abstract, Conference: DGIM 2023. Inn Med 2023;64(Suppl 1):28. doi:10.1007/s00108-023-01509-x.

Jonas Stöckmann, Verena von Bülow, **Maryam Schneider**, Christoph G. Grevelding, Martin Roderfeld, Elke Roeb. Androgen-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion im Darmgewebe Schistosoma mansoni-infizierter Mäuse. Abstract Vortrag, Conference: Viszeralmedizin 2023 77. Jahrestagung der DGVS. Zeitschrift für Gastroenterologie 2023,61(8). DOI: 10.1055/s-0043-1771719

Nicht zitierbare Abstracts/ Vorträge

Jonas Stöckmann, Verena von Bülow, **Maryam Schneider**, Christoph G. Grevelding, Martin Roderfeld, Elke Roeb. Auswirkungen einer Schistosoma mansoni Infektion auf den Androgen-Rezeptor-Signalweg in Darmgewebe von Mäusen. Abstract Vortrag Science Day 2022, FB11, JLU Gießen.

Maryam Schneider, Verena von Bülow, Jonas R. Stöckmann, Annette Tschuschner, Heike Müller, Christoph G. Grevelding, Martin Roderfeld, Elke Roeb. Osteopontin verstärkt die hepatische Parenchymschädigung bei einer Infektion mit Schistosoma mansoni. Abstract Vortrag Science Day 2022, FB11, JLU Gießen

15 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift