Aus dem Exzellenzcluster Kardiopulmonales System

am Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Pathomechanismen der Schistosomiasis-induzierten pulmonalen Hypertonie im Hamster-Modell

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaft

- Dr. rer. nat. -

der naturwissenschaftlichen Fachbereiche

(Fachbereich 08 Biologie und Chemie)

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Christin Ritter

aus Annaberg-Buchholz

Gießen 2012

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Volkmar Wolters
Institut für Tierökologie und spezielle Zoologie, FB 08
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Adriaan Dorresteijn
Institut für Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Stephanstraße 24, 35390 Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ralph T. Schermuly
Exzellenzcluster Kardiopulmonales System (ECCPS)
Lungenzentrum der Universität Gießen (UGMLC)
Aulweg 130, 35392 Gießen

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der Graduiertenkollegs *Molecular Biology and Medicine of the Lung* (MBML) am Exzellenzcluster Kardiopulmonales System des Lungenzentrums der Justus-Liebig-Universität Gießen (UGMLC, *University of Giessen and Marburg Lung Center*) und dem Zentrum für Innere Medizin – Medizinische Klinik II/V in der Zeit von Mai 2009 bis November 2012 unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Adriaan Dorresteijn angefertigt. Das Thema und das Labor wurden von Prof. Dr. rer. nat. Ralph Schermuly bereitgestellt, unter dessen Betreuung diese Arbeit entstand.

„Hier ist der Wurm drin!“

Christina Vroom, 2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 9
1.1 Pulmonale Hypertonie 9
1.1.1Definition und Klassifikation 9
1.1.2 Klinische Symptome und Diagnose 11
1.1.3 Vasokonstriktion und pathomorphologische Veränderungen der pulmonalen Arterien 12
1.1.5 Therapiemöglichkeiten 15
1.2 Schistosomiasis-Infektion 16
1.2.1 Verbreitungsgebiete 16
1.2.2 Krankheitsverlauf und Symptome 16
1.2.3 Diagnose der Schistosomiasis 17
1.2.4 Lebenszyklus *Schistosoma mansoni* 18
1.2.6 Therapie der Schistosomiasis-Infektion 20
2 Material und Methoden 22
2.1 Material 22
2.1.1 Versuchstiere 22
2.1.1.1 Pärchenegel *Schistosoma mansoni* 22
2.1.2 Tierversuchsgenehmigung 22
2.1.3 Material und Geräte für Tierversuche 23
2.1.3.1 Injektionslösungen und Substanzen 23
2.1.3.2 Verbrauchsmaterialien 23
2.1.3.3 Geräte für Organentnahme 25
2.1.4 Histologie 26
2.1.4.1 Geräte 26
2.1.4.2 Verbrauchsmaterialien 26
2.1.4.3 Kits, Lösungen und Antikörper für histologische Färbungen 27

2.1.4.4 Geräte/Software/Makros 28
2.1.5 Molekularbiologie 29
2.1.5.1 Kits und Verbrauchsmaterialien 29
2.1.5.2 Geräte 30
2.1.5.3 Primerdesign und verwendetet Primer 30
2.2 Methoden 32
2.2.1 Tiermodell der Schistosomiasis-induzierten pulmonalen Hypertonie 32
2.2.1.1 Gewinnung von Miracidien und Cercarien 32
2.2.2 Blutentnahme und Gewinnung von Plasma 33
2.2.3 Organentnahme 34
2.2.4 Histologie 34
2.2.4.1 Hämatoxylin – Eosin - Färbung 35
2.2.4.2 Elastica van Gieson-Färbung für die Quantifizierung der medialen Wandstärke 36
2.2.4.3 Picro-Sirius Red-Färbung zur Quantifizierung des Kollagengehalts 36
2.2.4.4 Tolouidinblau-Färbung - metachromatische Färbung von Mastzellen 37
2.2.4.5 Immunhistochemische Färbung für α-smooth muscle actin und von Willebrand-Faktor 37
2.2.4.6 Protokolle für die Histologie 39
2.2.4.6 Morphometrische Analyse des Muskularisierungsgrades 41
2.2.4.7 Analyse der medialen Wandstärke 41
2.2.4.8 Sirius Red Färbung 42
2.2.4.9 Ashcroft’s Fibrose Scoring 42
2.2.4.10 Statistische Auswertung 42
2.2.5 Molekularbiologie 43
2.2.5.1 RNA-Isolation 43
2.2.5.2 cDNA-Synthese 43
2.2.5.3 Quantitative Real-time PCR (SYBR Green-Methode) 44

2.2.5.4 Enzyme-linked Immonusorbent Assay (ELISA) 45
3. Ergebnisse 46
3.1 Veränderungen des rechten Herzventrikels 46
3.1.1Rechtsherzhypertrophie 46
3.1.2 Herzfibrose 47
3.2 Pulmonal-vaskuläre Umbauprozesse 48
3.2.1 Der Muskularisierungsgrad kleiner Pulmonalarterien ist ein Parameter des strukturellen Gefäßwandumbaus 48
3.2.2 Analyse der medialen Wandstärke 51
3.2.3 Messung des Fibrosegrades der Lunge 52
3.3. Beteiligung von Mastzellen 54
3.3.1 Totalzahl der pulmonalen Mastzellen 54
3.3.2 Verteilung der pulmonalen Mastzellen 55
3.4 Expressionsprofile von pulmonalen Zytokinen 56
3.4.1 Expressionsprofile der Th1-Zytokine 56
3.4.2 Expressionsprofile der Th2-Zytokine 58
3.4.3 Expressionsprofile von Wachstumsfaktoren 59
3.4.4 Plasmaspiegel von zirkulierendem TGF-β 60
4. Diskussion 61
4.1 Wahl des Tiermodells 61
4.2 Herzremodeling bei der Schistosomiasis-induzierten PH 62
4.3 Pulmonal-vaskuläre Gefäßumbauprozesse 63
4.4 Rolle der pulmonalen Mastzellen 65
4.5 Th1- oder Th2-Immunantwort – was zeigt das Hamstermodell? 66
4.6 Rolle der Wachstumsfaktoren 72
5. Zusammenfassung 74
6. Anhang 76
6.1 Literaturverzeichnis 76

6.2 Abbildungsverzeichnis 88

6.3 Tabellenverzeichnis 88

6.4 Abkürzungsverzeichnis 89

6.5 Lebenslauf 92

6.6 Eidesstattliche Erklärung 94

6.7 Danksagungen 95

1 Einleitung

1.1 Pulmonale Hypertonie

1.1.1Definition und Klassifikation

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine lebensbedrohende, proliferative Erkrankung der Lungengefäße, die durch anhaltende Erhöhung des pulmonalen Gefäßdruckes und eingeschränkter körperlicher Leistungsfähigkeit charakterisiert ist. Klinisch wird die PH als ein Anstieg des mittleren pulmonal-arteriellen Druckes (mPAP = mean pulmonary arterial pressure) auf über 25 mmHg in Ruhe oder >30 mmHg bei körperlicher Belastung (Rosenkranz *et al*., 2007) definiert. Um die Veränderungen in der Lunge zu kompensieren, kommt es durch die Erhöhung des Auswurfwiderstandes des rechten Herzventrikels zur Dilatation desselben, und bei anhaltender Belastung zum Rechtsherzversagen und schließlich zum Tode.
Die aktuelle Klassifikation wurde 2008 auf der 4. Weltkonferenz in Dana Point, Kalifornien, erstellt. Unterteilt wird die PH in 5 heterogene Gruppen (Tabelle 1). Obwohl die anfänglichen pathologischen Ereignisse sich in den Gruppen unterscheiden mögen, so sind die Mechanismen, welche die Krankheit patholgisch manifestieren, oftmals die gleichen.
Die pulmonal-arterielle Hypertonie umfasst die 1. Gruppe und beinhaltet die idiopathische (früher bekannt als primäre PAH) und erbliche (familiäre) Form. Desweiteren gehört die PH, welche mit verschiedensten Ursachen verknüpft ist, mit in die Gruppe der PAH (Tabelle 1). Im Jahr 2008 wurde die Schistosomiasis-assoziierte pulmonale Hypertonie aufgrund der Ähnlichkeiten zur idiopathischen PAH neu in die 1. Gruppe aufgenommen (Simonneau *et al*., 2009). Bis zur 4. Weltkonferenz 2008 in Dana Point wurde die Schistosomiasis-assoziierte PH in der 5. Gruppe gelistet.
Die Pathologie der PAH umfasst viele Komponenten wie den pulmonal-vaskulären Gefäßumbau, Vasokonstriktion und am Ende die Entwicklung der Rechtsherzhypertrophie.
Das progressive pulmonal-vaskuläre Remodeling ist das Kennzeichen der pulmonal-arteriellen Hypertonie und ist durch Veränderungen der vaskularen Zellen wie

Proliferation, Migration und Apoptose-Resistenz charakterisiert (Ghofrani *et al*., 2009).

Die idiopathische PAH betrifft vor allem Frauen, die sich in der dritten oder vierten Dekade ihres Lebens befinden und wird nur selten nach Ausbruch diagnostiziert.

Aufgrund dessen schreitet die Krankheit schnell voran und die Überlebensrate beläuft auf etwa 2 – 8 Jahren nach der Diagnose (Rosenkranz *et al*., 2007).

1. Pulmonale arterielle Hypertonie (PAH)
   - 1.1 Idiopathische PAH
   - 1.2 Erbliche PAH (BMPR2, Alk1, Endoglin (mit oder ohne hereditärer hämorrhagischer Telengiektasie), unbekannt)
   - 1.3 Medikamente/Giftstoffe
   - 1.4 PAH assoziiert mit: Kollagenosen, HIV-Infektion, portale Hypertonie, angeborene Herzfehler, **Schistosomiasis**, chronisch hämolytischer Anemie
   - 1.5 Persistierende PH bei Neugeborenen

1‘ Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonal kapillärer Hämangiomatose (PCH)

2. Pulmonale Hypertonie bei linksventrikulärer Herzerkrankung
   - 2.1 Systolische Funktionsstörungen
   - 2.2 Diastolische Funktionsstörungen
   - 2.3 Herzklappenerkrankungen
3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen mit/ohne Hypoxämie
   - 3.1 Chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen
   - 3.2 Interstitielle Lungenerkrankungen
   - 3.3 andere Lungenerkrankungen mit gemischten restriktiven und obstruktiven Mustern
   - 3.4 Schlafapnoesyndrom
   - 3.5 Zentrale alveoläre Hypoventilationssyndrome
   - 3.6 Chronische Höhenkrankheit
   - 3.7 Entwicklungsbedingte Fehlbildungen
4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)
5. Pulmonale Hypertonie bei unklaren multifaktoriellen Mechanismen
   - 5.1 Hämatologische Erkrankungen: Myeloproliferative Störungen, Splenektomie
   - 5.2 Systemische Störungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhans Zell Histiozytose: Lymphangioleiomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis
   - 5.3 Andere Erkrankungen (der Schilddrüse, Glykogenspeicherkrankheit, Gaucher)
   - 5.4 Andere: Kompression der Pulmonalgefäße durch Tumore, fibrosierende Mediastinitis, dialysepflichtig chronische renale Insuffizienz

Tabelle 1: Klassifikation der pulmonalen Hypertonie

Die zweite Gruppe der pulmonalen Hypertonie wird durch vergrößerte und verdickte Pulmonal-Venen und interstitielle Ödembildung durch Linksherzerkranung charakterisiert (Galie *et al*., 2009).
Pulmonale Hypertonie verursacht durch Pneumopathie und/oder Hypoxie umfasst die dritte Gruppe. Diese Gruppe schließt viele Erkrankungen oder pathologische Konditionen ein, die mit intermittierender oder anhaltender Hypoxie innerhalb begrenzter Bereiche der Lunge assoziiert sind (Stenmark *et al*., 2006).
Chronische Hypoxie kann pathologische Veränderungen in der Struktur pulmonal-arterieller Gefäße induzieren und führt letztendlich zur Entwicklung des strukturellen Gefäßumbaus (= Remodeling) und anhaltender Vasokonstriktion des Lungenkreislaufes (Tuder *et al*., 2007).
Die pathologischen Veränderungen der chronisch thromboembolischen pulmonalen Hypertonie (Gruppe 4) umfassen fest an die Media pulmonaler Arterien verbundene Thrombi. Die „normale“ Intima wird in Folge dessen ersetzt und es kann zur vollkommenen Okklusion des Gefäßlumens kommen. In den offenen, nicht-okkludierten Bereichen kann eine pulmonale Arteriopathie entstehen (Galie *et al*., 2009).
Die fünfte Gruppe beinhaltet pulmonale Hypertonien verursacht durch unklare und/oder multifaktorielle Mechanismen und inkludiert heterogene Bedingungen (Galie *et al*., 2009).

1.1.2 Klinische Symptome und Diagnose

Anfängliche Symptome wie Atemlosigkeit und Unwohlsein sind sehr unspezifisch.
Sollten sich weitere Symptome wie Synkopen, Schmerzen im Brustkorb, periphere Ödeme und ein geschädigtes Herz, welches sich nicht mehr an den erhöhten pulmonal-vaskulären Druck anpassen kann, so muss man leider ein bereits fortgeschrittenes Stadium diagnostizieren. Die nicht-invasive echokardiale Untersuchung hat sich als sehr nützliche Anwendung für die Diagnose bewiesen und kann weitere wertvolle Informationen wie z. B. die Wandstärke des rechten Ventrikels oder Größe des rechten Ventrikels liefern. Desweiteren kann die Echokardiographie zur Einschätzung der Hämodynamik-Parameter hilfreich angewendet werden (Rosenkranz *et al*., 2007). Weitere nicht-invasive Tests, die zur Anwendung

kommen, sind: 6-Minuten Gehtest, Röntgenaufnahmen des Thorax oder Computer-Tomographie.
Obwohl diese Untersuchungen viele wichtige Informationen liefern können, muss, um die endgültige Bestätigung der Diagnose zu erhalten, eine Rechts-herzkatheterisierung durchgeführt werden. Diese invasive Untersuchungsmöglichkeit ist der sog. Gold-Standard in der Diagnostizierung (Nauser *et al*., 2001).

1.1.3 Vasokonstriktion und pathomorphologische Veränderungen der pulmonalen Arterien

PAH ist eine komplexe pulmonal-vaskulare Erkrankung mit einer Vielfalt von verschiedenen pathophysiologischen, molekularen und histologischen Reaktionen. Charakteristisch für PH ist ein Ungleichgewicht zwischen Vasodilatoren und Vasokonstriktoren. Patienten, die an PAH leiden, zeigen reduzierte Spiegel der gefäßerweiternden Mediatoren, wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin, während die Produktion von Vasokonstriktoren (z.B. Angiotensin II, Endothelin-1, Thromboxan) verstärkt ist. Weiterhin ist die Krankheit mit progressiven morphologischen Veränderungen der Strukturen von pulmonalen Arterien verknüpft. Das fortschreitende vaskuläre Remodeling ist das Kennzeichen und ist eine Konsequenz des anormalen Verhaltens von vaskulären Zellen (erhöhte Proliferation und Apoptose-Resistenz).
Betroffen von diesen komplexen Veränderungen, wie Neumuskularisierung von normalerweise nicht-muskularisierten Gefäßen, sind hauptsächlich die kleinen pulmonalen Arterien und Arteriolen (Abb.1). Weitere histopathologische Veränderungen sind Neointima-Bildung, Entwicklung plexiformer Läsionen und Proliferation in der Adventitia.
Der Prozess der Neumuskularisierung von normal nicht-muskularisierten, distalen Lungenarterien ist eng assoziiert mit einer erhöhten Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs vascular smooth muscle cells) und somit auch mit der Verdickung der medialen Schicht.
Zusätzlich zu den Veränderungen der medialen Schicht erfolgt eine Proliferation von Fibroblasten in der Adventitia nebst Kollagenablagerung.
Die Bildung der Neointima ist typisch für Patienten mit PAH und stellt eine neue strukturelle Schicht zwischen dem vaskularen Endothelium und der *Lamina elastica*

interna dar. Die Neointima besteht hauptsächlich aus vaskulären Zellen und extrazellulärer Matrix. Man geht davon aus, dass die Neointima-Entwicklung durch Migration glatter Muskelzellen von der Media zum Subendothelium, die Rekrutierung von Entzündungszellen und endotheliale Zellproliferation verursacht wird (Jones *et al*., 1997). Allerdings ist der exakte Ursprung der Zellen, die die Neointima bilden, nicht bekannt.

Auch Fibroblasten können in die Media migrieren und sich dort zu glatten Muskelzellen transformieren (Stenmark *et al*., 2002). Es ist allerdings auch möglich, dass sich endotheliale Zellen nach Stimulation mit PDGF in glatte Muskelzellen differenzieren können (Frid *et al*., 2002).

Weitere histologische Veränderungen sind die Bildung von plexiformen Läsionen, die in ca. 80% aller PAH Fälle auftreten (Nicod, 2007). Durch die unorganisierte Proliferation der endothelialen Zellen kommt es zur Entwicklung plexiformer Läsionen (Nicod, 2007; Abb. 1 C und F).

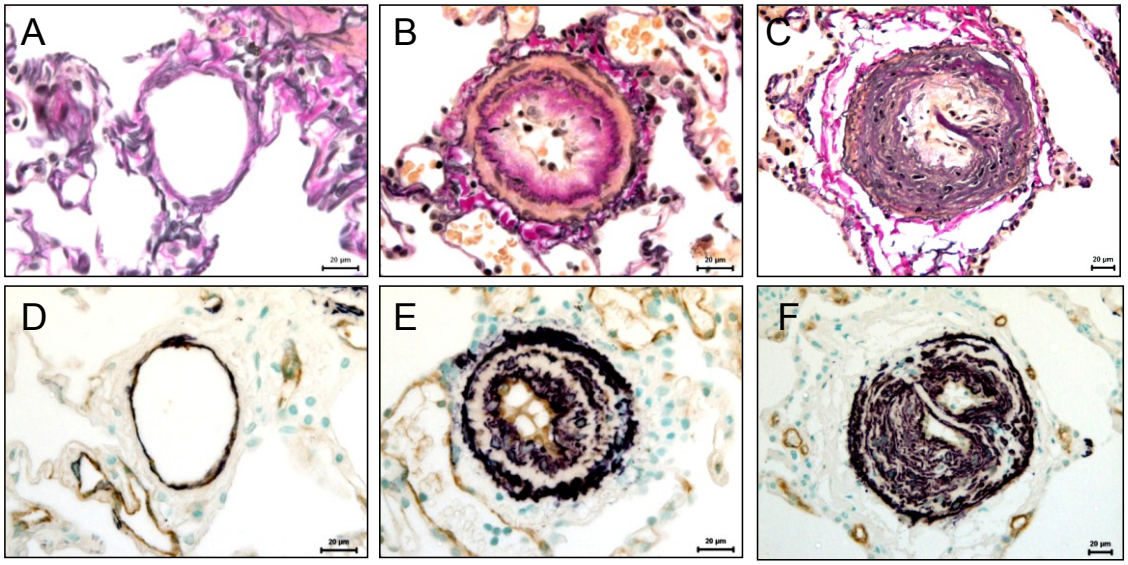

Abbildung 1: Morphologische Veränderungen der pulmonal-arteriellen Gefäße.
Lungengewebe von gesunden Spendern (A, D) und IPAH-Patienten wurden für Elastica van Gieson (A, B, C) und immunhistochemisch (D, E, F) für Faktor VIII (braun) und α-smooth-muscle Actin (violett) gefärbt. Scala = 20 µm. Die Bilder wurden der Doktorarbeit von Djuro Kosanovic mit freundlicher Genehmigung entnommen.

1.1.4 Entzündungsreaktionen

Entzündungsreaktionen spielen sowohl in der humanen PAH als auch in experimentellen Modellen der pulmonalen Hypertonie eine große Rolle (Pullamsetti *et al*., 2011). Es lassen sich bei strukturell veränderten Gefäßen zirkulierende Monozyten, Neutrophile, dentritische Zellen, Makrophagen und Lymphozyten, sowie Fibroblasten nachweisen (Savai *et al*., 2012). Es wird vermutet, dass zirkulierende Zellen nach erfolgter Rekrutierung in die *Lamina elastica interna* einwandern und verschiedene Substanzen an die Umgebung abgeben. Diese Zytokine und Wachstumsfaktoren führen dann zu einer entzündlichen Reaktion, indem sie die Kommunikation zwischen zirkulierenden und residenten Zellen vermitteln (Pullamsetti *et al*., 2010).

Endotheliale Dysfunktion, Proliferation von Endothelzellen und ungeordnete Angiogenese sind innerhalb von plexiformen Läsionen bei Patienten mit idiopathischer PAH nachweisbar (Otah-Ogo *et al*., 2012).

Mastzellen spielen die Hauptrolle bei Immunantworten im Zusammenhang mit Allergien bzw. mit Abwehrreaktion des Wirts-Immunsystems und können nach erfolgter Aktivierung verschiedene proinflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und Proteasen abgeben (Pullamsetti *et al*., 2009). Bei IPAH-Patienten konnte gezeigt werden, dass innerhalb des Lungengewebes eine Zunahme der Anzahl an Mastzellen zu beobachten ist (Dahal *et a*l., 2011). In der Literatur wird vermutet, dass Mastzellen, durch die Produktion von sekretierten Faktoren, die pulmonale Hypertonie und den Gefäßumbau diktieren (Farha *et al*., 2012).

Einige der Zytokine wirken entzündungsfördernd: Interleukin-1β, Interleukin-12 und auch TNF-α (Price *et al*., 2012). In Patienten mit IPAH treten erhöhte Spiegel von Interleukin 1β, Interleukin 6 und TNF-α (Tumornekrosefaktor α) auf (Humbert *et al*., 1995). Auch im Monocrotalin-Rattenmodell der pulmonalen Hypertonie sind erhöhte Interleukin 6-Werte in den Lungen feststellbar (Bhargava *et al*., 1999). Interleukin-1β führt zur Aktivierung von pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (PASMCs = pulmonary artery smooth muscle cells) und Interleukin-6 induziert die Proliferation von PASMCs (Price *et al*., 2012). Eine weitere Ursache für PAH ist eine Schistosomiasis-Infektion, eine parasitäre Infektion, die eine erhebliche Entzündung und pulmonale Gefäßerkrankung hervorruft (Kolosionek *et al*., 2010).

1.1.5 Therapiemöglichkeiten

In den letzten Jahren wurden viele Therapie-Optionen auf ihr Potenzial zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie untersucht. Zugelassen zur Behandlung sind Medikamente aus verschiedenen Wirkstoffklassen. Dazu zählen Phosphodiesterase (PDE) 5-Inhibitoren (Sildenafil), Prostazyklin-Analoga (Treprostinil, Iloprost, Beraprost), und Endothelin-Rezeptor-Antagonisten wie Bosentan und Ambrisentan (Boutet *et al*., 2008; Barst *et al*., 2006; Langleben *et al*., 2004; Hoeper *et al*., 2002).
Durch klinische Forschung konnten zusätzlich zu den bisher zugelassenen Medikamenten weitere Therapieformen entwickelt werden: Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (Imatinib, Sunitib) und Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase (Riociguat) bewiesen in verschiedenen Studien ein hohes Potenzial um die Progressivität der pulmonalen Hypertonie zu verlangsamen (Kojonazarov *et al*., 2012; Lang *et al*., 2012)
Und obwohl diese Medikamente die Lebensqualität der Patienten deutlich verbessert, gilt es immer noch ein Heilmittel, welches die Rechtsherzhypertrophie und das progressive pulmonal-vaskuläre Remodeling umkehren kann, zu finden.

1.2 Schistosomiasis-Infektion

1.2.1 Verbreitungsgebiete

Schistosomiasis ist eine der wichtigsten parasitären Infektionskrankheiten. Weltweit sind ca. 240 Millionen Menschen mit Schistosomiasis infiziert und etwa 700 Mio. leben im Risikobereich (WHO, 2011). 85% aller Infizierten leben in Afrika südlich der Sahara, wo *Schistosoma haematobium, S. intercalatum* und *S. mansoni* (auch in Nordost-Brasilien) als endemisch angesehen werden. Besonders betroffen sind die 3 Kontinente Asien, Afrika und Südamerika. Früher wurden meist nur Fälle aus den afrikanischen Ländern gemeldet. Allerdings werden immer häufiger Infektionsfälle aus Südamerika und China berichtet (Kolosionek *et al*., 2010). *S. mansoni* ist ebenfalls in Venezuela, Surinam und der Karibik präsent.

1.2.2 Krankheitsverlauf und Symptome

Eine Schistosomiasis-Infektion kann von verschiedenen *Schistosoma*-Arten ausgelöst werden: *S. mansoni, S. haematobium, S. intercalatum, S. mekongi* und *S. japonicum* (Chitsulo *et al*., 2000). Die WHO schätzt die jährliche Dunkelziffer der Todesfälle durch Schistosomiasis auf ca. 300000 (Fairfax *et al*., 2012). Gemeldet werden allerdings nur 15000 (WHO World Health Report, Genf, 2002).
Die anfängliche akute immunologische Reaktion erfolgt durch die Penetration der Haut durch die Cercarien. Diese verursacht einen juckenden Ausschlag, welcher als cercariale Dermatitis bekannt ist (Kolosionek *et al*., 2010).
Eine Schistosomiasis-Infektion verläuft in 2 Phasen: die akute und die chronische Infektion. Die akute Infektion wird auch als Katayama-Syndrom bezeichnet und betrifft alle Personen, die zum ersten Mal infiziert wurden (hauptsächlich Reisende, welche nicht zur immunen Population gehören). Es wird vermutet, dass das Katayama-Fieber eine Immunkomplex-vermittelte Hypersensitivitätsreaktion gegen die Parasitenantigene ist. Charakterisiert wird die akute Schistosomiasis weiterhin durch generelles Unwohlsein, erhöhte Temperatur, Husten, Kopfschmerzen, Myalgien, Arthralgien, Kurzatmigkeit, Hepatomegalie, Splenomegalie, Urtikaria, Ödeme, Gewichtsverlust mit Anorexie, Diarrhö und abdominale Schmerzen (Doherty

et al., 1996; Ross *et al*., 2002). Die Symptome manifestieren sich 14-84 Tage nach erfolgter Infektion (Burke *et al*., 2009).

Die chronische Schistosomiasis wird durch Reaktionen auf die Ei-Antigene bewirkt. Innerhalb eines Gewebes können diese Eier granulomatöse Reaktionen um die Eier herum induzieren. Die Granulome bestehen in erster Linie aus Makrophagen, Eosinophilen, Lymphozyten und Mastzellen (Cheever *et al*., 2002) und spielen eine wichtige Rolle bei der Zerstörung der Eier. Desweiteren resultieren granulomatöse Veränderungen in fibrotischer Deposition innerhalb des Gewebes des Wirtes.

Im menschlichen Körper kann es Jahre dauern bis sich diese fibrotische Krankheit entwickelt (von Lichtenberg *et al*., 1980). Weiterhin ist eine Herunterregulierung der Immunantwort des Endwirtes zu beobachten und obwohl die Reaktion auf neue Eier reduziert ist, kommt es zu kumulativen Schäden wie fibrotischen Narben (Cheever *et al*., 2002).

Geschätzte 10% aller chronisch infizierten Patienten entwickeln die hepatosplenische Form der Erkrankung (Graham *et al*., 2010), die sich durch Hepatomegalie und periportaler Kollagen-Ablagerung (Symmers‘ Fibrose), welche zu einer graduellen Behinderung des Blutstromes und portaler Hypertonie (Pfortaderhochdruck) führt, auszeichnet (Peterson *et al*., 1965).

Die im Darm verbleibenden Eier induzieren Entzündungen, Diarrhö, Ulzeration und Dickdarm-Polyposis (Peterson *et al*., 1965). Weiterhin wurde ein kleiner Anstieg des Risikos für kolorektale Tumoren beobachtet (von Lichtenberg *et al*., 1980). Weitere Symptome sind Hämaturie, Hämospermie, chronische Lebererkrankung unklarer Ätiologie, Papillome und polypoide Veränderungen von Blase (auch Blasentumore können bei Infektion mit *S. haematobium* beobachtet werden), Vulva, Vagina oder Zervix und Sterilität (Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit = DTG).

1.2.3 Diagnose der Schistosomiasis

Die Diagnose erfolgt im Falle von *Schistosoma mansoni* über die Untersuchung von Stuhlproben. Eine Infektion mit *S. haematobium* kann nur über eine Urinprobe diagnostiziert werden. Denn die meisten der produzierten Eier werden über den Stuhl an die Umwelt abgegeben. Desweiteren werden serologische Untersuchungen auf spezifische Antikörper unternommen (DTG).

1.2.4 Lebenszyklus *Schistosoma mansoni*

Schistosoma mansoni reift über eine Dauer von 5 Wochen nach der perikutanen Infektion im Endwirt heran (Abb. 2). Nach der Penetration verlieren die Cercarien ihren Schwanz und werden so zur Schistosomula-Larve. Anschließend migrieren die Larven über das Lymphgefäßsystem zur Lunge. In der Lunge gehen die Schistosomen über in das Blutgefäßsystem, um anschließend über die Leber, wo sich die Würmer paaren, zu ihrem Bestimmungsort, die mesenterischen Venolen des Darmes, gegen den Blutstrom zu migrieren. Sind die gepaarten Würmer in den Venolen angekommen, so beginnen sie mit der Eierproduktion, welche entweder in die Leber wandern oder über den Stuhl des Endwirtes an die Umwelt abgegeben werden. Die Eierproduktion kann während der kompletten Lebensdauer der Würmer aufrecht erhalten werden (Crosby *et al*., 2011; Ross *et al*., 2002).
Sind diese Eier dann im Süßwasser, so schlüpfen aus ihnen die Miracidien, welche dann die als Zwischenwirt dienende Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata* infizieren. In der Schnecke entwickeln sich die Miracidien zu Sporocysten und weiter zu Cercarien, die ins Wasser abgegeben werden.

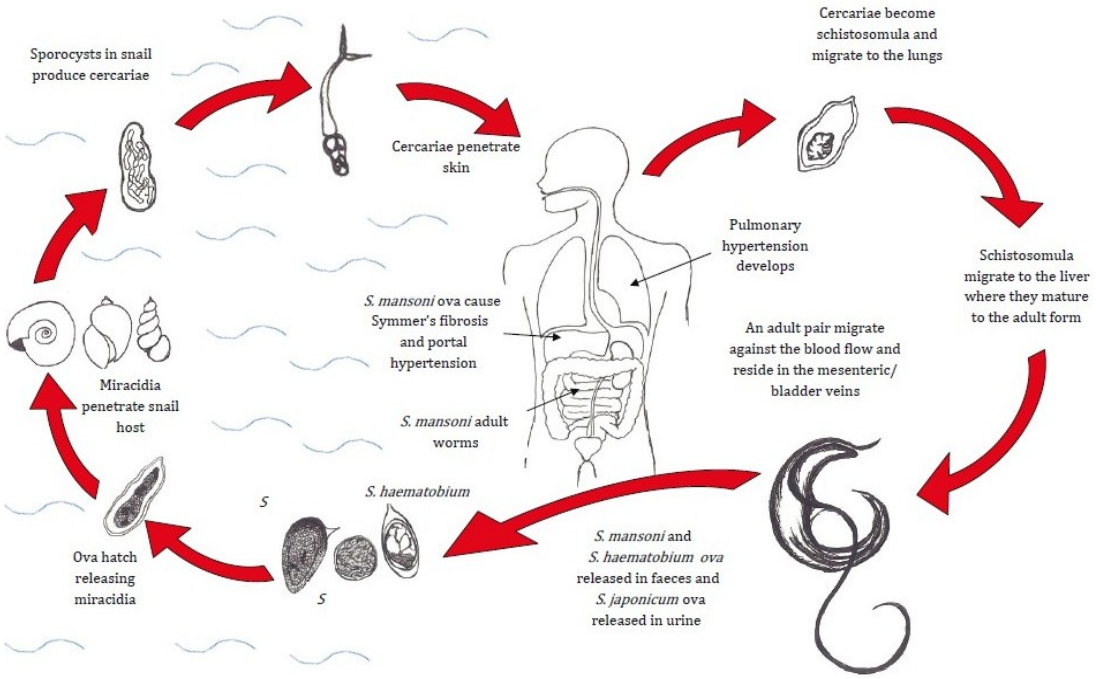

Abbildung 2: Lebenszyklus von *Schistosoma mansoni*.
Cercarien-verseuchtes Wasser ist für alle Endwirte die Infektionsquelle. Nach erfolgter Penetration der Haut verwandeln sich die Cercarien zu Schistosomula-Larven und migrieren durch den Körper bis zur Leber, wo sie zu adulten Würmern reifen und sich zu Pärchen formieren. Anschließend migrieren die Wurmpaare zu den mesenterialen Venen und beginnen

mit der Eierproduktion. Die Eier werden über den Stuhl wieder freigesetzt und können so vom Zwischenwirt aufgenommen werden. Übernommen von Ward *et al*. 2011

1.2.5 Immunpathologie der Schistosomiasis-Infektion

Die Immunantwort auf eine Schistosomen-Infektion wird im Allgemeinen in die T-Helfer 1- (Th1) und T-Helfer 2- (Th2) Zellantwort unterteilt (Abb. 3). Während die Th1-Immunantwort durch den ersten Kontakt mit Schistosomen ausgelöst wird und damit charakteristisch für das Katayama-Syndrom ist, spielt die Th2-Immunantwort die Hauptrolle in der Induktion der IgE-vermittelten Entzündungsreaktion aufgrund der Ei-Antigene (Zhu *et al*., 1999; Wilson *et al*., 2007). Th1-Zellen sekretieren Interleukin 2, Interferon-γ und Tumornekrosefaktor-β, während Th2-Zellen die Interleukine (IL-) 4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 sekretieren (Burke *et al*., 2009).

Bereits während der Penetrationsphase der Cercarien wird ein Influx von mononukleären und polymorphkernigen Immunzellen in die Haut nach wenigen Stunden induziert. Dabei kommt es zu einer lokalen Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-1β, IL-12, TNFα und IL-6) und Vermittlern, welche immunoregulatorische Funktionen besitzen, wie z.B. IL-10, Porstaglandine E_2 und D_2 (Jenkins *et al*., 2007).

Die Intensität der induzierten Zytokinspiegel im Plasma steht in Korrelation mit den Begleitkrankheiten, wie z.B. Leberfibrose oder hepatosplenale Krankheit (Burke *et al*., 2009).

Während der akuten Phase der Infektion können erhöhte Plasmalevel an Tumornekrosefaktor (TNF) und eine gesteigerte Produktion von TNF, Interleukin-1 und -6 durch periphere mononukleäre Blutzellen gemessen werden (Pearce *et al*., 2002).

Die chronische Schistosomiasis-Infektion ist hauptsächlich durch eine IL-13-vermittelte Immunreaktion charakterisiert (Dessein *et al*., 2004).

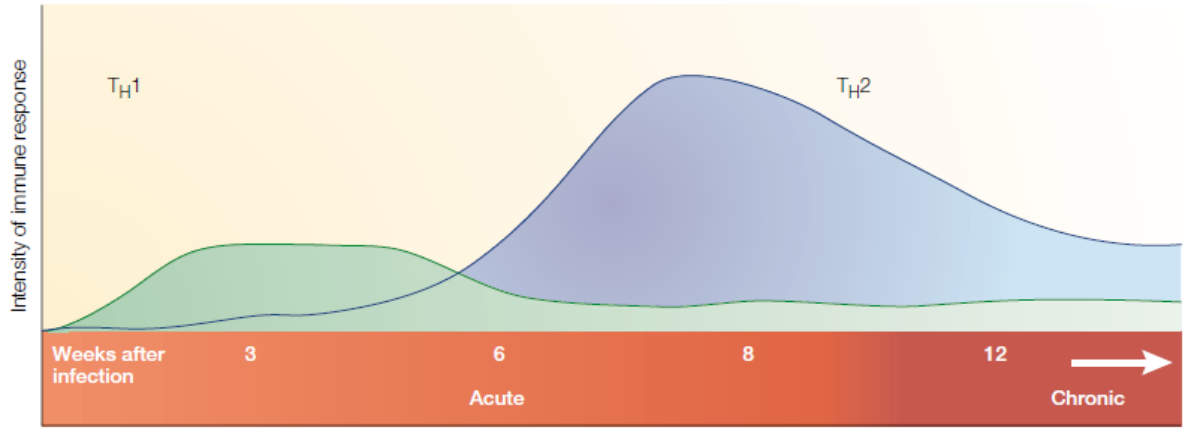

Abbildung 3: Verlauf der Th1- und Th2-Immunantwort während der Schistosomen-Infektion.
Nach ca. 6 Wochen erfolgt der Wechsel von der Th1- zur Th2-Immunantwort, welche deutlich intensiver ist. (Übernommen von Pearce *et al*., 2002)

1.2.6 Therapie der Schistosomiasis-Infektion

Eine effektive Möglichkeit der Behandlung von Schistosomiasis ist Praziquantel (PZQ; erhältlich unter den Namen Cesol®, Biltricide, Cysticide). Praziquantel wirkt vermicid durch die Hemmung der Aktivität von Ca^{2+}-Kanäle im Tegument, wodurch eine Paralyse ausgelöst werden kann (Crosby *et al*., 2011). Eingesetzt wird Praziquantel als Chemotherapie für Schistosomiasis bereits seit 1984. Allerdings wirkt PZQ nur gegen adulte Würmer (Liu *et al*., 2011). Es zeigten sich leider Resistenzprobleme in den letzten Jahren (Liu *et al*., 2011).
Neben PZQ werden auch Artemether und Artesunat zur Kontrolle der Krankheit seit den späten 1990er Jahren eingesetzt. Diese sind Derivate von Artesiminin und wirken hauptsächlich gegen das Schistosomulum-Stadium (Liu *et al*., 2011) und eignen sich daher zur Behandlung der akuten Schistosomiasis-Infektion (Katayama-Syndrom). Allerdings werden diese Medikamente eigentlich zur Behandlung bzw. Prävention von Malaria eingesetzt. Die Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit (DTG) empfiehlt die Verabreichung von Artemether nur im Zusammenhang mit Studien.
Ein weiteres vielversprechendes Medikament ist Oxamniquine. Dabei handelt es sich um ein 2-aminomethyltetrahydrochinolin-Derivat, welches eine anticholinerge Wirkung auf die Pärchenegel hat und somit die Beweglichkeit einschränkt. Zusätzlich

wird die Nukleinsäuresynthese inhibiert (Ferrari *et al*., 2003). Allerdings konnten Ferrari *et al*. zeigen, dass PZQ effektiver wirkt als Oxamniquine.

1.3 Zielsetzung

Eine Schistosomiasis-Infektion wird in der Literatur oft als häufigste Ursachen für eine pulmonale Hypertonie genannt (Crosby *et al*., 2010). Die bisher erfolgten Studien zur Erforschung der Grundlagen dieser Erkrankung wurden v. a. im Mausmodell durchgeführt (Crosby *et al*., 2010, Crosby *et al*., 2011, Stavitsky 2004).
Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Pathomechanismen in der Schistosomiasis-induzierten pulmonalen Hypertonie im Hamstermodell. Folgende Fragen standen dabei im Vordergrund:

1. Eignet sich das Hamstermodell als zukünftiger Labor-Modellorganismus?
2. Welche histopathologischen Veränderungen lassen sich beobachten?
3. Welche Konsequenzen hat die Infektion auf die Expressionsprofile diverser Zytokine und Wachstumsfaktoren und korrelieren diese mit den in der Literatur bekannten Daten?

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung eines neuen Tiermodells zur Untersuchung der Schistosomiasis-induzierten PH.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Für die dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche wurden männliche und weibliche syrische Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) aus eigener Zucht verwendet. Die uninfizierten, sowie auch die infizierten Tiere wurden freundlicherweise im Rahmen einer Kooperation von Herrn Prof. Dr. Christoph G. Grevelding zur Verfügung gestellt. Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte durch die Beschäftigten der AG Grevelding (Institut für Parasitologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen).

2.1.1.1 Pärchenegel *Schistosoma mansoni*

Es wurden Schistosomen eines liberianischen Stammes (Bayer AG, Monheim, Deutschland) von *Schistosoma mansoni* für die Infektion der Hamster eingesetzt (Grevelding, 1995).

2.1.2 Tierversuchsgenehmigung

Die Zucht der Tiere und deren Infektion zur Gewinnung von Schistosomen wurde vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt. Einzusehen ist diese Genehmigung unter dem Aktenzeichen Az V54-19 c 20/15 c GI 18/10.

2.1.3 Material und Geräte für Tierversuche

2.1.3.1 Injektionslösungen und Substanzen

50% 2-Propanol / 1% Providionjod-Lösung	Braunoderm ®	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Destilliertes Wasser	A. dest	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Heparin	Heparin-Natrium-25000-ratiopharm ®	Ratiopharm GmbH Ulm, Deutschland
Isofluran	Isofluran Baxter®	Baxter Deutschland GmbH Unterschleißheim, Deutschland
Ketaminhydrochlorid	Ketamin 10%®	MEDISTAR Arzneimittelvertrieb GmbH Ascheberg, Deutschland
Natriumchloridlösung (100 ml)	Isotonische Natriumchlorid-lösung Diaco®	Serag-Wiessner KG Naila, Deutschland
Natriumchloridlösung (1000 ml)	zum Spülen und Befeuchten	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Xylazinhydrochlorid	Xylariem®	Riemser Arzneimittel AG Greifswald, Deutschland

2.1.3.2 Verbrauchsmaterialien

Dreiwegehahn	Discofix®	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Universaleinbettkassetten	Tissue Tek® 3 Uni-Cassette®	Sakura Finetek Europe B.V Zoeterwoude, Niederlande
Einmalhandschuhe	Vasco® Nitril white	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einmalnitrilhandschuhe	Peha soft® nitrile	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Einmalspritze 1 ml, 2 ml, 5ml, 10 ml, 20ml	Inject Luer®	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einmalspritze 50 ml	Original Perfusor® Spritze	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland

Mikrozentrifugengefäß	Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Ko Nümbrecht, Deutschland
Falconröhrchen 50ml, 15ml	Cellstar® Tubes	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Hämatokritkapillaren		Hirschmann Laborgeräte GmbH & KoKG Eberstadt, Deutschland
Kanülen 24 G (0,55 mm x 25mm) 26 G (0,9 mm x 25 mm) 30 G (0,3 mm x 25 mm)	BD Microlance 3®	Becton Dickinson Heidelberg, Deutschland
Medizinisches Klebeband	Durapore®	3M St. Paul, MN, USA
Parafilm		American National Can Menasha, Wisconsin, USA
Perfusor-Leitung 150 cm		B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
PET-Schläuche	mit unterschiedlichen Durchmessern	
Polyester Garn 5/0		FSSB Jestetten, Deutschland
Skalpell 10er, 11er, 20er	Feather® Disposal Scalpel	Pfmmedical AG Köln, Deutschland
Venenverweilkanüle 20 G (1,1 mm x 33 mm)	Vasofix® Safety	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Zellstofftupfer 4 x 5 cm	Pur-Zellin®	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Zellulose-Handtücher		Tork Mannheim, Deutschland

2.1.3.3 Geräte für Organentnahme

Narkosekammer		Keutz Labortechnik Reiskirchen, Deutschland
Operationsbesteck		FST Fine science tools GmbH Heidelberg, Deutschland
Spülkanüle	Perfusion canulae for mouse pulmonary artery	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Stativ	Zum Halten der Spritzen während des Spülens	
Vergrößerungslupe	MS5	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland

2.1.4 Histologie

2.1.4.1 Geräte

Digitale Kamera	DC 300F	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
geschlossener Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat	ASP 300 S	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Kühlplatte	EG 1150C	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Objektträgerstrecktisch	HI 1220	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinausgießstation	EG 1140H	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinstreckbad	HI 1210	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Rotationsmikrotom vollautomatisch	RM 2255	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Stereomikroskop Durchlicht	DMLA 6000	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Wärmeschrank		Memmert GmbH & Co KG Schwabach, Deutschland

2.1.4.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser 24 x 36mm, 24 x 60mm		R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Eindeckmedium Xylol-löslich	Pertex®	Medite GmbH Burgdorf, Deutschland
Mikrotomklingen A 35	Feather	Produkte für die Medizin AG Köln, Deutschland
Objektträger	Superfrost UltraPlus®	R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Paraffin Einbettmedium	Paraplast Plus®	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Selecta Faltenfilter		Schleicher + Schüll GmbH Dassel, Deutschland

2.1.4.3 Kits, Lösungen und Antikörper für histologische Färbungen

Albumin bovine Fraction V		Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland
Anti-alpha-smooth muscle Actin; Clone 1A4 monoklonal, mouse anti-human	Verdünnung 1:900 mit 10% BSA	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Anti-von Willebrand Faktor polyklonal, rabbit anti-human	Verdünnung 1:1200 mit 10% BSA	Dako Cytomation Hamburg, Deutschland
Avidin-Biotin-Blocking Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Dtl
DAB Substrat Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Dtl
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, pro analysi		Merck Darmstadt, Deutschland
Haematoxylin		Division Chroma Münster, Deutschland
Eisen-Haematoxylin A nach Weigert enthält Ethanol		Division Chroma Münster, Deutschland
Eisen-Haematoxylin B nach Weigert		Division Chroma Münster, Deutschland
Essigsäure 100%		Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70%, 96%, 99,6% vergällt mit Ethylmethylketon		Fischer Saarbrücken, Deutschland
Eosin Y		Thermo Fischer Scientific Schwerte, Deutschland
Formaldehyd – Lösung 3,5 – 3,7 %	neutral gepuffert mit Methanol stabilisiert	Otto Fischar GmbH & Co. KG Saarrbrücken, Deutschland
ImmPRESS Reagent Anti-Rabbit Ig		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Dtl.
Isopropanol (99,8%)		Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid		Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat pro analysi		Merck Darmstadt, Deutschland
Methanol, reinst		Fluka Chemie Buchs, Schweiz

Methylgrün		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Dtl.
Natriumchlorid pro analysi		Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Pikrinsäure, wässrig, gesättigt		Appli Chem GmbH Darmstadt, Deutschland
Resorcin Fuchsin		Waldeck GmbH & CO. KG Münster, Deutschland
Salzsäure 25%		Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Säurefuchsin		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Sirius Rot F3B Lösung		Niepötter Labortechnik Bürstadt, Deutschland
Toluidine Blue O		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Trypsin	Digest All 2®	Zytomed Berlin, Deutschland
Vector VIP® Peroxidase Substrat Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Dtl.
Wasserstoffperoxid 30% pro analysi		Merck Darmstadt, Deutschland
Xylol		Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland

2.1.4.4 Geräte/Software/Makros

Computer	Q 550 IW	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Software	Q Win V3	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Makro für - Muskularisierungsgrad - Wandstärke - Kollagengehalt - Zellzählung manuell - Septenscan		speziell entwickelt von Herrn Christoph Frank (Informatiker), Leica Microsystems Nussloch, Deutschland

2.1.5 Molekularbiologie

2.1.5.1 Kits und Verbrauchsmaterialien

2 ml Schraubverschluss-Gefäße	Mikro-Schraubröhre	Sarstedt Nümbrecht, Deutschland
96-well Mikroplatten		Thermo Fischer Scientific Schwerte, Deutschland
96-well Mikroplatten *PolySorb*™	Immuno 96 MicroWell™ Solid Plates	Nunc; Vertrieb durch Thermo Fischer Scientic Schwerte, Deutschland
Aqua dest.		B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
cDNA-Synthese Kit	iScript	Bio-Rad München, Deutschland
CH_3COOH 100%	Eisessig 100%	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Chloroform		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
DEPC-H_2O		Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
HEPES Pufferan®	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
H_2SO_4 2N	Schwefelsäure 2N	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol		Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Keramikkügelchen	1,4mm	Peqlab Erlangen, Deutschland
Mouse TGF-β1 Duo Set	TGF-β ELISA	R&D Systems Minneapolis, USA
NaOH	Natriumhydroxid	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Real-time PCR Kit	Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG Invitrogen	Life Technologies Darmstadt, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Mikrozentrifugengefäße	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Real-time PCR-Reaktionsgefäße		Thermo-Fischer (Abgene), Hamburg, Deutschland

Substrat-Lösung für ELISA	Tetramethylbenzidin	R&D Systems Minneapolis, USA
Tween 20		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
TRIzol®		Invitrogen Karlsruhe, Deutschland
Urea for electrophoresis	Harnsäure	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland

2.1.5.2 Geräte

Homogenisator	Precellys 24	Peqlab Erlangen, Deutschland
Mikroplattenlesegerät	Molekular Devices Versamax Microplatereader	MDS Analytical Technologies Ismaning, Deutschland
Mikrozentrifuge 200R		Hettich Tuttlingen, Deutschland
Real Time PCR System	Mx3000P® QPCR System	Agilent (Stratagene), Waldbronn, Deutschland
Spektrometer, NanoDrop	ND-1000	Kisker-Biotech Steinfurt, Deutschland
Thermoblock		VWR Bruchsal, Deutschland
Thermocycler	T-personal	Biometra Göttingen, Deutschland
Vortex-Mixer	Vortex Genie® 2	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland

2.1.5.3 Primerdesign und verwendetet Primer

Alle verwendetenPrimer wurden mithilfe des Onlinetools „Primer Blast“ der Internetseite der Nationalbibliothek für Medizin des nationalen Gesundheitsinstitutes der USA (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) designt.
Die Primerherstellung erfolgte durch Metabion International AG, Martinsried, Deutschland.

Gen	Primersequenz
β-Aktin	Fw: CAGCCTTCCTTCCTGGGTATGGAA Rv: TGTGTTGGCATAGAGGTCTTTGCG
Interferon γ	Fw: CCAGGCCATCCAGAGGAGCA Rv: CCACCCCCAAAACAGCACCG
Interleukin 1α	Fw: AGCCTAGTGATGGTGGCAGCA Rv: TGCGGGTTATGGTCTCCAGGT
Interleukin 1β	Fw: GCCCGTGGACCTTCCAGGAT Rv: AGGGGTCAGACAGCACGAGG
Interleukin 4	Fw: GGGTCTCAGGCCCCAGCTAG Rv: TTGCGAAGCACCTGGGAAGC
Interleukin 5	Fw: AACGAGACGGTGAGGCTTCCT Rv: CGCCTCTCCTGGCCACACTG
Interleukin 6	Fw: ACGCCTAGCCCAACCTCCAA Rv: TCGGTATGCTAAGGCACAGCAC
Interleukin 10	Fw: TCCGAGAGCTGAGGACTGCC Rv: TGGTTCTCTGCCTGGGGCAT
Interleukin 12p40	Fw: TGGACGGTTCACCTGCTGGT Rv: GATGTCCTCCTGGCAGGCCA
Interleukin 13	Fw: AATGGCGGGTTCTGTGCAGC Rv: TGATGCCCTTCGGACGCAGA
Platelet Derived Growth Factor α	Fw: CGGGACCTCCAGCGACTCTT Rv: CGCTTCTCCGGCACATGCTT
Platelet Derived Growth Factor β	Fw: GGGGGACCCCATTCCAGAGG Rv: TTCAGGTCCAGCTCAGCCCC
Transforming Growth Factor β	Fw: CGCCAACTTCTGTCTGGGGC Rv: CGAAGCACCCGGGTTGTGTT
Tumor Necrosis Factor α	Fw: CGGCCCCCAAAGGGAAGAGA Rv: GACATGCCGTTGGCCAGGAG

2.2 Methoden

2.2.1 Tiermodell der Schistosomiasis-induzierten pulmonalen Hypertonie

Als Endwirte für *S. mansoni* und somit zur Erzeugung der pulmonalen Hypertonie wurden adulte, 8 Wochen alte syrische Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) verwendet. Diese wurden von der AG Grevelding selbst gezüchtet.
Um den Schistosomen die Infektion, welche durch Penetration der Haut erfolgte, zu erleichtern, wurden die Hamster für etwa 40 min vorab in warmem Schneckenwasser (ca. 0.5 – 1 cm hoch in einem Makrolonkäfig) gebadet, um die Haut aufzuweichen. Anschließend wurden ca. 2000 Cercarien/Endwirt hinzugegeben. Die Hamster verblieben noch weitere 45 min im Cercarien-haltigen Wasser (Dettmann *et al*., 1989).

2.2.1.1 Gewinnung von Miracidien und Cercarien

Zur Gewinnung von Miracidien wurden Lebern von infizierten Tieren in PBS homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat zentrifugiert und das entstandene Pellet mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in warmem Wasser aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurde diese Suspension in eine Schlupfflasche (Erlenmeyerkolben, versehen mit einem Steigrohr), überführt. Da das Schlüpfen der Miracidien phototaktisch induziert wird, wurde das Ende des Steigrohres mit Licht bestrahlt. Die aus den Eiern schlüpfenden Miracidien bewegen sich sofort in Richtung der Lichquelle und können von dort mit einer Pasteurpipette abgesammelt werden. Nach der Titerbestimmung wurden die Miracidien direkt zur Infektion der Zwischenwirte eingesetzt. Dafür wurden Schnecken (*Biomphalaria glabrata*) in Mikrotiterschalen überführt und pro Schnecke 2 ml Schneckenwasser sowie 10-15 Miracidien gegeben. Die Infektion erfolgte ü/N. Danach wurden die Schnecken in belüftete Aquarien bei einer RT von 26°C umgesetzt. Der Tag/Nachtrhythmus wurde konstant bei 12 h belassen. Als Futter dienten den Schnecken frischer Salat oder gefrorene Spinatpellets.

Um von infizierten Zwischenwirten Cercarien gewinnen zu können, wurden die Schnecken 3-4 Wochen nach der Infektion abgedunkelt für 1-2 weitere Wochen so gehalten. Zur Cercariengewinnung wurde die Schnecken in 12-well-Mikrotiterplatten überführt und erneut Schneckenwasser zugegeben. Die Freisetzung der Cercarien erfolgt ebenfalls phototaktisch und wurde durch Belichtung induziert. Anschließend wurde der Cercarientiter bestimmt.

2.2.2 Blutentnahme und Gewinnung von Plasma

Die durch Inhalationsnarkose mit Isofluran® leicht sedierten Tiere wurden vor dem Beginn der Blut- und Organentnahme mit etwa 3 ml Sedativum-Gemisch (1,9 ml Ketamin + 3,1 ml Xylazin + 95 ml NaCl) pro Tier intraperitoneal injiziert.
Die Überprüfung der Narkosetiefe erfolgte durch Tests des Lid- und Zwischenzehenreflexes. Waren diese Reflexe nicht mehr feststellbar, so konnte mit der Präparation begonnen werden.
Durch Entfernung der Haut auf der ventralen Körperseite und Explantation des Brustkorbes wurden die inneren Organe freigelegt. Erst nach Entfernen des Perikards konnte Blut direkt aus dem rechten oder linken Ventrikel mit heparinisierten Spritzen entnommen werden. Das gewonnene Blut wurde bis zur Zentrifugation bei 13000 U/min für 10 min bei 4°C auf Eis gekühlt.
Nach der Zentrifugation wurde das Plasma abpipettiert und für die weitere Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.3 Organentnahme

Die Entnahme der Lungen und Herzen fand unmittelbar nach der Blutentnahme statt. Dazu wurden das linke Herz, sowie die *Arteria pulmonalis*, inzisiert, um anschließend die Lunge mit physiologischer Kochsalzlösung spülen zu können. Die Lungen wurden weitestgehend blutfrei gespült. Danach wurde die rechte Lunge für weitere molekularbiologische Anwendungen und die linke Lunge für histologische Analysen vorsichtig am Hilus abgesetzt. Die rechte Lungenhälfte wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und für die weitere Verwendung bei -80°C gelagert.
Die linke Lungenhälfte wurde für 24h in ein mit Formalin gefülltes Falcon überführt.
Das Herz wurde entnommen, alle nicht-muskulären Bestandteile (Blutgefäße, Atrien) entfernt und der rechte Ventrikel vom linken Ventrikel plus Septum getrennt. Um eine Aussage über die Rechtsherzhypertrophie machen zu können, wurde das Nassgewicht der beiden Ventrikel gemessen und das Verhältnis beider Anteile zu einander berechnet: RV/(LV+S).
Anschließend wurden die Ventrikel halbiert und jeweils eine Hälfte für die Molekularbiologie schockgefrostet und die andere Hälfte für die Histologie in Formalin überführt.

2.2.4 Histologie

Die Gewebeproben verblieben für 24h in Formalin und wurden an den beiden folgenden Tagen in frisches 0,1M PBS überführt. Dazu wurden die Organe in Universal-Einbettkassetten verbracht. Am 3. Tag nach der Fixierung mit Formalin wurden die Organe in den Kassetten in 70% Ethanol überführt, um bis zur Entwässerung gelagert werden zu können.
Die Dehydrierung der Lungen und Herzen fand über Nacht im Routineprogramm des geschlossenen Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten (Modell TP 1050, Leica) statt.
Anschließend wurden die Organe mithilfe der Paraffinausgießstation eingebettet und bis zur weiteren Verwendung gelagert.
Von den so entstandenen Blöcken wurden 3µm dicke Schnitte mit dem automatischen Rotationsmikrotom angefertigt. Die auf Objektträgern aufgezogenen, getrockneten Schnitte wurden nach den folgenden Protokollen gefärbt.

2.2.4.1 Hämatoxylin – Eosin - Färbung

2.2.4.1.1 Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte	
60 min	Inkubation bei 58°C
3x10 min	Xylol
2x5 min	Ethanol 99,6%
5 min	Ethanol 96%
5 min	Ethanol 70%
2.2.4.1.2 Färben der Gewebeschnitte	
2 min	A. dest
20 min	Hämalaun nach Mayer, sauer
5 min	H_2O fließend bläuen
1 min	Ethanol 96%
4 min	Eosin Y
2.2.4.1.3 Dehydrieren der Gewebeschnitte	
kurz spülen	A. dest
2x2 min	Ethanol 96%
5 min	Ethanol 99,6%
2x5 min	Isopropanol 99,8%
3x5 min	Xylol
Eindecken mit Pertex®	

2.2.4.2 Elastica van Gieson-Färbung für die Quantifizierung der medialen Wandstärke

Entparaffinieren und Rehydrieren wie unter 2.2.4.1.1	
16 h	Resorcin-Fuchsin
15 min	H_2O fließend
kurz abspülen	A. dest
5 min	Fe-Hämatoxylin nach Weigert A + B 1:1
kurz abspülen	A. dest
15 min	H_2O fließend
kurz abspülen	A. dest
10 min	van Gieson-Lösung
kurz abspülen	A. dest
Dehydrieren und Eindecken mit Pertex® wie unter 2.2.4.1.3	

2.2.4.3 Picro-Sirius Red-Färbung zur Quantifizierung des Kollagengehalts

Entparaffinieren und Rehydrieren wie unter 2.2.4.1.1	
kurz abspülen	A. dest
60 min	0,1% Picro-Sirius Red
3x2 min	Essigsäure 1%
kurz abspülen	A. dest
Dehydrieren und Eindecken mit Pertex® wie unter 2.2.4.1.3	

2.2.4.4 Tolouidinblau-Färbung - metachromatische Färbung von Mastzellen

Entparaffinieren und Rehydrieren wie unter 2.2.4.1.1	
2 min	A. dest
2-3 min	Tolouidinblau-Gebrauchslösung
5 s	A. dest
5 s	A. dest
10x kurz eintauchen	Ethanol 96%
10x kurz eintauchen	Ethanol 100%
3 min	Xylol
3 min	Xylol
Eindecken mit Pertex® wie unter 2.2.4.1.3	

2.2.4.5 Immunhistochemische Färbung für α-smooth muscle actin und von Willebrand-Faktor

Entparaffinieren und Rehydrieren wie unter 2.2.4.1.1		
15 min	Block endogener Peroxidasen	H_2O_2-Methanol-Gemisch 1:1
2 x 5 min	Waschen	A. dest
2 x 5 min	Waschen	PBS
15 min	Proteolytische Demaskierung	Trypsin 1:3 bei 37°C
4 x 5 min	Waschen	PBS
15 min	Blocken unspezifischer Bindungen	BSA 10%
2 x 5 min	Waschen	PBS
10 min	2,5% Normal Horse Serum	Vector Quick-Kit
30 min	1. Primärantikörper α-smooth muscle actin	1:800 in BSA 10%

4 x 5 min	Waschen	PBS
10 min	biotinylierter Sekundärantikörper	Vector Quick-Kit
3 x 5 min	Waschen	PBS
5 min	Streptavidin-Peroxidase-Komplex	Vector Quick-Kit
3 x 5 min	Waschen	PBS
25 s – 1 min	Violettes Chromogen	Vector VIP® Substrat Kit
5 min		H_2O
5 min	Waschen	PBS
15 min	Blocken unspezifischer Bindungen	BSA 10%
2 x 5 min	Waschen	PBS
20 min	2,5% Normal Horse Serum	ImmPRESS Kit anti-Rabbit Ig Peroxidase
30 min	2. Primärantikörper anti-Von Willebrand-Faktor	1:1200 in 10% BSA bei 37°C
4 x 5 min	Waschen	PBS
30 min	Sekundär-Antikörper	ImmPRESS Kit anti-Rabbit Ig Peroxidase
2 x 5 min	Waschen	PBS
25-30 s	Braunes Chromogen	Vector DAB Substrat Kit
5 min	Waschen	H_2O
3 min		Methylgrün bei 60°C auf Heizplatte
Dehydrieren und Eindecken mit Pertex® wie unter 2.2.4.1.3		

2.2.4.6 Protokolle für die Histologie

20x PBS – Phosphate buffered saline

NaCl	160,00g
KCl	4,00g
Na_2HPO_4	23,00g
KH_2PO4	4,00g

Substanzen in 900ml A. dest lösen, auffüllen auf 1000ml und vor Gebrauch auf 1x Konzentration verdünnen

10% BSA

BSA	20,00g

in 200ml 1x PBS lösen und anschließend bei -20°C bis zum Gebrauch lagern.

1%iger HCl-Alkohol

25% HCl	7,20ml
70% Ethanol	193,00g

Resorcin-Fuchsin-Lösung, sauer

Weigerts Resorcin-Fuchsin	10,00ml
1%iger HCl-Alkohol	200,00ml

2% Säurefuchsin

Säurefuchsin	2,0g
A. dest	100,00ml

1% Essigsäure

100% Essigsäure	2,0ml
A. dest	198,00ml

van Gieson-Lösung

Pikrinsäure	240,00ml
2% Säurefuchsin	8,00ml
1% Essigsäure	4,00ml

1% Toluidinblau (Stocklösung)

Toluidinblau O	1,0g
70% Ethanol	100,00ml

1% Natriumchlorid (immer frisch ansetzen)

Natriumchlorid	1,0g
A. dest	100,00ml

Toluidinblau-Gebrauchslösung

Toluidinblau-Stocklösung	20,00ml
1% NaCl	180,00ml

Gut mischen, pH-Wert auf 2,0-2,3 einstellen

2.2.4.6 Morphometrische Analyse des Muskularisierungsgrades

Um den Muskularisierungsgrad von Lungengefäßen analysieren zu können, wurden Paraffinschnitte mit einer immunhistochemischen Doppelfärbung gegen die Antigene α-smooth muscle actin und von Willebrand Faktor (Faktor VIII) wie unter Punkt 2.2.4.5 gefärbt.

Pro Tier wurden je 85 intrapulmonale Gefäße mit einem externen Durchmesser von 20-50µm, 10 Gefäße mit einem Durchmesser von über 50-100µm und 5 große Gefäße (Durchmesser > 100µm) bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt. Mit Hilfe der Leica Q Win Standard Analyzing Software wurde der Muskularisierungsgrad bestimmt, indem der violette Anteil der Anti- alpha smooth muscle actin (α-sma) positiven Gefäßwandbereiche und der nicht-muskularisierte braunen endothelialen anti- von Willebrand Faktor-Färbung colorimetrisch-spektrometrisch berechnet wurden.
Die Gefäße wurden unterteilt in voll-muskularisiert, partiell muskularisiert oder nicht muskularisiert. Als voll-muskularisiert galten Gefäße mit einem Anteil von über 75% α-sma positiver Bereiche, teil-muskularisiert zwischen 5 und 75% und nicht-muskularisiert Gefäße unter einem Anteil von 5% α-sma der Gefäßmedia.

2.2.4.7 Analyse der medialen Wandstärke

Die Elastica-van-Gieson Färbung wurde zur Bestimmung der Wandstärke verwendet. Dazu wurden genau wie bei der Analyse des Muskularisierungsgrades 85 kleine (20-50µm Durchmesser), 10 mittlere (>50-100µm Durchmesser) und 5 große Gefäße (>100µm Durchmesser) analysiert.
Die Wandstärke wurde definiert als mittlerer Abstand zwischen *Lamina elastica externa* und Gefäßlumen. Zur Berechnung der medialen Wandstärke wurde dieser Wert durch den externen Gefäßdurchmesser geteilt, um einen von der Gefäßgröße unabhängigen Wert zu erhalten.

Prozent mittlere Wandstärke = (2 x Mediadicke/externer Gefäßdurchmesser) x 100 (% MWST)

2.2.4.8 Sirius Red Färbung

Der prozentuale Kollagengehalt wurde bei einer 400-fachen Vergrößerung sowohl von rechten Ventrikeln als auch von Lungenschnitten analysiert. Der gesamte Gewebsschnitt wurde meanderförmig abgefahren und jedes zweite Bild einer Analyse mit Leica Q Win Standard Analyzing Software unterzogen. Dazu wurden alle Kollagen-positiven roten Bereiche prozentual zu den negativen gelben ermittelt.

2.2.4.9 Ashcroft's Fibrose Scoring

Um den Grad der Lungenfibrose einschätzen zu können, wurden Haematoxylin-Eosin-gefärbte Paraffinschnitte mithilfe der Leica Q Win Standard Analyzing Software bei einer 100-fachen Vergrößerung eingescant und die entstandenen Bilder anschließend ausgewertet. Hierzu wurde das modifizierte Ashcroft Scoring verwendet. Dabei wurden nur Bilder in die Analyse integriert, bei denen eine Lungenfläche von circa 60% gegeben war.
Das Ashcroft Scoring bewertet die Dicke der alveolaren Septen. Das modifizierte Scoring wurde auf 4 Bewertungskriterien reduziert.

0 gesundes, Gewebe, normal dünne Septen
2 verdickte Septen, < als 2 Zellfoci,
4 deutliche Reduktion des alveolaren Raums, > als 2 Zellfoci
6 nahezu kompletter Verlust des alveolaren Raums

2.2.4.10 Statistische Auswertung

Die Daten sind angegeben als Mittelwerte (MW) ± Standardfehler (SEM). Die Normalverteilung wurde getestet. Die Unterschiede zwischen mehreren Gruppen wurde durch Varianzanalyse (ANOVA – analysis of variance) mit dem Student-Newman-Keuls post-hoc Test ermittelt. Ein P-Wert unter 0,05 wurde als signifikant angesehen und mit * gekennzeichnet.

2.2.5 Molekularbiologie

2.2.5.1 RNA-Isolation

1. 100 mg Gewebe in 1ml TRIzol® in Mikroschraubgefäßen mit ca. 15 Keramikkügelchen im Homogenisator (Precellys 24 - lysis & homogenization, Bertin Technologies) zerkleinern und für 10 min bei RT stehen lassen
2. 10 min bei 12000g bei 4°C zentrifugieren
3. 200µl Chloroform pro 1ml TRIzol® hinzufügen und durch Invertieren gut mischen, anschließend bei RT für 10min inkubieren
4. wässrige Phase vorsichtig abnehmen und in ein neues Mikrozentrifugengefäß überführen
5. 500µl Isopropanol hinzugeben und durch Inversion mischen, anschließend bei RT 10min inkubieren
6. 10min bei 12000g bei 4°C zentrifugieren
7. Überstand vorsichtig dekantieren und das RNA-Pellet mit 1ml 75% Ethanol waschen und anschließend für 5min bei 7500g bei 4°C zentrifugieren
8. Überstand abermals dekantieren und das Mikrozentrifugengefäß zum Trocknen des Pellets offen stehen lassen
9. Pellet in 50µl DEPC-H_2O resuspendieren und für 10min bei 55°C im Thermocycler inkubieren
10. Konzentrationsbestimmung der RNA bei λ=260nm

2.2.5.2 cDNA-Synthese mittels iScript (Bio-Rad)

1. in einem Mikrozentrifugengefäß werden die RNA (0,1µg/µl) und der oligo(dT)-Pimer (500µg/ml) vermischt und für 6min bei 70°C im Thermocycler inkubiert
2. 30µl Mastermix hinzufügen und direkt im Thermocycler für 5min bei 25°C, anschließend 1h bei 42°C, gefolgt von 15 min bei 70°C inkubieren
    - Mastermix:

Reaktionspuffer [5x]	8µl
$MgCl_2$ [25mM]	4µl
dNTP-Mix [10mM]	2µl
Ribonuklease-Inhibitor [40U/µl]	1µl

M-MLV reverse Transkriptase	2µl
DEPC-H_2O	13µl

3. Bestimmung der cDNA-Konzentration (mit Hilfe des Spektrometers Nano-Dropbei) 260nm und evtl. Verdünnung der cDNA auf 0,25µg/µl, anschließend Lagerung bei -20°C

2.2.5.3 Quantitative Real-time PCR (SYBR Green-Methode)

1. Ansetzen der Komponenten für die Reaktion

Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG	12,5µl
$MgCl_2$ [50mM]	1µl
Forward primer [10µm]	0,5µl
Reverse primer [10µm]	0,5µl
ROX Referenz-Farbstoff [25µM]	0,1µl
cDNA [0,25µg/µl]	2µl
DEPC-H_2O	8,4µl

2. Pipettieren in 96-well Zellkulturplatte im Doppelansatz
3. Programm im Gerät (Stratagene MX3000P QPCR System) wie folgt einstellen:

Abschnitt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Denaturierung	95°C	10min	
Denaturierung	95°C	30s	40
Hybridisierung	58°C	30s	
Elongation	72°C	30s	
Denaturierung	95°C	1min	
Schmelzkurve	55-95°C		
Abkühlen	25°C	∞	

2.2.5.4 Enzyme-linked Immonusorbent Assay (ELISA)

Der Proteingehalt an TGF-β1 (Transforming Growth Factor) wurde im Blutplasma mittels ELISA bestimmt. Bei dem hier durchgeführten sog. Sandwich-ELISA handelt es sich um ein spezifisches, quantitatives Nachweisverfahren für Proteine, dass auf der Antigen-Antikörper-Bindung beruht. Die Bindung des gewünschten Proteins erfolgt durch einen spezifischen, an eine Mikrotiterplatte gekoppelten Antikörper.
Im Anschluss daran wird durch Zugabe des enzymgekoppelten Detektions-antikörpers, welcher an das bereits gebundene Antigen bindet, die Grundlage für die Quantifizierung des Proteingehaltes gelegt. Mittels spezifischen Substrats erfolgt, bedingt durch die Oxidation des farblosen Chromogens, ein Farbumschlag.
Die Farbintensität und die Menge an gebundenem Protein stehen in einer proportionalen Beziehung, d.h. je intensiver die Färbung, desto mehr Protein wurde gebunden.
Zum Nachweis von TGF-β wurde das mouse TGF-β1 DuoSet Kit von R&D Systems laut Herstellerangaben verwendet. Da keine spezifischen ELISA Kits für Hamster kommerziell verfügbar sind und sich die Homologie der Aminosäuresequenz verglichen mit Maus-TGF-β auf 100% beläuft (Melby *et al*., 1998), wurde ein ELISA Kit gewählt, welches spezifisch für Maus ist.
Die Quantifizierung der Proteinkonzentrationen erfolgte durch die photometrische Bestimmung im Bio-Tex ELx 808 und anhand der Standardkurve, welche bei jeder Durchführung angefertigt wurde.
Die einzelnen Messwerte der Doppelansätze wurden am Ende gemittelt.

3. Ergebnisse

3.1 Veränderungen des rechten Herzventrikels

3.1.1Rechtsherzhypertrophie

Um eine Aussage über die Rechtsherzhypertrophie, welche sich im Verlauf der pulmonalen Hypertonie entwickelt, machen zu können, wurde das Verhältnis der Masse des rechten Herzventrikels zum linken Ventrikel plus Septum ermittelt. Ebenfalls wurden die Gewichte der rechten Ventrikel ins Verhältnis zum Körpergewicht der jeweiligen Tiere gesetzt, da dies auch ein Indikator für eine Rechtsherzhypertrophie ist.

Im hier beschriebenen Tiermodell der Schistosomiasis-induzierten pulmonalen Hypertonie konnte weder bei den für 4 Wochen infizierten Tieren, noch bei den für 7 Wochen infizierten Hamster eine signifikante Veränderung des Verhältnisses vom rechten Herzventrikel zu linken Ventrikel (RV/LV+S) gemessen werden (Abb. 4A). Dabei fällt vor allem auf, dass sich die Ergebnisse der uninfizierten Tiere (RV/LV+S = 0,29) im Vergleich zu den für 4 Wochen infizierten Tiere (RV/LV+S = 0,28) kaum unterscheiden. In der Gruppe der länger infizierten Tiere hingegen zeigt sich ein leichter, nicht signifikanter Anstieg (RV/LV+S = 0,32) dieses Verhältnisses.

Ein sehr ähnliches Ergebnis zeigte sich auch bei der Messung des Verhältnisses von rechtem Ventrikel zum Körpergewicht (RV/KG): bei keiner der beiden Infektions-Gruppen (7 Wochen: 0,68; 4 Wochen: 0,71) konnten signifikante Änderungen im Vergleich zu den uninfizierten Tieren (RV/KG = 0,66) beobachtet werden (Abb. 4B).

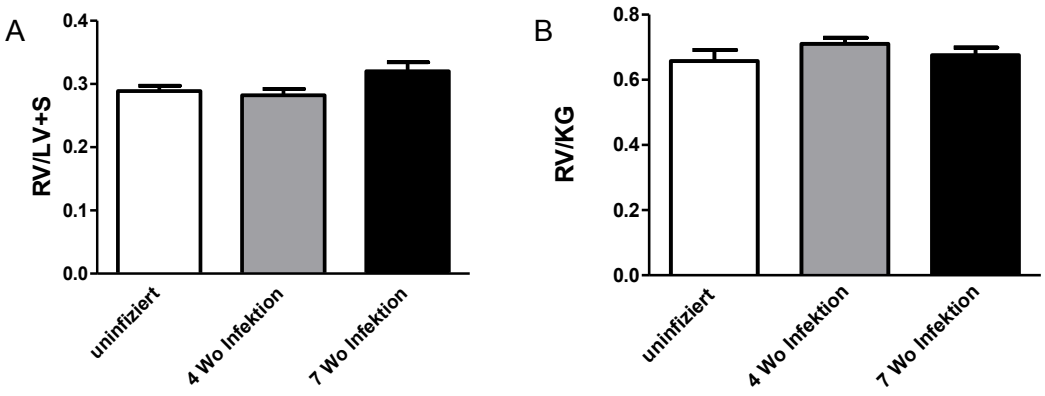

Abbildung 4: Rechtsherzhypertrophie in der Schistosomiasis-induzierten PAH im Hamstermodell.

Bei keiner der beiden Berechnungsmethoden gibt es Hinweise auf eine Rechtsherzhypertrophie im Krankheitsverlauf. n = 10 Tiere pro Gruppe

3.1.2 Herzfibrose

Da sich keinerlei Anzeichen für eine bestehende Rechtsherzhypertrophie anhand der beiden ermittelten Verhältnisse ergeben haben, wurde zusätzlich noch der Kollagengehalt des rechten Herzventrikels gemessen (Abb. 5). Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede bei den für 4 Wochen infizierten Tieren (4,33%) und bei den 7 Wochen Tieren (4,12%) im Vergleich zur uninfizierten Gruppe (2,32%). Man spricht hierbei von einer Herzfibrose.

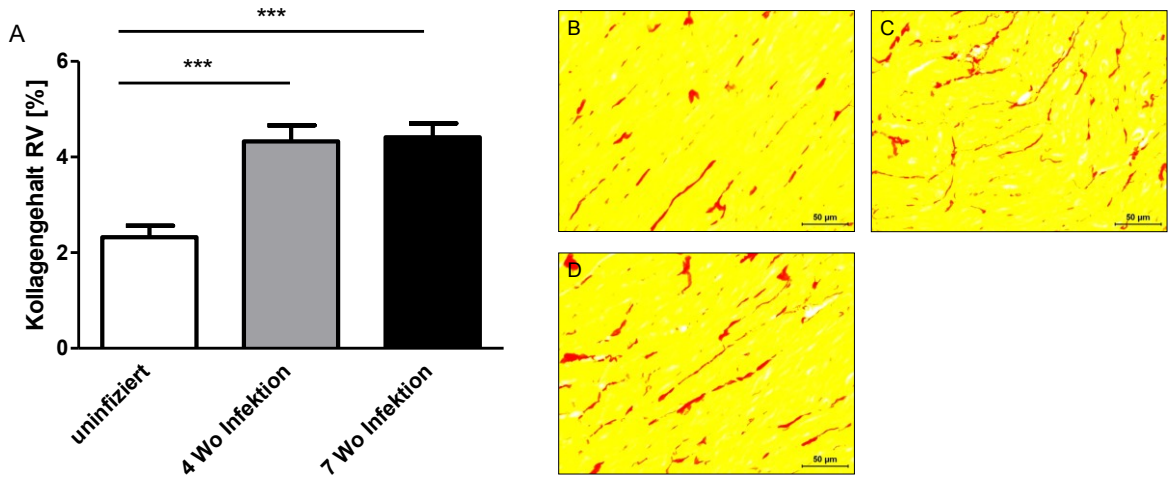

Abbildung 5: Herzfibrose des rechten Ventrikels im Verlauf der Schistosomiasis-induzierten PAH.

In beiden Infektionsgruppen ließ sich eine signifikante Erhöhung des Kollagengehaltes um ca. 2% messen (A). Dazu wurde Gewebe des rechten Ventrikels von uninfizierten (B) und 4- (C) bzw.

7-wöchig (D) infizierten Tieren mit Picro Sirius Rot gefärbt (rot = Kollagenfasern). Scala = 50 µm. n = 10 Tiere pro Gruppe

3.2 Pulmonal-vaskuläre Umbauprozesse

3.2.1 Der Muskularisierungsgrad kleiner Pulmonalarterien ist ein Parameter des strukturellen Gefäßwandumbaus

Mit zunehmendem Krankheitsverlauf der Schistosomiasis-induzierten PH nimmt i. d. R. auch der Muskularisierungsgrad der Lungengefäße zu.
Die signifikantesten Veränderungen sind bei kleinen (20 – 50µm im Durchmesser) Lungengefäßen zu beobachten (Abb. 6): der Anteil der nicht-muskularisierten Gefäße sank (von 54,9% in uninfizierten Lungen) auf 9,7% bei 4 Wochen infizierten und auf 23,6% bei 7 Wochen infizierten Hamsterlungen. Eine Zunahme von voll-muskularisierten Lungengefäßen zeigte sich bei Lungen von 4-wöchig infizierten Tieren: der Anteil von vollmuskularisierten Gefäßen stieg auf 39,4% im Vergleich zu 18,9% bei uninfizierten Lungen.
Die Anteile von partiell-muskularisierten Gefäßen änderten sich nicht signifikant, allerdings konnte man einen Anstieg bei den infizierten Gruppen im Vergleich zu den Lungen von uninfizierten Tieren beobachten.

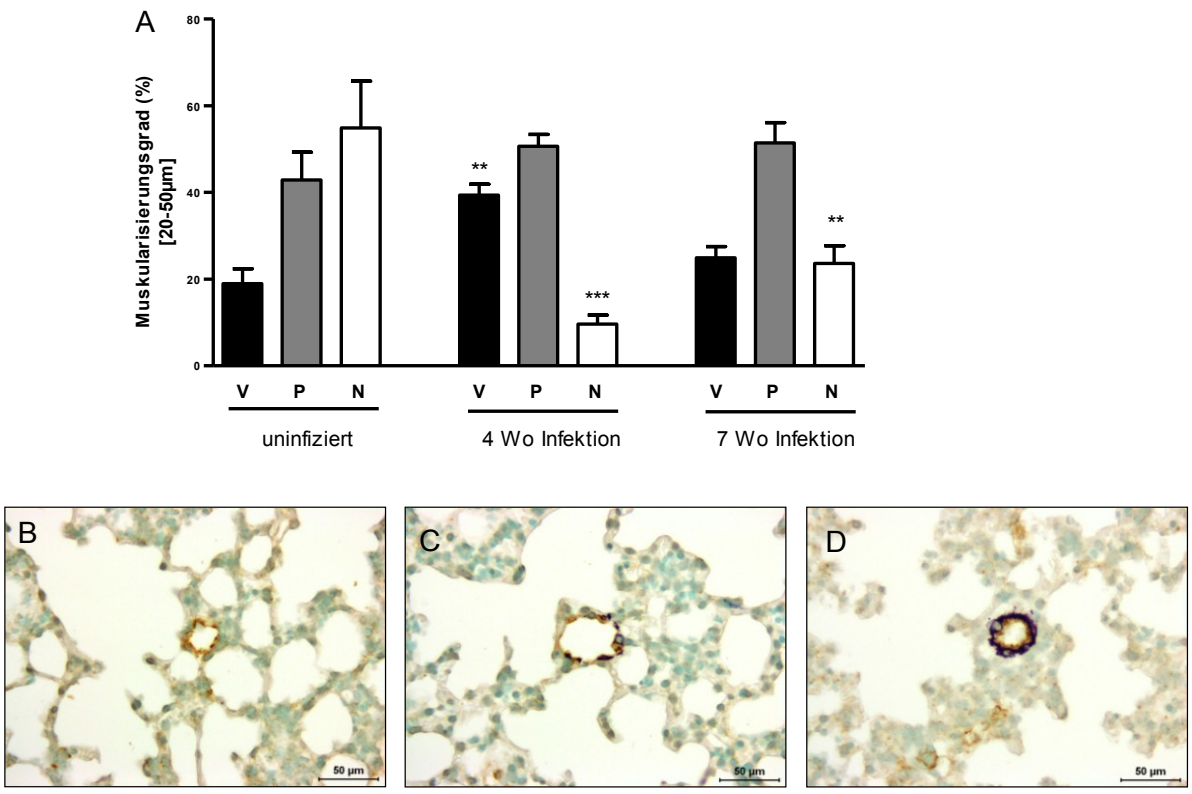

Abbildung 6: Muskularisierungsgrad der kleinen pulmonal-arteriellen Gefäße.
In der Gruppe der 4-wöchig infizierten Tiere war eine Reduktion der nicht-muskularisierten Gefäße um ca. 4/5 im Vergleich zu den uninfizierten Hamstern zu beobachten, während der Anteil von vollmuskularisierten pulmonal-arteriellen Gefäße verdoppelt wurde. Die Analyse der Lungen der für 7 Wochen infizierten Tiere zeigte ebenfalls eine Reduzierung des Anteils nicht-muskularisierter Gefäße um 50% (A). Die Bilder B-D zeigen Beispiele für nicht- (B), teil- (C) und vollmuskularisierte (D) kleine Pulmonalarterien. Scala = 50 µm. N = nicht-muskularisiert; P = partiell-muskularisiert; V = vollmuskularisiert. n = 10 Tiere pro Gruppe

Auch in der Gruppe der mittleren Lungengefäße (>50 – 100µm im Durchmesser) zeigten sich histopathologische Veränderungen. So reduzierte sich die Anzahl der nicht-muskularisierten pulmonalen Gefäße bei den für 4 Wochen infizierten Tieren auf 2,3% im Vergleich zu 18,4% bei uninfizierten Tieren. Dabei kam es zu einer Erhöhung des Anteils an vollmuskularisierten Gefäßen bei 4 Wochen infizierten Tieren. Im weiteren Krankheitsverlauf (Tiere, welche für 7 Wochen infizierte wurden) ließ sich eine reversible Tendenz des Remodeling-Prozesses, welcher bei den für 4 Wochen infizierten Tieren offensichtlich war, feststellen (Abb. 7).

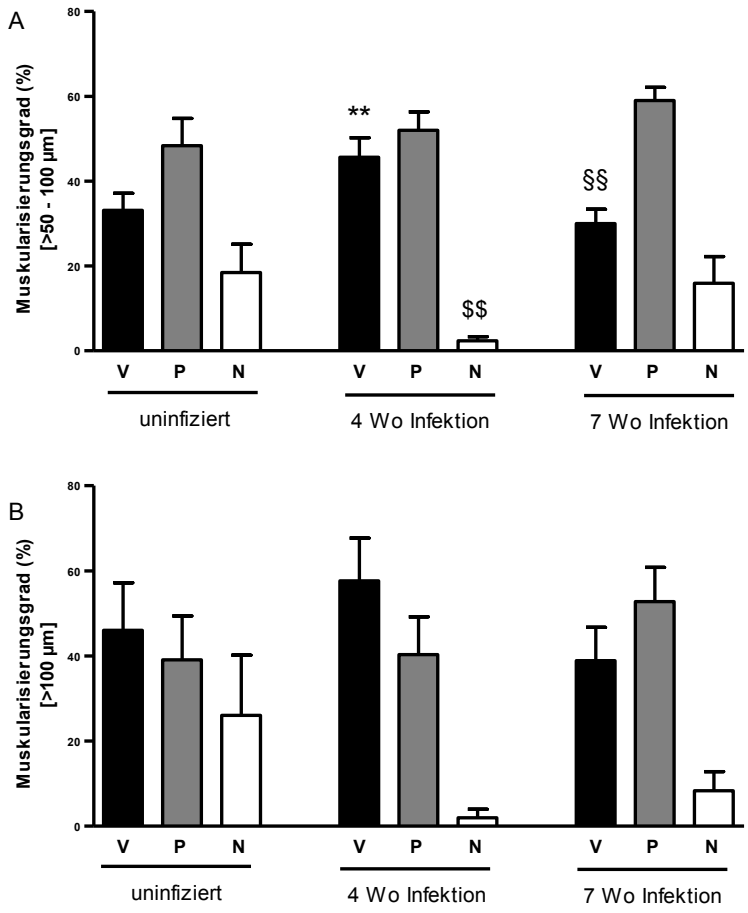

Abbildung 7: Muskularisierungsgrad bei mittleren und großen pulmonal-arteriellen Gefäße. Der Anteil der vollmuskularisierten, mittleren (>50 – 100 µm) Gefäße war bei den 4-wöchig infizierten Tieren signifikant erhöht im Vergleich zu den uninfizierten Tieren. Des Weiteren reduzierte sich der prozentuale Anteil nicht-muskularisierter Gefäße auf 2.34% gegenüber den uninfizierten Tieren (18,47%). Bei den für 7 Wochen infizierten Hamstern konnten keine signifikanten Veränderungen des Muskularisierungsgrades im Vergleich zu uninfizierten Tieren beobachtet werden. Allerdings reduzierte sich der Anteil vollmuskularisierter Gefäße (30,03%) verglichen mit den 4-wöchig infizierten Tieren (45,63%) (A).

Bei großen (>100 µm Ø), pulmonal-arteriellen Gefäßen waren keine signifikanten Veränderungen des Muskularisierungsgrades zu beobachten (B). N= nicht-muskularisiert; P= partiell-muskularisiert; V= vollmuskularisiert. n = 10 Tiere pro Gruppe. ** = V (4 Wo Infektion) vs. V (uninfiziert); §§ = V (7 Wo Infektion) vs. V (4 Wo Infektion); $$ N (4 Wo Infektion) vs. N (uninfiziert).

3.2.2 Analyse der medialen Wandstärke

Neben dem Muskularisierungsgrad nimmt im Krankheitsverlauf auch die mediale Wandstärke bei Lungengefäßen zu. Um dies zu analysieren, wurden van Gieson-gefärbte Paraffinschnitte mittels computer-gestützter Software (Leica, Nussloch, Deutschland) ausgewertet.

Bei der Analyse der Paraffinschnitte wurde deutlich, dass bei den Lungengefäßen Umbauprozesse stattfanden: die mediale Wandstärke (Abb. 8) bei kleinen (20 – 50µm Ø) erhöhte sich signifikant um ca. 4% bei beiden Infektionsgruppen verglichen mit den uninfizierten Hamster (19,7%).

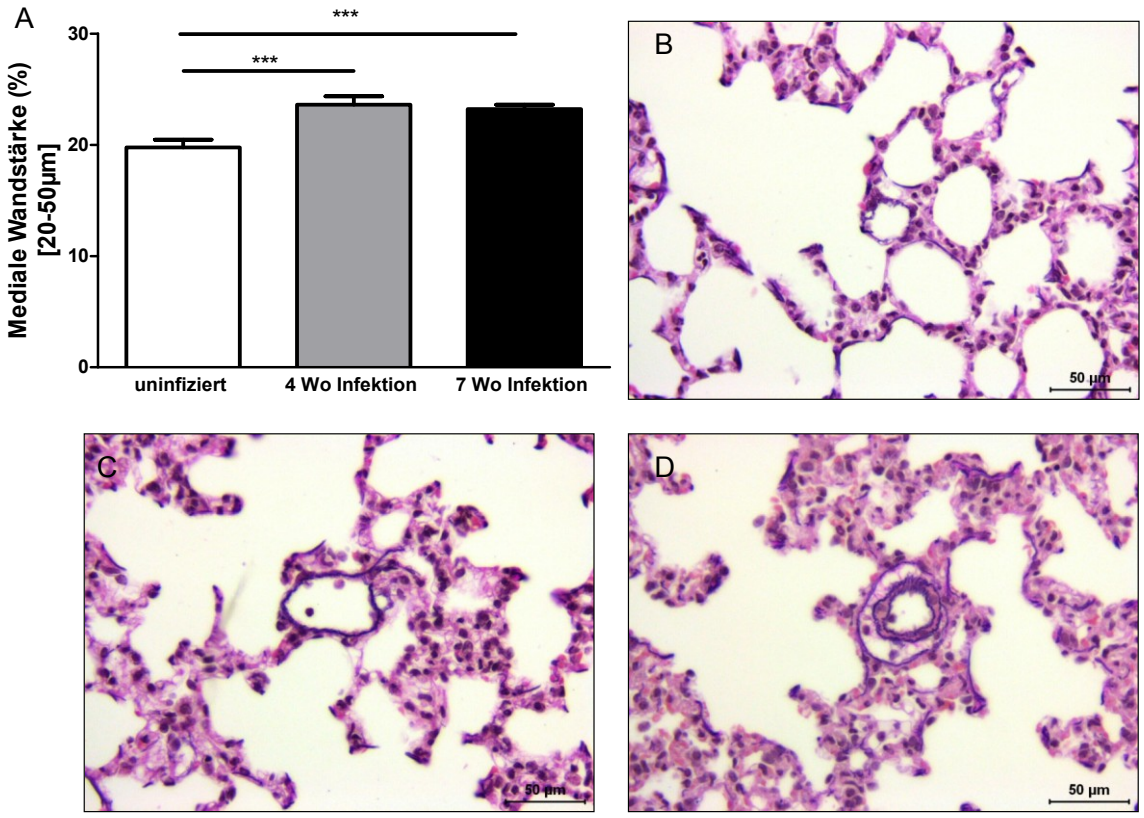

Abbildung 8: Mediale Wandstärke von kleinen pulmonal-arteriellen Gefäßen.

In beiden Infektionsgruppen war eine signifikante Zunahme der medialen Wandstärke um ca. 5% im Vergleich zu uninfizierten Hamstern messbar (A). Dazu wurden Lungengewebsschnitte von uninfizierten (B) und infizierten (C und D) Tieren für Elastika van Gieson gefärbt. Die Bilder C und D zeigen die schrittweise Verdickung der medialen Wand. Scala = 50 µm. n = 10 Tiere pro Gruppe.

Die mediale Wandstärke wurde auch für die mittleren (>50 – 100µm Ø) und großen (>100µm Ø) Gefäße analysiert. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der medialen Wandstärke bei infizierten Tieren im Vergleich zu uninfizierten (Abb. 9 A und B).

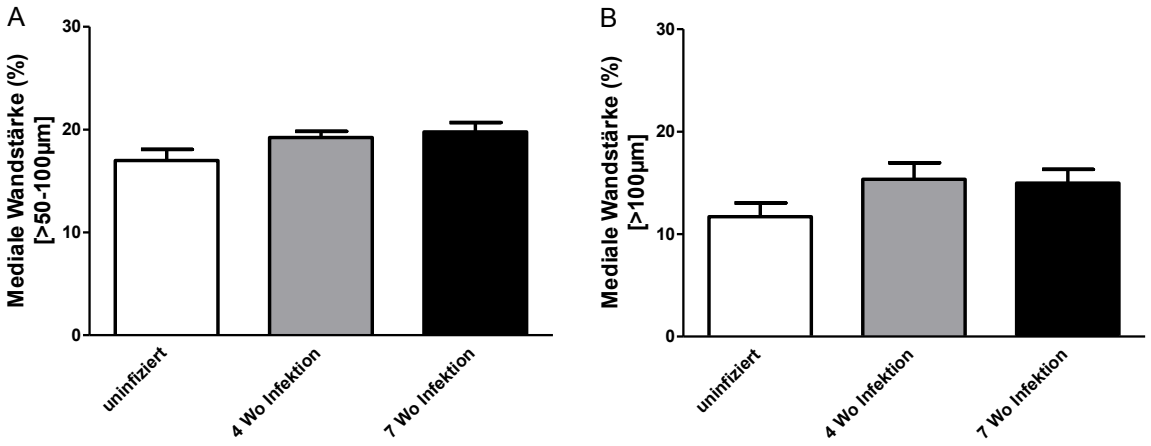

Abbildung 9: Mediale Wandstärke von mittleren und großen pulmonal-arteriellen Gefäßen. In keiner der beiden Gefäßklassen zeichneten sich signifikante Unterschiede der Infektionsgruppen zu den uninfizierten Tieren aus. n = 10 Tiere pro Gruppe.

3.2.3 Messung des Fibrosegrades der Lunge

Da sich während der beiden morphometrischen Analysen der Lungenschnitte des Öfteren fibrotische Areale innerhalb der Lungen zeigten, wurden zusätzliche Färbungen, die eine Auswertung des Fibrosegrades zuließen, durchgeführt. Wie bereits bei der Messung der Herzfibrose, wurde auch für die Lunge eine Färbung des Lungenkollagens mithilfe von Picro Sirius Rot unternommen. Dabei zeigte sich eine Zunahme des prozentualen Anteils an Lungenkollagen in den beiden Infektionsgruppen (4 Wochen Infektion: 1,97%, 7 Wochen Infektion: 2,42%) im Vergleich zu den nicht-infizierten Hamsterlungen (1,27%). Die Zunahme des interstitiellen Kollagengehaltes scheint dabei in Abhängigkeit von der Infektionsdauer zu stehen, da nur für die 7-wöchige Infektionsdauer eine signifikante Änderung des Kollagengehaltes zu beobachten war (Abb. 10A).

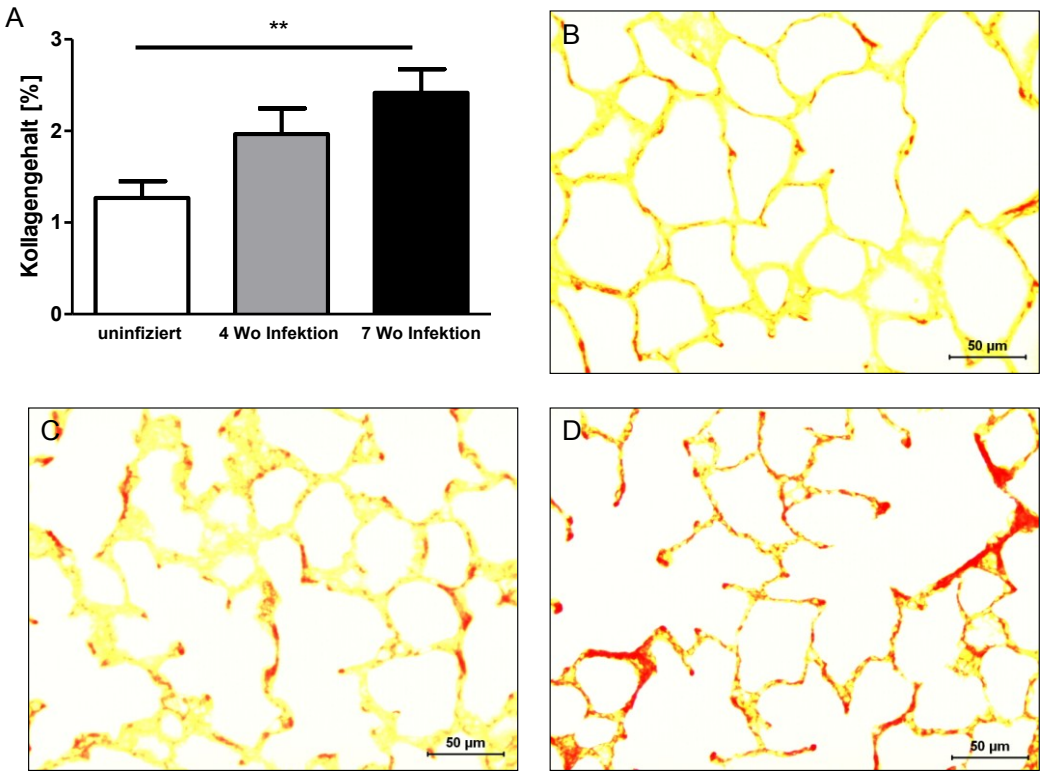

Abbildung 10: Analyse des Kollagengehaltes in der Lunge.

Im Krankheitsverlauf der Schistosomiasis-induzierten PAH war eine Verdopplung des interstitiellen Kollagengehaltes (rot angefärbt; gelb = alveolare Septen) messbar (A). Dazu wurden Lungengewebsschnitte von uninfizierten (B) und 4-wöchig (C), sowie 7-wöchig (D) infizierten Tieren mit Picro Sirius Red gefärbt. Scala= 50 µm. n = 10 Tiere pro Gruppe.

Zusätzlich zur Analyse des Kollagengehaltes in den Lungen wurden weitere Paraffinschnitte zur Übersicht H&E gefärbt. Anhand dieser Färbung konnte man dann mithilfe von Ashcroft's Fibrose-Scoring einen weiteren Parameter zur Beurteilung der Lungenfibrose generieren. Dabei zeigte sich, wie bereits bei der Messung des Kollagengehaltes in der Lunge, eine Zunahme des Fibrosegrades im Verlauf der Erkrankung (Abb. 11). Zu bemerken ist, dass in den Infektionsgruppen eine beinahe Verdoppelung (für 4 Wochen infizierte Tiere: 1,15) bzw. eine beinahe Verdreifachung (für 7 Wochen infizierte Tiere: 1,59) des Ashcroft Scorings, welches ein Äquivalent zur Dicke der alveolaren Septen ist, im Vergleich zu den uninfizierten Tieren (0,67) zu beobachten war.

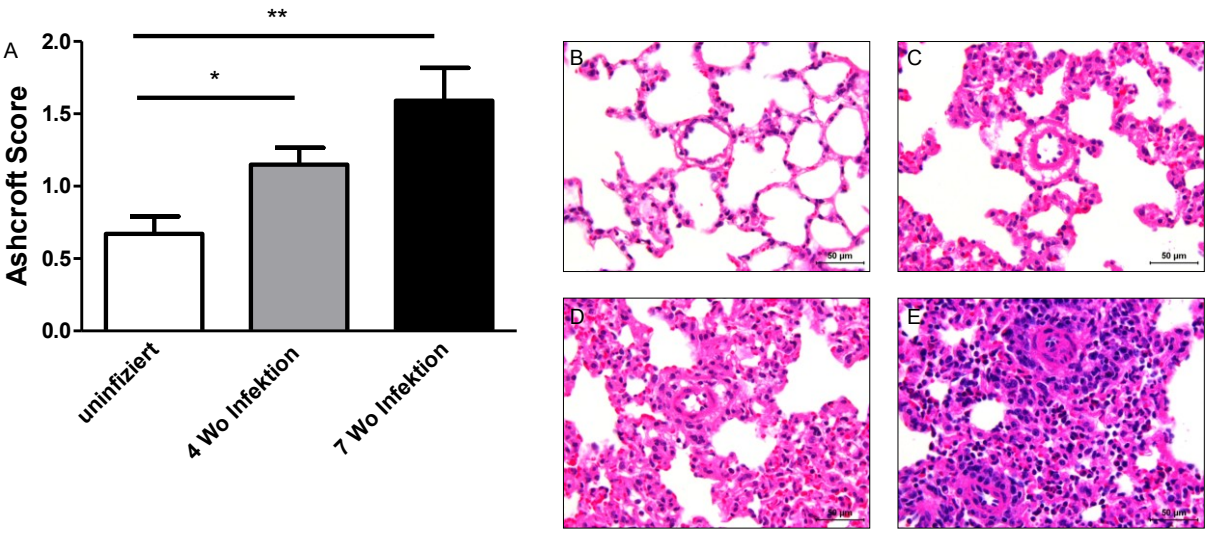

Abbildung 11: Ashcroft's Fibrose-Scoring.

Es konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Infektionsdauer auch die Intensität der Lungenfibrose zunahm (A). Für das Ashcroft Scoring wurden Lungenschnitte von uninfizierten (B) und infizierten (C – D) Tieren HE gefärbt. Die Bilder C – D zeigen die Ashcroft Scoring-Stufen 2 – 6 (Erläuterung siehe 2.2.4.9). Scala= 50 µm. n = 10 Tiere pro Gruppe

3.3. Beteiligung von Mastzellen

3.3.1 Totalzahl der pulmonalen Mastzellen

Da sich die Pärchenegel im Laufe ihrer Reise durch den Körper des Endwirtes auch zirka eine Woche in den Lymph- und Blutgefäßen der Lungen aufhalten und diese vom körpereigenen Immunsystem des Endwirtes erkannt werden, wurden das Mastzellenprofil und die Verteilung der Mastzellen näher untersucht, da Mastzellen ein wichtiger Bestandteil der Immunabwehr sind. Dazu war es nötig, die Mastzellen innerhalb der Lungen mittels Toluidinblau-Färbung sichtbar zu machen.

Besonders auffällig waren die zuerst erfolgende Zunahme der Mastzellen (Abb. 12) bei den für 4 Wochen infizierten Hamstern (1,75 Zellen/mm^2) und die zeitlich nachfolgende signifikante Reduktion der Gesamtzahl der Mastzellen in den für 7 Wochen infizierten Tieren (0,13 Zellen/mm^2).

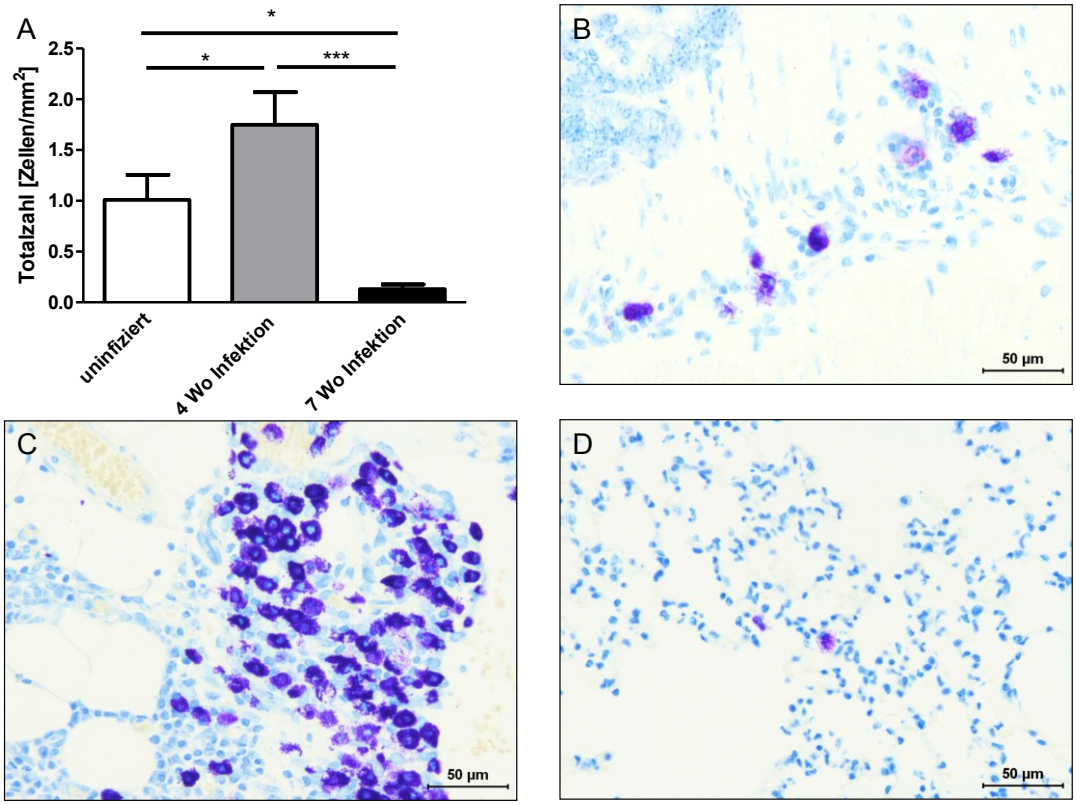

Abbildung 12: Totalzahl der in der Lunge lokalisierten Mastzellen.
Im Krankheitsverlauf der Schistosomiasis-induzierten PAH zeigte sich nach einer 4-wöchigen Infektionsdauer eine signifikante Zunahme der Mastzellen, während nach 7-wöchiger Infektionszeit eine Reduzierung der gesamten Mastzellpopulation in der Lunge zu beobachten. Um die Mastzellen zu visualisieren, wurden Lungengewebsschnitte von uninfizierten (B), 4-wöchig infizierten (C) und 7-wöchig infizierten Tieren mit Toluidinblau gefärbt. n = 10 Tiere pro Gruppe

3.3.2 Verteilung der pulmonalen Mastzellen

Aufgrund dieser ersten Ergebnisse wurden weiterführende Untersuchungen zur Verteilung der Mastzellen innerhalb des Lungengewebes durchgeführt. Dazu wurde die Lokalisierung der Mastzellen in 4 Gruppen unterteilt: Zellen die im Parenchym (also in der Peripherie) zu finden waren, Zellen direkt an Lungengefäßen, Zellen zwischen Lungengefäßen und Bronchien und als letzte Gruppe, Mastzellen, die nur an Bronchien lokalisiert waren.
Zwischen den Hamsterlungen der uninfizierten und der für 4 Wochen infizierten Tiere waren bezüglich der Mastzellverteilung keinerlei signifikanten Unterschiede zu

beobachten: der Großteil aller in der Lunge zu findenden Mastzellen befindet sich in direkter Nähe zum Hauptbronchius bzw. zu den kleineren Bronchien. Änderungen zeigten sich nur in der Analyse der Lungen der für 7 Wochen infizierten Tiere: in dieser Tiergruppe war ein deutlich erhöhter Anteil von Mastzellen (67,00% aller Mastzellen) in der Peripherie angesiedelt und ein signifikant geringerer Anteil (18,68%) an den Bronchien (Abb. 13). Daraus lässt sich schließen, dass bei fortschreitendem Krankheitsverlauf eine Wanderung der Mastzellen von den Bronchien in die Peripherie stattfindet.

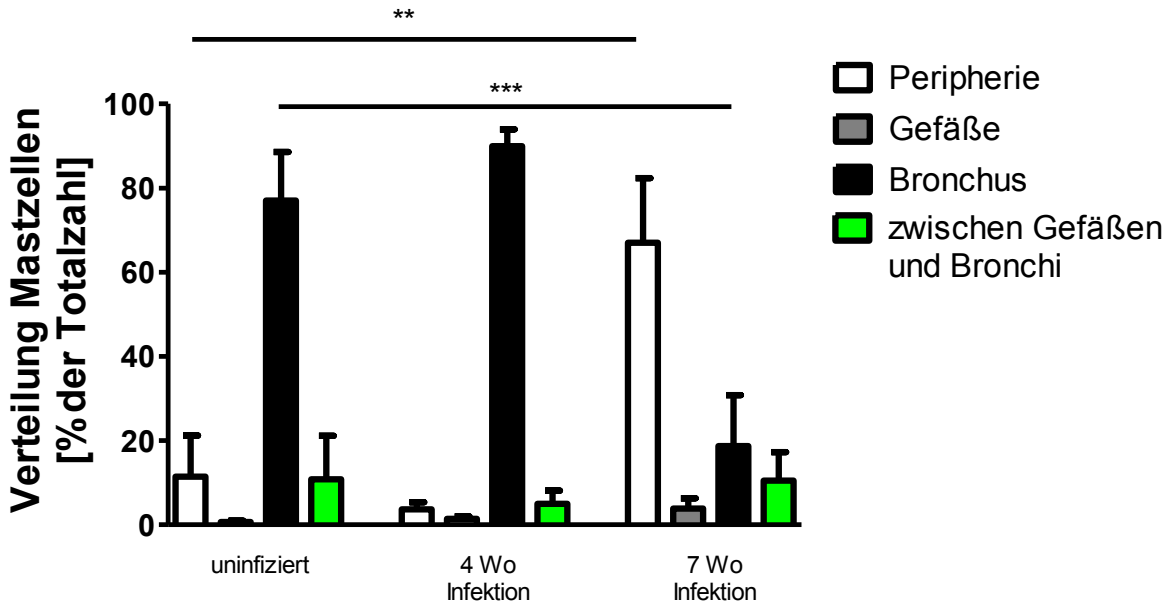

Abbildung 13: Verteilung der pulmonalen Mastzellen.

Nach ca. 7-wöchiger Infektion der Tiere mit Schistosomen konnte eine Umverteilung der Mastszellpopulation in der Lunge beobachtet werden: die sonst an den Bronchien angesiedelten Mastzellen scheinen in die Peripherie auszuwandern. n = 10 Tiere pro Gruppe

3.4 Expressionsprofile von pulmonalen Zytokinen

3.4.1 Expressionsprofile der Th1-Zytokine

Um die Reaktionen des Immunsystems im Verlauf der Infektion näher zu charakterisieren, wurden das Zytokinexpressionsprofil wie auch die Expression von einigen Wachstumsfaktoren in den Lungen mittels quantitativer RT PCR überprüft. Bei der Immunabwehr spielen Interleukine eine große Rolle: sie dienen der Informationsvermittlung und werden von den unterschiedlichen Zellen des Immunsystems sekretiert.

Die Zytokine der Th1-Immunantwort IL-1α, IL-1β, IL12p40, IFN-γ und TNF-α zeigten nur sehr geringfügige Änderungen. Nur für Interferon γ und TNF-α konnten signifikante Veränderungen der ΔΔCt-Werte der Expressionsmuster zwischen den beiden Infektionsgruppen beobachtet werden. Wobei die Tiere der 7-wöchigen Infektion in beiden Fällen stärke Änderungen der Expressionsmusters zeigten als die für 4 Wochen infizierten Tiere (Abb. 14). Während IFN-γ das einzige Lungenzytokin war, welches eine signifikante Hochregulierung (4-fach höhere Expression bei 7-wöchig infizierten Tieren als bei 4-wöchig infizierten Hamstern) zeigte, wurde bei TNF-α vor allem bei den für 7 Wochen infizierten Tieren eine 12-fache Herunterregulation im Vergleich zu 4-wöchig infizierten Hamster festgestellt. Das Expressionsmuster von Interleukin 1α unterscheidet sich von IL-1α, denn diese Gene verhalten sich gegensätzlich. Interleukin 1α wurde im Krankheitsverlauf immer weiter herunterreguliert, während Interleukin 1α nach 4 Wochen Infektionsdauer das Minimum erreichte und im weiteren Verlauf nicht signifikant hochreguliert wurde. Anders verhielt sich das Expressionsmuster von IL-12p40: nach einer 4-wöchigen Infektion war eine Hochregulierung messbar, welche nach einer 7-wöchigen Infektion in eine Herunterregulation umgekehrt wurde.

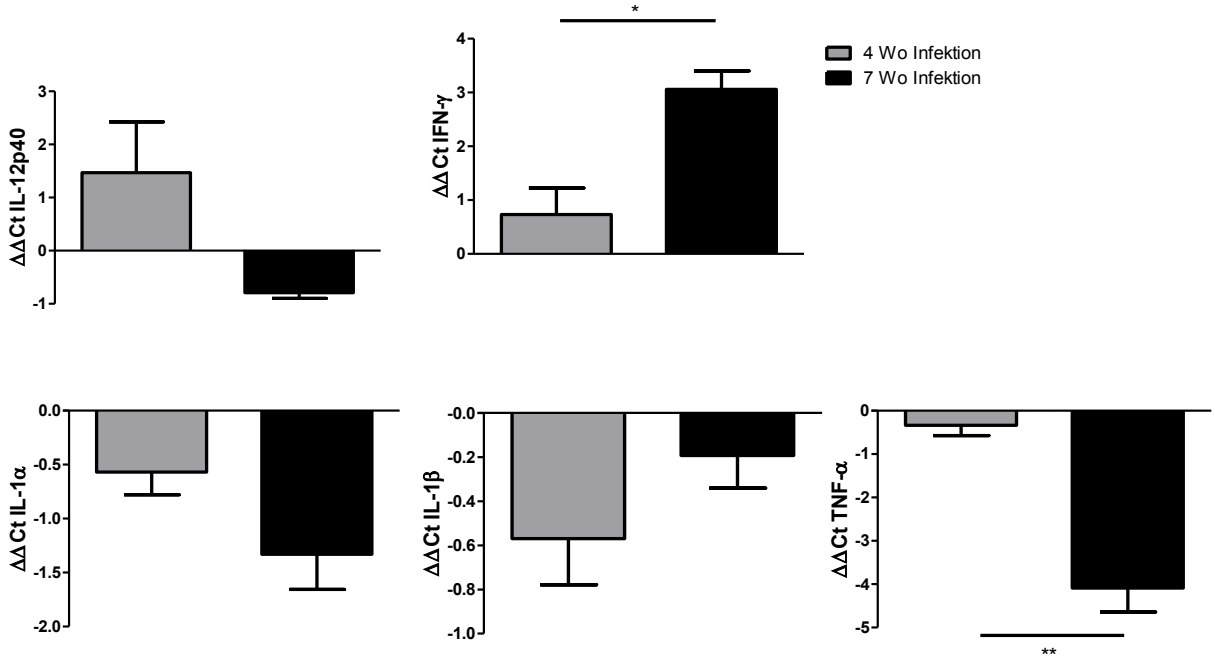

Abbildung 14: Expressionsprofile der Th1-Zytokine.

Interferon γ war in der Gruppe der 7-wöchig infizierten Tiere 4-mal stärker exprimiert als in den Lungen 4-wöchig-infizierter Hamster. Im Gegensatz dazu war TNF-α 12-mal stärker herunterreguliert in den Lungen von 7-wöchig infizierten Tieren im Vergleich zu den für 4 Wochen

infizierten Tieren. Die Interleukine der Th1-Immunantwort zeigten keine signifikanten Änderungen im Verlauf der Schistosomiasis-induzierten PH. n = 5 Tiere pro Gruppe.

3.4.2 Expressionsprofile der Th2-Zytokine

Zusätzlich zu den Komponenten der Th1-Immunantwort wurden auch Komponenten der Th2-Immunantwort untersucht. Diese Komponenten waren die Interleukine 4, 5, 6, 10 und 13. Auffallend bei der Analyse war, dass sich die Expressionsmuster von IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 sehr ähnlich verhielten (Abb. 15). Es zeigte sich immer eine Hochregulation bei Tieren, die für 4 Wochen infiziert wurden. Wird die 7-wöchige Infektionsdauer genauer betrachtet, so wird offensichtlich, dass die vorgehende Hochregulierung in eine Herunterregulierung umgewandelt wurde. Für die Interleukine 4, 6 und 10 lies sich eine ca. 3-fache Herunterregulation bei den für 7 Wochen infizierten Tieren im Vergleich zu 4-wöchig infizierten Hamstern verzeichnen. Interleukin 13 hingegen war in beiden Infektionsgruppen nicht signifikant hochreguliert.

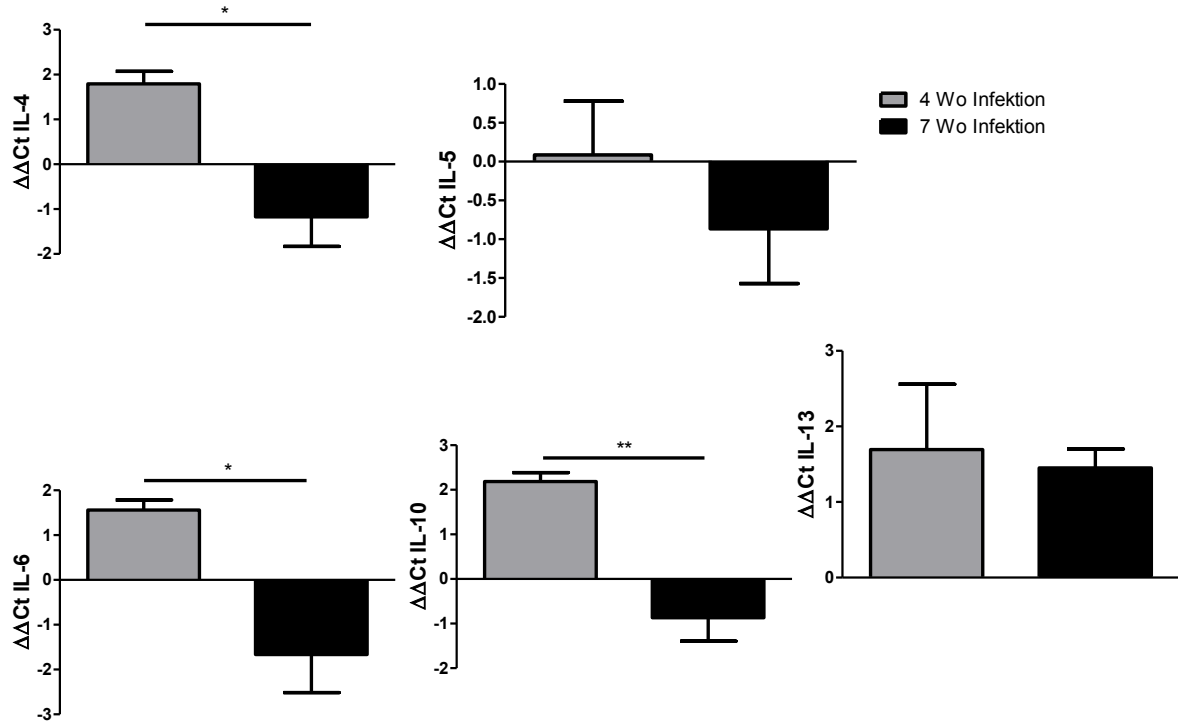

Abbildung 15: Expressionsprofile der Th2-Zytokine.

Die Interleukine 4, 6 und 10 zeigten alle eine signifikante (etwa 3-fache) Herunterregulation nach 7-wöchiger Infektion im Vergleich zu den 4-wöchig infizierten Tieren. Die Veränderungen der Expression von IL-5 und -13 im Verlauf der Schistosomiasis-induzierten PH waren nicht signifikant. n = 5 Tiere pro Gruppe.

3.4.3 Expressionsprofile von Wachstumsfaktoren

Um wichtige Signaltransduktionswege der Schistosomiasis-induzierten pulmonalen Hypertonie und damit verbunden eventuelle Therapieansätze eruieren zu können, wurden die Expressionsprofile der Wachstumsfaktoren TGF-β, PDGF-α und –β näher untersucht. Nach der Analyse der Versuche wurde deutlich, dass alle Wachstumsfaktoren in beiden Infektionsgruppen herunterreguliert waren. Dabei ähnelten sich die Profile von TGF-β und PDGF-α sehr: die Herunterregulierung war bei den 7 Wochen infizierten Tieren stärker ausgeprägt als bei den 4 Wochen infizierten, wobei PDGF-α 3,2-fach geringer in der Gruppe der 7-Wochen-Tiere exprimiert wurde als in der 4-Wochen-Gruppe und TGF-β 1,3-fach geringer in der Gruppe der 7-wöchig infizierten Hamster im Vergleich zu 4-wöchig infizierten Tieren. Bei PDGF-β lies sich eine eher gegenteilige Beobachtung machen: die für 4 Wochen infizierten Tiere zeigten eine 4,7-fach geringere Expression als 7-wöchig infizierte Hamster.

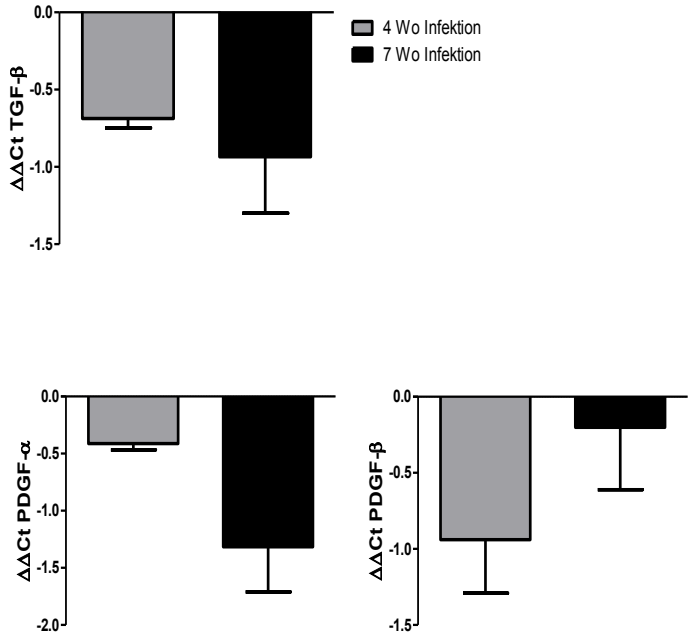

Abbildung 16: Pulmonale Expressionsprofile von Wachstumsfaktoren.
Keiner der untersuchten Wachstumsfaktoren zeigte signifikante Unterschiede zwischen den 4- und 7-wöchig infizierten Tieren. n = 5 Tiere je Gruppe

3.4.4 Plasmaspiegel von zirkulierendem TGF-β

Auch die Plasmaspiegel von zirkulierendem TGF-β wurden weitergehend mithilfe eines ELISAs untersucht. Aber im Gegensatz zu den TGF-β-Levels im Lungengewebe war im Blutplasma keine signifikante Veränderung im Infektionsverlauf feststellbar. Es deutete sich eine geringfügige Zunahme an TGF-β im Plasma von 4-wöchig infizierten Hamstern an.

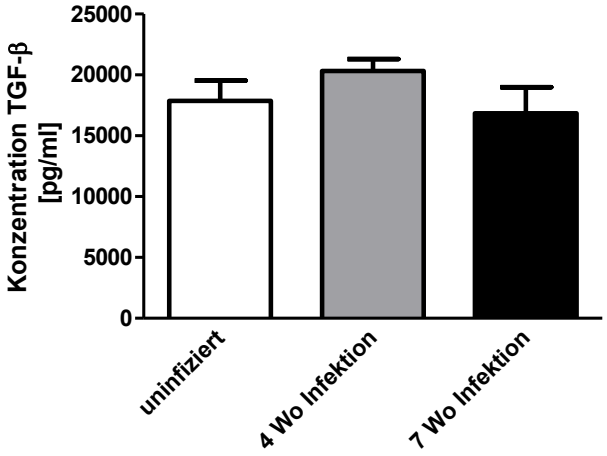

Abbildung 17: Plasmaspiegel von zirkulierendem TGF-β.
Bei den im Blutplasma gemessenen Konzentrationen von TGF-β waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu messen. Es zeichnete sich eine leichte Zunahmetendenz nach 4-wöchiger Infektion ab. n = 10 Tiere pro Gruppe.

4. Diskussion

4.1 Wahl des Tiermodells

Die zur Wahl stehenden Tiermodelle sind recht geringer Anzahl, da nicht alle Säugetiere empfänglich für eine solche parasitäre Infektion sind oder sich, wie im Falle der Infektion bei Ratten, die Pärchenegel nicht bis zur Geschlechtsreife und damit zum vermehrungsfähigen Stadium entwickeln können (Farah *et al*., 2000). Als nützliche Nagetierarten stehen nur Mäuse, Hamster und Gerbils zur Verfügung. Weiterhin ist es möglich, die Folgen einer *Schistosoma*-Infektion in verschiedenen Primaten, welche dem Menschen als Modell am nächsten stehen, zu untersuchen. Allerdings sind diese Tiere haltungs- und genehmigungstechnisch äußerst anspruchsvoll, sodass man sich aufgrund der nachfolgend erläuterten Faktoren auf das Hamster-Modell konzentrierte:

1. Aufgrund der Situation, dass die AG Grevelding die Steuerung der Interaktion zwischen den männlichen und weiblichen Schistosomen untersucht und für die Vermehrung der Parasiten Hamster als Endwirte einsetzt.
2. Mit Punkt 1 einhergehend ist die Erfahrung mit der Infektionsmethodik und der Haltung aller Tiere, welche die AG Grevelding durch ihre jahrelangen Forschungen gewonnen haben.
3. Die Hamster sind in ihrer Haltung ähnlich den anderen Nagetierarten, welche standardmäßig als Labororganismen genutzt werden.

Dennoch birgt das Hamstermodell einige Schwierigkeiten in sich, da Hamster nicht regelmäßig als Labororganismen Verwendung finden. Dies liegt zum einen an den veränderten Bedingungen der Haltung: sie sind keine sozialen Lebewesen, d.h. sie leben als Einzelgänger und müssen auch als solche gehalten werden, was einen höheren Pflegeaufwand nach sich zieht. Ein weiterer, sehr wichtiger Punkt gegen die Verwendung von Hamstern ist die Limitierung in den Standardtechniken in der Forschung. Es gibt einerseits keine für die Erforschung der Schistosomiasis-induzierten pulmonalen Hypertonie relevanten Antikörper, die spezifisch für Hamster sind, d.h. Techniken wie Western blots, spezifische Antikörperfärbungen, ELISA etc.

sind, wenn überhaupt, nur unter schwierigen Voraussetzungen möglich. Getestet wurden verschiedene anti-Maus-Antikörper, um Immunzellen (CD 3 für T-Zellen, CD 68 für Makrophagen, etc.) in Lungengewebsschnitten zu lokalisieren. Da es sich bei diesen Zellmarkern um sehr spezies-spezifische Antigene handelt (und die Antikörper dementsprechend auch sehr spezifisch für die Spezies sind), war kein positives Ergebnis des Tests zu generieren. Aufgrund dieser Situation war eine Durchführung von Proteinanalysen mittels Western blot nicht möglich. Aufgrund dieser Situation, dass es keine für Hamster spezifischen Antikörper zur Untersuchung der relevanten Eigenschaften gibt, konnten die mittels PCR generierten Expressionsanalysen nicht weiter auf die Proteinsynthese übertragen werden.
Die Durchführbarkeit von Expressionsanalysen von relevanten Genen wurde ebenfalls durch die bisher nicht vollständig erfolgte Sequenzierung des Hamster-Genoms erschwert. Aufgrund dieser Tatsache konnten nur einige Zytokine und Wachstumsfaktoren und nicht ganze Signalkaskaden untersucht werden.
Trotz dieser Limitierungen entschied man sich für dieses Tiermodell, da die Vorteile der Erfahrung mit diesem Infektionsmodell der AG Grevelding weit überwogen.

4.2 Herzremodeling bei der Schistosomiasis-induzierten PH

Normalerweise findet man in den verschiedenen Tiermodellen der pulmonalen Hypertonie einen deutlichen Anstieg der rechtsventrikulären Drücke und der Rechtsherzhypertrophie. Allerdings konnte bereits im Mausmodell der Schistosomiasis-induzierten pulmonalen Hypertonie gezeigt werden, dass weder beim rechtsventrikulären Druck noch bei der Herzratio ein signifikanter Anstieg nachweisen lies (Crosby *et al*., 2010). Im Vergleich zu diesem Modell (35 Cercarien/Endwirt für die chronische bzw. 100 Cercarien/Endwirt für eine akute Schistosomiasis) wurden im Hamster-Modell wesentlich mehr infektiöse Larven (ca. 2000 Cercarien/Endwirt) zur Endwirtinfektion für eine kürzere Infektionsdauer (4 und 7 Wochen) eingesetzt. Dies lässt nun 2 Schlussfolgerungen zu: zum einen, dass die Infektion bei weitem nicht so herzschädigend ist wie alle weiteren experimentellen Modelle der pulmonalen Hypertonie. Und zum anderen, dass eine einmalige, so kurzfristige Infektion nicht wie bei Menschen, bei denen die chronische Infektion erst nach Jahren diagnostiziert wird, zu einer ausgeprägten Rechtsherzhypertrophie führt.

Menschen der Entwicklungsländer, die von Schistosomiasis betroffen sind, leben in endemischen Gebieten und sind daher regelmäßig mit einer Infektion konfrontiert. Es konnte bereits in einer Studie gezeigt werden, dass PZQ zu einer Reduktion der Symptome einer Schistosomiasis-induzierten pulmonalen Hypertonie bei Mäusen führt (Crosby *et al*., 2011).

Es zeigte sich bei den für 7 Wochen infizierten Tieren ein leichter Anstieg der Rechtsherzhypertrophie. Dies lässt darauf schließen, dass es auch im Tiermodell möglich ist, die beim Menschen zu findenden Symptome nachzustellen, wenn man die Infektionsdauer weiter verlängern würde. Dies ist aber nicht möglich, wenn die Anzahl der zur Infektion benutzten Cercarien weiterhin so hoch bleibt, da man bereits bei den 7-Wochen Tieren eine deutlich erhöhte Sterblichkeit beobachten konnte (etwa 20-30% der Tiere starben kurz vor Beendigung der Versuchsreihe; Daten nicht gezeigt). Von daher wäre es von großer Bedeutung, die Cercarien-Zahl deutlich zu reduzieren.

Obwohl es nicht zur Entwicklung einer Rechtsherzhypertrophie im Verlauf der Schistosomiasis-Infektion kam (Abb. 4), so war dennoch eine Herzfibrose, welche anhand des Kollagengehaltes im rechten Ventrikel bestimmt wurde, messbar (Abb. 5). Zu erklären ist dies durch eine gesteigerte Expression des Zytokins IL-13, welches bekannt für seine profibrotische Wirkung ist (Graham *et al*., 2010). Diese Hypothese müsste allerdings durch weiterführende Experimente des rechten Herzventrikels überprüft werden.

4.3 Pulmonal-vaskuläre Gefäßumbauprozesse

Es konnte bewiesen werden, dass das Remodeling der arteriellen Lungengefäße und auch des Lungenparenchyms durch eine Infektion mit *Schistosoma mansoni* induziert werden konnten. Im Verlauf der Infektion konnten erhebliche strukturelle Veränderungen an vor allem kleinen und mittleren pulmonalen Arterien beobachtet werden. Wie auch schon bei Schistosomiasis-infizierten Mäusen (Crosby *et al*., 2009) erfolgten eine Reduktion des prozentualen Anteils von nicht-muskularisierten Gefäßen und eine Erhöhung des Anteils von voll-muskularisierten Lungengefäßen. Betrachtet man das Ergebnis der Analyse des Muskularisierungsgrades der kleinen Lungengefäße (20 – 50 µm Durchmesser) näher, so fällt auf, dass sich eine reversible Tendenz bei den für 7 Wochen infizierten Hamstern bezüglich des Anteils

von nicht- und voll-muskularisierten Gefäßen abzeichnete. Das heißt, dass es zu einer leichten „Erholung“ in Bezug auf die Reaktionen auf die Infektion zu kommen schien. Erklärbar scheint dies durch die Expressionslevel des Lungen-Zytokins IL-13, welches tendenziell höher exprimiert wird in den 4-wöchig infizierten Tieren als in den für 7 Wochen infizierten Hamstern (Abb. 15). Diese Hypothese bedarf allerdings genauerer nachfolgender Untersuchungen. Im Mausmodell der *Schistosoma*-induzierten, pulmonalen Hypertonie zeigten sich diese Remodeling-Prozesse der kleinen und mittleren arteriellen Gefäße erst nach einer Infektionsdauer von frühestens 12 Wochen (Crosby *et al*., 2010). Man muss jedoch bedenken, dass diese Tiere für diese Versuche mit signifikant geringeren Dosen an Cercarien infiziert wurden.

Vergleicht man die Hypothese, dass eine kleine Verbesserung des pulmonalen Gefäß-Remodelings nach einer Infektionsdauer von 7 Wochen im Vergleich zu einer 4-wöchigen Infektion eintritt, so wird diese von den Ergebnissen zur Messung der medialen Wandstärke weder bestätigt, noch entkräftet: die Verdickung der medialen Wandstärke bei den kleinen Lungengefäßen (20 – 50 µm) war in den beiden Infektionsgruppen verglichen mit den uninfizierten Tieren gleich intensiv. Im Gegensatz dazu zeigten die mittleren und großen pulmonalen Arterien nur eine Tendenz der Verdickung der medialen Wandstärke, wobei diese Tendenz bei Gefäßen mit einem Durchmesser von >100 µm offensichtlicher war als bei den mittleren. Diese Ergebnisse korrelieren zum Teil mit den Ergebnissen von Crosby und Kollegen 2010, die bereits im Mausmodell der Schistosomiasis-induzierten pulmonalen Hypertonie gezeigt haben, dass im Verlaufe der chronischen Infektion eine Zunahme der medialen Wandstärke bei allen Größenklassen der Lungengefäße zu beobachten war. Eine Verdickung der medialen Wandstärke konnte auch in Lungengewebsschnitten von Patienten mit Schistosomiasis-assoziierter PH nachgewiesen werden (Butrous *et al*., 2008). Graham und Kollegen (2011) konnten ebenfalls eine Zunahme der medialen Wandstärke bei 89% der Patienten mit Schistosomiasis-induzierter PH beobachten.

Der in der Literatur beschriebene Einfluss von Schistosomen-Eiern auf das pulmonale Gefäß-Remodeling (Crosby *et al*., 2010 und 2011) konnte im Hamster-Modell der Schistosomiasis-induzierten pulmonalen Hypertonie, aufgrund der nicht gegebenen Häufigkeit von Schistosomen-Eiern in der Lunge, nicht nachgewiesen werden. Zu begründen ist diese Tatsache mit der kürzeren Infektionsdauer von

maximal 7 Wochen und dem Lebenszyklus von *S. mansoni*, denn erst nach ca. 5 Wochen *post infectionem* beginnen die gepaarten Würmer mit der Eierproduktion, von denen die meisten nach Durchbrechen der Darmwand über den Stuhl ausgeschieden werden. Die im Körper verbleibenden Eier migrieren über die Pfortader in die Leber, wodurch es zur Ausbildung einer Leberfibrose und zum Pfortaderhochdruck kommt (Graham *et al*., 2010). Als Konsequenz dessen kommt es zum portalen Shunt und die Eier können in die Lunge infiltrieren (Crosby *et al*., 2011).

Die zusätzlich zum pulmonal-vaskulären Remodeling durchgeführten Untersuchungen auf fibrotische Veränderungen des Lungengewebes zeigten, dass die Lungenfibrose im Verlauf der Erkrankung weiter zunimmt. Da Interleukin 13 die Ablagerung von Kollagen steuert, die lokale Expression von IL-13 in der Lunge jedoch nicht im Krankheitsverlauf weiter hochreguliert wird, sondern auf einem Level bleibt, müssen weitere Faktoren an der Kollagenablagerung in der Lunge involviert sein. Auch Interleukin 1 zeigte im Mausmodell der Schistosomiasis ebenfalls eine profibrotische Wirkung (Ei *et al*., 2006). Im hier verwendeten Hamster-Modell kann eine solche Schlussfolgerung nicht getroffen werden, da IL-1 in der Lunge herunterreguliert war (Abb. 14).

4.4 Rolle der pulmonalen Mastzellen

Das Verhalten der pulmonalen Mastzellen in der Schistosomiasis-induzierten PH im Hamster-Modell erschien gegensätzlich zu den bisher bekannten Daten zur Analyse von Mastzellen bei IPAH-Patienten: Dahal und Kollegen konnten zeigen, dass im Lungengewebe der Patienten eine signifikante Erhöhung der totalen Mastzellzahl im Vergleich zu Donor-Gewebe zu beobachten war. Dies ist in der Schistosomiasis-induzierten PH im Hamstermodell nicht zu beobachten gewesen: hier zeigte sich zwar eine signifikante Erhöhung der Mastzelldichte in den Lungen von 4-wöchig infizierten Tieren im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollen, allerdings wurde diese Erhöhung nach weiteren 3 Wochen Infektionsdauer stark reduziert. Daraus lässt sich folgende Hypothese schließen: Nach einer Infektionsdauer von 4 Wochen haben die Schistosomen-Pärchen noch nicht mit der Eierproduktion begonnen, aber das Immunsystem des Endwirtes hat die Anwesenheit des Parasiten registriert und versucht dagegen anzukämpfen. Nach 7 Wochen ist die Eierproduktion in vollem

Gange, und da die Eier vom Immunsystem des Endwirtes nicht eliminiert werden sollen, sekretieren die Pärchenegel immun-modulatorische Moleküle bzw. Substanzen, die einen eventuellen Abbau verhindern sollen. Dabei wird auch die Bildung bzw. das Einwandern der Mastzellen in die Lunge verhindert. Duvaux-Miret und Kollegen berichten, dass in allen Stadien des *Schistosoma*-Lebenszyklus Proopiomelanocortin-abgeleitete Peptide präsent sind. Zu diesen gehören ACTH (Adrenocorticotropes Hormon), α-MSH (Melanozyten-stimulierendes Hormon) und β-Endorphin. Besonders α-MSH wirkt der Entzündungsreaktion von IL-1 und TNF durch Inhibierung der polymorphkernigen Zellen entgegen (Robertson *et al*., 1988).
ACTH ist in der Lage, die Interferon-Produktion von T-Zellen zu unterdrücken, (Johnson *et al*., 1984) und kann zusätzlich die IFN-Aktivierung von Makrophagen inhibieren (Koff *et al*., 1985). Das Potenzial, in die Immunreaktionen des Wirtes eingreifen zu können, führt zu einer „Maskierung“ des Wurmes gegenüber der Immunüberwachung (Duvaux-Miret *et al*., 1992).
Es konnte auch bereits gezeigt werden, dass Mastzellen der Haut durch exkretierte/sekretierte Moleküle von Cercarien zur Degranulierung *in vitro* angeregt werden können (Jenkins *et al*., 2007).
Die Totalzahl der Mastzellen in den Hamsterlungen reflektiert das Ergebnis der Bestimmung der Zytokin-Expression von IL-4 in den infizierten Lungen: in der Gruppe der 7-wöchigen Infektionsdauer sind sowohl die Mastzellen stark reduziert als auch die IL-4-Expression deutlich herunterreguliert.

Die Verteilung der Mastzellen innerhalb der Lungen zeigte, dass zwischen 4 und 7 Wochen *post infectionem* eine Veränderung der Hauptanteile stattfindet: so war bei den 7-wöchig infizierten Tieren eine Verschiebung der Mastzellen von den Hauptbronchien in die Peripherie zu beobachten. Eine Erklärung für die „Migration“ der Mastzellen wäre die Ei-Deposition im Lungenparenchym. Allerdings waren keine Eier in den ausgewerteten Gewebeschnitten zu finden. Es wäre aber denkbar, dass sich die Eier tiefer im Gewebe befanden und somit nicht angeschnitten wurden.

4.5 Th1- oder Th2-Immunantwort – was zeigt das Hamstermodell?

Die akute Schistosomiasis ist charakterisiert durch die Th1-Immunantwort, welche ihren Höhepunkt ca. 6 – 8 Wochen nach der Infektion hat. Th1-Zellen produzieren

hauptsächlich IFN- γ und bieten Schutz vor intrazellulären Pathogenen (Pearce *et al*., 2002). Generell betrachtet, ist die Th1-Immunantwort viel weniger intensiv untersucht wie die Th2-Immunantwort.

Interferon-γ ist bekannt für seine anti-fibrotische und, zusammen mit dermalem IL-13, protektive Wirkung (Dessein *et al*., 2004). Reguliert wird IFN-γ hauptsächlich durch die IL-10-Expression, welche eine Unterdrückung von IFN-γ mittels IL-12/IL-12R-Signalweg bewirkt (Burke *et al*. 2009), und durch IL-6 (Pearce *et al*., 2002).

Im Hamstermodell der Schistosomiasis-induzierten PH war es möglich im Verlauf der Erkrankung steigende Expressionslevel von Interferon-γ in der Lunge zu beobachten (Abb. 14). Crosby und Kollegen berichteten 2010 steigende Konzentrationen von zirkulierendem IFN-γ, die ihren Höhepunkt nach ca. 17 Wochen Infektionsdauer erreichten, und TNF-α, die ihren Höhepunkt bereits nach 12 Wochen *post infectionem* hatten, im Blutserum. Es konnte im Mausmodell der Schistosomiasis-Infektion mit einer Infektionsdauer von 4 Wochen nachgewiesen werden, dass die mRNA-Expression von IFN-γ in den Lungen infizierter Tiere bis zum 24. Tag nach Infektion stetig hochreguliert und danach herunterreguliert wurde (Wynn *et al*., 1994). TNF-α hingegen wurde, je weiter die Erkrankung fortschritt, immer weiter in den Lungen von Schistosomiasis-infizierten Hamstern herunterreguliert (Abb. 14). In einer Studie von Wynn konnte hingegen gezeigt werden, dass im Verlauf der Schistosomiasis-Infektion (0 – 28 Tage) die mRNA-Expression von TNF-α im Lungengewebe infizierter Mäuse stetig anstieg und ihren Höhepunkt 28 Tage *post infectionem* fand (Wynn *et al*., 1994). Beim Vergleich der Studie von Wynn und Kollegen mit der hier vorliegenden Studie muss man sowohl die unterschiedlichen Spezies, Infektionsdauer und Infektionsdosen beachten. Mwatha und Kollegen konnten 1998 in einer Patientenstudie belegen, dass hohe Level von TNF-α und IFN-γ, sowie geringe Level von IL-5 mit der hepatosplenischen Erkrankung assoziiert sind. TNF-α wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen produziert (Vassalli, 1992). Generell wird TNF-α mit der Th1-Immunantwort in Verbindung gebracht und kann durch die INF-γ-vermittelte Makrophagen-Aktivierung stimuliert werden (Farrar *et al*., 1993). Negativ reguliert werden TNF-α und Interleukin-1 durch Interleukin-4 (Essner *et al*., 1989). Eine Überexpression von TNF-α führt zur Entwicklung einer schlimmen pulmonalen Hypertonie und Rechtsherzhypertrophie (Pullamsetti *et al*., 2011).

Die Interleukine-1α und β waren ebenfalls Gegenstand der Untersuchungen zur lokalen Zytokin-Expression in den Lungen im Hamstermodell der Schistosomiasis-induzierten pulmonalen Hypertonie und verhielten sich gänzlich gegensätzlich: während IL-1α im Krankheitsverlauf weiter herunterreguliert wurde, war IL-1β nach 4-wöchiger Infektion weiter herunterreguliert als nach 7 Wochen (Abb. 14). Im Mausmodell der Schistosomiasis-induzierten PH wurden steigende Konzentrationen zirkulierenden IL-1β bis zum Höhepunkt in der 12. Woche post infectionem gemessen. Auch in Patienten mit idiopathischer pulmonal-arterieller Hypertonie konnten erhöhte IL-1β-Level gemessen werden (Humbert *et al*., 1995). Wynn und Kollegen konnten nachweisen, dass die Expression von IL-1β in den Lungen infizierter Mäuse ihren Höhepunkt bereits 10 Tage nach Infektion erreichte, in den nachfolgenden Tagen wieder abfiel und nach etwa 22 Tagen nach Infektion wieder einen starken Anstieg verzeichnen ließ (Wynn *et al*., 1994).
Im MCT-Rattenmodell der pulmonalen Hypertonie wurden erhöhte Mengen von Interleukin-1 in den Lungen produziert und es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Behandlung mit einem IL-1-Rezeptor-Antagonist zu einer Verbesserung führte (Voelkel *et al*., 1994).

Die Zytokine IL-4, -5, -6, -10 und -13, die eine Th2-Immunantwort charakterisieren, zeigten sehr ähnliche Expressionsprofile, ausgenommen Interleukin-13. Die Th2-Immunantwort ist sehr wichtig für die Immunität gegen Helminthen und die Hauptaufgabe besteht in der Unterdrückung der Th1-Immunantwort (Pearce *et al*., 2002).
Interleukin-4 wird in der Literatur oft in Relation mit IL-13 genannt. So konnte bei IL-4-defizienten Mäusen ein schlimmerer Krankheitsverlauf beobachtet werden (Fallon *et al*., 2000). Vergleicht man die Konzentrationen von zirkulierendem IL-4 im Schistosomiasis-Maus-Modell (Crosby *et al*., 2011) mit der lokalen Expression von IL-4 in den Lungen im Hamster-Modell, so fällt auf, dass in beiden Modellen eine Reduktion an IL-4 nach 7-wöchiger Infektionsdauer zu beobachten war. Im weiteren Krankheitsverlauf konnten Crosby und Kollegen allerdings eine deutliche Steigerung der lokalen IL-4-Expression in den Mäuselungen nachweisen.
Im Hamster-Modell der Schistosomiasis-induzierten PH war bereits nach 4 Wochen *post infectionem* eine Hochregulation von IL-4 zu sehen. Dies spricht für eine früher beginnende Th2-Immunantwort, denn Interleukin-4 ist bekannt für seine

proinflammatorische Wirkung. Es konnte bereits gezeigt werden, dass IL-4-defiziente Mäuse statt einer Th2- eine Th1-Immunantwort zeigen (Fallon *et al*., 2000). Die Autoren beschrieben weiterhin, dass IL-4$^{-/-}$-Tiere hochgradige Darmentzündungen entwickeln, da es diesen Tieren nicht möglich ist, die produzierten Eier über den Stuhl auszuscheiden und die Eier in der Darmwand stecken bleiben. Eine weitere Studie zum Schistosomiasis-Mausmodell zeigte bereits ab Beginn der Infektion eine Hochregulierung von lokal in der Lunge exprimiertem Interleukin-4 während der gesamten Infektionszeit, wobei der Höhepunkt am 18. Tag post infectionem erreicht wurde (Wynn *et al*., 1994).

Bei dem profibrotischen IL-13, welches das Hauptcharakteristikum der Th2-Immunantwort darstellt, zeigten sich zwischen den beiden Infektionsgruppen keine signifikanten Änderungen in der Expression der lokalen mRNA. Allerdings war im Hamstermodell der Schistosomiasis-induzierten PH eine erhöhte Expression von IL-13 in der Lunge nachweisbar.

Crosby und Kollegen konnten 2011 zeigen, dass die lokale Expression der IL-13 mRNA in der Lunge bei einer chronischen Schistosomiasis im Mausmodell (nach 17 bzw. 25 Wochen) deutlich erhöht ist. Auch in Serumproben konnten im Mausmodell progressive Steigerungen der IL-13-Levels ab der 7. Woche *post infectionem* beobachtet werden, wobei nachgewiesen werden konnte, dass nach 23 Wochen *post infectionem* der Konzentrationshöhepunkt erreicht wurde und danach eine Reduktion der IL-13-Konzentration im Serum von Mäusen erfolgte. Wynn und Kollegen konnten bereits 1994 in ihrer Studie bei 4-wöchig infizierten Mäusen ebenfalls eine Hochregulierung der pulmonalen mRNA-Expression von IL-13 aufzeigen. Diese wurde jedoch ab dem 18. Tag nach Infektion schrittweise wieder auf „Normalniveau“ herunterreguliert.

Die Steigerungen in Konzentration von zirkulierendem und die Expression von lokalem Interleukin-13 können sowohl die Kollagen-Deposition in der Lunge als auch im rechten Ventrikel erklären. Um die Mechanismen der Kollagenablagerung im rechten Herzventrikel endgültig erklären zu können, wären weiterführende Untersuchungen von großer Bedeutung, da die profibrotische Wirkung von IL-13 bisher hauptsächlich in der Leber nachgewiesen wurde. Desweiteren konnte das Potenzial, die Migration von pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen zu regulieren, im Mausmodell bewiesen werden (Crosby *et al*., 2010).

Interleukin-10 spielt eine protektive, immunmodulatorische Rolle während der Infektion (Fairfax *et al*., 2012) und ist einer der Hauptfaktoren zur Inhibierung der Th1-Immunantwort (Pearce *et al*., 2002). Wird der IL-10-Signalweg unterbrochen, so kommt es zur Entwicklung schwerer Lungen- und Herzschäden und es scheint, dass IL-10 die Entwicklung einer B-Zell-Population, welche für die Minimierung der Inflammation verantwortlich ist, in der Leber fördert (Fairfax *et al*., 2012).

Im Hamster-Modell konnte nach 4-wöchiger Infektion eine Hochregulierung und nach 7-wöchiger Infektion eine Herunterregulierung der IL-10-Expression gemessen werden (Abb. 15).

Im Gegensatz dazu konnten Wilson und Kollegen 2011 nach 8-wöchiger Infektion deutlich erhöhte Konzentrationen von IL-10 in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC = peripheral blood mononuclear cells) von Mäusen feststellen.

Die Aufgabe der Th1-Immunantwort-Inhibierung erfüllt Interleukin-10 durch die Herunterregulierung von Interferon-γ (Chensue *et al*., 1994). Dies scheint auch bei der Schistosomiasis-induzierten pulmonalen Hypertonie im Hamstermodell auf diesem Wege zu geschehen, denn während die Expression von Interleukin-10 in der Lunge nach 4-wöchiger Infektion hochreguliert war, ließ sich eine reduzierte Expression von IFN-γ zum gleichen Zeitpunkt in der Lunge messen. Nach einer 4-wöchigen Infektion kann man in der Regel nicht von einer chronischen Infektion sprechen. Nach 7 Wochen Infektionsdauer reagierten beide Zytokine genau umgekehrt: IFN-γ war deutlich hochreguliert, während IL-10 eher herunterreguliert war (Abb. 14 und 15). Diese Tatsachen widersprechen allen bisher bekannten Studien und geben so Anlass für weiterführende Untersuchungen zur Relation zwischen IL-10 und IFN-γ während einer Schistosomiasis-Infektion. Im Gegensatz zum Expressionsprofil von IL-10 im Hamstermodell stehen die Analysen vom Wynn und Kollegen: es konnte bei 4-wöchiger Infektionsdauer eine Hochregulierung der pulmonalen Expression von Interleukin-10 im Mausmodell nachgewiesen werden.

Interleukin-5, welches mit in direkter Assoziation mit einer parasitären Infektion steht, zeigte im Hamstermodell keine dramatischen Änderungen der Expression. Crosby und Kollegen untersuchten IL-5-Level in Blutserum und konnten nach 7-wöchiger Infektion eine signifikant erhöhte Konzentration beobachten. Wynn und Kollegen konnten ebenfalls eine Hochregulierung von IL-5 im Lungengewebe infizierter Mäuse bis zum 18. Tag post infectionem nachweisen. Nach diesem Zeitpunkt wurde eine

schrittweise Herunterregulation der pulmonalen mRNA-Expression bis zum Ende der Versuchsreihe (28 Tage) verzeichnet (Wynn *et al*., 1994).
Reiman und Kollegen zeigten 2006, dass IL-5 die Produktion des antifibrotisch wirkenden IFN-γ unterdrückt und somit die Entwicklung einer Leberfibrose reguliert.
Da sich Schistosomen gegenüber dem Immunsystem des Wirtes „maskieren" können (Duvaux *et al*., 1988), ist es möglich, dass die Expression von IL-5 nicht stimuliert wird. Gegen diese Hypothese sprechen jedoch die Tatsachen, dass das von Pärchenegeln sekretierte Molekül ACTH die IFN-γ-Produktion durch T-Zellen inhibieren kann und somit auch die IFN-γ-gesteuerte Aktivierung von Makrophagen.
Die Rolle von Interleukin-6 beschrieben Angeli und Kollegen 2009 im Schistosomiasis-Mausmodell: IL-$6^{-/-}$-Mäuse zeigten eine beschleunigte Mobilisierung von Eosinophilen in der Lunge und einen Anstieg von rekrutierten Leukozyten in den Atemwegen. Weiterhin vermuten die Autoren, dass die Produktion IL-6 in endothelialen Zellen durch die Schistosomula-Larven induziert wird, um die Entzündungsreaktionen in der Lunge zu unterdrücken. Dies scheint in den ersten 4 Wochen der Infektion auch im Hamstermodell zu funktionieren, jedoch nicht nach 7-wöchiger Infektion.
Es ist ebenfalls bekannt, dass hohe Konzentrationen des proinflammatorischen Interleukin-6 mit der Th1-Immunantwort, die durch migrierende Schistosomula-Larven und unreife adulte Pärchenegel ausgelöst wird, verknüpft sind (Burke *et al*., 2009). Auch in Patienten, welche an der idiopathischen Form der PAH leiden, konnten deutlich erhöhte Level an zirkulierendem IL-6 gemessen werden (Humbert *et al*., 1995).

Zusammengenommen zeigten die Ergebnisse der lokalen Zytokin-Expression in der Lunge, dass auch nach 7 Wochen *post infectionem* eher von einer Th1-Immunantwort ausgegangen werden muss. Dies widerspricht allen bisher bekannten Studien, da die Umstellung von Th1 auf Th2-Immunantwort mit Einsetzen der Eierproduktion geschieht. Da es sich hier allerdings nicht um systemisch gemessene Konzentrationen aus Blutplasma oder –serum handelt, sondern um lokale Expressionslevel in der Lunge, lässt sich schlussfolgern, dass die Th2-Immunantwort in der Lunge noch nicht ausgelöst wurde, da es keine Eier in den Lungen gibt und dass die Umstellung erst dann geschieht, wenn es den Schistosomen-Eiern möglich ist nach der Ausprägung einer Pfortaderhypertonie und des darauffolgenden portalen

Shunts in die Lunge zu infiltrieren. Allerdings spricht das schlechte Allgemeinbefinden der Tiere, und die folglich hohe Sterberate, nach 7 Wochen Infektionsdauer gegen diese Tiermodell-abhängige Verzögerung der bekannten Abläufe bezüglich der Immunantworten.

4.6 Rolle der Wachstumsfaktoren

PDGF (platelet-derived growth factor) und TGF-β sind an der abnormalen Proliferation pulmonal-vaskulärer Zellen in der PAH beteiligt (Schermuly *et al*., 2011). PDGF ist ein potentes Mitogen und Lockstoff für glatte Muskelzellen (Yu *et al*., 2003). Patienten mit PAH zeigten erhöhte Expressionslevel an PDGF in der Lunge (Perros *et al*., 2008).

Die Ergebnisse der Schistosomiasis-induzierten PH im Hamstermodell widersprechen den humanen Daten: denn es konnten in beiden Infektionsgruppen für beide PDGF-Liganden herunterregulierte Expressionslevel in den Lungen gemessen werden. Das hat zur Folge, dass das pulmonal-vaskuläre Remodeling nicht nur durch PDGF vermittelt sein kann, sonder Faktoren wie Scherstress, welcher von den durch die Lunge migrierenden Schistosomen ausgeübt wird, und die sekretierten Moleküle der Pärchenegel eine wichtige Rolle dabei spielen müssen. Dazu sind weitere Untersuchungen nötig, die die Rolle dieser Faktoren darlegen.

Ein möglicher Therapieansatz, wie er durch Imatinib® möglich wäre, der Schistosomiasis-induzierten PH braucht aufgrund dieser Ergebnisse nicht durchgeführt zu werden.

Chu und Kollegen berichteten 2007 von der TGF-β-vermittelten Kollagen-Produktion in der Leber bei einer *S. japonicum*-Infektion. Dies war bei der *S. mansoni*-vermittelten PH in der Lunge nicht nachweisbar, da weder das Expressionsprofil von TGF-β auf eine vermehrte Kollagen-Produktion hinwies, noch die zirkulierenden Konzentrationen in Blutplasmaproben signifikante Änderungen im Krankheitsverlauf zeigten. Bei dem hier verwendeten Tiermodell scheint die Kollagen-Deposition in Herz und Lunge eher dem IL-13-Signalweg zuzuschreiben sein.

De`Broski und Kollegen zeigten 2008 steigende Konzentrationen von TGF-β im Blutserum Schistosomiasis-infizierter Mäuse im Verlauf der akuten Infektion. Daraus schlussfolgerten sie, dass TGF-β und IL-10 protektive Wirkungen gegen ernsthafte Leberschäden und die Sterblichkeit während der akuten Schistosomiasis wirken. Die

protektive Wirkung von IL-10 konnte im Schistosomiasis-Hamster-Modell infizierten Tieren nicht nachgewiesen werden, denn trotz Hochregulierung der TGF-β Expression bei 4-wöchig infizierten Tieren war eine erhöhte Kollagendeposition in der Lunge messbar.

5. Zusammenfassung

Auf der Basis der hier präsentierten Ergebnisse lässt sich sagen, dass es sich bei der hier untersuchten Erkrankung nicht um eine diagnostizierbare pulmonale Hypertonie handelt. Vielmehr geht aus den histologischen Daten hervor, dass es sich um eine pulmonal-vaskuläre Erkrankung mit fibrotischen Charakteristika handelt. Die Beweise für eine klassische pulmonale Hypertonie, wie z.B. die signifikante Rechtsherzhypertrophie, konnten nicht aufgezeigt werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass dennoch strukturelle Veränderungen im Herzen stattfanden.
Darüber hinaus zeigt dieses Modell auf, dass bereits nach einer kurzfristigen, einmaligen Infektion Gefäß-Umbauprozesse, welche heterogen über das Gewebe verteilt waren, innerhalb der Lunge zu beobachten sind. Zurückzuführen sind diese Prozesse nicht auf die in die Lunge einwandernden Eier der Pärchenegel, sondern vielmehr auf die Scherkräfte, die durch die Migration der Würmer durch die Lunge auf die pulmonalen Gefäße einwirken. Um die molekularen Mechanismen und die relevanten Zielzellen aller histologischen Veränderungen zu identifizieren, sind weitere Untersuchungen nötig
Aufgrund der molekularbiologischen Daten, welche durch die Analyse der pulmonalen Zytokinexpressionsprofile belegt wurden, kann man schlussfolgern, dass die Infektionsdauer nicht ausreichte, um von einer chronischen Schistosomiasis-Infektion zu sprechen. Da die chronische Infektion die Grundvoraussetzung für eine folgende pulmonale Hypertonie ist, sollte man für weitere Untersuchungen die Infektionsdauer auf deutlich über 8 Wochen ansetzen. Dafür ist es notwendig, die verwendete Anzahl an infektiösen Cercarien deutlich zu verringern, da sich abzeichnete, dass die hier verwendete Cercarien-Zahl von 2000/Endwirt nach 7-wöchiger Infektion zu einer Sterblichkeit von etwa 25% führte.

Um diese Tiermodell vergleichbar für die humane Schistosomiasis-assoziierte PH zu machen, ist es zwingend erforderlich, die sich dann in der chronischen Phase der Infektion befindlichen Tiere (mehrfach) einer Reinfektion auszusetzen.

Summary

Based on the results presented here it can be said that the investigated disease is not a diagnosable pulmonary hypertension. Rather, the histological data indicate that there is a pulmonary vascular disease with fibrotic features. The evidence for a classical pulmonary hypertension, such as a significant right heart hypertrophy, could not be demonstrated. However, it was shown that nevertheless structural changes in the right ventricle took place.
In addition, the here used model shows that pulmonary vascular remodeling, which were heterogeneously distributed in the tissue, is observable after a single, short-term infection. These processes are not due to the immigrating eggs of the schistosomes into the lung, but rather to the shear forces acting on the pulmonary vessels due to the migrating worms. Further investigations are needed to identify the molecular mechanisms and the relevant target cells of all the histological changes.
Based on the molecular data, which were confirmed by the analysis of pulmonary cytokine expression profiles, it can be concluded that the duration of infection was not sufficient to speak of a chronically schistosomiasis infection. Since the chronic infection is a prerequisite for a subsequent pulmonary hypertension, the infection duration should be adjusted to more than 8 weeks for further investigations. For this it is necessary to significantly reduce the used number of infectious cercariae as it became clear that the here used infection dosis of 2000 cercariae/final host after 7 weeks of infection resulted in a mortality rate of about 25%.

To make this animal model comparable to the human schistosomiasis-associated PH, it is essential to expose the animals, which are then in the chronic phase of the infection, to (repeatedly) reinfection.

6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- Abath, FGC; Morais, CNL; Montenegro, CEL; Wynn, TA; Montenegro, SML: **"Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies?"** *TRENDS in Parasitology* Vol.22 No.2 February 2006; 85 - 91

- Andrade, ZA: **"Pathology of Human Schistosomiasis"** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro Vol. 82, Suppl. IV: 17-23, 1987; Intern. Symp. Of Schistosomiasis

- Angeli, V; Faveeuw, C; Delerive, P; Fontaine, J; Barriera, Y; Franchimont,N; Staels, B; Capron, M; Trottein, F: **"Schistosoma mansoni induces the synthesis of IL-6 in pulmonary microvascular endothelial cells: role of IL-6 in the control of lung eosinophilia during infection"** *Eur J Immunol*. 2001 Sep;31(9):2751-61

- Ashcroft, T; Simpson, JM; Timbrell V: **"Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale"** *J Clin Pathol* 1988;41:467-470

- Barbosa, MM; Lamounier, JA; Oliveira, EC; Souza, MV; Marques, DS; Silva, AA; Lambertucci, JR: **"Pulmonary Hypertension in *Schistosoma mansoni*"** *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene* (1996) 90,663-665

- Barron, L; Wynn, TA: **"Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis"** *Eur. J. Immunol*. 2011, 41: 2470–2525

- Barst, RL: **„PDGF signaling in pulmonary arterial hypertension"** *J. Clin. Invest*. 115:2691–2694 (2005)

- Barst, RL; Langleben, D; Badesch, D; Frost, A; Lawrence, EC; Shapiro, S; Naeiji,R; Galie, N: **"Treatment of pulmonary arterial hypertension with the selective endothelin-A receptor antagonist sitaxsentan"** *J.Am.Coll.Cardiol.* 47:2049-2056

- Bhargava, A, Kumar, A; Yuan, N; Gewitz, MH; Mathew, R: **"Monocrotaline induces interleukin-6 mRNA expression in rat lungs"** *Heart Dis*. 1999 Jul-Aug;1(3):126-32

- Bethlem, EP; Schettino, GDPP; Carvalho, CRR: **"Pulmonary Schistosomiasis"** *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 1997, 3: 361 – 365

- Boros, DL: **"Immunopathology of *Schistosoma mansoni* Infection"** *Clinical Microbiology Reviews*, July 1989, Vol. 2 No. 3, 250-269

- Boutet, K; Montani, D; Jais, X; Yaici, A; Sitbon, O; Simonneau, G; Humbert, M: **"Therapeutic advances in pulmonary arterial hypertension"** *Ther.Adv.Respir.Dis.* 2:249-265

- Brij, S; Peacock, AJ: **"Pulmonary hypertension: its assessment and treatment"** *Thorax* 1999;54 (Suppl 2): S28–S32

- Burke, ML; Jones, MK; Gobert, GN; Li, YS; Ellis, MK; McManus, DP: **"Immunpathogenesis of human Schistosomiasis"** *Parasite Immunology*, 2009, 31, 163–176

- Butrous, G; Ghofrani, HA; Grimminger, F: **"Pulmonary Vascular Disease in the Developing World"** *Circulation* 2008;118;1758-1766

- Chapman, PJC; Wilkinson, PR; Davidson, RN: **"Acute Schistosomiasis (Katayama fever) among British air crew"** *BMJ* VOLUME 297 29 OCTOBER 1988

- Cheever, AW; Hoffmann, KF; Wynn, TA: **"Immunopathology of schistosomiasis in mice and men"** *IMMUNOLOGY TODAY* 2000, Vol. 21, No.9, 465 – 466

- Cheever, AW; Lenzi, JA; Lenzi, HL; Andrade ZA: **„Experimental Models of *Schistosoma mansoni* Infection"** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 97(7): 917-940, October 2002

- Chensue, SW; Warmington KS; Ruth, J; Lincoln, PM; Kunkel, SL: **"Cross-regulatory role of interferon-gamma (IFN-γ), IL-4 and IL-10 in schistosome egg granuloma formation: in vivo regulation of Th activity and inflammation"** *Clin Exp Immunol* 1994; 98:395-400

- Chitsulo, L; Loverde, P; Engels, D: **"Schistosmiasis (Disease Watch)"** *Nature Reviews Microbiology* 2004 Vol. 2, 12 – 13

- Cool, CD; Kennedy, D; Voelkel, NF; Tuder RM: **„Pathogenesis and Evolution of Plexiform Lesions in Pulmonary Hypertension Associated With Scleroderma and Human Immunodeficiency Virus Infection"** *Human Pathology* Vol. 28,No. 4 (April 1997)

- Crosby, A; Jones, FM; Southwood, M; Stewart, S; Schermuly RT; Butrous, G; Dunne, DW; Morrell NW: **"Pulmonary Vascular Remodeling Correlates**

with Lung Eggs and Cytokines in Murine Schistosomiasis" *Am J Respir Crit Care Med* Vol 181, pp 279–288, 2010

- Crosby, A; Jones, FM; Kolosionek, E; Southwood, M; Purvis, I; Soon, E; Butrous, G; Dunne, DW; Morrell, NW: **"Praziquantel Reverses Pulmonary Hypertension and Vascular Remodeling in Murine Schistosomiasis"** Am *J Respir Crit Care Med* Vol 184. pp 467–473, 2011

- Dahal, BK; Kosanovic, D; Kaulen, C; Cornitescu, T; Savai, R; Hoffmann, J; Reiss, I; Ghofrani, HA; Weissmann, N; Kuebler, WM; Seeger, W; Grimminger, F; Schermuly, RT: **"Involvement of mast cells in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats"** *Respiratory Research* 2011, 12:60

- Daley, E; Emson, C; Guignabert, C; de Waal Malefyt, R; Louten, J; Kurup, VP; Hogaboam, C; Taraseviciene-Stewart; L; Voelkel, NF; Rabinovitch, M; Grunig, E; Grunig, G: **"Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response"** *JEM © The Rockefeller University Press* Vol. 205, No. 2, February 18, 2008 361-372

- Davis, A; Wegner, DHG: **"Multicentre trials of praziquantel in human schistosomiasis: design and techniques"** *Bulletin of the World Health Organization*, 57 (5): 767-771 (1979)

- De Jesus, AR; Silva, A; Santana, LB; Magalhaes, A; de Jesus, AA; de Almeida; RP; Rêgo, MAV; Burattino, MN; Pearce, EJ; Carvalho, EM: **"Clinical and Immunologic Evaluation of 31 Patients with Acute *Schistosomiasis mansoni*"** *The Journal of Infectious Diseases* 2002;185:98–105

- De'Broski, HR; Orekov, T; Perkins, C; Finkelman, FD: **"IL-10 and TGF-b Redundantly Protect against Severe Liver Injury and Mortality during Acute Schistosomiasis"** *J Immunol* 2008; 181:7214-7220

- Dessein, A; Kouriba, B; Dessein, H; Argiro, L; Marquet; S; Elwali, NMA; Rodrigues, V; Li, Y; Doumbo, O; Chevillard, C: **"Interleukin-13 in the skin and interferon-γ in the liver are key players in immune protection in human Schistosomiasis"** *Immunological Reviews* 2004 Vol. 201: 180–190

- Dettmann, CD; Higgins-Opitz, SB; Saikoolal, A: **"Enhanced efficacy of the paddling method for schistosome infection of rodents by a four-step pre-soaking procedure"** *Parasitol. Res.*(1989) 76(2): 183 - 184

- Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit: „**Diagnostik und Therapie der Schistosomiasis (Bilharziose)"** http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/042-005l_S1_Diagnostik_Therapie_Schistosomiasis_Bilharziose_2011-03.pdf

- Doherty, JF; Moody, AH; Wright, SG: **"Katayama fever: an acute manifestation of schistosomiasis"** *BMJ* 1996;313:1071-2

- dos Santos Fernandes, CJC; Jardim, CVP; Hovnanian, A; Hoette, S; Dias, BA; Souza, S; Humbert, M; Souza, R: **"Survival in Schistosomiasis-Associated Pulmonary Arterial Hypertension"** *J. Am. Coll. Cardiol*. 2010;56;715-720

- Duvaux-Miret, O; Stefano, GB; Smith, EM; Dissous, C; Capron, A: **"Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite Schistosoma mansoni by release of immunoactive neuropeptides"** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jan 15;89(2):778-81

- Eddahibi, S; Morrell, NW; d'Ortho, M-P; Naeije, R; Adnot, S: **"Pathobiology of pulmonary arterial hypertension"** *Eur Respir J* 2002; 20: 1559–1572

- Ei, RR; Wagih, A; Salem, R; Mahana, N; Ei, DM; Tallima, H: **"Impact of interleukin-1 and interleukin-6 in murine primary schistosomiasis"** *Int. Immunopharmacol* 2006; 6; 1100-1108

- Fairfax, KC; Amiel, E; King, IL; freitas, TC; Mohrs, M; Pearce, EJ: **"IL-10R Blockade during Chronic Schistosomiasis Mansoni results in the Loss of B Cells from the Liver and the Development of Severe Pulmonary Disease"** PLoS Pathog. 2012 Jan;8(1):e1002490

- Farah, IO; Kariuki, TM; King, CL; Hau, J: **"An overview of animal models in experimental schistosomiasis and refinements in the use of non-human primates"** *Laboratory Animals* (2001) 35, 205-212

- Farha, S; Sharp, J; Asosingh, K; Park, M; Comhair, SAA; Tang, WHW; Thomas, J; Farver, C; Hsieh, F; Loyd, JE; Erzurum, SC: **"Mast cell number, phenotype and function in human pulmonary artereial hypertension"** *Pulm Circ* 2012;2:220-8

- Farrar, MA; Schreiber, RD: **"The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor"** *Annu. Rev. Immunol*. 1993;11-571

- Fernandes, CJCS; Dias, BA; Jardim, CVP; Hovnanian, A; Hoette, S; Morinaga, LK; Souza, S; Suesada, M; Breda, AP; Souza, R: **"The Role of Target Therapies in Schistosomiasis-Associated Pulmonary Arterial Hypertension"** *Chest* 2012;141;923-928

- Fernandes, CJC; Jardim, C; Hovnanian, A; Hoette, S; Morinaga, LK; Souza, R: **"Schistosomiasis and Pulmonary Hypertension"** *Prog Respir Res*. Basel, Karger, 2012, vol 41, pp 143–148

- Ferrari, MLA; Coelho, PMZ; Antunes, CMF; Tavares, CAP; da Cunha, AS: **"Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial"** *Bulletin of the World Health Organization* 2003;81:190-196.

- Forth, W: **"Anthelminthika – Neuentwicklungen zur Behebung unangenehmer Reiseerinnerungen"** *Deutsches Ärzteblatt* 94, Heft 42, 17. Oktober 1997

- Fox, DJ; Khattar, RS: **„Pulmonary arterial hypertension: classification, diagnosis and contemporary management"** *Postgrad Med J.* 2006 Nov;82(973):717-22

- Franco-Paredes, C; Rouphael, N; Méndez, J; Folch, E; Rodrígez-Morales, AJ; Santos, JI; Hurst, JW: **"Cardiac Manifestations of Parasitic Infections Part 3: Pericardial and Miscellaneous Cardiopulmonary Manifestations"** *Clin. Cardiol.* 30, 277–280 (2007)

- Frid, MG; Kale, VA; Stenmark, KR: **"Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis"** *Circ.Res.* 90:1189-1196

- Galie, N; Manes, A; Uguccioni, L; Serafini, F; De Rosa, M; Branzi, A; Magnani, B: **"Primary Pulmonary Hypertension: Insights Into Pathogenesis From Epidemiology"** *Chest* 1998;114;184S-194S

- Galie, N; Hoeper, MM; Humbert, M; Torbicki, A; Vachiery, J-L; Barbera, JA; Beghetti, M; Corris, P; Gaine, S; Gibbs, JS; Gomez-Sanchez, MA; Jondeau, G; Klepetko, W; Opitz, C; Peacock, A; Rubin, L; Zellweger, M; Simonneau, G: **"Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension"** *European Heart Journal* (2009) 30, 2493–2537

- Ganley-Leal, LM; Mwinzi, PNM; Cetre-Soussah, CB; Andove, J; Hightower, AW; Karanja, DMS; Colley, DG; Secor, WE: **"Short Report: Higher Percentages of Circulating Mast Precursors Correlate With Susceptibility To Reinfection With *Schistosoma mansoni*"** *Am. J. Trop. Med. Hyg*., 75(6), 2006, pp. 1053–1057

- Ghofrani, HA; Barst, RJ; Benza, RL; Champion HC; Fagan, KA; Grimminger, F; Humbert, M; Simonneau, G; Stewart, DJ; Ventura, C; et al: **"Future perspectives for the treatment of pulmonary arterial hypertension"** *J.Am.Coll.Cardiol.* 2009 54:S108-S117

- Gilfillan, AM; Rivera, J: **"The tyrosine kinase network regulating mast cell activation"** *Immunol Rev*. 2009 March ; 228(1): 149–169

- Graham, BB; Bandeira, AP; Morrell, NW; Butrous, G; Tuder, RM: **"Schistosomiasis-Associated Pulmonary Hypertension : Pulmonary Vascular Disease: The Global Perspective"** *Chest* 2010;137;20S-29S

- Graham, BB; Chabon, J; Bandeira, A; Espinheira, L; Butrous, G; Tuder, RM: **"Significant intrapulmonary *Schistosoma* egg antigens are not present in**

Schistosomiasis-associated pulmonary hypertension" *Pulmonary Circulation* 2011,Vol. 1,No. 4,456 – 461

- Grevelding, CG: **"The female-specific W1 sequence of the Puerto Rican strain of *Schistosoma mansoni* occurs in both genders of a Liberian strain"** *Molecular and Biochemical Parasitology* 71 (1995) 269-272

- Hassou, PM; Mouthon, L; Barberà, JA; Eddahibi, S; Flores, SC; Grimminger, F; Jones, PL; Maitland, ML; Michelakis, ED; Morrell, NW; Newman, JH; Rabinovitch, M; Schermuly, RT; Stenmark, KR; Voelkel, NF; Yuan, JXJ; Humbert, M: **"Inflammation, Growth Factors, and Pulmonary Vascular Remodeling"** *J. Am. Coll. Cardiol*. 2009;54;S10-S19

- Hoeper, MM; Spiekerkoetter, E; Westerkamp, V; Gatzke, R; Fabel, H: **„Intravenous iloprost for treatment failure of aerosolised iloprost in pulmonary arterial hypertension"** *Eur.Respir.J.* 20:339-343

- Hoeper, MM: **"Definition, Classification, and Epidemiology of Pulmonary Arterial Hypertension"** *Semin Respir Crit Care Med* 2009;30:369–375

- Humbert, M; Monti, G, Brenot, F; Sitbon, O; Portier, A; Grangeot-Keros, L; Duroux, P; Galanaud, P; Simonneau, G; Emilie, D: **"Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension"** *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 May;151(5):1628-31

- Humbert, M; Trembath, RC: **"Genetics of pulmonary hypertension: from bench to bedside"** *Eur Respir J* 2002; 20: 741–749

- Jenkins, SJ; Hewitson, JP; Jenkins, GR; Mountford, AP: **„Modulation of the host's immune response by schistosome larvae"** *Parasite Immunol*. 2005 ; 27(10-11): 385–393

- Johns, RA: **"Th2 Inflammation, Hypoxia-induced Mitogenic Factor/FIZZ1, and Pulmonary Hypertension and Vascular Remodeling in Schistosomiasis"** *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Feb 1;181(3):203-5

- Johnson, HM; Torres, BA; Smith, EM; Dion, LD; Blalock, JE: **"Regulation of lymphokine (gamma-interferon) production by corticotropin"** *J Immunol*. 1984 Jan;132(1):246-50

- Jones, PL; Cowen, KN; Rabinovitch, M: **"Tenascin-C, Proliferation and Subendothelial Fibronectin in Progressive Pulmonary Vascular Disease"** *American Journal of Pathology*, Vol. 150, No. 4, April 1997

- Katz, N; Rocha, RS; Chaves, A: **"Preliminary trials with praziquantel in human infections due to *Schistosoma mansoni*"** *Bulletin of the World Health Organization*, 57 (5): 781-785 (1979)

- Kojonazarov, B; Sydykov, A; Pullamsetti, SS; Luitel, H; Dahal, BK; Kosanovic, D; Tian, X; Majewski, M; Baumann, C; Evans, S; Phillips, P; Fairman, D; Davie, N; Wayman, C; Kilty, I; Weissmann, N; Grimminger, F; Seeger, W; Ghofrani, HA, Schermuly, RT: **"Effects of multikinase inhibitors on pressure overload-induced right ventricular remodeling"** *Int J Cardiol*. 2012 Jul 30

- Kolosionek, E; Graham, BB; Tuder, RM; Butrous, G: **„Pulmonary vascular disease associated with parasitic infection—the role of schistosomiasis"** *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 15–24

- Koff, WC; Dunegan, MA: "**Modulation of macrophage-mediated tumoricidal activity by neuropeptides and neurohormones**" *J Immunol.* 1985 Jul;135(1):350-4

- Lambertucci, JR; Antunes, CM: **"Letter by Lambertucci and Antunes Regarding Article: Pulmonary Vascular Disease in the Developing World"** *Circulation* 2009, 120:e6

- Lambertucci; JR; Carvalho, VT; dos Santos Silva, LC: **"Pulmonary hypertension in schistosomiasis mansoni"** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(3):295-296, mai-jun, 2006

- Lang, M; Kojonazarov, B; Tian, X; Kalymbetov, A; Weissmann, N; Grimminiger, F; Kretschmer, A; Stasch, JP; Seeger, W; Ghofrani, HA; Schermuly, RT: **„The Soluble Guanylate Cyclase Stimulator Riociguat Ameliorates Pulmonary Hypertension Induced by Hypoxia and SU5416 in Rats"** *PLoS One*. 2012;7(8):e43433

- Langleben, D; Brock, T; Dixon, R; Barst, R: **„STRIDE 1: effects of the selective ET(A) receptor antagonist, sitaxsentan sodium, in a patient population with pulmonary arterial hypertension that meets traditional inclusion criteria of previous pulmonary arterial hypertension trials**" J.Cardiovasc.Pharmacol. 44 Suppl 1:S80-S84

- Lapa, M; Dias, B; Jardim, C; Fernandes, CJC; Dourado, PMM; Figueiredo, M; Farias, A; Tsutsui, J; Terra-Filho, M; Humbert, M; Souza, R: **"Cardiopulmonary Manifestations of Hepatosplenic Schistosomiasis"** *Circulation*. 2009;119:1518-1523

- Liu, R; Dong, H-F; Zhao, Q-P; Jang, M-S: **"Efficacy of praziquantel and artemisinin derivatives for the treatment and prevention of human schistosomiasis: a systematic review and meta-analysis"** *Parasites & Vectors* 2011, 4:201

- Lopes, AA; Bandeira, AP; Flores, PC; Santana, MVT: **"Pulmonary Hypertension in Latin America: Pulmonary Vascular Disease: The Global Perspective"** *Chest* 2010;137;78S-84S

- Lucey, DR; Clerici, M; Shearer, GM: **"Type 1 and Type 2 Cytokine Dysregulation in Human Infectious, Neoplastic, and Inflammatory Diseases"** *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, Oct. 1996, p. 532–562

- Lukacs, MW; Kunkel, SL; Strieter, RM; Chensue, SM: **"The Role of Chemokines in *Schistosoma mansoni* Granuloma Formation"** *Parasitology Today*, vol. IO, no. 8, I 994

- Marinho, M; Oliveira-Júnior, IS; Rodrigues Monteiro, CM; Perri, SH; Salomao, R: **"Pulmonary Disease in Hamsters Infected with *Leptospira interrogans*: Histopathologic Findings and Cytokine mRNA Expressions"** *Am. J. Trop. Med. Hyg.,* 80(5), 2009, pp. 832–836

- Molyneux, DH; Malecela, MN: **"Neglected Tropical Diseases and the Millennium Development Goals-why the "other diseases" matter: reality versus rhetoric"** *Parasites & Vectors* 2011, 4:234

- Montenegro, SML; Miranda, P; Mahanty, S; Abath, FGC; Teixeira, KM; Coutinho, EM; Brinkman, J; Goncalves, I; Domingues, LAW; Domingues, ALC; Sher, A; Wynn, TA: **"Cytokine Production in Acute versus Chronic Human *Schistosomiasis mansoni*: The Cross-Regulatory Role of Interferon-γ and Interleukin-10 in the Responses of Peripheral Blood Mononuclear Cells and Splenocytes to Parasite Antigens"** *The Journal of Infectious Diseases* 1999;179:1502–14

- Mwatha, JK; Kimani, G; Kamau, T; Mbugua, GG; Ouma, JH; Mumo, J; Fulford, AJC; Jones, FM; Butterworth, AE; Roberts, MB; Dunne, DW: **"High Levels of TNF, Soluble TNF Receptors, Soluble ICAM-1, and IFN-γ, but Low Levels of IL-5, Are Associated with Hepatosplenic Disease in Human *Schistosomiasis Mansoni*"** *J Immunol* 1998; 160:p1992-1999

- Nauser, TD; Stites, SW: **"Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension"** *Am. Fam. Physician* 63:1789-1798

- Nemmar, A; Nemery, B; Hoet, PHM; Vermylen, J; Hoylaerts, MF: "**Pulmonary Inflammation And Thrombogenicity Caused By Diesel Particles In Hamsters: Role of Histamine"** *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Dec 1;168(11):1366-72

- Nicod, LP: **"The endothelium and genetics in pulmonary arterial hypertension"** *Swiss.Med.Wkly.* 137:437-442

- Oliveira, CR; Rezende, CMF; Silva, MR; Borges, OM; Pêgo, AP; Goes, AM: **"Oral Vaccination Based on DNA-Chitosan Nanoparticles against *Schistosoma mansoni* Infection"** *The ScientificWorld Journal* Volume 2012, Article ID 938457, 11 pages

- Olschewski, H; Hoeper, MM; Borst, MM; Ewert; Grüning, E; Kleber, F-X; Kopp, B; Opitz, C; Reichenberger, F; Schmeisser, A; Schranz, D; Schulze, Neick, I; Wilkens, H; Winkler, J; Worth, H: „**Diagnostik und Therapie der chronischen pulmonalen Hypertonie“** *Clin Res Cardiol* 96:301–330 (2007)

- Ormiston, ML; Chang, C; Long, LL; Soon, E; Jones, D; Machado, Rajiv; Treacy, C; Toshner, MR; Campbell, K; Riding, K; Southwood, M; Pepke-Zaba, J; Exley, A; Trembath, RC; Colucci, F; Wills, M: Trowsdale, J; Morrell, NW: **“Impaired Natural Killer Cell Phenotype and Function in Idiopathic and Heritable Pulmonary Arterial Hypertension”** *Circulation.* 2012;126:1099-1109

- Otah-Ogo, K; Hao, H; Isjibashi-Ueda, H; Hirota, S; Nakamura, K; Ohe, T; Ito, H: **“CD44 expression in plexiform lesions of idiopathic pulmonary arterial hypertension”** *Pathology International* 2012; 62: 219–225

- Peacock, AJ: **„Primary pulmonary hypertension“** *Thorax* 1999;54:1107–1118

- Pearce, EJ; Caspar, P; Grzych, J-M; Lewis, FA; Sher, A: **“Downregulation of Thl Cytokine Production Accompanies Induction of Th2 Responses by a Parasitic Helminth, *Schistosoma mansoni*”** *The Journal of Experimental Medicine* Volume 173 January 1991 159-166

- Pearce, EJ; MacDonald, AS: **“The Immunobiology of Schistosomiasis”** *NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY* VOLUME 2 JULY 2002 499-511

- Perros, F; Dorfmüller, P; Montani, D; Hammad, H; Waelput, W; Girerd, B; Raymond, N; Mercier, O; Mussot, S; Cohen-Kaminsky, S; Humbert, M; Lambrecht, BN: **“Pulmonary Lymphoid Neogenesis in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension”** *Am J Respir Crit Care Med* Vol 185, Iss. 3, pp 311–321, Feb 1, 2012

- Peterson, WP, von Lichtenberg, F: **“Studies on Granuloma Formation. IV. In vivo Antigenicity of Schistosome Egg Antigen in Lung Tissue“** *J. Immunol.* 95. 959-965, 1965

- Price, LC; Wort, SJ; Perros, F; Dorfmüller, P; Huertas, A; Montani, D; Cohen-Kaminsky, S; Humbert, M: „**Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension”** *Chest.* 2012 Jan;141(1):210-21

- Pullamsetti, SS; Schermuly, RT: **„Receptor Tyrosine Kinases in Pulmonary Hypertension”** *PVRI Review* 2009 Vol. 1 Issue 2; 124-128

- Pullamsetti, SS; Savai, R; Janssen, W; Dahal, BK; Seeger, W; Grimminger, F; Ghofrani, HA; Weissmann, N; Schermuly, RT: **"Inflammation, immunological reaction and role of infection in pulmonary hypertension"** *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 7–14

- Rabinovitch, M: **"Pulmonary hypertension: updating a mysterious disease"** *Cardiovascular Research 34 (1997) 268–272*

- Reiman, RM; Thompson, RW; Feng, CG; Hari, D; Knight, R; Cheever, AW; Rosenberg, HF; Wynn, TA: **"Interleukin-5 (IL-5) Augments the Progression of Liver Fibrosis by Regulating IL-13 Activity"** *Infection And Immunity*, Mar. 2006, p. 1471–1479

- Rezende, CMF; Silva, MR; Santos, IGD; Silva, GAB; Gomes, DA; Goes, AM: **„Immunization with rP22 induces protective immunity against *Schistosoma mansoni*: Effects on granuloma down-modulation and cytokine production"** *Immunology Letters* 141 (2011) 123– 133

- Ridi, RE; Aboueldahab, M; Tallima, H; Salah, M; Mohana, N; Fawzi, S; Mohamed, SH; Fahmy, OM**: "*In Vitro* and *In Vivo* Activities of Arachidonic Acid against *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*"** *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Aug. 2010, p. 3383–3389

- Robertson, B; Dostal, K; Daynes RA: **"Neuropeptide regulation of inflammatory and immunologic responses. The capacity of alpha-melanocyte-stimulating hormone to inhibit tumor necrosis factor and IL-1-inducible biologic responses"** *J Immunol*. 1988 Jun 15;140(12):4300-7

- Rodriguez, GC; Lacerda, DC; Gusmao, EdS; Colares, FA; Mota, VT: **"Pseudotumoral presentation of chronic pulmonary schistosomiasis without pulmonary hypertension"** *J Bras Pneumol*. 2009;35(5):484-488

- Rosenkranz, S: **"Pulmonary hypertension: current diagnosis and treatment"** *Clin.Res.Cardiol.* 2007 96:527-541.

1. Ross, AG; Bartley, PB; Sleigh, AC; Olds, GR; Li, Y; Williams, GM; McManus, DP: **"Schistosomiasis"** *N Engl J Med.* 2002 Apr 18;346(16):1212-20.

- Rubin, LJ: **"Therapy of Pulmonary Hypertension - The Evolution from Vasodilators to Antiproliferative Agents"** *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Nov 15;166(10):1308-9

- Savai, R; Pullamsetti, SS; Kolbe, J; Bieniek, E; Voswinckel, R; Fink, L; Scheed, A; Ritter, C; Dahal, BK; Vater, A; Klussmann, S; Ghofrani, HA; Weissmann, N; Klepetko, W; Banat, GA; Seeger, W; Grimminger, F; Schermuly, RT: **"Immune/Inflammatory Cell Involvement in the Pathology**

of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension" *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Sep 6

- Schramm, G; Haas, H: **"Th2 immune response against *Schistosoma mansoni* infection"** *Microbes and Infection* 12 (2010) 881e888

- Secor, WE: **"Immunology of human schistosomiasis: off the beaten path"** *Parasite Immunology*, 2005,27, 309–316

- Simonneau, G; Robbins, IM; Beghetti, M; Channick, RN; Delcroix, M; Denton, CP; Elliott, CG; Gaine, SP; Gladwin, MT; Jing, Z-C; Krowka, MJ; Langleben, D; Nakanishi, N; Souza, R: **"Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension"** *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009;54;S43-S54

- Smith, RE; Strieter, RM; Zhang, K; Phan, SH; Standiford, TJ; Lukacs, NW; Kunkel, SL: **„A role for C-C chemokines in fibrotic lung disease"** *Journal of Leukocyte Biology*; Vol. 57; Mai 1995; 782-787

- Souza Vidal, MRF; Barbosa Jr, AA; Andrade, ZA: **"Experimental Pulmonary Schistosomiasis: Lack of Morphological Evidence of Modulation in Schistosomal Pulmonary Granulomas"** *Rev. Inst. Med. Trop*. Sao Paulo 35 (5): 423-429

- Stacher, E; Graham, BB; Hunt, JM; Gandjeva, A; Groshong, SD; McLaughlin, VV; Jessup, M; Grizzle, WE; Aldred, MA; Cool, CD; Tuber, RM: **"Modern Age Pathology of Pulmonary Arterial Hypertension"** *Am J Respir Crit Care Med* Vol 186, Iss. 3, pp 261–272, Aug 1, 2012

- Staines, HM; Croft, SL; Horrocks, PD: **"Developing novel strategies to prevent parasitic infections"** *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 9(7), 783–785 (2011)

- Stavitsky, AB: **"Regulation of Granuloamtous Inflammation in Experimental Models of Schistosomiasis"** *Infection And Immunity*, Jan. 2004, p. 1–12

- Stenmark, KR; Gerasimovskaya, E; Nemenhoff, RA; Das, M: „**Hypoxic Activation of Adventitial Fibroblasts: Role in Vascular Remodeling"** *Chest* 2002;122;326S-334S

- Stenmark, LR; Fagan, KA; Frid, MG: **„Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms"** *Circ.Res.* 99:675-691

- Terra-Filho, M; Mello, MF; Lapa, MS; Braga Teixeira, RHO; Biscegli Jatene, F: **"Clinical and haemodynamic evaluation of chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients scheduled for pulmonary**

thromboendarterectomy. Is schistosomiasis hypertension an important confounding factor?“ *CLINICS* 2010;65(11):1155-1160

- Tuder, RM; Yun, JM; Bhunia, A; Fijalkowska, I: **“Hypoxia and chronic lung disease”** *J.Mol.Med.* 85:1317-1324 (2007)

- Tuder, RM: **“Pathology of Pulmonary Arterial Hypertension”** *Semin Respir Crit Care Med* 2009;30:376–385

- Vassilli, P: **“The pathophysiologyof tumor necrosis factor”** *Annu Rev. Immunol.* 1992;10:411

- von Lichtenberg, F; Byram, JE: **“Pulmonary cell reactions in natural and aquired host resistance to *Schistosoma mansoni”*** *Am. J. Trop. Med. Hyg*., 29(6), 1980, pp. 1286-1300

- WHO 2011. **Schistosomiasis**. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/

- Wilson, MS; Mentkin-Kane, MM; Pesce, JT; Ramalingan, TR; Thompson, R; Wynn, TA: **“Immunopathology of Schistosomiasis”** *Immunology and Cell Biology* (2007) 85, 148–154

- Wilson, MS; Cheever, AW; White, SD; Thompson, RW; Wynn, TA: **“IL-10 Blocks the Development of Resistance to Re-Infection with *Schistosoma mansoni*”** *PLoS Pathog* 7(8): e1002171 August 2011

- Wynn, TA; Oswald, IP; Eltoum, IA; Caspar, P; Lowenstein, CJ; Lewis, FA; James, SL; Sher, A: **“Elevated Expression of Th1 Cytokines and Nitric Oxide Synthase in the Lungs of Vaccinated Mice After Challenge Infection with *Schistosoma mansoni*”** J Immunol. 1994 Dec 1;153(11):5200-9

- Yasuhara, K; Mitsumori, K; Yoshimura, H; Imazawa, T; Hayashi, S-M; Onodera, H; Takahashi, M; Hayashi, Y: **“Relationship Between the Development of Pulmonary Fibrosis and Lung Tumors in Syrian Golden Hamsters Induced by N-methyl-N-nitrosourethane”** *Toxicol Pathol* 1995 23: 551

- Zhu, Z; Homer, RJ; Wang, Z; Chen, Q; Geba, GP; Wang, J; Zhang, Y; Elias, JA: **“Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production”** *J. Clin. Invest.* 103:779-788 (1999)

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologische Veränderungen der pulmonal-arteriellen Gefäße. 13
Abbildung 2: Lebenszyklus von *Schistosoma mansoni*. 18
Abbildung 3: Verlauf der Th1- und Th2-Immunantwort während der Schistosomen-Infektion. 20
Abbildung 4: Rechtsherzhypertrophie in der Schistosomiasis-induzierten PAH im Hamstermodell. 47
Abbildung 5: Herzfibrose des rechten Ventrikels im Verlauf der Schistosomiasis-induzierten PAH. 47
Abbildung 6: Muskularisierungsgrad der kleinen pulmonal-arteriellen Gefäße. 49
Abbildung 7: Muskularisierungsgrad bei mittleren und großen pulmonal-arteriellen Gefäße. 50
Abbildung 8: Mediale Wandstärke von kleinen pulmonal-arteriellen Gefäßen. 51
Abbildung 9: Mediale Wandstärke von mittleren und großen pulmonal-arteriellen Gefäßen. 52
Abbildung 10: Analyse des Kollagengehaltes in der Lunge. 53
Abbildung 11: Ashcroft's Fibrose-Scoring. 54
Abbildung 12: Totalzahl der in der Lunge lokalisierten Mastzellen. 55
Abbildung 13: Verteilung der pulmonalen Mastzellen. 56
Abbildung 14: Expressionsprofile der Th1-Zytokine. 57
Abbildung 15: Expressionsprofile der Th2-Zytokine. 58
Abbildung 16: Pulmonale Expressionsprofile von Wachstumsfaktoren. 59
Abbildung 17: Plasmaspiegel von zirkulierendem TGF-β. 60

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der pulmonalen Hypertonie……...10

6.4 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A.	Arterie; lat.: *Arteria*
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
BSA	bovines Serumalbumin
Ca^{2+}	Calcium-Ionen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophophat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlendioxid
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure, deoxyribonucleic acid
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IL	Interleukin
i. m.	intramuskulär
i. p.	intraperitoneal
IHC	Immunhistochemie
IPAH	idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
$KHPO_4$	Kaliumhydrogenphosphat
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LV	linker Ventrikel
M	Molar
M.	Muskel; lat.: *Musculus*
mg	Milligramm
Mg^{2+}	Magnesium-Ionen
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

mPAP	mittlerer pulmonal-arterieller Druck
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N.	Nerv
NaCl	Natriumchlorid
$NaHPO_4$	Natriumhydrogenphosphat
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
O_2	Sauerstoff
pg	Pikogramm
p.	nach; lat.: *post*
PAH	pulmonal-arterielle Hypertonie
PAP	pulmonal-arterieller Druck
PASMC	pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen, pulmonary arterial Smooth muscle cells
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGF-α	Platelet derived growth factor α
PDGF-β	Platelet derived growth factor β
PEEP	positive-endexpiratorischer Enddruck, positive Endexpiratory pressure
PH	pulmonale Hypertonie
RNA	Ribonukleinsäure,ribonucleic acid
RV	rechter Ventrikel
RV/LV+S	Ratio der Massen von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum
RVP	rechtsventrikulärer Druck
RVSP	rechtsventrikulärer systolischer Druck
s.	siehe
s. c.	subkutan
SAP	systemisch-arterieller Druck
SD	Standardabweichung, standard deviation
SEM	Standardfehler, standard error mean
TGF-β	Transforming growth factor β

TNF-α	Tumor necrosis factor α
u. a.	unter anderem
V.	Vene; lat.: *Vena*
v. a.	vor allem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VP	Beatmungsdruck, ventilation pressure
vWF	von Willebrand Faktor (Faktor VIII)
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.

6.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

Dezember 2012

Christin Ritter

6.7 Danksagungen

Zu guter Letzt möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei den Personen zu bedanken, die auf die eine oder andere Art zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Bei…

…Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ralph T. Schermuly für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie für die Betreuung und Bewertung dieser Arbeit.

…Herrn Prof. Dr. rer. nat Adriaan Dorresteijn für die Betreuung der Arbeit innerhalb des Fachbereichs 08 und die Begutachtung dieser.

…Herrn Prof. Dr. rer. nat Christoph G. Grevelding und seinem Team für die gute Zusammenarbeit und die Hilfestellung bei der Infektion und Haltung der Hamster.

…Frau Christina Vroom für die stetige Motivation, Unterstützung in allen Lebenslagen und die guten Ratschläge. Ohne deine Hilfe wäre Vieles nicht so geworden wie es ist!!!

…Frau Stephie Viehmann für die molekular-biologische Unterstützung und den freundschaftlichen Umgang.

…Frau Michaela Lang und Samantha Storn für ihre Freundschaft und den Ideenaustausch. Die vielen Kilos „kollagenöser, farbiger Kalorienbomben“ nicht zu vergessen.

…Dr. Baktybek Kojonazarov, Dr. Djuro Kosanovic und Dr. Bhola Dahal für die stetigen Anregungen, Diskussionen und die vielen Hilfestellungen bei der Literatursuche.

…bei den Personen aus meinem privaten Bereich! Ohne ihren bedingungslosen Rückhalt, die stete Motivation und Unterstützung wären viele Hindernisse nicht zu überwinden gewesen! DANKE!!!