

Aus der

Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung VII, Tropenmedizin

(Schwerpunkt: Institut für Tropenmedizin, Reisemedizin und  
Humanparasitologie)

**Identifizierung von antiplasmodialen Substanzen mit  
Aktivität gegen das Schistosoma mansoni-  
Larvenstadium**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Zander, Nina**

**2024**

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. P. G. Kremsner
2. Berichterstatter:	Professor Dr. J.-S. Frick
Tag der Disputation:	19.03.2024

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	1
Tabellenverzeichnis .....	2
Abkürzungsverzeichnis .....	3
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Epidemiologie der Schistosomiasis .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Ätiologie .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Lebenszyklus der Schistosomen .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Pathogenese und klinisches Erkrankungsbild.....</b>	<b>10</b>
1.4.1 Penetrationsstadium: Zerkarien-Dermatitis / Swimmers itch.....	11
1.4.2 Akute Schistosomiasis: Das Katayama-Syndrom.....	11
1.4.3 Chronische Schistosomiasis.....	12
1.4.3.1 Intestinale Schistosomiasis.....	12
1.4.3.2 Hepatische und hepato-splenische Schistosomiasis .....	13
1.4.3.3 Urogenitale Schistosomiasis.....	13
<b>1.5 Diagnostik .....</b>	<b>14</b>
1.5.1 Direkte parasitologische Diagnoseverfahren .....	14
1.5.2 Immundiagnostische Verfahren.....	15
1.5.2.1 Indirekte immundiagnostische Verfahren .....	15
1.5.2.2 Direkte immundiagnostische Verfahren.....	15
1.5.3 Direkte molekulardiagnostische Methoden .....	16
1.5.4 Weitere indirekte Diagnoseverfahren .....	16
1.5.5 Neue Diagnoseverfahren der Schistosomiasis .....	17
<b>1.6 Therapie.....</b>	<b>17</b>
1.6.1 Praziquantel.....	17
1.6.2 Oxamniquin.....	19
1.6.3 Resistenzen .....	20
1.6.4 Impfung .....	20
<b>1.7 Prävention und Kontrolle .....</b>	<b>21</b>
<b>1.8 Wirkstoffsuche gegen Schistosomiasis.....</b>	<b>21</b>
1.8.1 Antiplasmodiale Substanzen aus Therapie und Forschung .....	22
1.8.1.1 Das Artemisinin-Derivat Artesunat .....	22
1.8.1.2 Die Arylaminoalkohole Chinin und Mefloquin .....	23
1.8.1.3 Die 4-Aminochinolin-Derivate Chloroquin, Amodiaquin und Ferroquin.....	24

1.8.1.4	Das Benzonaphthyridin-Derivat Pyronaridin .....	24
1.8.1.5	Das 8-Aminochinolin Primaquin .....	25
1.8.1.6	Weitere antiplasmodiale Substanzen: Atovaquon, Auranofin und Methylenblau .....	25
1.8.1.7	Die Folsäureantagonisten Proguanil, Cycloguanil, WR99210 .....	26
1.8.1.8	Antibiotika mit antiplasmodialer Wirkung aus Therapie und Forschung .....	27
1.8.1.9	Das Tetracyclin Doxycyclin und Tetracyclin-Derivat Tigecyclin .....	27
1.8.1.10	Die Lincosamide Clindamycin, 4-cis- und -trans-Mirincamycin.....	27
<b>1.9</b>	<b>Beurteilung der Vitalität der Schistosomula nach Substanzexposition .....</b>	<b>28</b>
1.9.1	Lichtmikroskopie als Goldstandard .....	28
1.9.2	Resazurin-Assay.....	29
1.9.3	Laktat-Assay .....	30
1.9.3.1	Laktat-Reaktion.....	30
<b>1.10</b>	<b>Ziele der Doktorarbeit.....</b>	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>33</b>
<b>2.1</b>	<b>Haltung des <i>Schistosoma mansoni</i> Lebenszyklus im Labor .....</b>	<b>33</b>
2.1.1	Haltung und Infektion des Endwirtes Maus.....	33
2.1.2	Haltung und Infektion des Zwischenwirtes <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	33
<b>2.2</b>	<b>Isolation aus dem Zwischenwirt und Transformation der Schistosomula ..</b>	<b>34</b>
<b>2.3</b>	<b><i>In vitro</i> Kultivierung von Schistosomula.....</b>	<b>36</b>
<b>2.4</b>	<b>Vorbereitung der Wirkstoff-Stocklösungen.....</b>	<b>36</b>
<b>2.5</b>	<b><i>In vitro</i> Schistosomula-Wirkstoff-Assay .....</b>	<b>37</b>
2.5.1	Allgemeiner Ansatz des Wirkstoff-Assays.....	37
2.5.2	Vorbereitung der Vorverdünnungen der Wirkstoffe .....	38
2.5.3	Vorbereitung der Schistosomula-Kulturen .....	38
2.5.4	Ansatz der Verdünnungsreihe.....	38
<b>2.6</b>	<b>Kontrollen .....</b>	<b>39</b>
2.6.1	No-Drug-Kontrolle (Negativ-Kontrolle) .....	39
2.6.2	Mefloquin-Kontrolle (Positiv-Kontrolle).....	39
2.6.3	SCM-Kontrolle.....	40
2.6.4	Stock-Kontrolle.....	40
<b>2.7</b>	<b>Lichtmikroskopische Beurteilung der <i>in vitro</i> Kulturen.....</b>	<b>41</b>
<b>2.8</b>	<b>Resazurin-Assay .....</b>	<b>42</b>
<b>2.9</b>	<b>Laktat-Assay .....</b>	<b>42</b>
2.9.1	Vorbereitung des Laktat-Assays .....	42

2.9.2	Ansatz des Laktat-Assays .....	43
2.9.3	Laktat-Standard-Kurve .....	46
<b>2.10</b>	<b>Statistische Auswertung der Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Versuchsaufbau .....</b>	<b>48</b>
3.1.1	Kontrollen.....	48
3.1.2	Schistosomulazahlen pro Mikrotitereinsenkung.....	49
3.1.3	Laktat-Standard-Kurven .....	50
<b>3.2</b>	<b>Lichtmikroskopische Beurteilung morphologischer Veränderungen der <i>in vitro</i> Schistosomula-Kulturen von <i>S. mansoni</i> .....</b>	<b>50</b>
3.2.1	Antiplasmodiale Substanzen aus Therapie und Forschung .....	52
3.2.2	Antibiotika aus Therapie und Forschung.....	54
3.2.3	Die Folsäureantagonisten Proguanil, Cycloguanil und WR99210.....	55
<b>3.3</b>	<b>Identifikation von Substanzen mit antischistosomaler Aktivität .....</b>	<b>56</b>
<b>3.4</b>	<b>Analyse-Ergebnisse der getesteten, antiplasmodialen Substanzen .....</b>	<b>60</b>
3.4.1	Das Artemisinin-Derivat Artesunat .....	61
3.4.2	Das Benzonaphthyridin-Derivat Pyronaridin .....	61
3.4.3	Weitere antiplasmodiale Substanzen .....	62
3.4.4	Der Arylaminoalkohol Chinin .....	64
3.4.5	Die 4-Aminochinolin-Derivate Chloroquin, Amodiaquin und Ferroquin .....	65
3.4.6	Das 8-Aminochinolin Primaquin .....	67
3.4.7	Die Folsäureantagonisten Proguanil, Cycloguanil und WR99210.....	68
3.4.8	Antibiotika aus Therapie und Forschung.....	70
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>73</b>
<b>4.1</b>	<b>Identifikation von Substanzen mit antischistosomaler Aktivität .....</b>	<b>73</b>
<b>4.2</b>	<b>Versuchsaufbau für die <i>in vitro</i> Schistosomula-Wirkstoff-Assays.....</b>	<b>77</b>
4.2.1	Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	79
<b>4.3</b>	<b>Betrachtung der drei Messmethoden .....</b>	<b>80</b>
4.3.1	Analyse der Vitalität der Schistosomula anhand der Lichtmikroskopie .....	80
4.3.2	Analyse der Vitalität der Schistosomula mit dem Resazurin-Assay.....	81
4.3.3	Analyse der Vitalität der Schistosomula mit dem Laktat-Assay.....	82

<b>4.4</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>84</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL .....</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>105</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>106</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF (ENTFERNT).....</b>	<b>107</b>
<b>11</b>	<b>APPENDIX.....</b>	<b>110</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schistosomiasis weltweit .....	6
Abbildung 2: Geographische Verteilung der Schistosomiasis weltweit.....	8
Abbildung 3: Lebenszyklus von <i>Schistosoma ssp.</i> ....	9
Abbildung 4: Prinzip des Resazurin-Assays .....	29
Abbildung 5: Prinzip des Laktat-Assays.....	31
Abbildung 6: Pipettierschema der 1:2 Verdünnungsreihe .....	40
Abbildung 7: Pipettierschema der 1:3 Verdünnungsreihe .....	41
Abbildung 8: Exemplarische Fotos von lebendigen und toten Schistosomula.....	42
Abbildung 9: Pipettierschemata für den Laktat-Assay-Ansatz .....	45
Abbildung 10: MQ-Ansätze als Dosis-Wirkungs-Kurven .....	49
Abbildung 11: Laktat-Standard-Kurve .....	50
Abbildung 12: Artesunat .....	52
Abbildung 13: Mefloquin .....	52
Abbildung 14: Methylenblau .....	52
Abbildung 15: Pyronaridin .....	52
Abbildung 16: Amodiaquin .....	53
Abbildung 17: Ferroquin .....	53
Abbildung 18: Tigecyclin .....	54
Abbildung 19: 4-trans-Mirincamycin.....	54
Abbildung 20: Clindamycin.....	54
Abbildung 21: Doxycyclin .....	54
Abbildung 22: Proguanil .....	55
Abbildung 23: Cycloguanil.....	55
Abbildung 24: WR99210 .....	55
Abbildung 25: Dot-Plot-Diagramm Mikroskopie .....	58
Abbildung 26: Dot-Plot-Diagramm Resazurin-Assay .....	59
Abbildung 27: Dot-Plot-Diagramm Laktat-Assay .....	60

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Parasitenspezies, spezifischer Zwischenwirt und geographische Verbreitung der Schistosomiasis .....	8
Tabelle 2: Eingesetzte Wirkstoffe mit antiplasmodialer Aktivität .....	36
Tabelle 3: Minimale letale Konzentration [ $\mu\text{M}$ ] in Ansatz A, B und C.....	51
Tabelle 4: Median der $\text{IC}_{50}$ -Werte aus drei Messverfahren .....	57
Tabelle 5: Mikroskopische Beurteilung der Lebendigkeit der Schistosomula .....	110
Tabelle 6: Anzahl der Schistosomula pro Mikrotitereinsenkung für jeden Ansatz .....	110
Tabelle 7: Anzahl der Schistosomula pro Mikrotitereinsenkung von Mefloquin.....	111
Tabelle 8: Angabe der minimalen letalen Konzentration [ $\mu\text{M}$ ] sowie der errechneten $\text{IC}_{50}$ -Werte [ $\mu\text{M}$ ] für MQ.....	111
Tabelle 9: Angabe der lichtmikroskopisch beurteilten minimalen letalen Konzentration [ $\mu\text{M}$ ] für jedes Medikament .....	112



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACM	Adult Worms Culture Medium
ACT	Artemisinin Combination Therapy, Artemisinin-basierte Kombinationstherapie
AQ	Amodiaquin
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ART	Artesunat
AT	Atovaquon
ATM	Artemether
AU	Auranofin
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
CLINDA	Clindamycin
CQ	Chloroquin
CT	Kernspintomographie
CYCLO	Cycloguanil
DC	Doxycyclin
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DHODH	Dihydroorotatdehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid Medium
FBS	Fetal Bovine Serum, fetales Kälberserum
FQ	Ferroquin
h	hours, Stunden
HTS	High throughput screening
IC <sub>50</sub>	Inhibitorische Konzentration 50 %
KK	Kato-Katz-Methode
l	Liter
M	Molar
m	Meter
MB	Methylenblau
MeOH	Methanol
min	Minuten

ml	Milliliter
mm	Millimeter
MQ	Mefloquin
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Molecular Weight, Molekülmasse
M199	Medium 199
n	Nano
NTD	Neglected Tropical Diseases
NTS	Neu transformierte Schistosomula
OXA	Oxamniquin
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PQ	Primaquin
PRO	Proguanil
PYRO	Pyronaridin
PZQ	Praziquantel
Q	Chinin
RFU	Relative fluorescence units
rpm	Revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
s	Sekunden
SCM	Schistosomula Culture Medium
SGTP	Schistosome glucose transporter protein
<i>Sma</i> AQP	<i>Schistosoma mansoni</i> Aquaporin
SOP	Standard Operating Procedures
TC	Tigecyclin
TCM	Traditionell Chinesische Medizin
TDR	Tropical Disease Research
THF	Tetrahydrofuran
U	Units
VOCC	Voltage-operated Calcium Channels
WHO	World Health Organisation
WR	WR99210
μ	Mikro

4-cis-M

4-cis-Mirincamycin

4-trans-M

4-trans-Mirincamycin

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie der Schistosomiasis

Über 700 Millionen Menschen in 78 endemischen Ländern weltweit sind dem Risiko einer Schistosomiasis, auch Bilharziose genannt, ausgesetzt (s. Abbildung 1) (1). Weltweit sind ca. 250 Millionen Menschen mit *Schistosoma* spp. infiziert. Schätzungen zufolge benötigten 2019 236,6 Millionen Menschen eine präventive Therapie, rund 105,4 Millionen Menschen wurden präventiv mit Praziquantel (PZQ) behandelt. Man nimmt an, dass ca. 90 % der sich in Therapie gegen Schistosomiasis befindlichen Menschen im tropischen und subtropischen Afrika leben (7). In den Endemiegebieten dominiert die chronische Schistosomiasis, die einen wesentlichen Morbiditätsfaktor darstellt. Von den Infizierten zeigen 120 Millionen Menschen Symptome, wovon 20 Millionen Menschen schwerwiegende Konsequenzen von sich tragen (3). Die Mortalität der Schistosomiasis beträgt Schätzungen zufolge zwischen 20.000 und 200.000 Tote/Jahr (2,4).

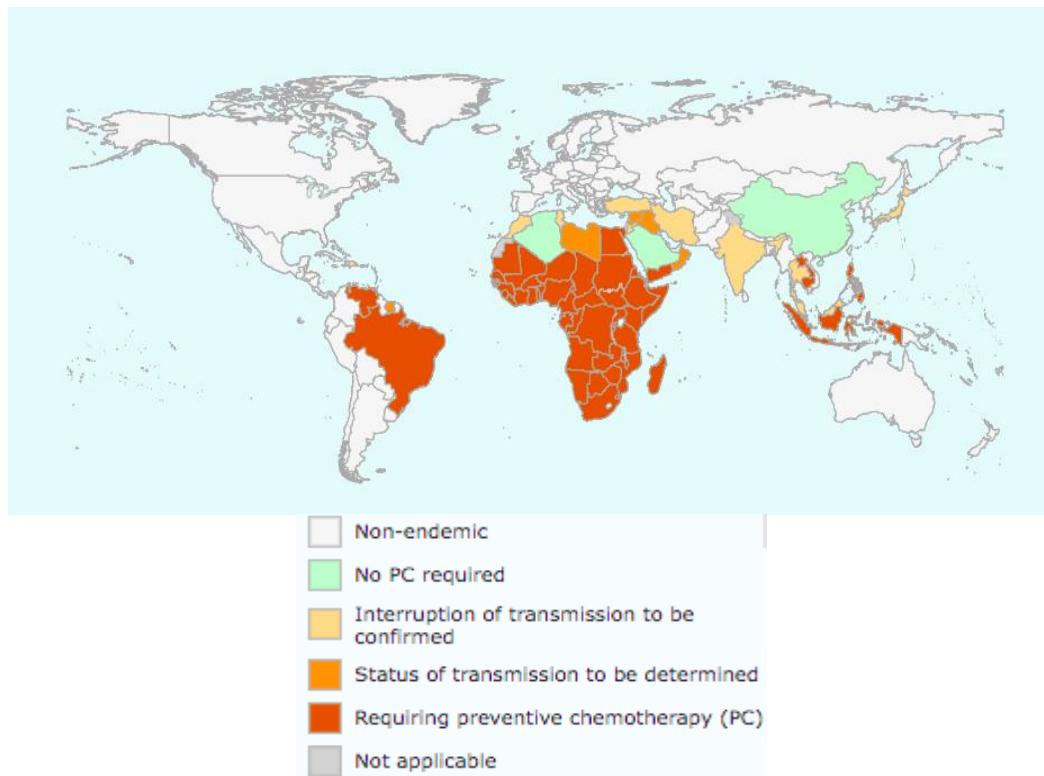


Abbildung 1: Schistosomiasis weltweit, endemische Situation im Jahre 2020 (modifiziert) (5)

Die Infektion erfolgt über Wasserkontakt mit infizierten Süßwasserschnecken. Zur Risikogruppe innerhalb der Endemiegebiete zählt die Bevölkerung armer und ländlicher Regionen, wo es keine gesicherte Trinkwasserzufuhr gibt bzw. keine geregelten Sanitäreinrichtungen vorhanden sind. Inadäquate Hygienestandards sowie infiziertes Trinkwasser erhöhen das Risiko in besonderem Maße für Kinder, Waschfrauen, Bauern oder Fischer (2,5). Durch Tourismus, Entwicklungshilfe, Bewässerungsprojekte und Migration verbreitet sich die Schistosomiasis in anderen Regionen der Welt. Voraussetzung für eine Übertragung ist, dass der Parasit die nötigen Gegebenheiten für die asexuellen und sexuellen Entwicklungsstufen hat sowie die richtige Umgebung für die einzelnen Entwicklungsstufen vorhanden ist (6). Die Übertragung ist maßgeblich von folgenden Faktoren abhängig:

1. Ausbreitung, Biologie und Populationsdynamik der Süßwasserschnecke als Zwischenwirt.
2. Ausmaß und Verbreitung von menschlichen Exkrementen in der Umwelt.
3. Kontakt und Länge des Aufenthaltes in kontaminiertem Süßwasser.
4. Die Beziehung zwischen Wirt und Parasit, sowohl in den Schnecken als auch im Menschen sowie die Abwehrmechanismen des menschlichen Körpers (7).

Im Jahre 2019 befanden sich 105 Millionen Menschen in Therapie gegen Schistosomiasis, ein Jahr später, 2020, waren es aufgrund der COVID-19-Pandemie 76,9 Millionen Menschen. Die Anzahl der Behandlungen von Schulkindern sank im Jahre 2019 zu 2020 von 67 % auf 45 % (8).

## 1.2 Ätiologie

Die Helminthen zählen zum Stamm der Plattwürmer (Plathelminthes) der Klasse Saugwürmer (Trematoden) und zur Gattung der Pärchenegel (*Schistosoma*). Es gibt sechs humanpathogene Schistosomenspezies: *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi* und *S. intercalatum/guineensis*. (9,10). Die Verbreitung der Schistosomenarten ist geographisch verschieden (s. Abbildung 2) und von dem jeweiligen spezifischen Zwischenwirt abhängig (s. Tabelle 1). Je nach Erreger wird zwischen der intestinalen und der urogenitalen Schistosomiasis unterschieden (2,11–15). Neben den humanpathogenen Erregern existieren tierpathogene

Stämme wie z.B. *S. bovis* (Rinder), *S. mattheei* (Schafe), *S. rodhaini* (Nagetiere) oder *S. edwardiense* (Nilpferd).

Tabelle 1: Parasitenspezies, spezifischer Zwischenwirt (Süßwasserschnecke) und geographische Verbreitung der Schistosomiasis.

	Spezies	Zwischenwirt	Geografische Verbreitung
<b>Intestinale Schistosomiasis</b>	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Biomphalaria</i>	Afrika, der Nahe Osten, die Karibik, Südamerika (Brasilien, Venezuela und Suriname)
	<i>Schistosoma japonicum</i>	<i>Oncomelania</i>	China, Indonesien, Philippinen
	<i>Schistosoma mekongi</i>	<i>Neutricula</i>	Mehrere Bezirke von Kambodscha und der Demokratischen Volksrepublik Laos
	<i>Schistosoma guineensis</i> / <i>Schistosoma intercalatum</i>	<i>Bulinus</i>	Regenwaldgebiete Zentralafrikas
<b>Urogenitale Schistosomiasis</b>	<i>Schistosoma haematobium</i>	<i>Bulinus</i>	Afrika, Naher Osten, Korsika

Die historische Bezeichnung Bilharziose geht auf den deutschen Arzt und Entdecker Theodor Bilharz im Jahre 1851 zurück (16). Bereits im alten Kaiserreich China zu Zeiten der Han Dynastie (17), sowie in Mesopotamien und im alten Ägypten wurde die Krankheit beschrieben oder konnte im Nachhinein nachgewiesen werden (16,18–20).

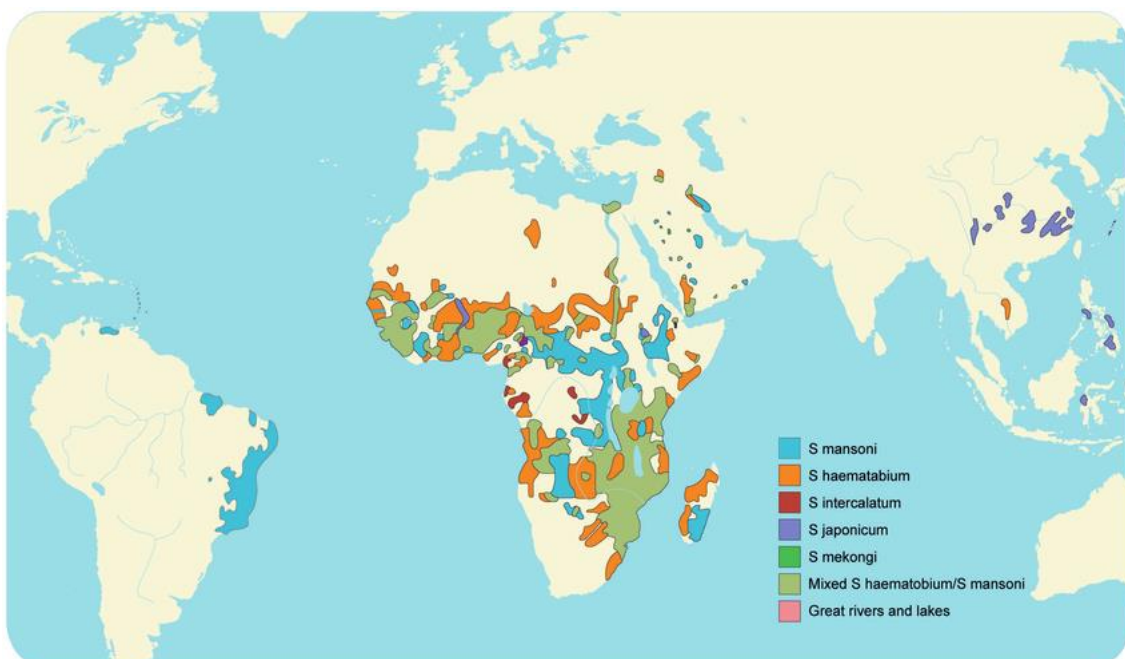


Abbildung 2: Geographische Verteilung der Schistosomiasis weltweit (21)

### 1.3 Lebenszyklus der Schistosomen

Der Lebenszyklus der Schistosomen aller sechs humanpathogenen Spezies läuft ähnlich ab und findet in einem Zwischen- und einem Endwirt statt. Es wird in eine asexuelle und eine sexuelle Fortpflanzung unterteilt. Der Zwischenwirt ist ein Weichtier (Mollusca), in diesem Fall eine Süßwasserschnecke, in dem es zur asexuellen Vermehrung kommt (12). Der Endwirt ist ein Säugetier, in diesem Fall der Mensch, in dem die Schistosomen zur Adoleszenz heranreifen und es zur sexuellen Paarung kommt.

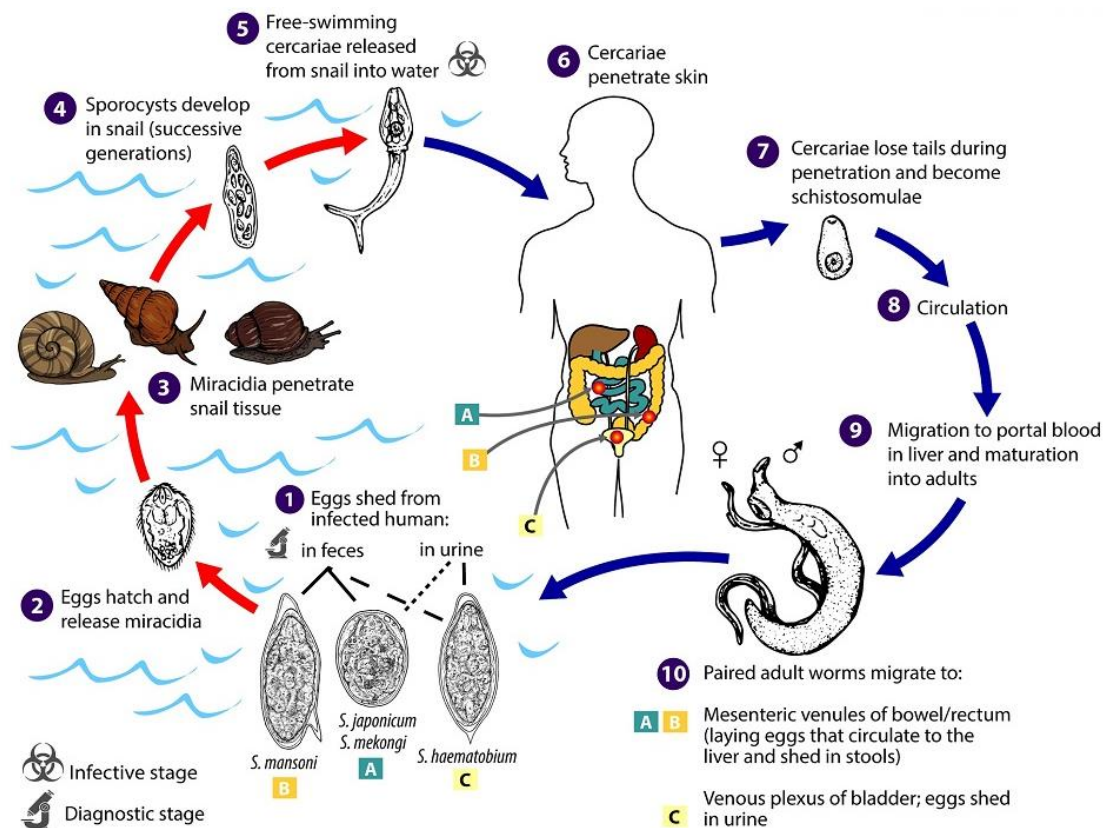


Abbildung 3: Lebenszyklus von *Schistosoma ssp.*. Mit freundlicher Genehmigung von DPDx, Centers for Disease Control and Prevention (modifiziert) (14).

Die Wurmeier werden durch menschliche Faeces oder Urin in die Umwelt abgegeben. Gelangen die Eier in das Süßwasser, so schlüpfen daraus Mirazidien (Wimpernlarven). Durch ihre Zilien sind sie freischwimmend und infizieren die Süßwasserschnecke geleitet durch Licht und chemische Stimuli (12). Die Mirazidie penetriert die Schnecke und vollzieht eine asexuelle Vermehrung über zwei Generationen hin zu einer vielzelligen Sporozyste, die im Verlauf zu zahlreichen Zerkarien (Gabelschwanzlarven) mit dem unverkennbaren, gegabelten Schwanz heranreifen (14). Eine Schnecke, die

durch ein Mirazidium infiziert worden ist, kann 4-6 Wochen nach der Infektion täglich tausende Zerkarien aus dem Zwischenwirt in das Süßwasser über Wochen abgeben (13). Die Zerkarien werden durch einen Lichtstimulus aus der Schnecke in das Süßwasser abgegeben und können dort bis zu 72 Stunden verweilen, bis sie den Endwirt ausfindig gemacht haben. Bei der Penetration durch die menschliche Haut werfen die Zerkarien ihren Schwanz ab und entwickeln sich zu Schistosomula (Larvenstadium). Diese migrieren durch das Gewebe, bis sie über Kapillaren in die Lungen und über den großen Blutkreislauf schließlich zur Leber gelangen. In der Pfortader erreichen sie nach 4-6 Wochen die Adoleszenz und es kommt zur Paarung. Im Anschluss migriert das Wurm-paar zu ihren mesenterialen oder perivesikulären Zielgefäßen, wo es zur Eiablage kommt. Die Eier gelangen über die Blase/Urin bzw. Darm/Stuhl nach außen und der Kreislauf beginnt von Neuem (s. Abbildung 3) (13). *S. mansoni* befällt dabei vornehmlich die inferioren Mesenterialvenen des Dickdarms, während *S. japonicum* die superioren Mesenterialvenen des Dünndarms besiedelt. *S. intercalatum* und *S. guineensis* befallen ebenfalls den inferioren mesenterialen Plexus jedoch etwas tiefer im Becken als *S. mansoni*. *S. haematobium* befällt den venösen Plexus der Blase, kann aber auch in den rektalen Venolen gefunden werden (14). Die weiblichen Schistosomen legen ihre Eier in die kleinen portalen oder perivesicalen Venolen, wo sie langsam in das Lumen des jeweiligen Darmabschnittes (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. intercalatum/guineensis*) oder in die Blase oder Uretren (*S. haematobium*) wandern (14).

Die Lebensspanne der adulten Schistosomen beträgt im Durchschnitt 3-5 Jahre, sie können jedoch auch bis zu 30 Jahre überleben (13). Theoretisch können aus einem Schistosomenpaar 600 Milliarden Schistosomen entstehen (13).

#### **1.4 Pathogenese und klinisches Erkrankungsbild**

Das Krankheitsbild Schistosomiasis wird in eine akute und eine chronische Form unterteilt, wobei in Endemiegebieten die chronische Schistosomiasis dominiert. Die Klinik ist sowohl von dem Entwicklungsstadium und der Dauer der Infektion als auch von der Schistosomenspezies und dem daraus resultierenden Organbefall abhängig. Sowohl die akute als auch chronische



Schistosomiasis können asymptomatisch verlaufen. Das Krankheitsbild der chronischen Schistosomiasis wird nicht durch die Helminthen selbst, sondern durch eine Immunantwort auf deren Eier hervorgerufen (13,22). Unspezifische Symptome innerhalb der ersten 3 Monate nach der Infektion sind neu auftretende Urtikaria oder Ödeme, unklare Eosinophilie, Fieber, Myalgien, Arthralgien, pulmonale Symptome wie Husten, pulmonale Rundherde und Granulome, ZNS-Symptome oder abdominale Schmerzen (10,23).

#### **1.4.1 Penetrationsstadium: Zerkarien-Dermatitis / Swimmers itch**

Hier handelt es sich um eine lokale, erythematös-papulöse Hautreaktion mit Juckreiz und einer Inkubationszeit von 6-48 Stunden nach Penetration (24). Es ist eine akute Hypersensitivitätsreaktion an der Eintrittsstelle der Zerkarien in die Haut, die durch das Absterben der Zerkarien in der Haut hervorgerufen wird. Paraklinisch zeigen sich eine Eosinophilie sowie eine IgG vermittelte, zytotoxische Immunantwort (7). Die Zerkarien-Dermatitis, auch Badedermatitis genannt, zeigt sich vor allem bei Menschen, die zuvor keinen Kontakt mit Zerkarien gehabt haben. In endemischen Gebieten kann dieses Stadium einen asymptomatischen Verlauf haben (13). Nicht-human pathogene Schistosomen (*Trichobilharzia*, *Gigantobilharzia*), die den Menschen als Fehlwirt haben, lösen oft eine ausgeprägtere Reaktion aus, da alle Zerkarien in der Haut absterben und eine stärkere Immunantwort hervorgerufen wird.

#### **1.4.2 Akute Schistosomiasis: Das Katayama-Syndrom**

Nach einer Inkubationszeit von 2-8 Wochen kann es bei einer Erstinfektion mit *S. japonicum*, *S. mekongi*, seltener mit *S. mansoni* und sehr selten mit *S. haematobium*, zu einem teils lebensbedrohlichen Krankheitsbild, dem Katayama-Syndrom, kommen. Dieses ist klinisch durch einen raschen und hochfebrilen Fieberanstieg mit Schüttelfrost, Husten und Kopfschmerzen, sowie Myalgien und abdominellen Schmerzen gekennzeichnet (24). In dieser Zeit vollzieht die Schistosomula ihre Entwicklung zum adulten Wurm. Im Körper kommt es zu einer systemischen Hypersensitivitätsreaktion gegen die Schistosomula und die Eier. Durch die Wurm- bzw. Ei-Antigene wird eine immense Immunantwort aktiviert und es kommt zu einer starken Antikörperreaktion im Serum in Form von IgG, IgM und IgA (7). Im Körper

zirkulierende Antigen-Antikörper-Komplexe können eine Lymphadenopathie, Glomerulonephritis sowie eine Hepatosplenomegalie hervorrufen. Paraklinisch zeigt sich eine deutliche Eosinophilie (7,10,22).

### **1.4.3 Chronische Schistosomiasis**

Die chronische Form der Schistosomiasis beruht auf einer Immunreaktion des Körpers gegen die im Gewebe verbleibenden Eier und kann sich klinisch erst nach Jahren der eigentlichen Infektion mit Symptomen äußern. Die Eier können proteolytische Enzyme sezernieren, die eine eosinophile Entzündungsreaktion sowie eine granulomatöse Entzündung hervorrufen (13). Mit der Zeit wird dieses granulomatöse Gewebe in eine irreversible Fibrose umgewandelt. Bei den Enzymen handelt es sich um „Soluble egg antigens (SEAs)“ (7), die durch Speicheldrüsen des sich in dem Ei nach wenigen Tagen entwickelnden Mirazidiums an die Umgebung abgegeben werden und eine Hypersensitivitätsreaktion auslösen. Des Weiteren können verschleppte Eier im Blutsystem Embolien in anderen Organen wie Leber, Milz und Lunge verursachen. Durch Kollateralkreisläufe gelangen die Eier ebenfalls in andere Körperregionen und können hier weitere Symptome herbeiführen, wie z. B. eine ektope Schistosomiasis in dem Pankreas, dem Peritoneum, der Haut oder als Neuroschistosomiasis im zentralen Nervensystem (ZNS) (13). Die Schwere der Symptome ist abhängig von der Intensität der Infektion sowie von der Immunreaktion (7,13). Als Folge der Infektion lassen sich vor allem bei Kindern im Schulalter Anämie, Malnutrition, sowie Einschränkungen der körperlichen und intellektuellen Entwicklung beobachten (22). In sub-Sahara Afrika dominiert die urogenitale Schistosomiasis mit einem Anteil von zwei Drittel aller Schistosomiasis-Infektionen (25).

#### **1.4.3.1 Intestinale Schistosomiasis**

Hervorgerufen wird die intestinale Schistosomiasis durch die Erreger *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* und *S. mekongi*. Durch die granulomatöse Entzündungsreaktion kommt es vornehmlich in Dickdarm und Rektum zu Schleimhautinfektionen, Pseudopolypen, Mikroulzerationen und oberflächlichen Blutungen. Die klinischen Symptome reichen von

rezidivierenden abdominellen Beschwerden, Abgeschlagenheit und Appetitlosigkeit zu chronisch-blutiger Diarrhoe und Anämie (13,23).

#### **1.4.3.2 Hepatische und hepato-splenische Schistosomiasis**

Bei der hepatischen oder hepato-splenischen Schistosomiasis kann zwischen einem frühen entzündlichem und einem chronisch fibrotischem Stadium unterschieden werden. Hervorgerufen wird diese durch die Erreger *S. mansoni*, *S. japonicum* und *S. mekongi*. Die frühe entzündlich hepatische Schistosomiasis wird durch eine Immunreaktion der Eier in der Leber hervorgerufen und ist verantwortlich für die Hepatomegalie bzw. Hepatosplenomegalie bei Kindern und Jugendlichen. Bei dem chronisch hepatischen oder fibrotischen Stadium kommt es nach Jahren der Erkrankung zur Fibrose der Leber mit portaler Hypertension, Verschluss der portalen Venen, Splenomegalie, portocavalen Shunts, venösen Kollateralkreisläufen und gastrointestinalen Varizen im jungen Erwachsenenalter. Als Folge daraus kommt es zu Aszites und gastro-intestinalen Blutungen (13).

#### **1.4.3.3 Urogenitale Schistosomiasis**

Bei der urogenitalen Schistosomiasis kommt es durch die Eier von *S. haematobium* zu einer granulomatösen Infektion der Ureteren und der Blasenwand. Folgen sind Ulzerationen und Pseudopolypen, die sich klinisch durch Mikro- und Makrohämaturie, Pollakisurie, Dysurie und Proteinurie äußern. Diese klinischen Symptome sind meist bei Schulkindern zu beobachten. Im Erwachsenenalter chronifiziert die Erkrankung und es kann zu Fibrosierung und Kalzifizierung der Blase und der Ureteren kommen. Klinische Folgen sind Hydronephrosen, Hydroureteren, postrenales Nierenversagen und Pyelonephritis (13). Langfristig kann es zu schwerwiegenden Komplikationen führen. Zum einen zeigt sich ein erhöhtes Risiko für die Bildung eines Plattenepithelkarzinoms der Harnblase (13,22). Zum anderen kann es bei Frauen eine genitale Schistosomiasis hervorrufen. Durch die granulomatöse Entzündungen an den Tuben, den Ovarien, dem Uterus, der Zervix, der Vagina und der Vulva kann es zu Schmerzen beim Geschlechtsverkehr, Infertilität und einem erhöhten Abortenrisiko kommen. Männer leiden vermehrt unter Haemospermie, Oligospermie, Orchitis und Prostatitis. Es besteht der

Verdacht, dass aufgrund der genitalen Läsionen ein erhöhtes HIV-Infektionsrisiko besteht und eine Infektion mit *S. haematobium* eine Präkanzerose darstellt (2,22).

## **1.5 Diagnostik**

Eine frühzeitige und genaue Diagnostik der Schistosomiasis ist sowohl für das Patientenmanagement von Reiserückkehrern und Migranten aus Endemiegebieten, als auch für die Überwachung von Kontrollprogrammen wichtig, um ein schnelles Eingreifen in den Infektionszyklus zu ermöglichen und chronische Komplikationen zu vermeiden (26). Dafür stehen unterschiedliche Diagnoseverfahren zur Verfügung, die im Folgenden beschrieben werden.

### **1.5.1 Direkte parasitologische Diagnoseverfahren**

Der Goldstandard zur Diagnostik der Schistosomiasis ist die Mikroskopie mit dem Nachweis von Parasiteneiern in Stuhl- (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. intercalatum*) und Urinproben (*S. haematobium*), seltener in Gewebebiopsien (23). Das mikroskopische Verfahren ist hochspezifisch, da vorhandene Schistosomen-Eier den direkten Nachweis für eine Infektion liefern und anhand ihrer Größe und Morphologie eine Differenzierung der Schistosomenart erlauben. Die WHO empfiehlt zur Diagnostik und Quantifizierung einer *S. mansoni* und *S. japonicum*-Infektionen die vorherige Anreicherung mittels der Kato-Katz-Methode (KK). Dabei erfolgt die mikroskopische Zählung der Eier aus dem Stuhlpräparat mit einer definierten Menge Stuhl (41,7 mg), sodass eine quantitative Angabe Eier/Gramm Stuhl gemessen werden kann (2,13,26–29). Für den Nachweis von *S. haematobium*-Eiern im Urin (10 ml) werden diese zunächst mittels Zentrifugation oder Filtration, z.B. durch Nuclepore™ Membranfiltertechnik oder Nylon-Filter (12-20 mm Porengröße), angereichert und anschließend mikroskopisch ausgelesen (Eier/10 ml Urin) (13,30,31).

Mikroskopische Methoden sind sehr spezifisch, preiswert und einfach in der Durchführung. Nachteile sind die geringe Sensitivität bei langjährigen chronischen Infektionen, bei Infektionen mit niedriger Intensität und damit verbundener geringer Eiausscheidung, eine tagesunterschiedliche Eiausscheidung, eine ungleiche Eiverteilung in dem Probenmaterial sowie eine

untersucherabhängige Durchführung und Auswertung (32–36). Eine höhere Sensitivität könnte durch ein größeres Probenvolumen und/oder mehrere Probenmessungen an aufeinander folgenden Tagen erreicht werden (34,35). Ein Ei-Nachweis ist erst 4-10 Wochen nach Infektionsbeginn möglich, wenn die Würmer das adulte Stadium erreicht haben (13). Eine akute Schistosomiasis kann mittels mikroskopischer Nachweisverfahren somit nicht nachgewiesen werden.

## **1.5.2 Immundiagnostische Verfahren**

### **1.5.2.1 Indirekte immundiagnostische Verfahren**

Zum einen zielen immundiagnostische Verfahren auf den Nachweis spezifischer Antikörper aus dem Serum (IgM, IgG, IgE) z.B. gegen lösliche Wurmantigene (soluble worm antigen) oder Ei-Antigene (crude egg-antigen) ab und eignen sich zur Diagnostik einer akuten Infektion, z.B. von Kindern in Endemiegebieten, im Rahmen des diagnostischen Screenings von Reiserückkehrern aus Endemiegebieten sowie Verdachtsdiagnosen in niedrigendemischen Gebieten (13,35). Zum Einsatz kommen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Immunfluoreszenztest (IFT) und indirekte Hämagglutination (13). Hierbei werden schistosomale Antigene verschiedener Parasitenstadien eingesetzt, um z.B. spezifische Antikörper aus dem Serum zu detektieren (35,37). Das Verfahren hat eine hohe Sensitivität, kann jedoch nicht zwischen einer akuten und chronischen Infektion unterscheiden oder die Intensität einer Infektion abbilden (35). Des Weiteren kann es durch Kreuzreaktionen sowohl zwischen den Schistosomenspezies als auch anderen Helminthen kommen und zu falsch positiven Ergebnissen führen (13,26,31,35,38,39). Eine weitere Problematik ist, dass in den ersten Wochen einer frischen Infektion noch keine Antikörper nachweisbar sind oder Individuen mit Zustand nach erfolgreicher Therapie weiterhin zirkulierende Antikörper besitzen (27,40). Für eine höhere Spezifität sollten definierte, rekombinant exprimierte Antigene zum Einsatz kommen (26,41).

### **1.5.2.2 Direkte immundiagnostische Verfahren**

Zum anderen können durch immunologische Nachweisverfahren Antigene von *Schistosoma ssp.* im Blut oder Urin von Patienten nachgewiesen werden, wie

z.B. das zirkulierende kathodische Antigen (CCA) oder das zirkulierende anodische Antigen (CAA). CAA wird über Vomitus von adulten Schistosomen abgegeben und kann im Anschluss im Urin nachgewiesen werden (42). Mit Hilfe eines point-of-care Kassettentests können CCA aus Patientenurin mittels Immunoassay nachgewiesen werden (POC-CCA), der auf monoklonalen Antikörpern basiert (39). In verschiedenen Studien wurden POC-CCA mit der KK-Methode bei *S. mansoni* Infektionen zur Diagnose der intestinalen Schistosomiasis verglichen. Die Resultate zeigen, dass die Methode empfindlicher ist als die KK-Methode (43), vor allem bei geringerer Infektionsintensität, jedoch mit insgesamt geringerer Spezifität (42,44–46).

### **1.5.3 Direkte molekulardiagnostische Methoden**

Für die Diagnostik einer Schistosomiasis kann der empfindliche und hochspezifische Nachweis von DNA aus Stuhl, Urin oder EDTA-Blut mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgen. Zum Einsatz kommen z.B. klassische PCR, Real-time PCR, multiplex PCR oder Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (26,30,47). In Stuhl- (*S. mansoni*) oder Urinproben (*S. haematobium*) erfolgt der DNA-Nachweis hauptsächlich aus den Eiern der Schistosomen, welche jedoch, je nach Tageszeit, unterschiedlichen Ausscheidungsintervallen und Verteilungen in den Probenmaterialien unterliegen (34,48). Eine Alternative aus der Forschung bietet den Nachweis von zellfreier Parasiten-DNA (cell-free parasite DNA, CFPD), die kontinuierlich durch Larvenstadien, adulte Würmer oder Eier in das Blut abgegeben wird und somit eine frühe Diagnose der Schistosomiasis ermöglicht (26,49).

PCR-Methoden können eine akute Schistosomiasis oder ein Infektionsstadium mit geringer Intensität diagnostizieren, wenn ein mikroskopischer Einachweis oder eine Serologie nicht nachzuweisen sind. Nachteile sind die hohen Kosten für die spezielle Laborgeräte, Testkits und Reagenzien sowie ausgebildetes Laborpersonal (30,50).

### **1.5.4 Weitere indirekte Diagnoseverfahren**

Urinteststreifen zur Detektion einer Hämaturie sind ein schneller und kostengünstiger Marker. In Endemiegebieten ist eine Hämaturie häufig mit der urogenitalen Schistosomiasis assoziiert, jedoch gibt es zahlreiche andere

Ursachen für Blut im Urin (51). Mit Hilfe des Ultraschalls lassen sich die pathologischen Veränderungen der intestinalen und urogenitalen Schistosomiasis darstellen, wie z.B. Zeichen der portalen Hypertension oder Hepato-Splenomegalie. Im Krankenhaus können Endoskopien und Zystoskopien genutzt werden, um Ösophagusvarizen und Blasenläsionen nachzuweisen. Durch die Entnahme von Biopsien im Rektum oder im Rahmen einer Laparoskopie können makroskopisch und mikroskopisch granulomatöse Entzündungsprozesse bei chronischer Schistosomiasis nachgewiesen werden. Bildgebende Verfahren wie Röntgen, Kernspintomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) werden ebenfalls genutzt, um pathologische Prozesse im Körper sichtbar zu machen (13).

### **1.5.5 Neue Diagnoseverfahren der Schistosomiasis**

Es ist wichtig, vorhandene Diagnosemethoden zu verbessern und gleichzeitig nach neuen Markern zu suchen, um die Diagnostik zu erweitern oder zu spezialisieren. Schistosomale Oberflächenproteine, wie z.B. die Tegumentproteine Aquaporin, Dysferlin und rSm200, sind attraktive Biomarker, welche in Form von Schnelltestkits die Diagnostik bereichern und eine genauere Diagnostik ermöglichen (26). Des Weiteren wurden extrazelluläre Vesikel (EV) in adulten Würmern und Schistosomula von *S. mansoni* entdeckt und einige als vielversprechende Impfkandidaten priorisiert (26). Ein anderer Forschungsschwerpunkt liegt bei dem Nachweis von schistosomale Mikro-RNA (miRNA), um z.B. Therapieerfolge abbilden zu können (26).

## **1.6 Therapie**

### **1.6.1 Praziquantel**

Für die Therapie der Schistosomiasis ist Praziquantel (Biltricide®, Cesol®, Cysticide®) das Mittel der ersten Wahl. Laut der aktuellen S1-Leitlinie zur Schistosomiasis der „Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften“ (AWMF) wird, anders als in der Fachinformation von Biltricide® und den Empfehlungen der WHO für die Schistosomiasistherapie in Endemiegebieten, in Deutschland eine Therapiedauer von drei Tagen statt einem Tag bevorzugt (23). Praziquantel (PZQ) ist gegen die adulte Form aller sechs humanpathogenen

Schistosomenspezies sowie deren Doppelinfektionen wirksam. Die empfohlene Dosis ist von der jeweiligen Schistosomenspezies abhängig. Für die orale Therapie von *S. haematobium* und *S. mansoni* sowie bei Doppelinfektion wird eine Dosis von 40 mg/kg Körpergewicht Praziquantel pro Tag über drei Tage empfohlen. Für die orale Therapie von *S. intercalatum*, *S. mekongi*, *S. guineensis* oder *S. japonicum*-Infektionen wird eine Dosis von 60 mg/kg Körpergewicht Praziquantel pro Tag über drei Tage empfohlen, wobei die Tagesdosis auf zwei Dosen im Abstand von 4-6 Stunden aufgeteilt werden kann. Praziquantel hat ein geringes Nebenwirkungsprofil. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen Schwindel, gastrointestinale Beschwerden, Fieber und urtikarielle Hautreaktionen (23). Die therapeutische Dosis zeigt in Abhängigkeit vom Infektionslevel eine Heilungsrate von 60-90 % bei *S. mansoni*-Infektionen mit einer Reduktion der Eiausscheidung von 90-95 % (52).

PZQ ist ein Pyrazinoisoquinolin-Derivat der Pharmafirma Merck mit anthelminthischer Aktivität, welches im Jahre 1972 durch ein gemeinsames Programm der Pharmakonzerne Merck und Bayer AG (Leverkusen) entdeckt worden ist. Im Jahre 1982 erfolgte die Erstzulassung für den Menschen. Es wird in einem First-Pass-Effekt der Leber metabolisiert und renal eliminiert, die Halbwertszeit beträgt 1,5 Stunden. PZQ ist in der Veterinärmedizin zugelassen und hat eine anthelminthische Wirksamkeit gegen verschiedene Saug- (Trematoden) und Bandwurmart (Cestoden) (53). Der genaue Wirkmechanismus von PZQ ist nicht bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass es gegen die spannungsabhängigen Kalziumkanäle (VOCC, Voltage-operated Calcium Channels) der Schistosomenmembran wirksam ist und durch einen schnellen Kalziumeinstrom in adulten Schistosomen eine krampfartige Muskelkontraktion bis hin zur Paralyse hervorruft (52,54,55). Die Membranpermeabilität wird ebenfalls beeinflusst, sodass es zu Vakuolisierung des Teguments kommt. Die adulten Würmer können sich dadurch nicht mehr über den Saugnapf festhalten, lösen sich von den Gefäßwänden und werden in die Leber gespült, wo das Immunsystem greift und diese eliminiert (52,53). PZQ hat eine anthelminthische Aktivität gegen adulte Würmer, nicht jedoch gegen die juvenilen Würmer (52). Im Zerkarien-Stadium und in den ersten Tagen nach



einer Schistosomen-Infektion zeigt sich eine Empfindlichkeit gegenüber dem Wirkstoff (53,56).

Im Gegenzug sind einige antiplasmodiale Substanzen wie Artemisinin-Derivate, z.B. Artemether, Artesunat oder Dihydroartemisinin, wirksam gegen juvenile Stadien der Schistosomen (15,57–60). In den Metaanalysen von Pérez del Villar et al. (61) und Liu et al. (15) mit Artemether (ATM) oder Artesunat (ART) in Kombination mit PZQ konnte nachgewiesen werden, dass die Heilungsraten signifikant höher waren als die alleinige Gabe von PZQ (53,60). Auf der einen Seite sinkt mit einer Kombinationstherapie das Risiko für den Erwerb von Resistenzen gegen PZQ. Auf der anderen Seite ist in Endemiegebieten, wo Malaria und Schistosomiasis als Koinfektion auftreten können, das Auftreten von Artemisinin-resistenter Malaria durch Massenbehandlungsprogramme gefürchtet (13,52,61). Ross et al. empfiehlt als neue globale Strategie zur Elimination der Schistosomiasis u.a. jährlich die einmalige Gabe einer geteilten Dosis PZQ 60 mg/kg Körpergewicht in Kombination mit ATM 6 mg/kg Körpergewicht, um sowohl adulte als auch juvenile Entwicklungsstufen der Schistosomen zu behandeln (59). Dabei liegt die ATM-Dosis unter der therapeutischen Dosis der Malaria, was bei einmaliger Gabe jährlich in Kombination mit PZQ eine Selektion von ATM-resistenten *Plasmodium falciparum*-Stämmen unwahrscheinlich macht (59). Schistosomiasis-Patienten, die regelmäßig wiederholten Kontakt mit infiziertem Süßwasser haben, könnten von einer Kombinationstherapie PZQ-ATM profitieren (15). Trotz guter Ergebnisse einzelner randomisiert kontrollierter Studien bezüglich der Kombinationstherapie PZQ-ATM konnte in einer großen randomisierten, Placebo kontrollierten Doppelblindstudie in China die Kombinationstherapie PZQ-ATM gegen akute Schistosomiasis mit *S. japonicum* keinen Vorteil gegenüber der Einzelgabe PZQ abbilden (33,62).

### **1.6.2 Oxamniquin**

Oxamniquin (OXA), ein Chinolin-Derivat, wurde 1969 entdeckt und durch die Pharmafirma Pfizer unter dem Namen Mansil® in Brasilien zugelassen. OXA ist ausschließlich wirksam bei Infektionen mit *S. mansoni* und wirkt hauptsächlich gegen die adulten, männlichen Schistosomen. Es wird, in Abhängigkeit der geographischen Lage, mit unterschiedlichen Einzeldosen verabreicht. Zur

oralen Therapie in Südamerika, den karibischen Inseln und Westafrika wird eine Einzeldosis von 15-20 mg/kg empfohlen. In Zentral- und Ostafrika sowie der arabischen Halbinsel wird eine orale Einzeldosis von 30 mg/kg verabreicht. In Südafrika und Ägypten werden orale Einzeldosen von 60 mg/kg nötig. Gegenüber OXA wurden resistente Stämme von *S. mansoni* beschrieben, die mit PZQ behandelt werden können. OXA steht wie PZQ nach wie vor auf der WHO-Liste der unverzichtbaren Arzneimittelstoffe und wird eingesetzt, wenn PZQ nicht erfolgreich ist (52,53).

Sowohl PZQ als auch OXA zeigen Grenzen in den Therapiemöglichkeiten, da sie weder die akute Schistosomiasis (Katayama-Syndrom), noch die juvenilen Schistosomen-Stadien behandeln und Resistenzen oder Toleranzen auftreten können (52). Dies ist der Grund, warum eine erweiterte Forschung bezüglich neuer, antischistosomaler Therapiemöglichkeiten unabdingbar ist.

### **1.6.3 Resistenzen**

Aufgrund der präventiven Chemotherapie und Massentherapie mit PZQ sind Resistenzen gegen PZQ vielfach diskutiert und gefürchtet. Bisher gibt es keine fundierten Studien, die beweisen, dass es PZQ-resistente Schistosomenstämme in Endemiegebieten gibt. Jedoch konnte eine erhöhte Toleranz der Schistosomen gegenüber PZQ aus Patienten isoliert werden, bei denen es zu Therapieversagen kam (15). Unter Laborbedingungen konnten PZQ-Resistenzen induziert werden (13,53,63–67). Es gibt epidemiologische und klinische Hinweise darauf, dass Menschen in Endemiegebieten nach jahrelanger Exposition eine Art immunologische Resistenz gegen Schistosomiasis aufbauen.

### **1.6.4 Impfung**

Um regelmäßigen Massentherapien mit PZQ entgegenzuwirken und effektiv gegen Reinfektionen in Endemiegebieten vorgehen zu können, ist die Forschung an einem prophylaktischen Impfstoff von großem Interesse. Vielversprechend sind Impfstoffe gegen Antigene von Schistosomen, z.B. Antigen *Sm-p80*, welches eine hohe Wirksamkeit im Primaten-Modell gezeigt hat (27,68,69). In den letzten Jahren wurde klinisch intensiv an der rekombinanten *S. haematobium*-28-kDa-Glutathion-S-Transferase (rSh28GST,

Bilhvax) geforscht (13). In einer klinischen Phase-3-Studie wurde im Jahr 2018 durch Riveau et al. der Impfstoff Bilhvax als immunogen und gut verträglich beschrieben, konnte jedoch keine ausreichende Wirksamkeit erreichen (27,70).

### **1.7 Prävention und Kontrolle**

Die Prävention und Kontrolle der Schistosomiasis in Endemiegebieten ist eine komplexe Herausforderung und erfordert ein multimodales Konzept, welches folgende Bestandteile enthält: Präventive Chemotherapie, Expositionsprophylaxe für Reisende, Zugang zu sicheren Trinkwasserquellen, Etablierung bzw. Verbesserung von sanitären Anlagen, medizinische Aufklärung und gesundheitliche Bildung, Vektorelimination sowie die Sicherstellung von Lieferketten in entlegene Gebiete und sichere Verabreichung von Medikamenten (2,59). Hierfür stehen mehrere Zielstrukturen als mögliche Angriffspunkte zur Verfügung. Zum einen die Reduktion der Ausbreitung von infektiösen Eiern vom Menschen auf den Schneckenzwischenwirt. Dies ist abhängig von dem Vorhandensein und Gebrauch regelrechter Sanitäreinrichtungen, Gesundheitsaufklärung und Verständnis für den Lebenszyklus der Schistosomen sowie antischistosomale Massentherapie für infizierte Personen und präventive Chemotherapie für Risikopersonen in Endemiegebieten, damit Dauerausscheider vermieden werden können (59). Zum anderen sind die Kontakte zwischen dem infizierten Schneckenzwischenwirt und dem Menschen zu reduzieren. Dies kann durch den Einsatz von niclosamidhaltigen Molluskiziden oder biologische Alternativen vorgenommen werden sowie durch modifizierte Wassersysteme (59). Des Weiteren ist eine effektive, regelmäßige Chemotherapie von großer Bedeutung, um infizierte Menschen zu behandeln und in Endemiegebieten vor Reinfektionen zu schützen. Basierend auf den Empfehlungen der WHO wird eine Massentherapie mit Praziquantel als Hauptkomponente im Kampf gegen Schistosomiasis in nationalen Kontrollprogrammen angesehen (4,7,27,50,71,72).

### **1.8 Wirkstoffsuche gegen Schistosomiasis**

Die Suche nach neuen Wirkstoffen zur Therapie der Schistosomiasis ist unerlässlich. Im Idealfall zeigen sie eine breite therapeutische Aktivität gegen

die verschiedenen Entwicklungsstadien des Parasiten (73). Die Wiederverwendung bereits zugelassener Medikamente ist eine effiziente Möglichkeit, um neue Therapieoptionen schnell zu entwickeln (74). In der vorliegenden, experimentellen Doktorarbeit wurden 19 antiplasmodiale Substanzen aus Therapie und Forschung auf ihre antischistosomale Wirkung gegen das *Schistosoma mansoni*-Larvenstadium (Schistosomula) getestet.

### **1.8.1 Antiplasmodiale Substanzen aus Therapie und Forschung**

Wirkstoffe mit antiplasmodialer Aktivität haben eine ausgeprägte Wirksamkeit gegen Schistosomiasis gezeigt und sind ein vielversprechender Startpunkt für neue medikamentöse Therapiekonzepte, da sie bereits die Zulassung erlangt haben und in weiteren klinischen Studien getestet werden können (74). Sowohl *Schistosoma ssp.* als auch *Plasmodium ssp.* ernähren sich von Erythrozyten, wobei Hämoglobin zu Hämозoin abgebaut wird, und nutzen intrazelluläre Mechanismen zum Schutz vor Hämtoxizität (53,73–76). Dieser Häm-Entgiftungsmechanismus wird oft durch antiplasmodiale Substanzen gehemmt und bietet einen guten Angriffspunkt für die Behandlung weiterer Parasiten, die sich von Erythrozyten ernähren (74).

#### **1.8.1.1 Das Artemisinin-Derivat Artesunat**

Wie bereits beschrieben zeigen Artemisinin-Derivate, wie z.B. Artesunat (ART), eine antischistosomale Aktivität gegen juvenile Entwicklungsstufen der Schistosomen (15,57–59,61,77). ART gehört zu der Gruppe der Sesquiterpentrioxanlacton-Artemisininen, die ursprünglich von der Heilpflanze *Artemisia annua* (einjähriger Beifuß) abstammen und seit über 2000 Jahren als Heilmittel gegen Fieber in der traditionell chinesischen Medizin (TCM) verwendet werden (77,78). Im Jahre 2002 wurde ART von der WHO in die Liste der unverzichtbaren Arzneimittel aufgenommen. ART ist der am häufigsten eingesetzte Kombinationspartner im Rahmen der „artemisinin based combination therapy (ACT)“, welche die Standardtherapie von Malaria und multiresistenter *P. falciparum*-Stämme darstellt (77,78). Dabei wird ein Artemisinin-Derivat mit einem langwirksamen Partnerarzneimittel einer anderen Wirkstoffklasse kombiniert.

Der genaue Wirkmechanismus von ART ist nicht geklärt, es greift jedoch in den Hämoglobinmetabolismus des Parasiten ein und umfasst die Bildung freier Radikale durch die Spaltung der Endoperoxidbindungen im Trioxanzylus mit Hilfe von Eisen(II)-Ionen (79). Neben der antiplasmodialen Wirkung zeigt sich eine Aktivität gegen Viren (humanes Cytomegalievirus), Protozoen (*Toxoplasma gondii*), Helminthen (*Schistosoma ssp.*, *Fasciola hepatica*), Pilze (*Cryptococcus neoformans*) sowie eine zytotoxische Wirkung gegen eine Vielzahl von Krebszellen (53,60,78,79).

### **1.8.1.2 Die Arylaminoalkohole Chinin und Mefloquin**

Chinin (Q) ist ein Alkaloid aus der Rinde des Chinarindenbaumes (*Chinchona pubescens*) und wird seit über 350 Jahren in der TCM als Mittel gegen Malaria verwendet (78). Bis zum heutigen Tag wird es als eines der wichtigsten Medikamente zur Bekämpfung der unkomplizierten und schweren Malaria eingesetzt (78) und zeigte in Versuchen eine vielversprechende antischistosomale Aktivität (76,80).

Mefloquin (MQ) wurde aus einem Chinin-Analoga gewonnen und in Deutschland bis 2016 unter dem Handelsnamen Lariam® in der Malariaphylaxe und -Therapie eingesetzt, aber aufgrund des schweren neuropsychiatrischen Nebenwirkungsprofils im Verlauf eingestellt (81). Der genaue Wirkmechanismus ist nicht geklärt, jedoch hemmen MQ und andere Chinolinderivate in *Plasmodium ssp.* die Hämozoin-Bildung (53,76). Aufgrund der guten Wirksamkeit liegt bei MQ die Vermutung nahe, dass der Häm-Metabolismus nicht der einzige Angriffspunkt ist (53,57,76). MQ hat eine vielfach beschriebene antischistosomale Wirkung auf juvenile und adulte Entwicklungsstadien von *Schistosoma ssp.*, während andere Chinolinderivate keine antischistosomale Wirksamkeit im Mausmodell zeigten (53,76,80,82). In einer präklinischen Studie durch Keiser et al. wurde gezeigt, dass eine Kombinationstherapie aus MQ-ART genauso effektiv war wie die Therapie mit PZQ und eine Reduktion der Eiausscheidung von > 95 % bei *S. haematobium*-infizierten Schulkindern hervorrief (82).

### **1.8.1.3 Die 4-Aminochinolin-Derivate Chloroquin, Amodiaquin und Ferroquin**

Chloroquin (CQ) wurde erfolgreich als Monotherapie in der Prophylaxe und Therapie der Malaria eingesetzt, bevor es in den 1960ern zum Auftreten von CQ-resistenten Plasmodienstämmen kam. Heutzutage sind mehr als 80 % der Plasmodien resistent gegen CQ, was in einer Mutation der Transportproteine PfCRT (K76T-Mutation), PfMDR1 und PfMRP begründet liegt (78,83). CQ hemmt die Polymerisation des Hämозoins im Häm-Entgiftungsmechanismus (78). Im Mausmodell zeigte sich eine gute antischistosomale Wirkung gegen juvenile, weibliche Schistosomen, während bei adulten Schistosomen kaum Effekte erzielt werden konnten (76,80).

Amodiaquin (AQ) besitzt im Vergleich zu CQ eine längere Halbwertszeit und ist wirksam bei moderaten CQ-resistenten Plasmodienstämmen (78). Es wird als Kombinationstherapie ART-AQ (Camoquin®) gegen die unkomplizierte Malaria tropica eingesetzt und zeigt eine antischistosomale Wirkung bei koinfizierten Kindern mit *S. mansoni* (84). AQ zeigt außerdem einen deutlichen antischistosomalen Effekt *in vitro* bei adulten Würmern von *S. mansoni* mit niedriger Konzentration (85).

Ferroquin (FQ) ist ein Wirkstoff aus der Forschung und setzt sich aus CQ kombiniert mit der Metallverbindung Ferrocen zusammen. Ziel ist es, die Wirksamkeit des Grundmedikamentes zu verbessern und bei ähnlicher Verträglichkeit gegen CQ-resistente *P. falciparum*-Stämme wirksam zu sein, was sich in klinischen Studien bestätigte (86,87). Keiser et al. beschreibt eine moderate antischistosomale Wirkung von FQ *in vitro* bei juvenilen und adulten Schistosomen bei geringer Wirksamkeit *in vivo* (88).

### **1.8.1.4 Das Benzonaphthyridin-Derivat Pyronaridin**

Pyronaridin (PYRO) ist ein Antimalariamittel mit starker Aktivität gegen multiresistente Plasmodienstämme und strukturell mit CQ und AQ verwandt. Es wird als Kombinationspräparat PYRO-ART (Pyramax®) gegen die unkomplizierte *P. falciparum*-Malaria bei Kindern und Erwachsenen eingesetzt und zeigt zudem antiparasitäre Wirkung sowie Antitumoraktivität (89). PYRO inhibiert die Polymerisation von  $\beta$ -Hämatin und damit die Hämозoin-Bildung. Des Weiteren hemmt PYRO die DNA-Topoisomerase 2, wodurch es zu DNA-

Schäden und zum Zelltod kommt (89). PYRO hat eine antischistosomale Wirkung gegen juvenile Schistosomen *in vitro* und *in vivo*, was durch Koehne et al. bestätigt werden konnte, und zu einem vielversprechenden Kandidaten für neue antischistosomale Therapiekonzepte macht (73,76,90). Gegen adulte Schistosomen zeigte PYRO in präklinischen Untersuchungen keine ausgeprägte Wirksamkeit (73,76,89,91).

#### **1.8.1.5 Das 8-Aminochinolin Primaquin**

Primaquin (PQ) ist die einzige antiplasmodiale Substanz, welche gegen alle Leberstadien von Plasmodien wirksam ist, inklusive der hepatischen Dauerformen (Hypnozoiten) von *P. vivax* und *P. ovale* (83). Der Wirkungsmechanismus ist nicht vollständig geklärt, vermutlich greift PQ in die mitochondriale Atmungskette ein (83). PQ zeigt *in vitro* eine antischistosomale Aktivität gegen juvenile und adulte Schistosomen, wo es vermutlich eine Wirkung auf die lysosomalen Vesikel in der Schistosomula hat, die an der Entgiftung und Endozytose teilhaben, wenn der Parasit durch das Immunsystem oder Medikamente angegriffen wird (73,92).

#### **1.8.1.6 Weitere antiplasmodiale Substanzen: Atovaquon, Auranofin und Methylenblau**

Atovaquon (AT) ist ein Hydroxynaphthochinon-Derivat und wird zur Therapie und Prophylaxe der unkomplizierten Malaria tropica, aber auch zur Therapie von Toxoplasmose sowie *Pneumocystis ssp.*-Pneumonien eingesetzt (78). Es wird in der Malaria-Therapie als Kombinationspräparat AT-PRO (Malarone®) verabreicht, um Resistenzen zu vermeiden und wirkt bereits auf die Leberschizonten (81). AT-PRO ist eine synergistische Chinon-Folat-Antagonisten-Kombination, die zum einen in das Cytochrom-Elektronentransportsystem (AT) eingreift, wodurch es zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials kommt, und zum anderen die Dihydrofolat-Reduktase (PRO) hemmt (78,93). Zudem wird das mitochondriale Enzym Dihydroorotatdehydrogenase (DHODH) durch AT gehemmt, welches ebenfalls in *Schistosoma mansoni* vorkommt (*SmDHODH*), und stellt einen potentiellen Angriffspunkt in der Nukleinsäure- und ATP-Synthese dar (94). In

einer Studie von Keiser et al. zeigte sich keine antischistosomale Aktivität im *in vivo* Mausmodell (80).

Auranofin (AU) ist eine organische Goldverbindung, die als Basistherapeutikum bei rheumatoider Arthritis verwendet wird. AU wirkt antiinflammatorisch und hemmt die Thioredoxinreduktase in Redoxreaktionen, wodurch intrazellulär vermehrt oxidativer Stress auftritt (95). Es besitzt dadurch eine antiplasmodiale sowie eine antischistosomale Wirkung (95–98).

Methylenblau (MB) ist ein Phenothiazin-Derivat und wurde bereits im 19. Jahrhundert als Malariamittel eingesetzt (78). Es verhindert die Polymerisation von Häm zu Hämozoin und inhibiert die Glutathion-Reduktase in *P. falciparum* (99). Durch seine tiefblaue Farbe wurde es als Färbemittel und Redoxindikator genutzt. In der Medizin wurde es neben seiner antiplasmodialen Wirksamkeit als Antidot bei Kohlenmonoxid-, Nitrit-, und Anilinvergiftungen eingesetzt, wodurch der Abbau von Methämoglobin beschleunigt wird (99,100).

#### **1.8.1.7 Die Folsäureantagonisten Proguanil, Cycloguanil, WR99210**

Bakterien und Protozoen können im Vergleich zu Menschen Folsäure mit Hilfe der Enzyme Dihydropteronsynthase (DHPS) und Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) selbst synthetisieren und bieten damit einen Angriffspunkt innerhalb des Nukleotidsäure-Metabolismus zur bakteriellen Chemotherapie (83). *S. mansoni* besitzt ebenfalls eine *SmDHFR*, sodass eine Inhibition eine Alternative in der Therapie gegen die Schistosomiasis darstellen könnte (101)

PRO gehört zu der Gruppe der DHFR-Inhibitoren und ist ein Prodrug, das sich durch eine Cytochrom-P450-Enzym-vermittelte Oxidation in der Leber in Cycloguanil (CYCLO) umwandelt (83). Die antiplasmodiale Wirksamkeit ist bekannt und beruht auf der Inhibition der DHFR in *P. falciparum* (78). Durch eine Mutation im *dhfr*-Gen kam es zu Resistenzen gegen DHFR-Inhibitoren, weshalb es als Kombinationspräparat AT-PRO verabreicht wird (83).

WR99210 (WR) ist ebenfalls ein DHFR-Inhibitor von *P. falciparum* und Gegenstand der Forschung (78,102,103).



### **1.8.1.8 Antibiotika mit antiplasmodialer Wirkung aus Therapie und Forschung**

Antibiotika zeigen nicht nur eine Wirkung gegen prokaryotische, sondern auch gegenüber eukaryotischen Zellen. Bei Plasmodien sind zwei Zellorganellen im Rahmen der Endosymbiontentheorie ein potentieller Angriffspunkt für Antibiotika: Die Mitochondrien und der Apicoplast (78). Tigecyclin (TC) und Clindamycin (CLINDA) zeigen bei der Therapie der Malaria tropica einen verzögerten Wirkungseffekt (engl.: delayed kill effect), wodurch sich in dem ersten, asexuellen Zyklus kaum eine Wirkung zeigt und es erst im zweiten Zyklus zu einem Absterben des Plasmodiums kommt (78,83). Doxycyclin (DC) wird zur Prophylaxe und Therapie, CLINDA zur Therapie der Malaria ohne formale Zulassung empfohlen und gilt somit als Off-Label-Use (81). Antibiotika eignen sich aufgrund des verzögerten Wirkungseintrittes von ca. vier Tagen ausschließlich in Kombination mit schnell wirksamen Malariatherapeutika und erweisen sich hier als wertvolle Kombinationspartner, da keine Hinweise auf klinisch relevante Resistenzen bei *Plasmodium ssp.* vorliegen (83,104).

### **1.8.1.9 Das Tetracyclin Doxycyclin und Tetracyclin-Derivat Tigecyclin**

Tetracycline und ihre Derivate haben eine bakteriostatische Wirkung und hemmen die Proteinbiosynthese durch Bindung an die 30S-Untereinheit der bakteriellen 70S-Ribosomen.

DC zeigt neben antiplasmodialer Aktivität auch eine antischistosomale *in vitro* Aktivität gegen adulte Schistosomen, was sich im *in vivo* Mausmodell nicht abbilden ließ und granulomatöse Entzündungsreaktionen begünstigte (105,106).

TC ist ein Tetracyclin-Derivat, das zur Untergruppe der Glycylcycline gehört und bei schweren Infektionen mit multiresistenten Keimen als Reserveantibiotikum zum Einsatz kommt.

### **1.8.1.10 Die Lincosamide Clindamycin, 4-cis- und -trans-Mirincamycin**

Lincosamide haben eine bakteriostatische Wirkung und hemmen die Proteinbiosynthese durch die Bindung an die 50S-Untereinheit der bakteriellen 70S-Ribosomen.

CLINDA ist ein halbsynthetisches, chloriertes Derivat von Lincomycin und zeigt eine gute Wirksamkeit gegen *P. falciparum*-Malaria sowie gegen Toxoplasmen, Babesien und *Pneumocystis* ssp. (78,107). CLINDA zeigte in mehreren klinischen Studien eine gute Alternative zu DC in Form des Kombinationspräparates CLINDA-Q und wird zur Therapie der unkomplizierten Malaria bei Kindern und Schwangeren empfohlen (83,108,109).

Mirincamycin mit seinen *cis*- und *trans*-Isomeren (4-*cis*-M/4-*trans*-M) ist ein Lincosamid-Antibiotikum aus der Forschung und zeigte *in vitro* an *P. falciparum*-Stämmen eine bessere Wirksamkeit als CLINDA und DC (110,111).

## **1.9 Beurteilung der Vitalität der Schistosomula nach Substanzexposition**

### **1.9.1 Lichtmikroskopie als Goldstandard**

Bei *in vitro* Testungen von Substanzen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegen *Schistosoma* ssp. ist die Mikroskopie der Goldstandard zur Beurteilung der Vitalität des Larvenstadiums Schistosomula und der adulten Würmer. Schistosomula lassen sich seit den 1970iger Jahren *in vitro* in großer Zahl kultivieren und eignen sich zur Testung und Priorisierung von Substanzen hinsichtlich ihrer antischistosomalen Wirksamkeit, wodurch Tierversuche in diesem Schritt vermieden werden können (112). Um die Kultivierung und Beurteilung von *in vitro* Schistosoma-Kulturen vereinheitlichen zu können, wurden „Standard Operating Procedures“ (SOPs) durch ein weltweites Programm der WHO, dem „Tropical Disease Research“ (TDR), bestimmt (112). Dabei wird die Wirkstoffaktivität anhand von Veränderungen der Motilität und Morphologie des Parasiten nach Wirkstoffexposition mikroskopisch beurteilt (112–116). Nachteil der mikroskopischen Bewertung ist, dass die beobachteten Effekte nicht quantifizierbar sind und somit eine Wirkungsabschätzung mittels Kalkulation der 50 %igen inhibitorischen Konzentration (IC<sub>50</sub>) nur eingeschränkt möglich ist. Außerdem ist die Bewertung subjektiv und stark von dem Untersucher und seinem Wissensstand abhängig, sodass eine generelle Standardisierung nicht gewährleistet werden kann (113–115). Des Weiteren sind der hohe Arbeits- und Zeitaufwand nachteilig, wodurch ein gesteigerter Durchsatz an Untersuchungen verhindert wird.

### 1.9.2 Resazurin-Assay

Der Resazurin-Assay (Thermo Fischer Scientific, alamarBlue®, USA) enthält den blauen, wasserlöslichen und ungiftigen Redoxfarbstoff Resazurin, der zur Messung von Zellebendigkeit und Zytotoxizität von Substanzen eingesetzt werden kann. In lebendigen Zellen wird blaues Resazurin über die Zellmembran aufgenommen und unter  $\text{NADH}+\text{H}^+$ -Verbrauch irreversibel zu dem rosafarbenen und fluoreszierenden Resorufin reduziert, welches quantitativ mittels Fluorometrie gemessen werden kann (s. Abbildung 4) (117,118). Je vitaler eine Schistosomula ist, umso mehr Resorufin kann umgewandelt werden und desto höher ist der fluorometrisch gemessene Wert. Umkehrt lässt sich daraus ableiten, dass je höher die Zytotoxizität einer Substanz ist, umso geringer ist die metabolische Aktivität der Schistosomula und desto geringer ist die fluorometrisch gemessene Resorufinkonzentration. Mansour et al. hat die Mikroskopie und den Resazurin-Assay an Schistosomula und adulten Würmern im Rahmen einer Medikamententestungen miteinander verglichen: Zusammenfassend zeigte der Resazurin-Assay sehr gute Ergebnisse bei den Schistosomula, welche durch die Medikamente abgetötet wurden oder deutlich sichtbare Effekte hatten (114). Der Resazurin-Assay eignet sich für eine Automatisierung und zeigt konstante Ergebnisse bei Kristallbildungen innerhalb der Testansätze, die eine mikroskopische Beurteilung beeinträchtigen können. Ein Nachteil ist die geringere Sensitivität und Zuverlässigkeit bei mikroskopisch detektierbaren, gering morphologischen Veränderungen der Schistosomula bei Medikamenten wie z.B. PZQ mit bekannter antischistosomaler Aktivität (114). Der Resazurin-Assay eignet sich als ergänzende Methode zur Mikroskopie, vor allem bei automatisierter mikroskopischer Auswertung, da sie einfach und schnell in der Durchführung ist.



Abbildung 4: Prinzip des Resazurin-Assays: Blaues Resazurin wird unter  $\text{NADH}+\text{H}^+$ -Verbrauch irreversibel zu dem rosafarbenen Resorufin reduziert, welches fluorometrisch gemessen werden kann.

### 1.9.3 Laktat-Assay

In der Arbeitsgruppe von Dr. rer. nat. Andrea Kreidenweiss am Tropeninstitut der Universität Tübingen wurde eine Methode etabliert, die Laktat als neue Messgröße nutzt, um die Lebendigkeit der Schistosomula im Rahmen von Medikamententestungen quantitativ zu messen. Sie basiert auf dem Glukosemetabolismus der Schistosomula, bei dem vitale Würmer Glukose aus der Umgebung zur Energiegewinnung aufnehmen und in Laktat umwandeln. Laktat wird dabei konstant an die Umgebung sezerniert und kann mittels des Laktat-Assays detektiert und fluorometrisch gemessen werden (116).

Die Energiegewinnung von *S. mansoni* verändert sich innerhalb der verschiedenen Entwicklungsphasen. Während Sporozoiten fakultative Anaerobier sind, sind freischwimmende Mirazidien und Zerkarien Aerobier. Im Vergleich dazu haben die Schistosomula und adulten Würmer einen anaeroben Metabolismus durch Glykolyse (116,119,120). Dabei wird Glukose aus dem Blut des Endwirtes durch die äußere Schistosomen-Membran und das Tegument über spezielle Glukosetransportproteine SGTP1 und SGTP4 (Schistosome glucose transporter protein) aufgenommen (116,121). Anschließend wird die Glukose im Rahmen der Glykolyse energiebringend zu Pyruvat abgebaut und in Laktat umgewandelt. Um einem intrazellulären pH-Wert-Abfall entgegen zu wirken, wird Laktat durch die Membran über das Aquaporin SmAQP (*Schistosoma mansoni* Aquaporin) in die Umgebung sezerniert, wo es aus dem Überstand fluorometrisch gemessen werden kann (116,122).

#### 1.9.3.1 Laktat-Reaktion

Für die *in vitro* Laktat-Messung erfolgt die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat über das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) in Form einer reversiblen Redoxreaktion, in der gleichzeitig das Koenzym Nikotinamidadenindinukleotid  $\text{NADH}+\text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert wird. In dieser Versuchsreihe wurde mit dem L-Laktat-Assay-Kit (Colometric/Fluorometric) von BioVision®, Abcam, USA gearbeitet, das L(+)-Laktat in einem Bereich von 0,001-10 mM misst. Enthalten sind ein Enzym Mix aus LDH und  $\text{NAD}^+$ , eine Pufferlösung und Probe. Durch LDH wird Laktat in einer Rückreaktion zu Pyruvat oxidiert und  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}+\text{H}^+$  reduziert (123).  $\text{NADH}+\text{H}^+$  reagiert mit der Probe zu einem fluorometrisch messbaren Farbumschlag, der proportional zur

Laktatkonzentration in dem Überstand ist (s. Abbildung 5) (116). Mit Hilfe der Laktat-Messungen ließ sich in der Vergangenheit zuverlässig zwischen lebenden und toten Schistosomen unterscheiden. Die Methode ist schnell durchführbar und einfach in den Laborablauf zu integrieren (116). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Laktat-Messung eine zuverlässige Beurteilung des Vitalitätsstatus von Schistosomula im Rahmen von Medikamententestungen ermöglicht.

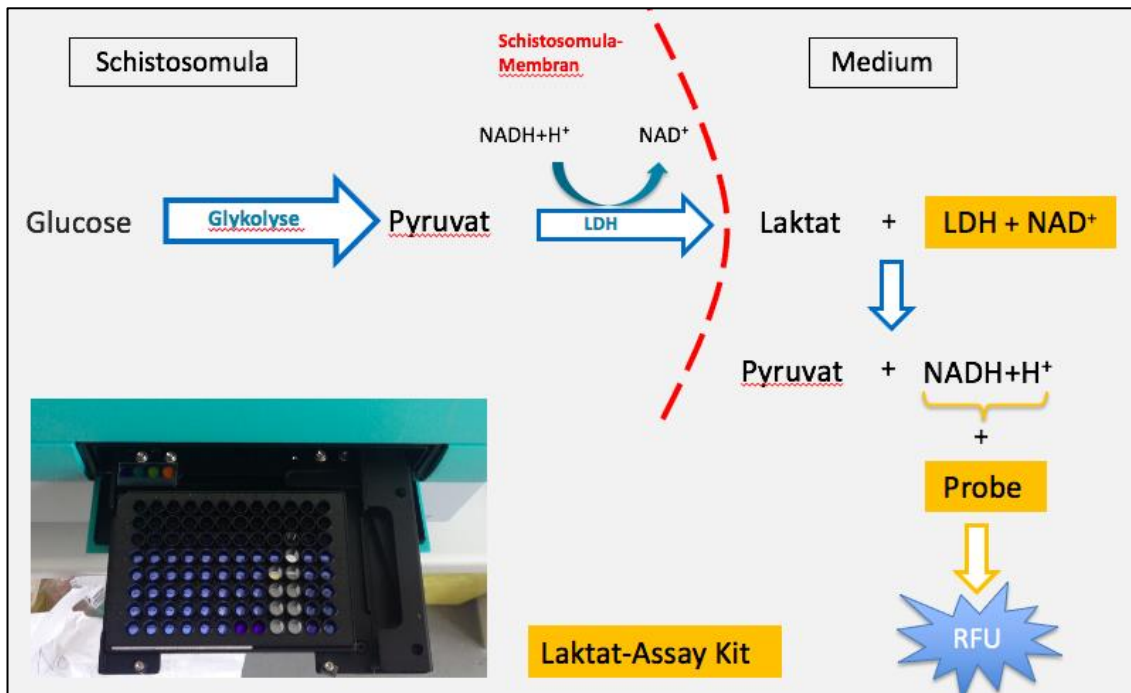


Abbildung 5: Prinzip des Laktat-Assays: Der Laktatgehalt in dem Schistosomula Kulturmedium (SCM) wird anhand des bei der Rückreaktion von Laktat zu Pyruvat entstehenden NADH+H<sup>+</sup> fluorometrisch gemessen. Die Laktatkonzentration bzw. NADH+H<sup>+</sup>-Konzentration steht in direkter Proportionalität zur Lebendigkeit von Schistosomula.

### 1.10 Ziele der Doktorarbeit

Die Doktorarbeit befasst sich mit drei Fragestellungen:

1. Zeigt der Wirkstoff einen Effekt an den Schistosomula nach 7 Tagen Inkubation z.B. in Form eines Abwärtstrends oder niedrigen IC<sub>50</sub>-Werten?
2. Zeigt der Wirkstoff bei IC<sub>50</sub>-Werten < 10 µM eine Aktivität und kann als vielversprechender Kandidat mit antischistosomaler Wirkung priorisiert werden?
3. Wie vergleichbar ist der Goldstandard Mikroskopie zu zwei alternativen, objektiven Methoden (Resazurin-Assay, Laktat-Assay) zur Bestimmung der Lebendigkeit der Schistosomula bei der Medikamententestung?

Zur Beantwortung der Fragen wurden neunzehn antiplasmodiale Substanzen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegen *S. mansoni* untersucht. Sie wurden in unterschiedlichen Verdünnungsstufen im Doppelansatz an Schistosomula-Kulturen getestet, mit den drei oben beschriebenen Messverfahren gemessen und die Ansätze dreimal wiederholt. Mefloquin (MQ) wurde als Positiv-Kontrolle eingesetzt, da eine antischistosomale Aktivität gegen juvenile und adulte Parasitenstadien von *S. mansoni* in der Vergangenheit beschrieben worden ist (53,76,80,82). Die Ergebnisse der drei Auswertmethoden wurden untereinander verglichen und vielversprechende Substanzen aus Therapie und Forschung mit antischistosomaler Aktivität für weitere Untersuchungen priorisiert.

## **2 Materialien und Methoden**

Die vorliegende Dissertation erfolgte in Vorarbeit mit der Arbeitsgruppe Kreidenweiss, Institut für Tropenmedizin, Tübingen, und einer damit verbundenen Veröffentlichung in ASM Journals, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, im Jahre 2015 von Howe et al. (116).

### **2.1 Haltung des *Schistosoma mansoni* Lebenszyklus im Labor**

Der gesamte *Schistosoma mansoni* Zyklus (Puerto Rico PR-1 Stamm) wurde künstlich im Labor des Tropeninstitutes in C57BL/6 Mäusen (Harlan Laboratories, USA) als stellvertretender Endwirt und *Biomphalaria glabrata* Schnecken (Albino M-Line, Institute of Zoology, Oregon State University, USA) als Zwischenwirt gehalten (116). Die Tierexperimente wurden von der Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt und waren kein direkter Bestandteil der hier vorliegenden Dissertation. Die Versuche wurden am *S. mansoni*-Larvenstadium Schistosomula durchgeführt.

#### **2.1.1 Haltung und Infektion des Endwirtes Maus**

Die Mäuse wurden unter Standard-Laborbedingungen mit Futter und Wasser *ad libitum* und einem 12h/12h Tag/Nacht Rhythmus gehalten. Eine Maus wurde perkutan mit 50 Zerkarien infiziert und nach 8-wöchiger Inkubation mit CO<sub>2</sub> euthanasiert. Die adulten Würmer wurden mittels PBS (Gibco™, Thermo Fischer Scientific, USA) aus der Portalvene der Maus ausgewaschen. Hierfür wurde die Portalvene vorsichtig nahe des Mesenteriums durchtrennt und in die rechte Herzkammer PBS injiziert. Die mit dem Rückstrom ausgespülten Würmer wurden in vorgewärmtem Rosewell-Park-Memorial-Institute-(RPMI)-1640-Medium (Gibco™, Thermo Fischer Scientific, USA) aufgefangen, welches mit 5 %igem fetalen Kälberserum (FBS), sowie 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin versetzt worden war (116).

#### **2.1.2 Haltung und Infektion des Zwischenwirtes *Biomphalaria glabrata***

Die Schnecken der Spezies *Biomphalaria glabrata* stammten aus einem Albino M-Stamm vom Institut für Zoologie der Oregon-State-Universität, Corvallis, USA, der Schistosomen-spezifisch ist. Sie wurden in Aquarien mit kohlegefiltertem Leitungswasser im Brutschrank (Heraeus Electronic, Hanau,

Germany) bei 27°C mit einem 12 h/12 h Tag/Nacht Zyklus gehalten und mit grünem Blattsalat alle 2 Tage gefüttert. Für die Infektion der Schnecken wurde die granuliert Leber der infizierten Mäuse entnommen und durch ein feines Sieb gerieben. Durch die pH-Änderung schlüpften die Mirazidien aus den Eiern und konnten aufgrund ihrer positiven Phototaxis in einem lichtgeschützten Schlüpfkolben mit einer freiliegenden Stelle nach 30 min bei Raumtemperatur gesammelt werden. Aus einer infizierten Maus konnten ca. 200-400 Mirazidien gewonnen werden. Für die Infektion wurden Schnecken mit einem Gehäusedurchmesser von 5 cm einzeln in Plastikgefäße isoliert, mit 2 ml Wasser aufgefüllt und mit jeweils 7 Mirazidien infiziert. Nach einer Inkubation von 3-4 h bei Raumtemperatur kamen 20 infizierte Schnecken pro Aquarium mit kohlegefiltertem Leitungswasser bei 27°C und in Dunkelheit in den Brutschrank. Infizierte Schnecken können 3- bis 4-mal Zerkarien schütten. Die Zeit zwischen Infektion und dem Schütten beträgt 5 bis 6 Wochen. Zwischen den einzelnen Zerkarienisolierungen sollte eine Pause von mindesten zwei Wochen liegen. Geschüttete Schnecken wurden in ein weiteres Aquarium separiert und das Datum der Isolation dokumentiert.

## **2.2 Isolation aus dem Zwischenwirt und Transformation der Schistosomula**

Das Ziel der Isolierung war die Gewinnung von Zerkarien aus dem Schneckenzwischenwirt *B. glabrata* und die mechanische Transformation zu dem humanen Larvenstadium Schistosomula (neu transformierte Schistosomula, NTS). Dafür wurden maximal 2-3 infizierte Schnecken in schmalen Glasgefäßen mit 10 ml kohlegefiltertem Leitungswasser bei Raumtemperatur isoliert und für 2-5 Stunden unter eine Lampe gestellt. Unter Lichtexposition wurden die Zerkarien aus den Schnecken ausgeschieden (Schütten). Je nachdem, wie viele Zerkarien benötigt wurden, konnte die Zeit des Schüttens variiert werden. Anschließend wurden die Schnecken unter Dokumentation des Datums in ein weiteres Aquarium transferiert. Der Überstand mit Zerkarien wurde kottfrei abpipettiert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, Corning Science, México S.A. de C.V.) überführt und auf Eis gelegt, um die Beweglichkeit der Zerkarien zu mindern (115,116). Die Zentrifugation (Heraeus Multifuge 1S-R Centrifuge, Thermo Scientific) der



50 ml Zentrifugenröhrchen wurde bei 3000 Umdrehungen pro Minute für 10 min bei 4°C vorgenommen. Der Überstand des gebildeten Pellets aus Zerkarien wurde steril abpipettiert und mit 10 ml eisgekühltem Schistosomula Culture Medium (SCM) resuspendiert. SCM setzte sich wie folgt zusammen: M199 + Earle's salt + L-Glutamine + 2,2 g/l Natriumhydrogencarbonat (Gibco™, Thermo Fischer Scientific, USA) + 1 % fetales Kälberserum dekomplementiert (FBS, Gibco™, Thermo Fischer Scientific, USA) + 200 µg/ml Streptomycin und 200 U/l Penicillin (Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml, Gibco™, Thermo Fischer Scientific, USA) (116). Das Zerkarien-Medium wurde für 2 min auf höchster Stufe gevortext. Bei diesem Vorgang trennten sich die Gabelschwänze von dem Corpus der Zerkarien und gingen dadurch *in vitro* in das humane Larvenstadium Schistosomula über. Anschließend wurde das Schistosomula-Medium für mindestens 5 min auf Eis gekühlt. Die Schistosomula senkten sich am Boden ab, während die abgetrennten Gabelschwänze weiterhin in der Lösung schwammen. Um die Schistosomula von den freischwimmenden Gabelschwänzen zu trennen, wurden diese resuspendiert und das Medium in eine 60 x 15 mm Petrischale überführt. Es wurde SCM zugegeben, bis die Petrischale  $\frac{3}{4}$  gefüllt war. Unter ständigem Schwenken der Petrischale wurden die schwereren Schistosomula am Boden der Mitte der Petrischale gesammelt und konnten mit einer 200 µl Pipette in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen abpipettiert werden (115,116). Nachdem alle Schistosomula abpipettiert worden waren, wurde der Vorgang einmal mit frischem SCM wiederholt, um möglichst alle Gabelschwänze zu eliminieren. Die Schistosomula wurden hierfür in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Cellstar Tubes, Greiner Bio-One, Germany) überführt, mit SCM auf 5 ml aufgefüllt und auf Eis gekühlt.

Für den korrekten Ansatz der *in vitro* Kultivierung mussten die Schistosomula gezählt werden. Dafür wurden 500 µl Schistosomula-Medium in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. Unter dem Mikroskop (Wild Heerbrugg, Switzerland) wurden bei 10- bis 20-facher Vergrößerung 4 x 125 µl Schistosomula-Medium mit Hilfe eines Fadenkreuz-Okulars ausgezählt und anschließend auf 5000 µl hochgerechnet. Gezähltes Schistosomula-Medium kam in das 15 ml Zentrifugenröhrchen zurück und wurde weiterhin auf Eis

gekühlt. Die Schistosomula-Anzahl wurde am Brutschrank mit Datum und Dauer der Lichtexposition dokumentiert.

### 2.3 *In vitro* Kultivierung von Schistosomula

Die *in vitro* Kultivierung von Schistosomula erfolgte unter sterilen Bedingungen auf 48-Well-Platten (Costar 3548, Corning, USA) in SCM. In jeder Mikrotiterensenkung sollten ca. 400 Schistosomula auf 1 ml SCM vorhanden sein, woraus sich die Anzahl der benötigten Mikrotiterensenkungen und das nötige Volumen von Schistosomula-Medium und SCM errechnen ließen (116). Zuerst wurde SCM in den Mikrotiterensenkungen vorgelegt, dann wurde das Schistosomula-Medium pipettiert. Die 48-Well-Platten wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für 18-24 h inkubiert. Am Folgetag wurde die Schistosomula-Anzahl in jedem Well manuell unter dem Lichtmikroskop (Nikon Eclipse Ti-S, Japan) bei 20-facher Vergrößerung ausgezählt und dokumentiert.

### 2.4 Vorbereitung der Wirkstoff-Stocklösungen

Die für die Wirkstoff-Stocklösungen verwendeten Wirkstoffe finden sich in Tabelle 1. Die Wirkstoffe lagen in Pulverform vor und wurden mit einer Waage (Mettler, AE 260, DeltaRange®, METTLER-Toledo, Switzerland) eingewogen und in ihrem jeweiligen Lösungsmittel (Puffer) gelöst. Des Weiteren ist angegeben, wie hoch die Start-Konzentration in der Mikrotiterplatte im Wirkstoff-Assay-Ansatz sein soll und welcher Verdünnungsfaktor in der Verdünnungsreihe pipettiert wurde. Das Auflösen der Wirkstoff-Stocklösungen erfolgte unter sterilen Bedingungen und wurde lichtgeschützt bei -20°C gelagert.

Tabelle 2: Eingesetzte Wirkstoffe mit antiplasmodialer Aktivität für den Wirkstoff-Assay mit Molekulargewicht, Konzentration, Lösungsmittel, Startkonzentration im Wirkstoff-Assay, Verdünnungsfaktor und Hersteller

Wirkstoff	MW	Stock [mM]	Puffer	Well [µM]	Verdünnungsfaktor	Hersteller
Mefloquin hydrochlorid (MQ)	414,8	24	DMSO	200	1:3	Sigma-Aldrich
Auranofin (AU)	678,0	14,7	DMSO	10	1:3	Sigma-Aldrich
Primaquin-phosphat (PQ)	455,3	50	DMSO	50	1:2	SantaCruz Biotechnology
Ferroquin (FQ)	434,5	12,5	DMSO	50	1:2	Sanofi Sythelabo
Chinin-Hemisulfat (Salz) (Q)	373,5	50	MeOH	200	1:2	Sigma-Aldrich

<b>Amodiaquin-Dihydrochlorid-Dihydrat (AQ)</b>	464,8	50	DMSO	200	1:2	Sigma-Aldrich
<b>Chloroquin-Diphosphate (Salz) (CQ)</b>	515,9	50	DMSO	200	1:2	Sigma-Aldrich
<b>Atovaquon (AT)</b>	366,8	50	DMSO	200	1:2	Sigma-Aldrich
<b>Artesunat (ART)</b>	384,4	50	DMSO	200	1:2	Sigma-Aldrich
<b>4-cis-Mirincamycin HCL (4-cis-M)</b>	475,5	100	DMSO	300	1:3	Bridge Organics
<b>4-trans-Mirincamycin HCL (4-trans-M)</b>	475,5	100	DMSO	300	1:3	Bridge Organics
<b>Tigecyclin (TC)</b>	585,7	100	DMSO	300	1:3	Wyeth
<b>Doxycyclin-hyclat (DC)</b>	512,9	100	DMSO	300	1:3	Sigma-Aldrich
<b>Proguanil HCL (PRO)</b>	290,2	100	DMSO	300	1:3	Jacobus Pharmaceutical
<b>Cycloguanil HCL (CYCLO)</b>	251,7	100	M199	300	1:3	Jacobus Pharmaceutical
<b>WR99210 HCL (WR)</b>	394,7	100	DMSO	300	1:3	Jacobus Pharmaceutical
<b>Clindamycin-Hydrochlorid (CLINDA)</b>	461,4	100	M199	300	1:3	Sigma-Aldrich
<b>Methyleneblau (MB)</b>	319,7	100	DMSO	300	1:3	Sigma-Aldrich
<b>Pyronaridin (PYRO)</b>	910,0	100	M199	300	1:3	Shinpoong

## 2.5 *In vitro* Schistosomula-Wirkstoff-Assay

Ziel des Wirkstoff-Assays war die Untersuchung von Verbindungen mit Aktivität gegen *in vitro* Schistosomula-Kulturen, die in der Malariatherapie Anwendung finden sowie von Wirkstoffen, deren antiplasmodiale Aktivität Gegenstand der Forschung ist.

### 2.5.1 Allgemeiner Ansatz des Wirkstoff-Assays

Für den Wirkstoff-Assay in schwarzen 96-Well-Platten (Assay Plate, 96 Well, black with clear flat bottom, Corning® CellBIND® Surface, NY, USA) galt folgender Ansatz:

Jeder Wirkstoff und jede Kontrolle wurden doppelt angesetzt und insgesamt 3 Mal wiederholt. Pro Ansatz und pro Medikament wurden 2 x 8 Mikrotitereinsenkungen benötigt, d.h. 16 Mikrotitereinsenkungen für jeden Wirkstoff. Pro Ansatz wurden 2 x 2 Mikrotitereinsenkungen für jede Kontrolle verwendet, z.B. Stock-Kontrolle und SCM-Kontrolle. In jeder Mikrotitereinsenkungen sollten sich 100 Schistosomula befinden, d.h. pro

Wirkstoff wurden ca. 1700 Schistosomula (16 Mikrotitereinsenkungen à 100 Schistosomula + 100 Extra-Schistosomula aufgrund des Pipettierverlustes) benötigt, was mikroskopisch ausgezählt wurde. Für jede Stock-Kontrolle (DMSO, MeOH, M199) wurden 200 Schistosomula aufgrund des Doppelansatzes benötigt. DMSO wurde in keinem Ansatz mit einer Konzentration über 1 % gewählt.

### **2.5.2 Vorbereitung der Vorverdünnungen der Wirkstoffe**

Die Wirkstoff-Stocklösungen wurden pro Ansatz bei Raumtemperatur aufgetaut und lichtgeschützt abgedeckt. Anhand der Konzentration konnten die gewünschten Volumina für die Anfangskonzentrationen in der Verdünnungsreihe (siehe Well H, Abbildung 6 Abbildung 7), sowie für die Stock-Kontrolle berechnet werden. Der Ansatz der Wirkstoff-Vorverdünnung erfolgte in einem separaten 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen. Für die Vorverdünnung wurde steriles SCM verwendet.

### **2.5.3 Vorbereitung der Schistosomula-Kulturen**

Um die gewünschte Schistosomula-Anzahl pro Mikrotitereinsenkung zu erhalten, musste die *in vitro* Kultur ausgezählt und ein Medium mit je 1700 Schistosomula erstellt werden. Die Auszählung der *in vitro* Kultur erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Eclipse Ti-S, Nikon, Japan) bei 20-facher Vergrößerung. Die gezählten Schistosomula pro Mikrotitereinsenkung wurden auf eine Gesamtzahl von 1700 Schistosomula kombiniert und anschließend mit dem Kulturmedium in 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Anschließend wurden sie bei 2000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet aus Schistosomula mit 3300 µl SCM (200 µl SCM x 16 Wells + 100 µl SCM extra aufgrund des Pipettierfehlers) resuspendiert. Mit diesem Schritt wurde zum einen sichergestellt, dass innerhalb der letzten 24 h produziertes Laktat zu Beginn des Wirkstoff Assays entfernt wurde. Zum anderen sollten für den kommenden Versuchsablauf mit 200 µl Schistosomula-Medium je 100 Schistosomen in eine Mikrotitereinsenkung pipettiert werden (116).

### **2.5.4 Ansatz der Verdünnungsreihe**

Der Ansatz der Verdünnungsreihe erfolgte unter sterilen Bedingungen. Das Endvolumen einer Verdünnungsreihe sollte 225 µl pro Mikrotitereinsenkung

betragen: 25 µl Wirkstoffverdünnung + 200 µl Schistosomula-Medium, was einem Verdünnungsfaktor von 1:9 entspricht. Die Wirkstoff-Anfangskonzentration in Well H muss zu Beginn 9 x höher gewählt werden als die gewünschte Endkonzentration in der Verdünnungsreihe, z.B. Mefloquin: gewünschte Well-Konzentration 500 µM → 4500 µM Anfangskonzentration in Well H. In Well A bis Well G wurden 25 µl SCM vorgelegt. Der Verdünnungsfaktor wurde abhängig von jedem Medikament gewählt:

1:3 Verdünnung: 37,5 µl Wirkstoffverdünnung (9-fach höher) in Well H, 12,5 µl wurden transferiert.

1:2 Verdünnung: 50,0 µl Wirkstoffverdünnung (9-fach höher) in Well H, 25 µl wurden transferiert.

Das Pipettieren der Verdünnungsreihe erfolgte von höherer Konzentration (Well H) zu niedrigerer Konzentration (Well B). Nach Well B wurden je nach Verdünnungsfaktor 12,5 µl bzw. 25 µl Verdünnung verworfen.

Die Wirkstoffe wurden in 7 Konzentrationsstufen mit 1:3 Verdünnungen getestet: MQ: 200-0,09 µM; AU: 10-0,005 µM; 4-cis-M, 4-trans-M, PRO, CYCLO, TC, DC, WR, CLINDA, MB, PYRO: 300-0,13 µM. Folgende Wirkstoffe wurden in 1:2 Verdünnungen getestet: PQ, FQ: 50-0,39 µM; Q, AQ, CQ, AT, ART: 200-1,56 µM. Nach dem Ansatz der Verdünnungsreihe wurden 200 µl Schistosomula-Medium à 100 Schistosomula in jede Mikrotitereinsenkung pipettiert. Der Wirkstoff-Assay wurde im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> für insgesamt 7 Tage inkubiert.

## **2.6 Kontrollen**

### **2.6.1 No-Drug-Kontrolle (Negativ-Kontrolle)**

Für jeden Wirkstoff wurden in Reihe A zwei Mikrotitereinsenkungen ohne Wirkstoffkonzentration pipettiert. Sie enthielten 100 Schistosomula und 225 µl SCM. Mit der No-Drug-Kontrolle wurde das Überleben der Schistosomula während der Inkubationsperiode überprüft.

### **2.6.2 Mefloquin-Kontrolle (Positiv-Kontrolle)**

Jeder Wirkstoffansatz enthielt eine Positiv-Kontrolle mit bekannter antiplasmodialer und antischistosomaler Aktivität des Medikamentes MQ (53,76,80,82). Damit konnten sowohl die Testansätze untereinander als auch

die Aktivität der anderen Wirkstoffe vergleichend zueinander betrachten werden.

### 2.6.3 SCM-Kontrolle

Zwei Mikrotitereinsenkungen pro Ansatz enthielten 225 µl SCM und dienten als Hintergrundmesswert für die fluorometrische Messungen.

### 2.6.4 Stock-Kontrolle

Die Stock-Kontrolle beinhaltet je nach Wirkstoff das Lösungsmittel DMSO, MeOH oder M199 (s. Tabelle 2). Sie wurde direkt in zwei Mikrotitereinsenkungen pipettiert und höher angesetzt als in den Verdünnungsreihen, um eine Aktivität des Lösungsmittels auf die Schistosomula ausschließen zu können.

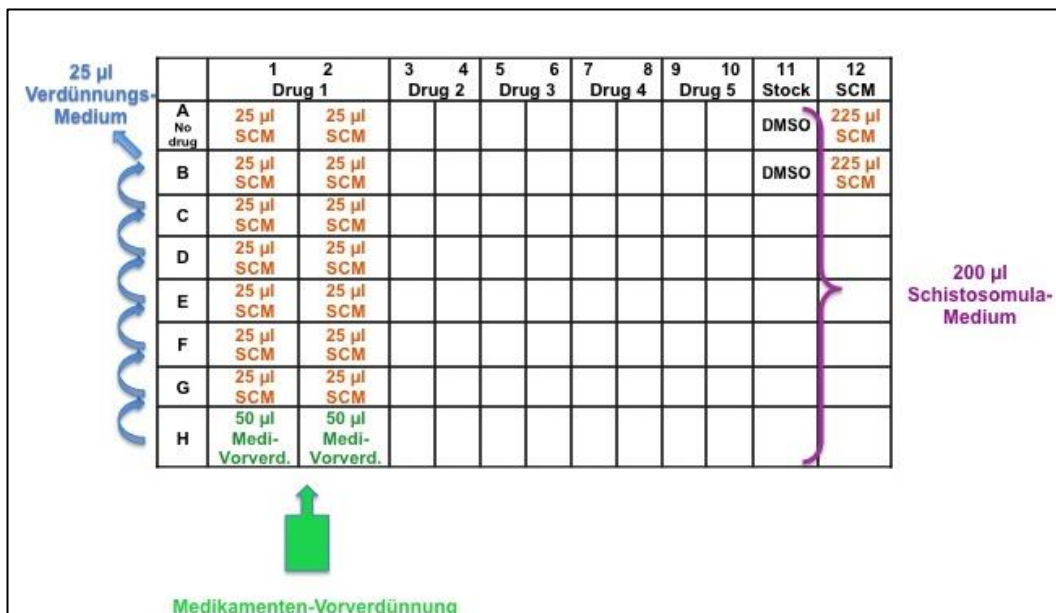


Abbildung 6: Pipettierschema der 1:2 Verdünnungsreihe für den Schistosomula-Wirkstoff-Assay inklusive der No-Drug-, SCM- und Stock-Kontrollen

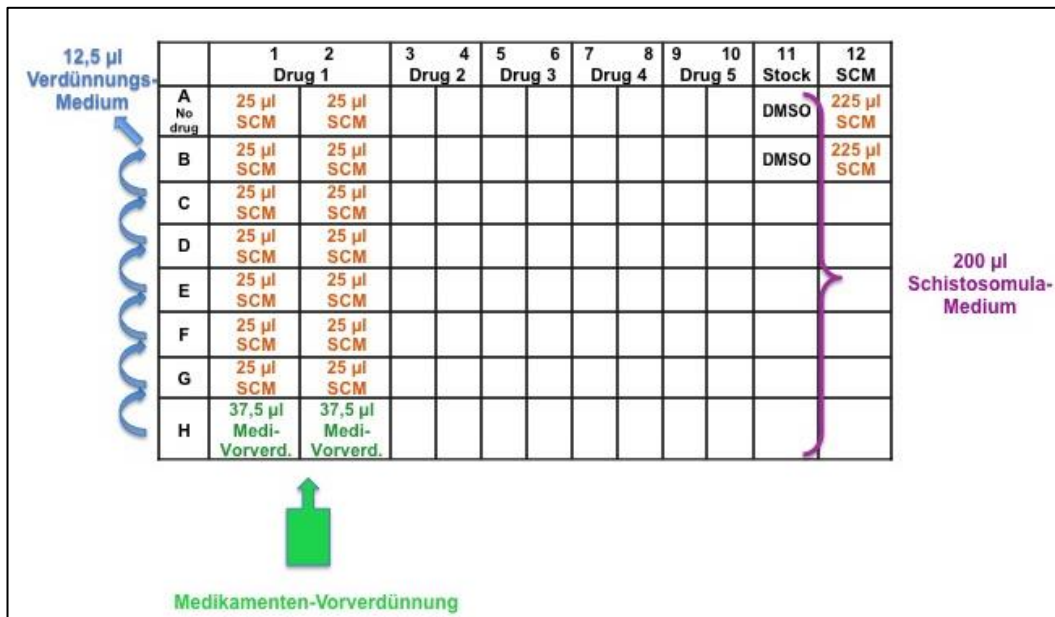


Abbildung 7: Pipettierschema der 1:3 Verdünnungsreihe für den Schistosomula Wirkstoff-Assay inklusive der No-Drug-, SCM- und Stock-Kontrollen

## 2.7 Lichtmikroskopische Beurteilung der *in vitro* Kulturen

Die Mikroskopie ist der Goldstandard für die Beurteilung der Lebendigkeit der Schistosomula. Direkt nach dem Ansatz des Wirkstoff-Assays wurde bei 20-facher Vergrößerung die Anzahl der Schistosomula pro Mikrotitereinsenkung ausgezählt, um zu prüfen, ob 100 Schistosomula mit einer Varianz von +/- 20 Schistosomula pro Mikrotitereinsenkung vorhanden sind. Dadurch wurden Abweichungen in der Laktatkonzentration vorgebeugt und Kontaminationen konnten rechtzeitig ausgeschlossen werden. Abweichungen über 120 oder unter 80 Schistosomula wurden markiert. Am 3. und am 7. Tag der Inkubation wurden die Schistosomula anhand der Kriterien Bewegung und Morphologie beurteilt, gezählt und dokumentiert (112,116).

Dieser Dissertation lagen für die morphologische Beurteilung folgende Kriterien zugrunde: Ein Schistosomulum galt als lebendig, wenn es sich bewegte, eine dreidimensionale Struktur hatte und eine gut sichtbare und intakte Membran besaß (s. Abbildung 8) (112,115,116). Wie von Mansour et al. (114) beschrieben galt ein Schistosomulum als tot, wenn es sich nicht bewegte (Dauer von 10 s), zweidimensional flach war, eine beschädigte Membran zeigte und/oder sich innere Bestandteile entleerten, sich starke Granulation oder Blasen am Rand bildeten (124). Beeinträchtigte Schistosomula zeigten stark

variierende Formen mit oder ohne Granulation und/oder Blasenbildung bei vorhandener Motilität (s. Abbildung 8) (114).

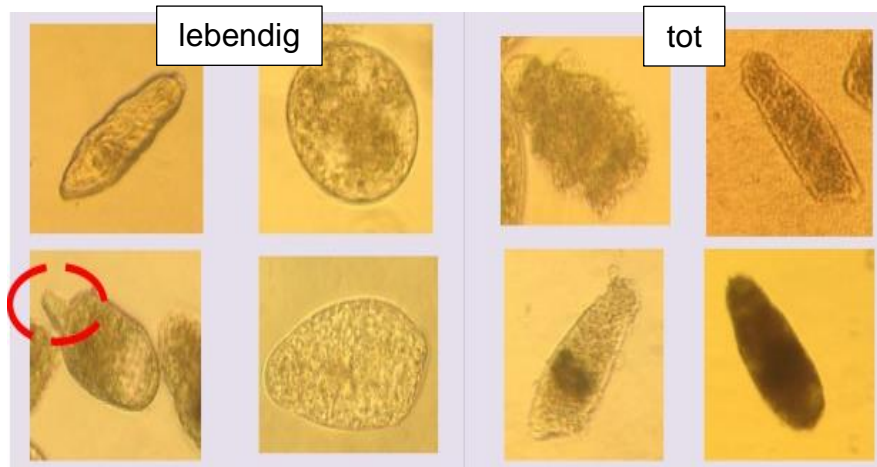


Abbildung 8: Exemplarische Fotos von lebendigen bzw. beeinträchtigen (links) und toten (rechts) Schistosomula bei 40-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop. Typische Schwanzform von Schistosomula durch roten Kreis gekennzeichnet.

## 2.8 Resazurin-Assay

Der Resazurin-Assay (AlamarBlue®) erfolgte am 7. Tag nach der Medientnahme für den Laktat-Assay. 20 µl Resazurin wurden unter sterilen Bedingungen direkt in jede Mikrotiterensenkung der schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Resazurin-Lösung wurde in ein separates, lichtgeschütztes 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen steril abgefüllt, um Kontaminationen zu vermeiden. Der Ansatz wurde im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, für 18-24 h inkubiert. Anschließend wurde er fluorometrisch bei Exzitation/Emission 530/590 nm gemessen (Fluoroscan Ascent, Thermo Electron Corporation, Finnland) und ausgewertet.

## 2.9 Laktat-Assay

Mit Hilfe des Laktat-Assays (Lactate Colorimetric/Fluorometric Assay Kit, BioVision®, USA) wurde ein objektives Messverfahren basierend auf dem Glucosemetabolismus der Schistosomula etabliert, wobei die Laktatkonzentration im Medium als Marker proportional für die Lebendigkeit der Schistosomula stand.

### 2.9.1 Vorbereitung des Laktat-Assays

Die Medientnahme für den Laktat-Assay erfolgte jeweils am 3. Tag und 7. Tag der Inkubation. Dabei wurden 20 µl Wirkstoff-Assay-Medium steril nach



dem Auszählen der toten Schistosomula an Tag 7 und vor dem Pipettieren des Resazurin-Assays entnommen. Das Medium wurde in der Wirkstoff-Assay-Platte nicht ersetzt und in eine durchsichtige 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Die Mikrotiterplatte wurde mit Parafilm abgedichtet, um Evaporation zu vermeiden, und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Im Folgenden wird auf die Mediumentnahme am 7. Tag eingegangen, da nur sie Relevanz für die Auswertung der Dissertation hat. Das Laktat-Assay-Kit wurde aus  $-20^{\circ}\text{C}$ , die Wirkstoffvorverdünnungen aus  $-80^{\circ}\text{C}$  und die Laktat-Assay-Medien bei Raumtemperatur und lichtgeschützt aufgetaut. Bei Öffnung eines neuen Laktat-Assay-Kits wurde vorschriftsgemäß der lyophilisierte Enzyme Mix mit  $220\ \mu\text{l}$  Laktat-Assay-Puffer gelöst. Des Weiteren musste eine Standardlösung hergestellt werden. Die Laktat-Standard-Lösung enthielt  $100\ \text{nmol}/\mu\text{l}$ . Die Mediumprobe aus dem Testansatz benötigte aufgrund des hohen Laktatgehaltes eine 1:10 Vorverdünnung mit destilliertem Wasser (Aqua dest.). Das Endvolumen der Mediumproben auf der Laktat-Assay-Platte betrug  $0,5\ \mu\text{l}$  pro Mikrotitereinsenkung. Von dem Puffer wurden  $45\ \mu\text{l}$  pro Mikrotitereinsenkung benötigt. In dieser Arbeit wurde im Reaktion-Mix das Volumen von Enzym-Mix und Probe auf  $0,5\ \mu\text{l}$  vermindert und das Volumen des Puffers auf  $49\ \mu\text{l}$  erhöht. Die Zusammensetzung des Reaktion-Mix pro Mikrotitereinsenkung betrug  $50\ \mu\text{l}$ . Der Reaktion-Mix musste auf jede Mediumverdünnung, jede Kontrolle und jede Standardlösung pipettiert werden. Der Ansatz erfolgte in  $15\ \text{ml}$  Zentrifugenröhrchen und wurde zügig mit einer Multipipette aufgetragen. Aufgrund der Blasenbildung und des Pipettenfehlers wurden zwei Extravolumina Reaktion-Mix mit angesetzt, bei längerer Arbeitszeit musste er lichtgeschützt abgedeckt werden.

### **2.9.2 Ansatz des Laktat-Assays**

Der Ansatz erfolgte in drei nebeneinander arrangierten Mikrotiterplatten, eine mit der Mediumprobe, eine für die Vorverdünnung mit Aqua dest. und die Laktat-Assay-Platte (s. Abbildung 9).  $45\ \mu\text{l}$  Aqua dest. wurden mit der Multipipette in durchsichtige 96-Well-Mikrotiterplatten pipettiert.  $45\ \mu\text{l}$  Laktat-Assay-Puffer wurden mit einer Multipipette in eine schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden mit einer Multipipette  $5\ \mu\text{l}$  Schistosomula-Medium in die Aqua dest. Platte überpipettiert, gut durchmischt


und anschließend in die 5 µl 1:10 Verdünnung in die schwarze Laktat-Assay-Platte pipettiert. Danach wurden zügig 50 µl Reaktion-Mix in jede Mikrotiterensenkung pipettiert. Das Gesamtvolumen pro Mikrotiterensenkung betrug am Ende des Ansatzes 100 µl: 45 µl Puffer + 5 µl Mediumverdünnung 1:10 + 50 µl Reaktion Mix.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Drug 1		Drug 2		Drug 3		Drug 4		Drug 5		Stock	SCM
A No drug	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
B	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
C	Etc.											
D												
E												
F												
G												
H												



5 µl Medium

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Drug 1		Drug 2		Drug 3		Drug 4		Drug 5		Stock	SCM
A No drug	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.
B	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.	45 µl A.d.
C	Etc.											
D												
E												
F												
G												
H												


5 µl Medium Vorverdünnung 1:10

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Drug 1		Drug 2		Drug 3		Drug 4		Drug 5		Stock	SCM
A No drug	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer
B	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer	45 µl Puffer
C	etc.											
D												STD 5
E												STD 4
F												STD 3
G												STD 2
H												STD 1



50 µl Reaktion Mix

Abbildung 9: Pipettierschemata für den Laktat-Assay-Ansatz: Wirkstoffplatte, Vorverdünnungsplatte mit Aqua dest. und Laktat-Assay-Platte wurden so arrangiert, dass man die Volumina gut transferieren konnte. Anschließend wurde in jede Mikrotiterreinsenkung 50 µl Reaktion-Mix pipettiert gemischt und 40 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Laktat-Assay-Platte wurde 30 s lang auf einem Rotator (Heidolph, Polymax 1040, Germany) gemischt und anschließend 40 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz fluorometrisch bei 530 nm /590 nm Exzision/Emission gemessen (Fluoroscan Ascent, Thermo Electron Corporation, Finnland) und ausgewertet. Das Laktat-Assay-Kit kann Laktatkonzentrationen im Bereich von 0,001-10 mM erfassen. Die übrig gebliebenen Mediumproben wurden mit Parafilm verschlossen und bei -80°C für Wiederholungsmessungen aufbewahrt.

### 2.9.3 Laktat-Standard-Kurve

In jedem Laktat-Assay-Testdurchlauf wurde ein definierter 100 mM Laktat-Standard mitgeführt und eine Laktat-Standard-Kurve aus 5 Messungen erstellt. Es wurden 3 Vorverdünnungen in 0,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen angesetzt, um im Anschluss die 5 Laktat-Standards á 50 ml auf jede schwarze 96-Well-Platte pipettieren zu können:

1. A: 10 µl Laktat-Assay-Standard + 90 µl Laktat-Assay-Puffer
2. B: 10 µl Standardlösung A + 90 µl Laktat-Assay-Puffer
3. C: 10 µl Standardlösung B + 90 µl Laktat-Assay-Puffer

Die 5 Laktat-Standards wurden nach dem folgenden Schema pipettiert:

1. 0,02 mM: 2 µl Standardlösung B + 90 µl Laktat-Assay-Puffer
2. 0,01 mM: 10 µl Standardlösung C + 40 µl Laktat-Assay-Puffer
3. 0,006 mM: 6 µl Standardlösung C + 44 µl Laktat-Assay-Puffer
4. 0,002 mM: 2 µl Standardlösung C + 48 µl Laktat-Assay-Puffer
5. 0,0 mM: 50 µl Laktat-Assay-Puffer

Die Laktat-Standards wurden mit dem Laktat-Assay-Testansatz fluorometrisch gemessen und im Anschluss ausgewertet.

### 2.10 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse des Schistosomula-Medikamenten-Assays wurden entweder in Lebendigkeit % für die Mikroskopie oder in RFU-Daten (Relative Fluorescence Units) für den Resazurin- und Laktat-Assay in tabellarischer Form in Microsoft Excel (Microsoft, USA) dokumentiert. Aus den gewonnenen Rohdaten wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus dem doppelten Wirkstoffansatz pro Durchlauf für jedes der drei Messverfahren berechnet. Für die Mikroskopie wurde die Lebendigkeit in Prozent berechnet, indem die toten Schistosomula von der Gesamtzahl subtrahiert wurden. Die Auswertung der Resazurin- und der Laktat-Assay-Tests erfolgten unverzüglich nach Ende der Inkubationszeiten mit dem Fluorometer (Fluoroscans Ascent, Thermo Electron Corporation, Finnland) bei Exzitation/Emission 530/590 nm. Bei den fluorometrisch gemessenen Ergebnissen wurde das Ergebnis der SCM-Kontrolle raussubtrahiert, wodurch Hintergrundstreulicht korrigiert wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mit Prism 9 (GraphPad Software, Inc.), um die 50-prozentige inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) berechnen zu können, und Dosis-

Wirkungs-Kurven zu erzeugen. Um die Ergebnisse mit unterschiedlichen Messeinheiten untereinander vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse normalisiert und als nicht-lineare Regressionskurven (Inhibitor vs. Response, variable slope, four parameters) auf einer logarithmierten X-Achse ( $\log(10)$ ) angegeben.

Für die qualitative und quantitative Auswertung der Aktivität der neunzehn Wirkstoffe wurden die Dosis-Wirkungs-Kurven und die  $IC_{50}$ -Werte genommen und verglichen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Versuchsaufbau

Neunzehn antiplasmodial wirksame Substanzen aus Therapie und Forschung der Malaria inklusive aller Kontrollen wurden im Doppelansatz und in drei Durchläufen über sieben Tage *in vitro* an Schistosomula-Kulturen getestet und mittels drei Testverfahren vergleichend zueinander betrachtet. Die Parasiten wurden anhand morphologischer Kriterien lichtmikroskopisch beurteilt, und im Anschluss zur Quantifizierung mit zwei fluorometrischen Messungen in Form des Zellvitalitätsmarkers Resazurin und des Metabolitenmarkers Laktat ausgewertet. Die durch Mikroskopie und Fluorometrie gewonnen Rohdaten wurden statistisch mit Excel und Prism 9 ausgewertet und die IC<sub>50</sub>-Werte in Form von Dot-Plot-Diagrammen und Dosis-Wirkungs-Kurven dargestellt. Teile der Versuchsergebnisse wurden im Jahre 2021 in PLOS Neglected Tropical Diseases veröffentlicht (73).

#### 3.1.1 Kontrollen

Jeder Wirkstoff wurde pro Durchlauf doppelt angesetzt (s. Abbildung 6 und Abbildung 7) und insgesamt dreimal wiederholt. In jedem Ansatz wurde eine MQ-Kontrolle als Positivkontrolle mitgeführt. Pro Mikrotiterplatte wurden drei zusätzliche Kontrollen im Doppelansatz mitgeführt: Eine SCM-Kontrolle, eine No-Drug-Kontrolle sowie eine Stock-Kontrolle für das jeweilige Lösungsmittel. Die SCM-Kontrollen stellten den Hintergrundmesswert bei fluorometrischen Messungen dar und wurden bei jedem Messergebnis raussubtrahiert, um Hintergrundstreulicht zu eliminieren.

Die No-Drug- und die Stock-Kontrollen dienten zur Überprüfung der Lebendigkeit der Schistosomula während des Ansatzes über 7 Tage. Beide Kontrollen wurden lichtmikroskopisch beurteilt. Zum einen konnte dadurch sichergestellt werden, dass die Schistosomula eine Inkubationsdauer von 7 Tagen unter standardisierten Bedingungen überlebten. Zum anderen konnte mit der Stock-Kontrolle gezeigt werden, dass das jeweilige Lösungsmittel keinen Effekt auf die Schistosomula hatte. Der durchschnittliche Wert aller No-Drug-Kontrollen betrug nach 7 Tagen Inkubation  $90,90 \pm 2,49$

Schistosomula/Mikrotitereinsenkung (s. Tabelle 5). Die Mittelwerte für die Stock-Kontrollen der folgenden Lösungsmittel waren: DMSO 0,1 %:  $92,21 \pm 4,47$ , DMSO 0,4 %:  $90,49 \pm 7,61$ , DMSO 0,5 %:  $91,49 \pm 6,18$ , MeOH 0,1 %:  $94,03 \pm 3,57$  Schistosomula/Mikrotitereinsenkung. Alle Lebendigkeitskontrollen wurden mit einer Schistosomula-Aktivität über 90 % als positiv gewertet.

### 3.1.1.1. Mefloquin-Kontrolle

Wie bereits unter Punkt 2.6.2 beschrieben, wurde die MQ-Kontrolle als Positiv-Kontrolle bzw. Qualitätskontrolle in jedem Wirkstoffansatz mitgeführt. Bei bekannter antischistosomaler Aktivität konnten sowohl die Ansätze untereinander als auch die Aktivität der einzelnen Substanzen vergleichend zu MQ betrachtet werden. MQ wurde in Konzentrationen von 200 bis  $0,274 \mu\text{M}$  bei einem Verdünnungsfaktor 1:3 getestet und insgesamt in neun Durchläufen (N=9) im Doppelansatz gemessen. MQ zeigte in allen Wirkstoffansätzen und allen drei Messmethoden nach 7 Tagen Inkubation  $\text{IC}_{50}$ -Werte  $< 10 \mu\text{M}$ , sowie einen sigmoidalen Verlauf in den Dosis-Wirkungs-Kurven (s. Abbildung 10). Die minimale letale Konzentration in der Mikroskopie nach 7 Tagen Inkubation betrug  $22,2 \mu\text{M}$ , der Median aller  $\text{IC}_{50}$ -Werte der Mikroskopie lag bei  $1,90 \mu\text{M}$  ( $1,48$ - $5,53 \mu\text{M}$ ), für den Resazurin-Assay bei  $1,83 \mu\text{M}$  ( $1,25$ - $4,64 \mu\text{M}$ ) und für den Laktat-Assay bei  $1,92 \mu\text{M}$  ( $0,01$ - $5,09 \mu\text{M}$ ) (s. Appendix Tabelle 8). Die Positiv-Kontrolle MQ konnte in allen Durchläufen als regelrecht gewertet werden.

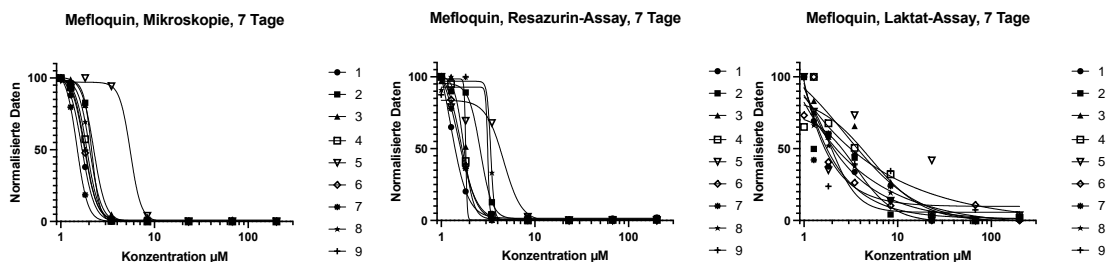


Abbildung 10: MQ-Ansätze (N=9) aller drei Messmethoden (Mikroskopie, Resazurin-Assay, Laktat-Assay) als Dosis-Wirkungs-Kurven nach 7 Tagen Inkubation

### 3.1.2 Schistosomulazahlen pro Mikrotitereinsenkung

Wie bereits unter Punkt 2.7 im Abschnitt Materialien und Methoden beschrieben, ist die Schistosomula-Anzahl zu Beginn des Ansatzes manuell unter dem Lichtmikroskop ausgezählt worden. Durch eine konstante Schistosomulazahl von  $100 \pm 20$  pro Mikrotitereinsenkung wurde eine Basis geschaffen, die für die Durchführbarkeit der objektiven Tests Resazurin-Assay

und Laktat-Assay notwendig war (116). Über den gesamten Testlauf mit neunzehn Wirkstoffen inklusive der MQ-Kontrolle war eine durchschnittliche Verteilung von  $100,5 \pm 15,3$  Schistosomula pro Mikrotiterensenkung vorhanden, woraus sich ein Variationskoeffizient von 15,2 % ergab. Bei guter Konformität der Schistosomulazahlen/Mikrotiterensenkung konnte zum einen bei einer Anzahl von  $100 \pm 15$  Schistosomula/Mikrotiterensenkung eine Abweichung der Laktatkonzentration ausgeschlossen und zum anderen Kontaminationen frühzeitig erkannt werden. Eine detaillierte tabellarische Übersicht über Mittelwerte und Standardabweichungen der Schistosomulazahlen pro Wirkstoff und Ansatz ist im Appendix (s. Tabelle 6 und Tabelle 7) angegeben.

### 3.1.3 Laktat-Standard-Kurven

Wie bereits unter Punkt 2.9.3 im Abschnitt Materialien und Methoden beschrieben, wurde pro Laktat-Assay ein definierter Laktat-Standard in fünf Konzentrationen mitgeführt. Er galt als interne Kontrolle für das Laktat-Assay-Kit, um z.B. Interferenzen der Reagenzien und dem Laktat ausschließen zu können. Alle Laktat-Assay-Standard-Kurven zeigten einen linear ansteigenden Verlauf und konnten regelrecht verwendet werden. Anhand des Graphen konnten die RFU-Werte der einzelnen Standardkonzentrationen abgelesen werden (s. Abbildung 11).

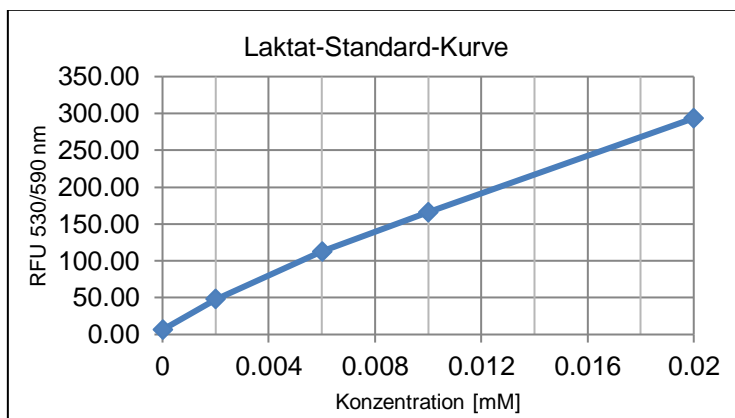


Abbildung 11: Beispiel einer Laktat-Standard-Kurve

### 3.2 Lichtmikroskopische Beurteilung morphologischer Veränderungen der *in vitro* Schistosomula-Kulturen von *S. mansoni*

Wie im Abschnitt Materialien und Methoden dargelegt, wurden die Parasitenvorstufen aus dem Schneckenzwischenwirt extrahiert, transformiert und in 96-Well-Mikrotiterplatten in SCM *in vitro* kultiviert und anschließend



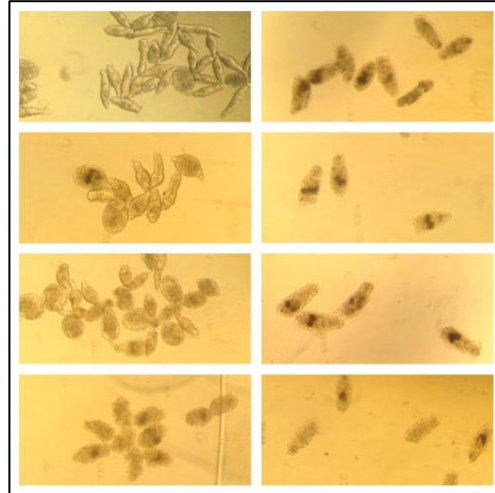
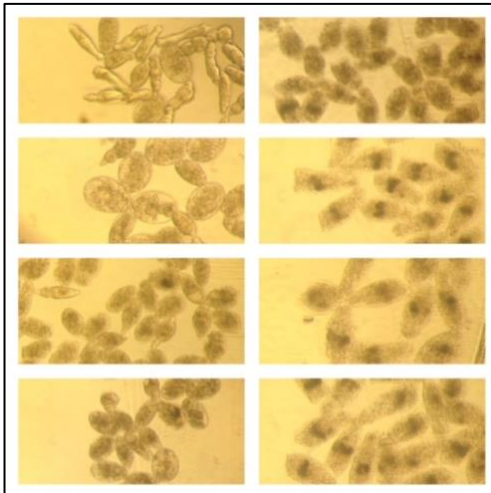
lichtmikroskopisch ausgewertet. Zur Bestimmung der Effektivität des Wirkstoffes sind die Schistosomula in jeder Mikrotitereinsenkung am Tag 3 und 7 lichtmikroskopisch binär als tot oder lebendig beurteilt worden, um z.B. eine Einteilung in langsam wirksame und schnell wirksame Medikamente treffen zu können. Bei der morphologischen Beurteilung mussten verschiedene Kriterien erfüllt sein: Wie von Howe et al. beschrieben, galt ein Schistosomulum als lebendig, wenn es sich bewegte und eine unversehrte Form aufwies, oder als tot, wenn es sich innerhalb von 10 s nicht bewegte und eine abnorme Morphologie aufwies, wie z.B. eine abweichende Form mit diskontinuierlichen Zellgrenzen, Blasenbildung und/oder Granulation (116). Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch die Schistosomula am Tag 7 in jeder der acht Konzentrationsstufen der Verdünnungsreihe, beginnend von links oben (No-Drug-Kontrolle) nach rechts unten (höchste Konzentrationsstufe), bei 20-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop (s. Links Abbildung 12 - Abbildung 24). Die jeweiligen Lösungsmittel und die Konzentrationen der Wirkstoffe zu Beginn der Verdünnungsreihe sind in Tabelle 2 beschrieben. Des Weiteren konnte die minimale letale Konzentration angegeben werden, bei der lichtmikroskopisch 100 % der Schistosomen nach 7 Tagen Inkubation tot waren (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Minimale letale Konzentration [ $\mu\text{M}$ ] in Ansatz A, B und C, Mikroskopie, nach 7 Tagen Inkubation. Querstrich (-): Keine Inhibition erfolgt.

Wirkstoff	Minimale letale Konzentration [ $\mu\text{M}$ ], Mikroskopie nach 7 Tagen		
	A	B	C
Auranofin (AU)	0,37	0,37	0,37
Primaquin (PQ)	12,50	25,00	25,00
Chinin (Q)	200,00	200,00	-
Ferroquin (FQ)	50,00	25,00	25,00
Amodiaquin (AQ)	25,00	50,00	50,00
Chloroquin (CQ)	100,00	12,50	50,00
Atovaquon (AT)	-	-	100,00
Artesunat (ART)	25,00	50,00	50,00
4-cis-Mirinacmycin	300,00	100,00	100,00
4-trans-Mirinacmycin	300,00	100,00	-
Tigecyclin (TIGE)	300,00	300,00	100,00
Doxycyclin (DOXY)	-	-	-
Methylenblau (MB)	33,30	1,24	3,70
Pyronaridin (PYRO)	11,11	3,70	3,70
WR99210 (WR)	100,00	33,30	33,30
Proguanil (PRO)	300,00	300,00	100,00
Cycloguanil (CYCLO)	-	-	-
Clindamycin (CLINDA)	-	-	-

### 3.2.1 Antiplasmodiale Substanzen aus Therapie und Forschung

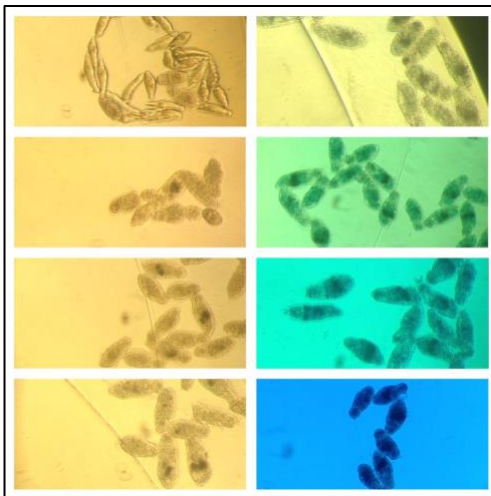
#### Artesunat und Mefloquin



Links Abbildung 12: Artesunat, 7 Tage Inkubation, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 300-3,125 µM; 20-fache Vergrößerung

Rechts Abbildung 13: Mefloquin, 7 Tage Inkubation, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 200-0,274 µM; 20-fache Vergrößerung

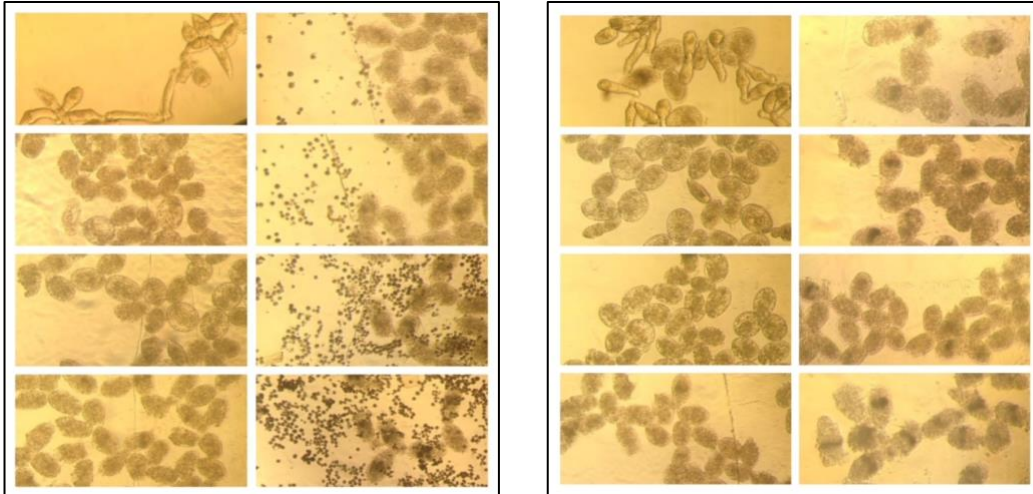
#### Methylenblau und Pyronaridin



Links Abbildung 14: Methylenblau, 7 Tage Inkubation, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 300-0,14 µM; 20-fache Vergrößerung

Rechts Abbildung 15: Pyronaridin, 7 Tage Inkubation, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 300-0,41 µM; 20-fache Vergrößerung

## Amodiaquin und Ferroquin



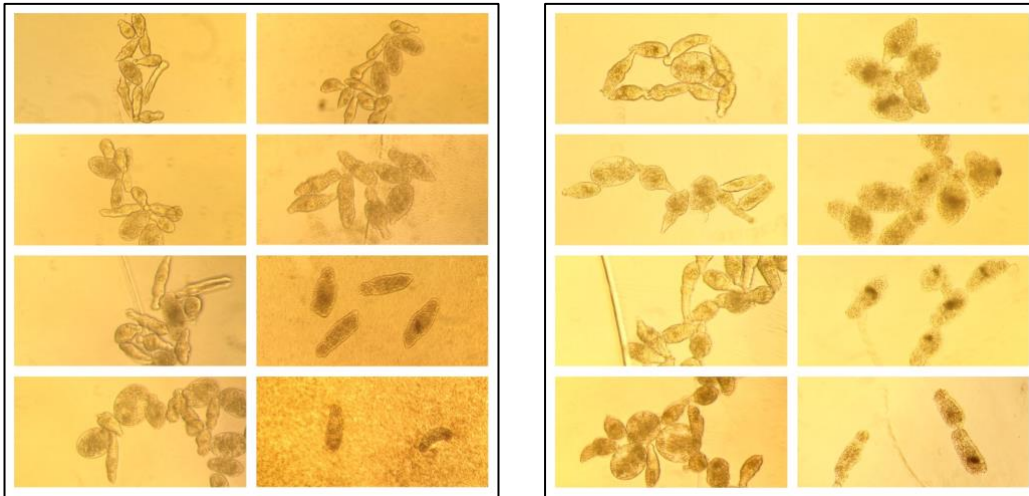
Links Abbildung 16: Amodiaquin mit Präzipitat-Bildung, 7 Tage Inkubation, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 200-3,125 µM; 20-fache Vergrößerung

Rechts Abbildung 17: Ferroquin, 7 Tage Inkubation, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 50-0,78 µM; 20-fache Vergrößerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ART, MQ, PYRO, MB, AQ, CQ, FQ PQ und AU lichtmikroskopisch einen deutlichen Effekt bei den Schistosomula zeigen. In der höchsten Konzentration der jeweiligen Medikamente ließen sich deutlich Granulationen, Lyse der Membran und die typische „Püppchenform“ beobachten. AQ zeigte ein Präzipitat, welches die Auswertung nicht beeinträchtigte. Q hatte zwar einen Effekt auf die Schistosomula, wodurch sie deutlich vergrößert, granuliert und rund erschienen. Dennoch war bei allen Konzentrationsstufen eine intakte Membran zu mikroskopieren, wodurch Vitalität oder noch einzelne funktionierende Stoffwechselprozesse nicht ausgeschlossen werden konnten. Aus diesem Grund wurde Q lichtmikroskopisch als nicht wirksam gewertet. AT bildete Präzipitate, die die lichtmikroskopische Auswertung nicht beeinträchtigten. AT zeigte kein eindeutiges Ergebnis und wurde mikroskopisch als nicht wirksam bewertet. MB zeigt eine deutliche Eigenfärbung in den hohen Konzentrationsstufen der Verdünnungsreihe.

### 3.2.2 Antibiotika aus Therapie und Forschung

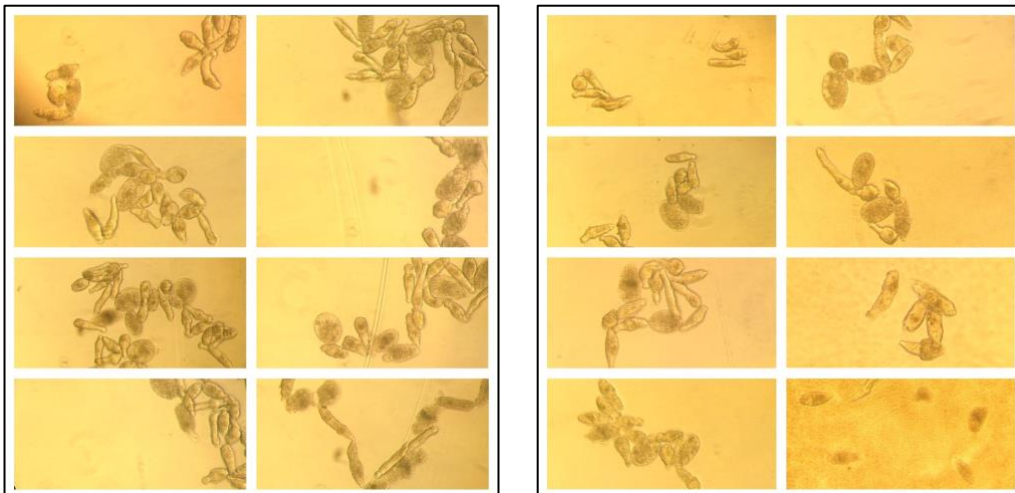
#### Tigecyclin und 4-trans-Mirincamycin



Links Abbildung 18: Tigecyclin mit Präzipitat-Bildung, 7 Tage Inkubation, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 300-0,41 µM; 20-fache Vergrößerung

Rechts Abbildung 19: 4-trans-Mirincamycin, 7 Tage Inkubation, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 300-0,41 µM; 20-fache Vergrößerung

#### Clindamycin und Doxycyclin



Links Abbildung 20: Clindamycin, 7 Tage Inkubation, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 300-0,41 µM; 20-fache Vergrößerung

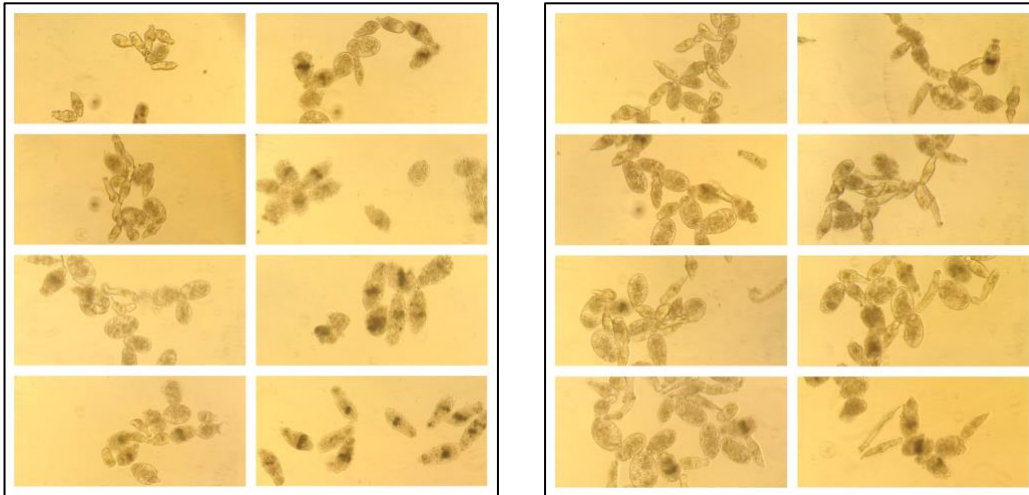
Rechts Abbildung 21: Doxycyclin mit Präzipitat-Bildung, 7 Tage Inkubation, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 300-0,41 µM; 20-fache Vergrößerung

Die Antibiotika 4-cis-M, 4-trans-M und TC zeigten mikroskopisch eine gute Wirksamkeit, da eine deutliche Granulation, Lyse von Zellgrenzen und die typische „Püppchenform“ sichtbar waren. CLINDA und DC dagegen zeigen mikroskopisch keine Wirksamkeit, weil in der höchsten Konzentrationsstufe

lebendige Schistosomula vorhanden waren. Bei TC und DC bildeten sich Präzipitate, die keinen Einfluss auf die lichtmikroskopische Auswertung hatten.

### 3.2.3 Die Folsäureantagonisten Proguanil, Cycloguanil und WR99210

#### Proguanil und Cycloguanil



Links Abbildung 22: Proguanil, 7 Tage Inkubation, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 300-0,41 µM; 20-fache Vergrößerung

Rechts Abbildung 23: Cycloguanil, 7 Tage Inkubation, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 300-0,41 µM; 20-fache Vergrößerung

#### WR99210

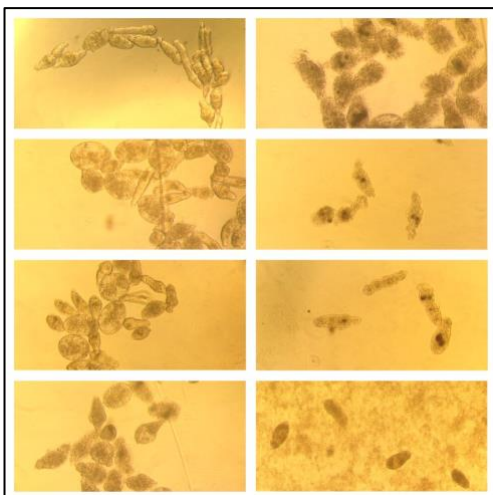


Abbildung 24: WR99210 mit Präzipitat-Bildung, 7 Tage Inkubation, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 300-0,41 µM; 20-fache Vergrößerung

In der Zusammenschau der lichtmikroskopischen Beurteilungen zeigten PRO und WR eine gute Wirksamkeit. Spätestens mit der 5. Konzentrationsstufe waren Granulationen, Lyse der Membran und die typische „Püppchenform“ zu sehen. WR bildete Präzipitate, die die lichtmikroskopische Auswertung nicht



beeinträchtigte. CYCLO hatte keine Wirksamkeit, es waren lebendige Schistosomula in der höchsten Konzentrationsstufe nachweisbar.

### **3.3 Identifikation von Substanzen mit antischistosomaler Aktivität**

Neunzehn verschiedene, antiplasmodiale Substanzen aus Therapie und Forschung wurden gegen das *S. mansoni* Schistosomula-Larvenstadium *in vitro* getestet. Die antischistosomale Aktivität wurde nach 7 Tagen Inkubation mit drei verschiedenen Messverfahren ausgewertet: Der Lichtmikroskopie, dem Resazurin-Assay und dem Laktat-Assay. Es wurden nur Wirkstoffansätze ausgewertet, die folgenden Qualitätskriterien entsprachen:

1. Antiplasmodiale Substanzen mit  $IC_{50}$ -Werten  $< 10 \mu\text{M}$  wurden als „aktiv“ gewertet und zeigten eine antischistosomale Aktivität (125).
2. Die Positiv-Kontrolle MQ musste nach 7 Tagen Inkubation mikroskopisch einen  $IC_{50}$ -Wert  $< 10 \mu\text{M}$  aufweisen.
3. Die *in vitro* Schistosomula-Kulturen mussten in jedem Ansatz und auf jeder Mikrotiterplatte mikroskopisch eine Lebendigkeit von mindestens 80 % in der No-Drug-Kontrolle und in der Stock-Kontrolle (DMSO, M199, MeOH) nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen zeigen.
4. Die Anzahl der Schistosomula pro Mikrotitereinsenkung durfte eine Abweichung von  $100 \pm 20$  Schistosomula/Mikrotitereinsenkung nicht über- oder unterschreiten.
5. Innerhalb der Verdünnungsreihe sollte eine Konzentrationsstufe zu 100 % tote Schistosomula/Mikrotitereinsenkung aufweisen zur Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven.
6. Die erstellten Dosis-Wirkungs-Kurven sollten einen sigmoidalen Verlauf zeigen, um  $IC_{50}$ -Werte berechnen zu können.
7. Die RFU-Werte der Laktat-Standard-Kurven mussten in jedem Laktat-Assay-Ansatz verwertbar sein.
8. Während des gesamten Versuchsansatzes musste eine Kontamination oder Evaporation in den Mikrotitereinsenkungen ausgeschlossen werden.

Nach der Auswertung aller Ergebnisse lassen sich folgende Fragen beantworten:

1. Zeigt der Wirkstoff einen Effekt an den Schistosomula nach 7 Tagen Inkubation z.B. in Form eines Abwärtstrends oder niedrigen IC<sub>50</sub>-Werten?
2. Zeigt der Wirkstoff bei IC<sub>50</sub>-Werten < 10 µM eine Aktivität und kann als vielversprechender Kandidat mit antischistosomaler Wirkung priorisiert werden?
3. Wie vergleichbar ist der Goldstandard Mikroskopie zu zwei alternativen, objektiven Methoden (Resazurin-Assay, Laktat-Assay) zur Bestimmung der Lebendigkeit der Schistosomula bei der Medikamententestung?

Von neunzehn getesteten antiplasmodialen Substanzen zeigten 15 Medikamente einen Effekt an den Schistosomula (s. Abbildung 25, Abbildung 26 und Abbildung 27). Neben der Positiv-Kontrolle konnten sieben Substanzen als vielversprechende Kandidaten mit einer antischistosomalen Aktivität IC<sub>50</sub> < 10 µM mittels mikroskopischer Auswertung priorisiert und als „aktiv“ bewertet werden (s. Tabelle 4). Substanzen ohne antischistosomale Wirkung wurden als „inaktiv“ gewertet. Bei einigen Wirkstoffen konnten keine IC<sub>50</sub>-Werte berechnet werden, da keine Inhibition vorlag, z.B. AT, DC, CYCLO, CLINDA (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Median der IC<sub>50</sub>-Werte aus drei unabhängigen Messdurchläufen für jedes der drei Messverfahren (Mikroskopie, Resazurin-Assay, Laktat-Assay) der *in vitro* Schistosomula-Kultivierung, gemessen nach 7 Tagen Inkubation. Querstrich (-) = Keine Inhibition vorhanden bzw. zu starke Abweichung.

Wirkstoff	Aktivität ≤ 10 µM	IC <sub>50</sub> -Werte [µM], Median, nach 7 Tagen Inkubation		
		Mikroskopie	Resazurin-Assay	Laktat-Assay
Mefloquin (MQ)	Ja	1,90	1,83	1,92
Auranofin (AU)	Ja	1,12	1,12	1,33
Primaquin (PQ)	Ja	4,76	3,48	13,76
Chinin (Q)	Nein	72,35	58,18	-
Ferroquin (FQ)	Ja	1,99	3,96	10,7*
Amodiaquin (AQ)	Ja	5,33	3,06	7,19*
Chloroquin (CQ)	Nein	10,10	13,73	19,29*
Atovaquon (AT)	Nein	-	-	-
Artesunat (ART)	Nein	14,69	10,26	37,68
4-cis-Mirincamycin	Nein	20,77	15,43	20,47
4-trans-Mirincamycin	Nein	33,29	26,6	35,76
Tigecyclin (TIGE)	Nein	101,20	-	96,49
Doxycyclin (DOXY)	Nein	-	-	-
Methylenblau (MB)	Ja	1,41	1,38	1,33
Pyronaridin (PYRO)	Ja	1,89	1,35	11,72*
WR99210 (WR)	Ja	5,45	5,20	23,29

<b>Proguanil (PRO)</b>	Nein	40,90	18,64	61,34*
<b>Cycloguanil (CYCLO)</b>	Nein	-	-	-
<b>Clindamycin (CLINDA)</b>	Nein	-	-	-

\* IC<sub>50</sub>-Ergebnisse aus einem Assay

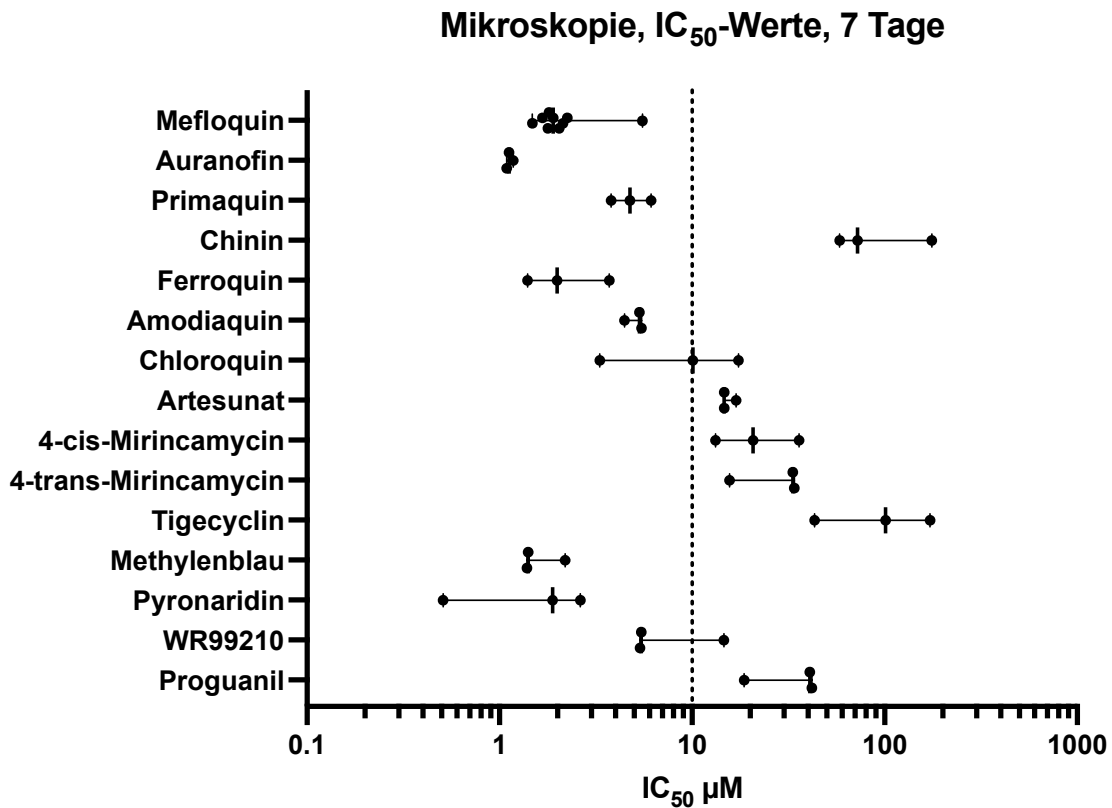


Abbildung 25: Dot-Plot-Diagramm Mikroskopie, *in vitro* Schistosomula-Kultivierung von *S. mansoni* nach 7 Tagen Inkubation: IC<sub>50</sub>-Ergebnisse aller 15 antiplasmodialen Substanzen inklusive der MQ-Kontrolle, die einen Effekt an den Schistosomula gezeigt hatten. Jedes Medikament wurde dreimal in unabhängigen Schistosomula-Assays getestet, abgesehen von MQ, welches als Positiv-Kontrolle neunmal (N=9) mitgeführt worden ist. Jeder IC<sub>50</sub>-Wert wird als Kreis dargestellt, der kleine vertikale Strich zeigt den Median an, die Linie den Interquartilsabstand (IQR). Die gepunktete vertikale Linie stellt den Cut-off Wert für antischistosomale Aktivität < 10 µM dar. Für vier Medikamente (AT, CYCLO, CLINDA, DOXY) konnten keine IC<sub>50</sub>-Werte berechnet werden, da keine Inhibition stattgefunden hat.



### Resazurin-Assay, IC<sub>50</sub>-Werte, 7 Tage

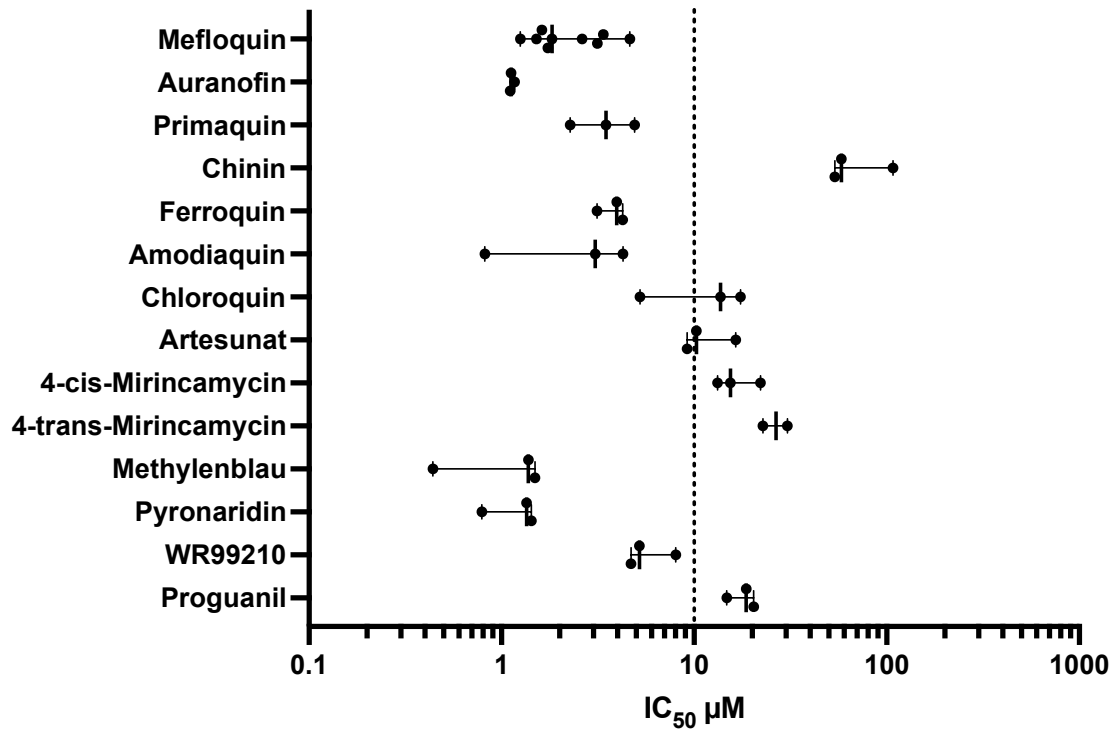


Abbildung 26: Dot-Plot-Diagramm Resazurin-Assay, *in vitro* Schistosomula-Kultivierung von *S. mansoni* nach 7 Tagen Inkubation: IC<sub>50</sub>-Ergebnisse aller 14 antiplasmodialen Substanzen inklusive der MQ-Kontrolle, die einen Effekt an den Schistosomula gezeigt hatten. Die gepunktete vertikale Linie stellt den Cut-off Wert für antischistomale Aktivität < 10 µM dar. Für fünf Medikamente (AT, CYCLO, CLINDA, DOXY, TIGE) konnten keine IC<sub>50</sub>-Werte berechnet werden, da keine Inhibition stattgefunden hat.

### Laktat-Assay, IC<sub>50</sub>-Werte, 7 Tage

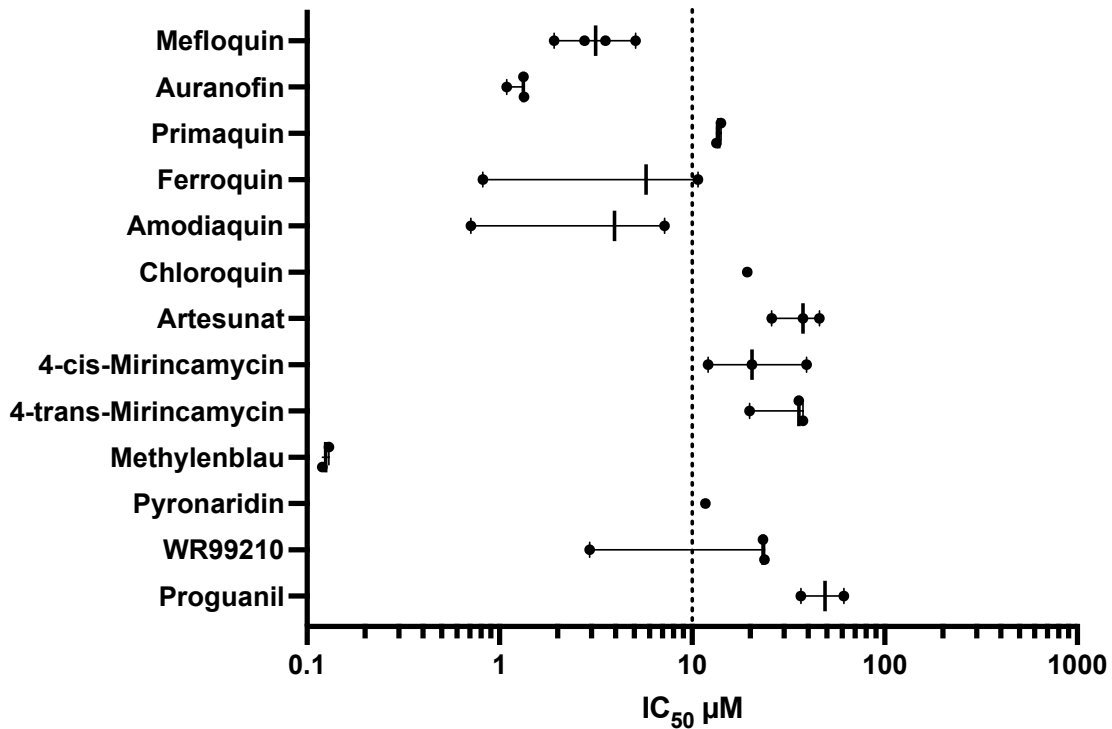


Abbildung 27: Dot-Plot-Diagramm Laktat-Assay, *in vitro* Schistosomula-Kultivierung von *S. mansoni* nach 7 Tagen Inkubation: IC<sub>50</sub>-Ergebnisse aller 13 antiplasmodialen Substanzen inklusive der MQ-Kontrolle, die einen Effekt an den Schistosomula gezeigt hatten. Die gepunktete vertikale Linie stellt den Cut-off Wert für antischistosomale Aktivität < 10 µM dar. Für fünf Medikamente (AT, CYCLO, CLINDA, DOXY, TIGE, Q) konnten keine IC<sub>50</sub>-Werte berechnet werden, da keine Inhibition stattgefunden hat. Für CQ und PYRO konnten nur die IC<sub>50</sub>-Werte aus einem Assay verwertet werden.

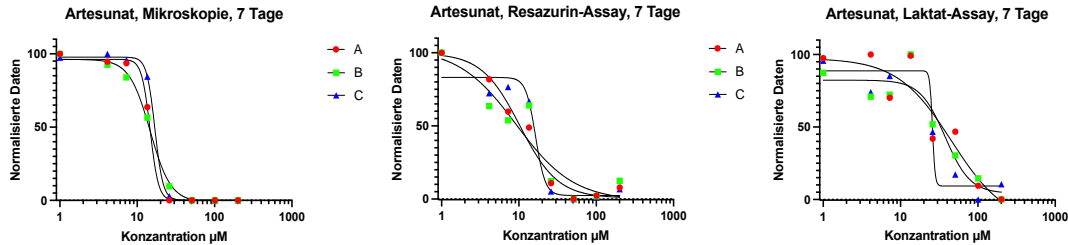
#### 3.4 Analyse-Ergebnisse der getesteten, antiplasmodialen Substanzen

Alle neunzehn Substanzen, inklusive der MQ-Kontrollen, wurden an Tag 7 der Inkubation mittels drei Messverfahren in drei Messdurchläufen (A, B, C) beurteilt. Um die subjektive Urteilsverzerrung in der mikroskopischen Auswertung zu minimieren, wurden die Messungen mit den objektiven Methoden des Resazurin-Assays und des Laktat-Assays analysiert. Der Resazurin-Assay spiegelt den aeroben Stoffwechsel der Schistosomula wider, der Laktat-Assay steht repräsentativ für den Glukosemetabolismus in lebendigen Zellen.

### 3.4.1 Das Artemisinin-Derivat Artesunat

#### Artesunat:

Konzentration: 200 – 3,125  $\mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor 1:2



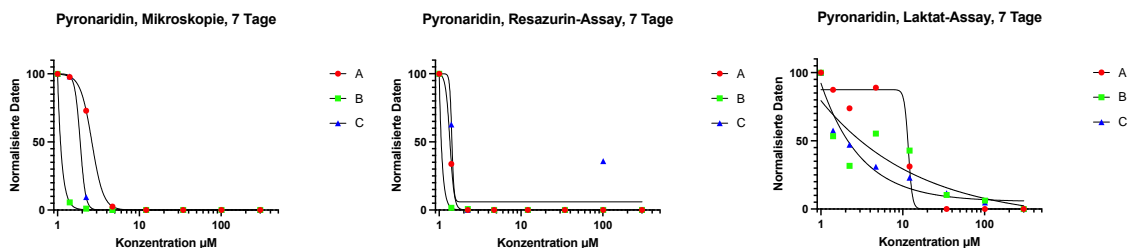
Wirkstoff	Antischistosomale Aktivität $\leq 10 \mu\text{M}$	Mikroskopie $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Resazurin-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Laktat-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Artesunat	Nein	14,69	14,67	16,92	10,26	9,211	16,43	45,85	37,68	25,88

Artesunat zeigte in allen drei Messverfahren sigmoidale Kurvenverläufe und generierte konsistente  $\text{IC}_{50}$ -Werte. ART hatte einen deutlichen Effekt an den Schistosomula in Form eines Abwärtstrends mit vielversprechend niedrigen  $\text{IC}_{50}$ -Werten, jedoch keine antischistosomale Aktivität mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten  $< 10 \mu\text{M}$ . Somit wurde ART als „inaktiv“ gewertet und nicht als vielversprechender Kandidat in diesem Versuchsaufbau priorisiert. Mikroskopisch wurde die durchschnittliche minimale, letale Konzentration bei  $50 \mu\text{M}$  gemessen.

### 3.4.2 Das Benzonaphthyridin-Derivat Pyronaridin

#### Pyronaridin:

Konzentration: 300 –  $0,41 \mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor 1:3



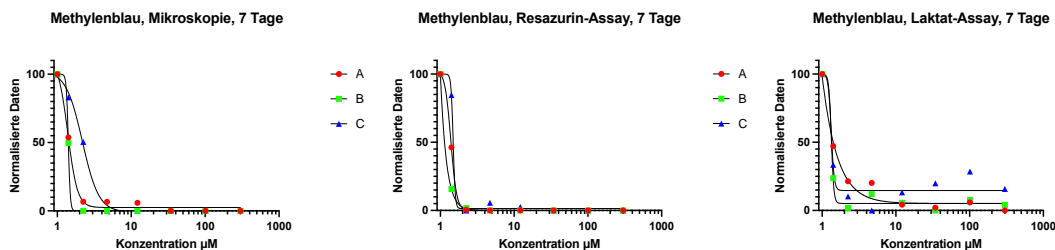
Wirkstoff	Antischistosomale Aktivität $\leq 10 \mu\text{M}$	Mikroskopie $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Resazurin-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Laktat-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Pyronaridin	Ja	2,63	0,51	1,89	1,35	0,79	1,43	11,72	-	-

Pyronaridin erzielte vielversprechende Ergebnisse in der Mikroskopie und im Resazurin-Assay mit sigmoidalen Kurvenverläufen und konsistenten  $IC_{50}$ -Werten  $< 10 \mu\text{M}$ . Die Messergebnisse im Laktat-Assay wichen deutlich voneinander ab, sodass die Werte aus Durchlauf B und C als nicht repräsentativ anzusehen sind. PYRO zeigte einen deutlichen Effekt an den Schistosomula und wurde als „aktiv“ gewertet sowie als vielversprechender Kandidat mit antischistosomaler Wirkung priorisiert. Mikroskopisch betrug die minimale letale Konzentration  $11,11 \mu\text{M}$ .

### 3.4.3 Weitere antiplasmodiale Substanzen

#### Methylenblau:

Konzentration:  $300 - 0,41 \mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor 1:3

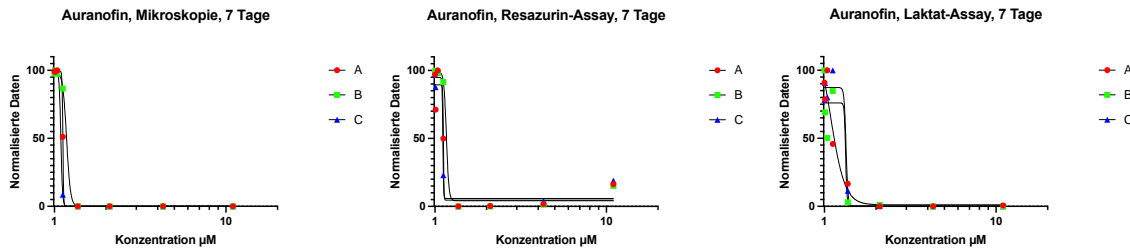


Wirkstoff	Antischistosomale Aktivität $\leq 10 \mu\text{M}$	Mikroskopie $IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]			Resazurin-Assay $IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]			Laktat-Assay $IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Methylenblau	Ja	1,39	1,41	2,19	1,38	0,44	1,49	0,05	1,33	1,33

Methylenblau zeigte sehr gute Ergebnisse in allen drei Messverfahren mit sigmoidalen Kurvenverläufen und  $IC_{50}$ -Werten  $< 10 \mu\text{M}$  innerhalb eines kleinen Konzentrationsbereiches von  $0,41-10 \mu\text{M}$ . MB wies einen deutlichen Effekt an den Schistosomula auf und wurde als „aktiv“ gewertet, sowie als vielversprechender Kandidat mit antischistosomaler Wirkung priorisiert. Mikroskopisch zeigte sich die minimale letale Konzentration uneinheitlich zwischen  $1,24-33,3 \mu\text{M}$ .

## Auranofin:

Konzentration: 10 – 0,01  $\mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor 1:3

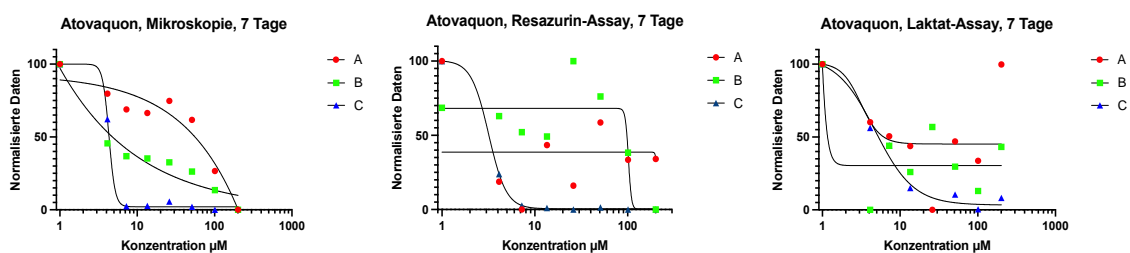


Wirkstoff	Antischistosomale Aktivität $\leq 10 \mu\text{M}$	Mikroskopie			Resazurin-Assay			Laktat-Assay		
		IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]			IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]			IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Auranofin	Ja	1,12	1,18	1,09	1,12	1,17	1,11	1,09	1,33	1,34

Auranofin erzielte sehr gute Ergebnisse in allen drei Messverfahren mit sigmoidalen Kurvenverläufen und konsistenten IC<sub>50</sub>-Werten deutlich  $< 10 \mu\text{M}$ . AU wies bereits in geringen Konzentrationsstufen einen deutlichen Effekt an den Schistosomula auf und wurde als „aktiv“ gewertet, sowie als vielversprechender Kandidat mit antischistosomaler Wirkung priorisiert. Die mikroskopische Beurteilung der minimalen letalen Konzentration lag bei 0,37  $\mu\text{M}$  in allen drei Durchläufen.

## Atovaquon:

Konzentration: 200 – 3,125  $\mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor 1:2



Wirkstoff	Antischistosomale Aktivität $\leq 10 \mu\text{M}$	Mikroskopie			Resazurin-Assay			Laktat-Assay		
		IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]			IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]			IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Atovaquon	Nein	-	-	4,31	-	-	3,19	-	-	4,77

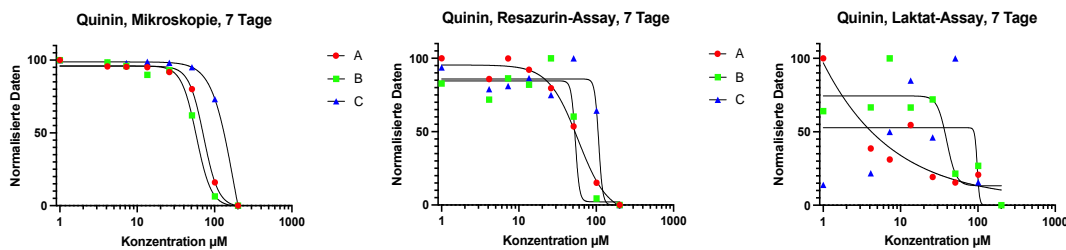
\*Instabile Werte

Atovaquon zeigte in allen drei Durchläufen sehr große Abweichungen und nur in Messung C einen sigmoidalen Verlauf mit auswertbaren  $IC_{50}$ -Werten. Die mikroskopische Beurteilung der minimalen letalen Konzentration lag bei Messung C bei 100  $\mu\text{M}$  und wurde durch die Präzipitat-Bildung bei steigender Konzentration nicht beeinträchtigt. Zusammenfassend wurde AT als „inaktiv“ gewertet.

### 3.4.4 Der Arylaminoalkohol Chinin

#### Chinin:

Konzentration: 200 – 3,125  $\mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor 1:2



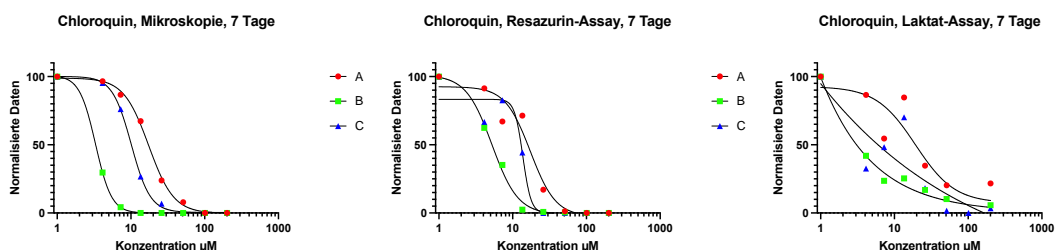
Wirkstoff	Antischistosomale Aktivität $\leq 10 \mu\text{M}$	Mikroskopie $IC_{50} [\mu\text{M}]$			Resazurin-Assay $IC_{50} [\mu\text{M}]$			Laktat-Assay $IC_{50} [\mu\text{M}]$		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Chinin	Nein	72,35	58,27	175,7	58,18	53,75	107,7	-	-	-

Chinin erzielte in der Mikroskopie und in dem Resazurin-Assay sigmoidale Kurvenverläufe und generierte  $IC_{50}$ -Werte, die jedoch innerhalb der Testdurchläufe deutlich voneinander abwichen. Der Laktat-Assay generierte starke Abweichungen der Messergebnisse in allen drei Testdurchläufen, sodass keine aussagekräftige Auswertung vorgenommen werden konnte. Q zeigte einen leichten Effekt an den Schistosomen und wurde als „inaktiv“ gewertet, da es keine antischistosomale Aktivität mit  $IC_{50}$ -Werten  $< 10 \mu\text{M}$  erzielte und somit nicht als vielversprechender Kandidat priorisiert werden konnte.

### 3.4.5 Die 4-Aminochinolin-Derivate Chloroquin, Amodiaquin und Ferroquin

#### Chloroquin:

Konzentration: 200 – 3,125  $\mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor 1:2

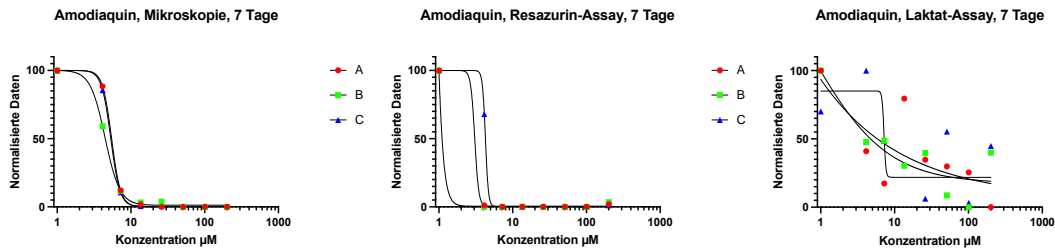


Wirkstoff	Antischistosomale Aktivität $\leq 10 \mu\text{M}$	Mikroskopie $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Resazurin-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Laktat-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Chloroquin	Nein	17,42	3,31	10,10	17,40	5,24	13,73	19,29	-	-

Chloroquin zeigte in der Mikroskopie und im Resazurin-Assay sigmoidale Kurvenverläufe mit vielversprechend niedrigen  $\text{IC}_{50}$ -Werten, die jedoch eine deutliche Abweichung zueinander zeigten. Mikroskopisch zeigte sich in der minimalen letalen Konzentration ebenfalls eine große Abweichung innerhalb der Versuchsdurchläufe, sie lag zwischen 12,5-100,00  $\mu\text{M}$ . Der Laktat-Assay zeigte in der Messung A einen sigmoidalen Kurvenverlauf inklusive  $\text{IC}_{50}$ -Wert, für die zwei weiteren Messungen B und C war eine aussagekräftige Berechnung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes nicht möglich. CQ zeigte einen deutlichen Effekt an den Schistosomula in Form eines Abwärtstrends, aber keine antischistosomale Aktivität mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten  $< 10 \mu\text{M}$ . Somit wurde CQ als „inaktiv“ gewertet und nicht als vielversprechender Kandidat mit antischistosomaler Aktivität in diesem Versuchsaufbau priorisiert.

## Amodiaquin:

Konzentration: 200 – 3,125  $\mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor 1:2

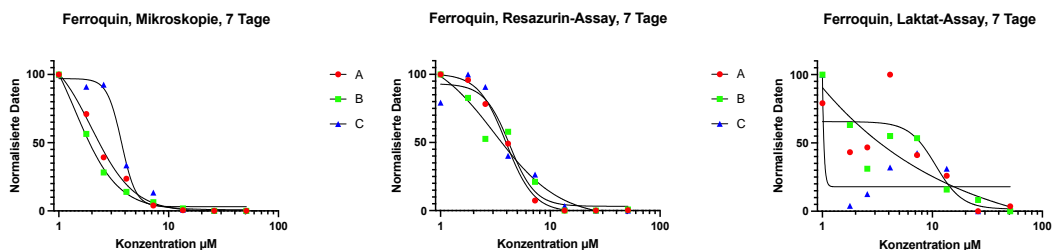


Wirkstoff	Antischistosomale Aktivität $\leq 10 \mu\text{M}$	Mikroskopie $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Resazurin-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Laktat-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Amodiaquin	Ja	5,47	4,46	5,33	3,06	0,82	4,27	-	-	7,19

Amodiaquin erzielte in der Mikroskopie und im Resazurin-Assay sigmoidale Kurvenverläufe und konsistente  $\text{IC}_{50}$ -Werte  $< 10 \mu\text{M}$ . AQ rief hohe Abweichungen der Messwerte untereinander im Laktat-Assay hervor. Die mikroskopische Beurteilung der minimalen letalen Konzentration lag bei  $50 \mu\text{M}$  und war trotz Präzipitat-Bildung nicht eingeschränkt. Zusammenfassend zeigte AQ einen deutlichen Effekt an den Schistosomula und wurde als „aktiv“ gewertet sowie als vielversprechender Kandidat mit antischistosomaler Wirkung priorisiert.

## Ferroquin:

Konzentration: 50 – 0,78  $\mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor 1:2



Wirkstoff	Antischistosomale Aktivität $\leq 10 \mu\text{M}$	Mikroskopie $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Resazurin-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Laktat-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Ferroquin	Ja	1,99	1,40	3,72	3,96	3,13	4,26	10,7	-	-

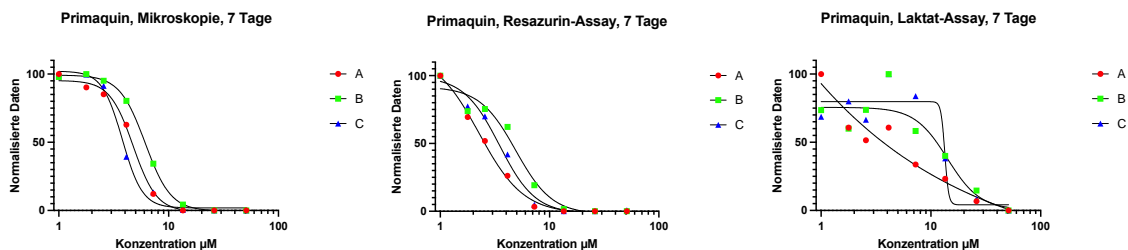


Ferroquin zeigte vielversprechende Ergebnisse in der Mikroskopie und im Resazurin-Assay mit sigmoidalen Kurvenverläufen und konsistenten  $IC_{50}$ -Werte  $\leq 10 \mu\text{M}$ . Die Messergebnisse im Laktat-Assay wichen deutlich voneinander ab, sodass dieser als nicht repräsentativ gewertet worden ist. Mikroskopisch zeigte sich eine minimale letale Konzentration bei  $50 \mu\text{M}$ . Zusammenfassend zeigte FQ einen deutlichen Effekt an den Schistosomula und wurde als „aktiv“ gewertet sowie als vielversprechender Kandidat mit antischistosomaler Wirkung priorisiert.

### 3.4.6 Das 8-Aminochinolin Primaquin

#### Primaquin:

Konzentration:  $50 - 0,78 \mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor 1:2



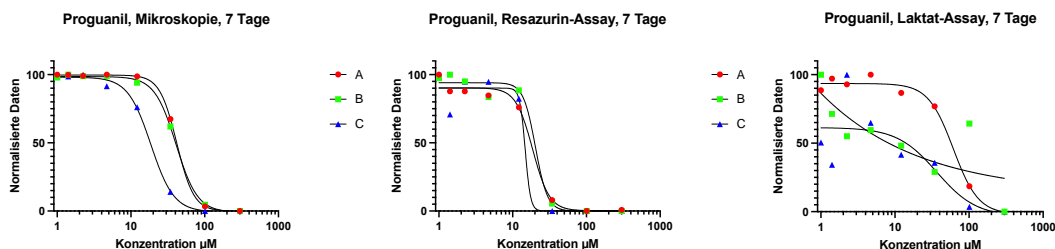
Wirkstoff	Antischistosomale Aktivität $\leq 10 \mu\text{M}$	Mikroskopie $IC_{50} [\mu\text{M}]$			Resazurin-Assay $IC_{50} [\mu\text{M}]$			Laktat-Assay $IC_{50} [\mu\text{M}]$		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Primaquin	Ja	4,76	6,12	3,79	2,27	4,91	3,48	-	14,13	13,39

Primaquin erzielte sehr gute Ergebnisse in der Mikroskopie und im Resazurin-Assay mit sigmoidalen Kurvenverläufen und  $IC_{50}$ -Werten  $< 10 \mu\text{M}$ . PQ zeigte einen deutlichen Effekt an den Schistosomula und wurde als „aktiv“ gewertet sowie als vielversprechender Kandidat mit antischistosomaler Wirkung priorisiert. Mikroskopisch betrug die minimale letale Konzentration  $25 \mu\text{M}$ .

### 3.4.7 Die Folsäureantagonisten Proguanil, Cycloguanil und WR99210

#### Proguanil:

Konzentration: 300 – 0,41  $\mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor 1:3

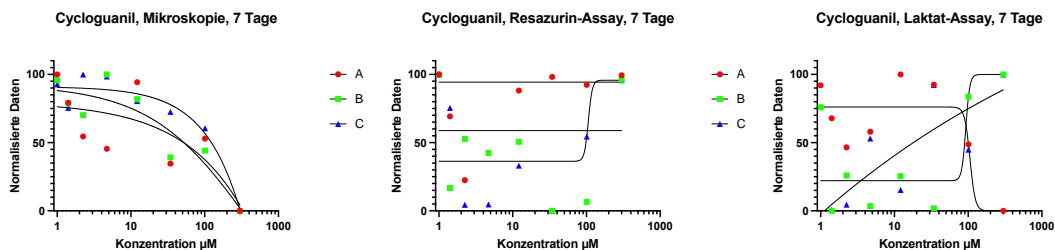


Wirkstoff	Antischistosomale Aktivität $\leq 10 \mu\text{M}$	Mikroskopie $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Resazurin-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Laktat-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Proguanil	Nein	41,83	40,90	18,62	18,64	20,34	14,78	61,34	-	-

Proguanil zeigte in der Mikroskopie und im Resazurin-Assay sigmoide Kurvenverläufe und generierte  $\text{IC}_{50}$ -Werte. Der Laktat-Assay hatte deutliche Abweichungen der Messwerte untereinander zu verzeichnen, sodass nur der Durchlauf A auswertbar war. Insgesamt wies PRO einen Effekt an den Schistosomula auf, die mikroskopisch gewertete minimale letale Konzentration lag bei  $300 \mu\text{M}$ . Es wurde jedoch keine antischistosomale Aktivität mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten  $< 10 \mu\text{M}$  gemessen und PRO somit als „inaktiv“ bewertet.

#### Cycloguanil:

Konzentration: 300 – 0,41  $\mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor 1:3

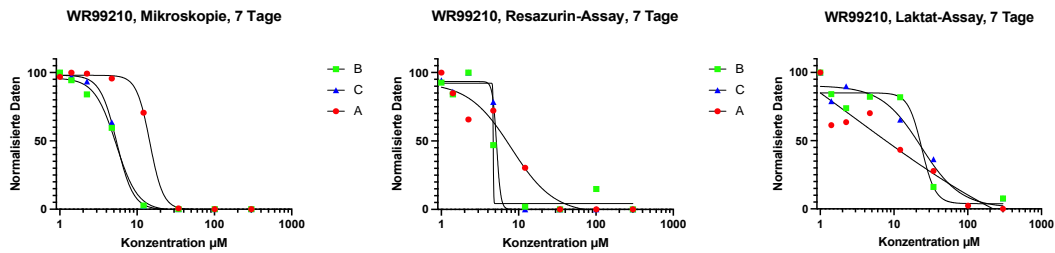


Wirkstoff	Antischistosomale Aktivität $\leq 10 \mu\text{M}$	Mikroskopie $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Resazurin-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Laktat-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Cycloguanil	Nein	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cyclogunamil erzielte im Vergleich zu seinem Podrug PRO keine Inhibition, es zeigten sich keine sigmoidalen Kurvenverläufe, die IC<sub>50</sub>-Werte konnten nicht berechnet werden und somit wurde das Medikament als „inaktiv“ bewertet.

### WR99210:

Konzentration: 300 – 0,41 µM, Verdünnungsfaktor 1:3



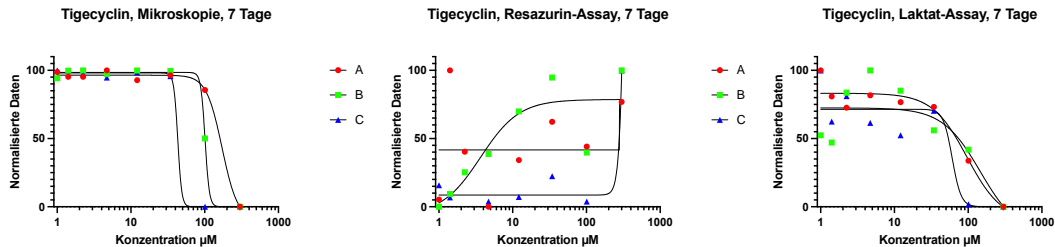
Wirkstoff	Antischistosomale Aktivität ≤ 10 µM	Mikroskopie IC <sub>50</sub> [µM]			Resazurin-Assay IC <sub>50</sub> [µM]			Laktat-Assay IC <sub>50</sub> [µM]		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
WR99210	Ja	14,61	5,36	5,45	8,03	4,70	5,20	-	23,78	23,29

WR99210 zeigte sehr gute Ergebnisse in allen drei Messverfahren mit sigmoidalen Kurvenverläufen und IC<sub>50</sub>-Werten < 10 µM. Es wies einen deutlichen Effekt an den Schistosomula auf und wurde als „aktiv“ gewertet, sowie als vielversprechender Kandidat mit antischistosomal Wirkung priorisiert. Bei einer Konzentration von 300 µM zeigte WR in der mikroskopischen Auswertung feine Präzipitate, die keine weiteren Probleme in der Auswertung darstellten. Die minimale letale Konzentration lag bei 100 µM.

### 3.4.8 Antibiotika aus Therapie und Forschung

#### Tigecyclin:

Konzentration: 300 – 0,41  $\mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor 1:3

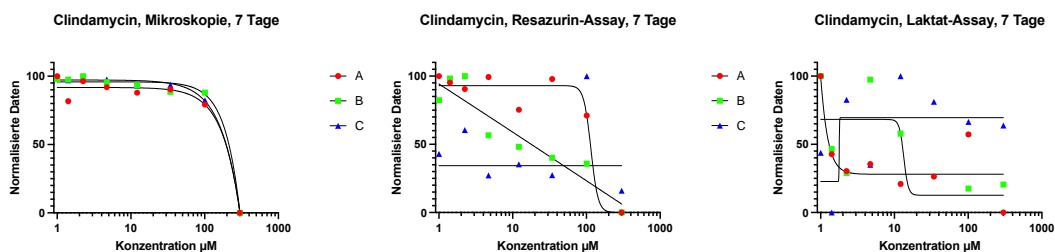


Wirkstoff	Antischistosomale Aktivität $\leq 10 \mu\text{M}$	Mikroskopie $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Resazurin-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Laktat-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Tigecyclin	Nein	171,80	101,20	43,19	-	-	-	96,49	146,50	60,71

Tigecyclin erzielte in der mikroskopischen Auswertung einen sigmoidalen Kurvenverlauf mit deutlich voneinander abweichenden  $\text{IC}_{50}$ -Werten. Mikroskopisch zeigte sich ein Effekt an den Schistosomen mit einer minimalen letalen Konzentration bei 300  $\mu\text{M}$ . Der Resazurin-Assay lieferte keine validen Ergebnisse, im Laktat-Assay konnten wiederum  $\text{IC}_{50}$ -Werte trotz starker Abweichung der Messwerte untereinander generiert werden. Zusammenfassend wurde TIGE als „inaktiv“ gewertet.

#### Clindamycin:

Konzentration: 300 – 0,41  $\mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor 1:3

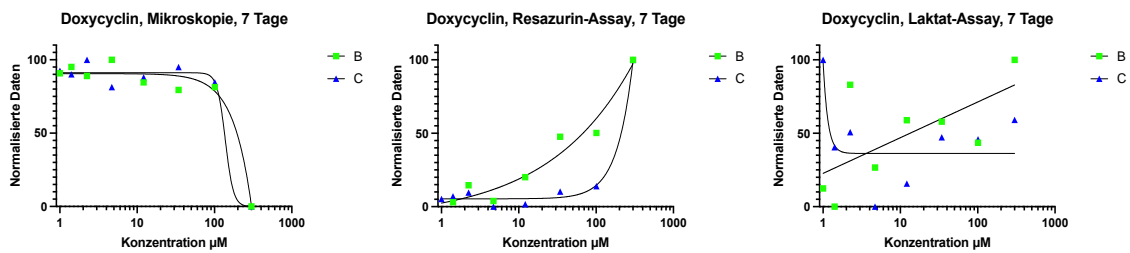


Wirkstoff	Antischistosomale Aktivität $\leq 10 \mu\text{M}$	Mikroskopie $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Resazurin-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Laktat-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Clindamycin	Nein	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Clindamycin zeigte in allen drei Messverfahren keine verwertbaren Ergebnisse und wurde als „inaktiv“ gewertet.

### Doxycyclin:

Konzentration: 300 – 0,41  $\mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor 1:3



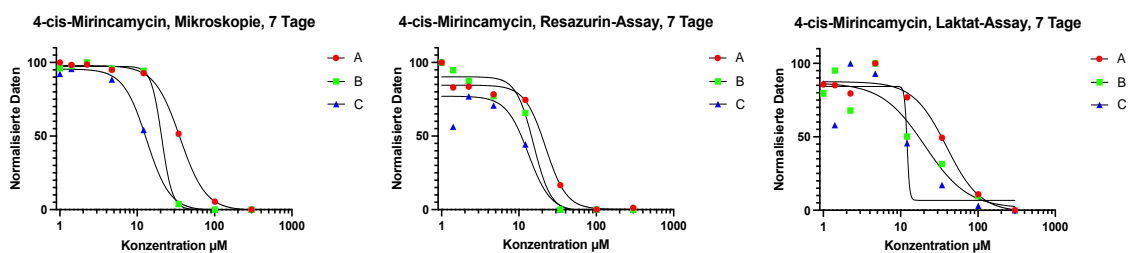
Wirkstoff	Antischistosomale Aktivität $\leq 10 \mu\text{M}$	Mikroskopie $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Resazurin-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Laktat-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Doxycyclin	Nein	n.a.*	-	-	n.a.*	-	-	n.a.*	-	-

\* nicht auswertbar

Doxycyclin erzielte in allen drei Messverfahren keine verwertbaren Ergebnisse und wurde als „inaktiv“ gewertet. Im Versuchsdurchlauf A zeigten sich in der No-Drug-Kontrolle über 50 % tote Schistosomula, weshalb die Auswertung nicht erfolgte, da von einer Kontamination ausgegangen werden muss.

### 4-cis-Mirincamycin:

Konzentration: 300 – 0,41  $\mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor 1:3

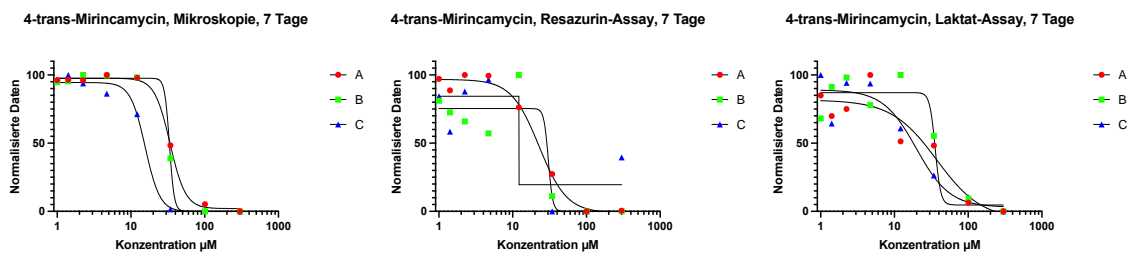


Wirkstoff	Antischistosomale Aktivität $\leq 10 \mu\text{M}$	Mikroskopie $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Resazurin-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$			Laktat-Assay $\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
4-cis-Mirincamycin	Nein	35,86	20,77	13,22	22,11	15,43	13,23	39,32	20,47	12,11

4-cis-Mirincamycin zeigte in allen drei Messverfahren sigmoidale Kurvenverläufe und generierte plausible  $IC_{50}$ -Werte. 4-cis-M wies einen deutlichen Effekt an den Schistosomula auf, ohne eine antischistosomale Aktivität mit  $IC_{50}$ -Werten  $< 10 \mu\text{M}$  zu haben. Somit wurde 4-cis-M nicht als vielversprechender Kandidat in diesem Versuchsaufbau priorisiert. Die minimale letale Konzentration lag bei  $300 \mu\text{M}$ .

#### 4-trans-Mirincamycin:

Konzentration:  $300 - 0,41 \mu\text{M}$ , Verdünnungsfaktor 1:3



Wirkstoff	Antischistosomale Aktivität $\leq 10 \mu\text{M}$	Mikroskopie $IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]			Resazurin-Assay $IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]			Laktat-Assay $IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
4-trans-Mirincamycin	Nein	33,89	33,29	15,62	22,76	30,44	-	37,58	35,76	19,85

4-trans-Mirincamycin erzielte in allen drei Messverfahren sigmoidale Kurvenverläufe und generierte plausible  $IC_{50}$ -Werte. Es wies einen deutlichen Effekt an den Schistosomula auf mit einer minimalen letalen Konzentration bei  $300 \mu\text{M}$ . Da es keine antischistosomale Aktivität mit  $IC_{50}$ -Werten  $< 10 \mu\text{M}$  aufzeigte, wurde es als „inaktiv“ gewertet. Somit wurde 4-trans-M nicht als vielversprechender Kandidat in diesem Versuchsaufbau priorisiert.

## 4 Diskussion

### 4.1 Identifikation von Substanzen mit antischistosomaler Aktivität

Von den neunzehn getesteten Substanzen aus der Malariatherapie und -forschung wiesen 15 Substanzen einen Effekt an den Schistosomula in Form eines Abwärtstrends mit sigmoidalem Kurvenverlauf und vielversprechend niedrigen IC<sub>50</sub>-Werten auf (s. Abbildung 25, Abbildung 26 und Abbildung 27). Davon zeigten MQ, AQ, FQ, PYRO, PQ, AU, MB und WR eine antischistosomale Aktivität mit IC<sub>50</sub>-Werten < 10 µM in der Mikroskopie oder einem der zwei weiteren Messverfahren (s. Tabelle 4) und wurden, wie bei Lombardo et al. beschrieben, als vielversprechende Kandidaten für weitere Untersuchungen priorisiert (125).

Bei dem vorliegenden Versuchsaufbau handelt es sich um ein *in vitro* Substanzen-Screening mit Schistosomula-Kulturen von *S. mansoni*. Wie bei Abdulla et al. beschrieben, stellt diese Form des Wirkstoff-Screenings die erste Stufe eines dreistufigen Testmodells dar, welches zur Identifizierung neuer Medikamente mit antischistosomaler Aktivität genutzt werden kann (115). Dieser schrittweise Ansatz trägt dazu bei, Tierversuche zu reduzieren. Koehne et al. untersuchte, basierend auf den Ergebnissen dieses ersten Screenings, in weiteren Experimenten die Substanzen PYRO und MB *ex vivo* an adulten Würmern (zweite Stufe) sowie *in vivo* an *S. mansoni*-infizierten Mäusen (dritte Stufe) und führte erfolgreich eine klinische Pilotstudie mit dem Kombinationspräparat PYRO-ART (Pyramax®) an *S. haematobium*-infizierten Kindern in Gabun durch (73).

Mit den Ergebnissen aus diesem Versuchsansatz lässt sich die vorbeschriebene antischistosomale Wirkung der antiplasmodialen Substanzen MQ, ART, Q, AQ, CQ, FQ, PQ, PYRO und AU an *in vitro* Schistosomula-Kulturen bestätigen, auch wenn nicht alle den Cut-off-Wert mit einer antischistosomalen Aktivität von IC<sub>50</sub>-Werten < 10 µM zeigten.

Als Positiv-Kontrolle in jedem Versuchsansatz mitgeführt, zeigte MQ replizierbare Ergebnisse mit mittleren IC<sub>50</sub>-Werten < 2 µM in allen drei Messmethoden (s. Tabelle 4). Die vielfach beschriebene, antischistosomale

Aktivität gegen juvenile *S. mansoni*-Stadien konnte erneut bestätigt werden (53,80).

ART zeigte einen deutlichen Effekt an den Schistosomula ohne eine antischistosomale Aktivität mit  $IC_{50}$ -Werten  $< 10 \mu M$  zu haben. Bei vielfach vorbeschriebener, antischistosomaler Aktivität gegen juvenile Entwicklungsstufen von *S. mansoni* sollte das Medikament in einem weiteren Versuchsaufbau getestet werden, z.B. in einem *ex vivo* Screening mit adulten Würmern oder einem *in vivo* Mausmodell (15,57–59,61,77).

PYRO zeigte eine hohe Aktivität an den Schistosomula und wurde bei  $IC_{50}$ -Werten um  $10 \mu M$  in allen drei Messverfahren als vielversprechender Kandidat mit antischistosomaler Aktivität priorisiert. Bei vorgeschriebener antischistosomaler Wirkung gegen juvenile Würmer *in vitro* und *in vivo* konnten die Aussagen von Xiao et al. durch Koehne et al. bestätigt werden, was PYRO zu einem vielversprechenden Kandidaten für neue, antischistosomale Therapiekonzepte macht, auch wenn gegen adulte Würmer keine ausgeprägte Wirksamkeit besteht (73,76,89–91). Es wird aktuell als Kombinationspräparat PYRO-ART (Pyramax®) gegen die unkomplizierte *P. falciparum*-Malaria bei Kindern und Erwachsenen eingesetzt (89).

Methylenblau wurde in diesem Versuchsdurchlauf als vielversprechender Kandidat für weitere Untersuchungen priorisiert. Wie bei Koehne et al. beschrieben, zeigte MB erfolgreich eine Aktivität gegen Schistosomula *in vitro* und an adulten Würmern *ex vivo* sowie *in vivo* an *S. mansoni*-infizierten Mäusen (73).

Mit der Wirksamkeit von AU konnte die vorbeschriebene antischistosomale Aktivität durch Howe et al. bestätigt werden und AU als vielversprechender Kandidat für weitere Untersuchungen priorisiert werden (95–97,116).

Chinin zeigte einen leichten Effekt an den Schistosomula bei vorbeschriebener antischistosomaler Aktivität (76,80). In der lichtmikroskopischen Auswertung zeigte sich eine deutliche Veränderung der Schistosomula ohne harte Kriterien für tote Schistosomen. Q zeigte in diesem Versuchsaufbau keine antischistosomale Aktivität mit  $IC_{50} < 10 \mu M$ , sollte jedoch innerhalb eines anderen Versuchsaufbaues hinsichtlich seiner langsam wirkenden Aktivität getestet werden.



Die 4-Aminochinolin-Derivate AQ und FQ sowie das 8-Aminochinolin PQ zeigten eine eindeutige antischistosomale Aktivität:

Die Ergebnisse von AQ und FQ weisen auf eine langsam-wirksame antischistosomale Aktivität hin. AQ hatte einen deutlichen Effekt an den Schistosomula mit einer antischistosomalen Aktivität mit  $IC_{50}$ -Werten  $< 10 \mu\text{M}$  bei vorgeschriebener guter, antischistosomaler Wirkung (84,85). Als zugelassenes Kombinationspräparat ART-AQ für die unkomplizierte Malaria tropica sollte AQ besondere Aufmerksamkeit in weiteren Versuchsdurchläufen hinsichtlich der antischistosomalen Aktivität gewidmet werden.

FQ zeigte eine hohe Aktivität an den Schistosomula und wurde bei einer  $IC_{50} \leq 10 \mu\text{M}$  als vielversprechender Kandidat mit antischistosomaler Aktivität priorisiert. Dem Medikament aus der Forschung wurde durch Keiser et al. eine moderate, antischistosomale Aktivität *in vitro* an juvenilen und adulten Schistosomen zugeordnet und sollte deshalb weiterhin untersucht werden (88).

PQ zeigte eine sehr gute Aktivität an den Schistosomula in allen drei Messverfahren und wurde als vielversprechender Kandidat mit  $IC_{50}$ -Werten um  $10 \mu\text{M}$  priorisiert. Eine vorbeschriebene antischistosomale Aktivität durch Holtfreter et al. konnte bestätigt werden (92).

CQ zeigte einen deutlichen Effekt an den Schistosomula bei vorbeschriebener antischistosomaler Wirkung gegen juvenile, weibliche Schistosomen im Mausmodell, während bei adulten Schistosomen kaum Effekte erzielt werden konnten (76,80). CQ wies in diesem Versuchsaufbau keine antischistosomale Aktivität mit  $IC_{50}$ -Werten  $< 10 \mu\text{M}$  auf und wurde nicht als vielversprechender Kandidat priorisiert, sollte jedoch innerhalb anderer Versuchsreihen weiterhin getestet werden.

AT hatte keinen Effekt an den Schistosomula und wurde als „inaktiv“ gewertet, wodurch die Aussage von Keiser et al. bestätigt werden konnte, dass AT keine antischistosomale Aktivität zeigt (80).

Die Folsäureantagonisten Proguanil und WR99210 zeigten einen deutlichen Effekt an den Schistosomen. Beide Substanzen inhibieren die DHFR in Parasiten, ohne dabei mit der menschliche DHFR zu interagieren (83,101)

Proguanil hatte eine antischistosomale Aktivität gezeigt ohne  $IC_{50}$ -Werte  $< 10 \mu\text{M}$  und wurde somit nicht als vielversprechender Kandidat in diesem

Versuchsaufbau priorisiert. Da eine antischistosomale Aktivität nicht explizit vorbeschrieben ist, sollte es in weiteren Versuchsreihen untersucht werden. Als DHFR-Inhibitor könnte PRO die *SmDHFR* hemmen und einen neuen Angriffspunkt in der antischistosomalen Chemotherapie darstellen (101). Cycloguanil hatte im Vergleich zu seinem Prodrug PRO keine antischistosomale Aktivität gezeigt.

WR99210 hatte eine sehr gute antischistosomale Aktivität mit  $IC_{50}$ -Werten  $< 10 \mu M$  gezeigt. In Versuchen mit *P. falciparum* hemmt WR die parasitäre, jedoch nicht die menschliche DHFR, was es zu einem interessanten Kandidaten zur Testung von antischistosomalen Aktivität in weiteren Versuchsreihen macht (102).

Die getesteten Antibiotika aus den Substanzklassen der Tetracycline und Lincosamide hatten keine antischistosomale Aktivität gezeigt, obwohl die Mirincamycin-Isomere einen deutlichen Effekt an den Schistosomen hatten:

TIGE zeigte gute Ergebnisse in der mikroskopischen Beurteilung, die jedoch nicht in den beiden anderen Messverfahren abgebildet werden konnten. CLINDA und DOXY zeigten keinen antischistosomalen Effekt, während die Isomere von Mirincamycin einen deutlichen Effekt an den Schistosomen aufwiesen und weiter getestet werden sollten.

Zusammenfassend zeigten acht Substanzen aus Therapie und Forschung eine antischistosomale Aktivität mit  $IC_{50}$ -Werten  $< 10 \mu M$  und wurden als vielversprechende Kandidaten für weitere Untersuchungen priorisiert: MQ, AU, PQ, FQ, AQ, MB, PYRO und WR. Damit kann eine vorbeschriebene antischistosomale Aktivität von MQ, AU, PQ, AQ, FQ und PYRO bestätigt werden. MB und WR haben sich diesem Versuchsaufbau als vielversprechende Kandidaten ohne vorbeschriebene antischistosomale Aktivität hervorgehoben. Des Weiteren sollte PRO besondere Erwähnung finden, da dieses Malariamedikament ebenfalls einen deutlichen Effekt an den Schistosomula zeigte und für weitere Untersuchungen für neue antischistosomale Medikamente in Betracht gezogen werden sollte.

## 4.2 Versuchsaufbau für die *in vitro* Schistosomula-Wirkstoff-Assays

*In vitro* Screening-Ansätze zur Medikamententestung mit Schistosomula-Kulturen haben in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen, da das Schistosomula-Larvenstadium unter standardisierten Bedingungen in großer Anzahl sehr gut im Labor gehalten werden kann (112). Dabei gibt es Vor- und Nachteile gegenüber *in vivo* Modellen. Beispielsweise ermöglichen *in vitro* Modelle die Untersuchung mehrerer Dosisschemata und die Kombination von Verbindungen auf kosteneffizientere Weise. Andererseits fehlen *in vitro* Modellen Wirtsmechanismen, die in den Tiermodellen vorhanden sind. Das WHO-TDR erkennt diese Einschränkungen an und empfiehlt, dass *in vivo* Screenings nur mit vorangegangenen *in vitro*-aktiven Substanzen durchgeführt werden sollten (112).

In dieser Arbeit wurden die *in vitro* Medikamenten-Screenings nach bestimmten Qualitätskriterien ausgewertet. Es gab mehrere Einflussfaktoren, die es zu berücksichtigen galt:

Für die Medikamentenansätze wurde mit 100 Schistosomula pro Mikrotiterensenkung gearbeitet, was einen geringen Durchsatz darstellt im Vergleich zu anderen Techniken, bei denen bis zu 10-mal mehr Schistosomen eingesetzt werden (s. Tabelle 6) (126). Bei der Anzahl lag eine Streubreite von 15,2 % vor, was keinen erkennbaren Einfluss auf die Auswertung der Messergebnisse darstellte. Vielversprechende Medikamenten-Kandidaten aus dem primären Screening könnten von einer höheren Durchlaufzahl profitieren, da sich damit Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit verbessern lassen, bevor sie in das *in vivo* Screening gehen (112).

Eine Inkubationszeit von 7 Tagen ermöglichte die Identifizierung von langsam-wirksamen Medikamenten mit antischistosomaler Aktivität. Die Schistosomula-Kulturen konnten diese Inkubationszeit unter standardisierten Bedingungen ohne Schaden oder vorzeitigen Tod überleben, wie die No-Drug-Kontrollen (s. Tabelle 5) oder Stock-Kontrollen zeigten. In vorangegangenen Experimenten wurde eine Inkubationszeit von 48-72 h Stunden gewählt, wodurch schnell-wirksame Substanzen identifiziert werden konnten, beziehungsweise eine erste Evaluation innerhalb des Testdurchlaufes bezüglich der Aktivität vorgenommen werden konnte (116).

Die *in vitro* Schistosomula-Kulturen mussten in jedem Ansatz und auf jeder Mikrotiterplatte mikroskopisch eine Lebendigkeit von mindestens 80 % nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen in der No-Drug- und Stock-Kontrolle zeigen (s. Tabelle 5). Die No-Drug- und Stock-Kontrollen wiesen eine durchschnittliche Überlebensrate von über 90 % auf und wurden in jedem Versuchsdurchlauf als regelrecht gewertet. Ein 100 prozentiges Überleben konnte in den Kontrollen nicht abgebildet werden, da sich die experimentellen Gegebenheiten den natürlichen Bedingungen der Parasiten nicht vollständig annäherten. Ursache für eine Überlebensfähigkeit unter 100 % in der *in-vitro* Kultur könnten das „Schütten“ und der Prozess der mechanischen Transformation von Zerkarien zu Schistosomula sein sowie die Menge an verwendetem FBS oder die subjektive mikroskopische Beurteilung (116). Die Positiv-Kontrolle MQ wurde bei bekannter antischistosomaler Aktivität in jedem Wirkstoffansatz mitgeführt (53,73,76,80,82,116). MQ zeigte in allen Wirkstoffansätzen (N=9) und allen drei Messmethoden  $IC_{50}$ -Werte  $< 10 \mu M$  (s. Tabelle 8) sowie einen sigmoidalen Verlauf in den Dosis-Wirkungs-Kurven (s. Abbildung 10) und wurde durchgehend als regelrecht bewertet.

Die neunzehn antiplasmodialen Substanzen wurden in unterschiedlichen Startkonzentrationen in den Verdünnungsreihen pipettiert, um sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurven zu generieren und daraus die benötigten  $IC_{50}$ -Werte berechnen zu können. Der  $IC_{50}$ -Wert liegt bei der Konzentration, wo die halbmaximale Inhibition des Medikamentes erreicht wurde. Um einen solchen Kurvenverlauf zu generieren, müssen die Konzentrationsstufen so gewählt werden, dass bei der niedrigsten Konzentration kein Effekt auf die Parasiten nachweisbar und bei der höchsten Konzentration eine letale Wirkung von 100 % vorhanden ist. Bei einem Großteil der Wirkstoffe zeigten sich sigmoidale Kurvenverläufe in mindestens einer der drei Nachweismethoden und es konnten  $IC_{50}$ -Werte berechnet werden. Bei den Medikamenten PYRO und MB konnte man in den Verdünnungsstufen bis  $10 \mu M$  die  $IC_{50}$ -Werte berechnen bei einer Startkonzentration von  $300 \mu M$ . In diesem Fall könnte man erneute *in vitro*-Screenings mit einer niedrigeren Startkonzentration ansetzen. AU zeigte ebenfalls  $IC_{50}$ -Werte in einer geringen Verdünnungsstufe, hier lag die Startkonzentration bei  $10 \mu M$ . Eine niedrigere Startkonzentration wäre bei der

Anzahl an Verdünnungsschritten mit der manuellen Pipette nicht mehr sicher durchführbar.

#### **4.2.1 Statistische Auswertung der Ergebnisse**

In dem Versuchsaufbau wurde jedes Medikament mit drei verschiedenen Messmethoden gemessen und jeweils dreimal wiederholt. Dabei wurde jedes Medikament im Doppelansatz auf der Mikrotiterplatte angesetzt. Aus diesen biologischen Replikaten konnte ein Mittelwert berechnet werden. Die Abweichung innerhalb der Replikate spiegelt die biologische Variation der Schistosomula unter experimentellen Bedingungen wider. Durch die wiederholte Messung der einzelnen Verdünnungsreihen wurden technische Replikate gewonnen, die die Abweichungen des Messverfahrens sowie Abweichungen der Durchführung darstellten. Durch die geringe Anzahl von Wiederholungen bei teilweise starker Abweichung der drei Versuchsreihen untereinander war die statistische Auswertung eingeschränkt. Die fluorometrisch gemessenen Daten wurden mit einer Hintergrundmessung (SCM) korrigiert, woraus teilweise negative Ergebnisse resultierten, die statistisch nicht dargestellt werden konnten. Es erfolgte eine korrigierte Analyse, wo negative Ergebnisse auf 0 gesetzt worden sind.

Um die drei unterschiedlichen Messverfahren Mikroskopie, Resazurin-Assay und Laktat-Assay vergleichend untereinander betrachten zu können, erfolgte die Normalisierung der Ergebnisse. Die daraus generierten Dosis-Wirkungskurven und  $IC_{50}$ -Werte ermöglichten eine objektive Bewertung der antischistosomalen Aktivität der einzelnen Wirkstoffe in jedem Versuchsdurchlauf, basierend auf der Einhaltung eines Cut-off-Wertes sowie auf dem Grad der Übereinstimmung der einzelnen Messverfahren untereinander (s. Tabelle 4). Des Weiteren wurden durch die mikroskopische Beurteilung der Ansätze eine subjektive Einschätzung der antischistosomalen Aktivität der Medikamente anhand der minimalen letalen Konzentration gewonnen (s. Tabelle 3).

### 4.3 Betrachtung der drei Messmethoden

#### 4.3.1 Analyse der Vitalität der Schistosomula anhand der Lichtmikroskopie

Die Lichtmikroskopie gilt als Goldstandard für die Messung der Vitalität der Schistosomen im Medikamenten-Screening. Das WHO-TDR gibt eine Klassifizierung von 0-4 für die Bestimmung der Lebendigkeit anhand der Beweglichkeit des Wurmes vor (0 = völliger Mangel an Mobilität, 4 = normal aktiv). Daraus wurde eine Skala für die Medikamentenaktivität in den Stufen 1-3 abgeleitet: 3 = aktiv, 2 = mäßig aktiv, 1 = inaktiv (112).

Anders als bei Lombardo et al. oder Ramirez et al. vorbeschrieben, wurde in dieser Arbeit ein binäres Beurteilungssystem mit der Einteilung in „tot-lebendig“ gewählt, da die phänotypischen Veränderungen der toten Parasiten je nach Medikament stark variierten und damit eine einheitliche, morphologische Beurteilung anhand der oben beschriebenen Skalierung erschwerten (112,125). In der statistischen Auswertung konnte daraus die Berechnung der prozentualen Lebendigkeit der Schistosomula und der  $IC_{50}$ -Werte nach 7 Tagen Inkubation erfolgen. Eine gestaffelte Skalierung, wie durch die WHO vorgegeben, hätte die statistische Auswertung erschwert und die subjektive Fehlerbreite erweitert. Die Umwandlung von mikroskopischer Beurteilung der Lebendigkeit in % in  $IC_{50}$ -Werte diene zum einen dazu, eine quantitative Aussage über das subjektive Messverfahren tätigen zu können und zum anderen, um die drei Messverfahren objektiv miteinander vergleichen zu können. Als Kritikpunkt kann man anführen, dass sich die Schistosomula, die sich in verschiedenen Konzentrationsstufen über einen siebentägigen Zeitraum in unterschiedlichen morphologischen Veränderungen zeigten, schwer anhand eines Endpunktes beurteilt werden können, was bei Howe et al. ebenfalls beschrieben worden ist (116). Deshalb wurde neben den  $IC_{50}$ -Werten die minimale letale Konzentration nach 7 Tagen Inkubation abgelesen, also die niedrigste Verdünnungskonzentration, bei der 100 % der Schistosomula tot waren, um einen weiteren Indikator für die antischistosomale Aktivität der antiplasmodialen Substanzen zu haben (s.

Tabelle 9). Die Abweichungen der minimalen letalen Konzentration innerhalb der drei Messungen könnten darauf zurückgeführt werden, dass in den Verdünnungsreihen mit Verdünnungsfaktoren von 1:2 oder 1:3 der wahre Wert zwischen zwei Konzentrationsstufen lag.

Lichtmikroskopische Störfaktoren, wie z.B. Präzipitat-Bildung bei den Wirkstoffen AQ, TIGE, DOXY und WR, sowie Eigenfärbungen, wie z.B. bei Metylenblau, hatten keine Auswirkung auf die Beurteilung.

Um die Lebendigkeit der Schistosomula besser abbilden zu können, wurde auf zwei weitere, objektive Messverfahren zurückgegriffen, in denen Stoffwechselprozesse der Parasiten gemessen wurden.

#### **4.3.2 Analyse der Vitalität der Schistosomula mit dem Resazurin-Assay**

Um den lichtmikroskopischen Nachweis vom Zelltod bzw. der Lebendigkeit der Parasiten besser quantifizieren zu können, wurde der fluorometrisch messbare Lebendigkeitsmarker Resazurin eingesetzt. Wie im Materialien- und Methodenteil unter Punkt 2.8 beschrieben, wurde der Resazurin-Assay nach siebentägiger Inkubationszeit in die 96-Well-Mikrotiterplatte der *in vitro* Schistosomula-Kultur pipettiert, inkubiert und anschließend am Fluorometer gemessen und ausgewertet. Die Konzentration von umgesetzten Resorufin nimmt umgekehrt proportional mit der Zytotoxizität einer Substanz ab. Insgesamt zeigte der Resazurin-Assay eine geringe Fehlerbreite der biologischen und technischen Replika sowie eine schnelle und zuverlässige Endpunktmessung. Mittels des Resazurin-Assays konnte deutlich zwischen lebendigen und toten Schistosomula unterschieden werden. Die erhobenen Ergebnisse stimmten, im Vergleich zum Laktat-Assay, besser mit den Ergebnissen der Mikroskopie überein (s. Tabelle 4). Ein Grund hierfür mag die von Mansour et al. beschriebene, geringere Sensitivität der Messmethode sein, die sich ggf. positiv darauf auswirken könnte, wenn z.B. Abweichungen der Schistosomulazahlen pro Mikrotitereinsenkungen vorhanden sind oder andere enzymatische Störfaktoren vorliegen (114). Im Vergleich zu dem Laktat-Assay zeigt der Resazurin-Assay die Lebendigkeit der Schistosomula zu einem bestimmten Zeitpunkt an, ohne von vorangegangenen Stoffwechselprozessen beeinflusst zu werden.

### 4.3.3 Analyse der Vitalität der Schistosomula mit dem Laktat-Assay

Um das lichtmikroskopische Testverfahren in Zukunft besser quantifizieren zu können, wurde durch Howe et al. mit dem Laktat-Assay ein neues, objektives Messverfahren, basierend auf dem Glukosemetabolismus der Schistosomula, etabliert. Das Endprodukt der Glykolyse aller *Schistosoma* ssp. ist Laktat, welches in die Umgebung sezerniert wird. Dabei stellt die Laktatkonzentration im Medium der *in vitro* Schistosomula-Kulturen proportional die Lebendigkeit der Schistosomula dar. Wie unter dem Punkt 2.9 in Materialien und Methoden beschrieben, wurden nach siebentägiger Inkubation 10 µl Medium aus der *in vitro* Schistosomula-Kultur entnommen, in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt, wie in Abbildung 9 beschrieben angesetzt und anschließend am Fluorometer gemessen und ausgewertet. Der Laktat-Assay konnte zu jedem Zeitpunkt innerhalb der Inkubationsperiode durchgeführt werden, ohne die *in vitro*-Kulturen in einer Weise zu unterbrechen. Entnommene Mediumproben ließen sich problemlos bei -80 °C aufbewahren und zu einem beliebigen Zeitpunkt messen.

In vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich eine starke Korrelation des Laktatspiegels mit der Anzahl der Schistosomula, sodass die Schistosomula-Anzahl pro Mikrotitereinsenkung keine starken Abweichungen aufweisen durfte (116). Ein resultierender Nachteil daraus war, dass die Schistosomula-Zahlen mikroskopisch geprüft werden mussten, was zeit- und arbeitsintensiv gewesen ist.

Ein weiterer Punkt ist, dass sich das Laktat durch den Stoffwechsel der Schistosomula von Beginn der Inkubationsperiode an in dem Kulturmedium ansammelt. Bei langsam wirksamen Substanzen, die eine späte schistosomizide Wirkung haben, könnte dadurch der Eindruck entstehen, dass eine metabolische Aktivität vorhanden ist. Bei der Auswertung könnten somit falsch hohe RFU-Werte gemessen werden, die in Diskrepanz zu den Ergebnissen der Mikroskopie und des Resazurin-Assays stehen oder die RFU-Werte bzw. die IC<sub>50</sub>-Werte gar nicht erst messbar waren. Bei den Medikamenten AQ, FQ und Q war dies möglicherweise der Fall (s. Tabelle 4). Um dieses Phänomen genauer zu prüfen, könnte man eine mikroskopische



Kontrolle und Laktat-Assay-Messung an Tag 3 der Inkubation durchzuführen, um langsam wirksame von schnell wirksamen Substanzen zu unterscheiden.

Der Laktat-Assay ist durch enzymatische Rückreaktionen anfälliger für Störfaktoren. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Wirkstoffe einen Effekt auf die Aktivität der LDH haben (116). Des Weiteren könnten sich die NADH-Spiegel in den Kulturmedien im Laufe der Inkubationszeit ändern, da z.B. durch geschädigte Parasiten NADH in die Umgebung abgegeben werden könnte (116). In beiden Fällen würde es zu falsch hohen oder falsch niedrigen Messwerten kommen. In der Zusammenschau sollte der Laktat-Assay aufgrund der Anfälligkeit für Störfaktoren nicht als einziger Lebendigkeitsmarker genutzt werden.

Zusammenfassend haben alle drei Messverfahren zur Bestimmung der Lebendigkeit der Schistosomula *in vitro* Vor- und Nachteile:

Die lichtmikroskopische Beurteilung ist einerseits subjektiv, zeitaufwändig und erschwert hohe Durchsätze bei den *in vitro* Medikamenten-Screenings. Auf der anderen Seite können bereits geringe morphologische Veränderungen der Schistosomula als Reaktion auf den jeweiligen Wirkstoff und die jeweilige Verdünnungskonzentration detektiert werden.

Der Resazurin-Assay ist eine schnelle, einfach durchführbare und kostengünstige Messmethode, die eine geringe Anfälligkeit für Störfaktoren aufweist und objektive Ergebnisse erzeugt. Er könnte, wie bei Mansour et al. beschrieben, zur Automatisierung von hohen Durchsätzen (high throughput screening, HTS) eingesetzt werden (114). Beispielsweise könnte der Resazurin-Assay als erste Stufe in großangelegten *in vitro* Medikamenten-Screenings eine schnelle und zuverlässige Auswertung in tote bzw. geschädigte Schistosomula vornehmen, bevor im Anschluss eine manuelle, mikroskopische Auswertung erfolgt. Der geringeren Sensitivität des Resazurin-Assays bei der Detektion von geringen morphologischen Veränderungen der Schistosomula könnte damit entgegengewirkt werden. Zusammenfassend eignet sich der Resazurin-Assay hervorragend als ergänzende Methode zur Mikroskopie in einem *in vitro* Medikamenten-Screening.

Der Laktat-Assay ist ebenfalls ein kostengünstiges, objektives und quantitatives Messverfahren, im Vergleich zum Resazurin-Assay jedoch anfälliger gegenüber Störfaktoren und Verfahrensfehlern. Vor allem die Abhängigkeit zwischen der Schistosomulazahl pro Mikrotiterplatte und der Laktatkonzentration sowie die Akkumulation von Laktat bei langsam wirksamen Medikamenten verfälschten möglicherweise die Messergebnisse trotz höherer Sensitivität und breiterem Nachweisbereich.

#### **4.4 Schlussfolgerung**

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen eine vielversprechende Auswahl von antiplasmodialen Substanzen mit einer zusätzlichen antischistosomalen Aktivität. Die Wiederverwendung bereits zugelassener Medikamente stellt hierbei eine kosteneffiziente und schnelle Möglichkeit dar, um neue Therapieoptionen zu erforschen und sollte in klinischen Studien weiter geprüft werden. Idealerweise sollte ein neuer antischistosomaler Wirkstoff eine breite therapeutische Aktivität gegen die verschiedenen Entwicklungsstadien des Parasiten zeigen, um die einzelnen Infektionsstufen der Schistosomiasis behandeln zu können. Mefloquin, Pyronaridin, Auranofin, Amodiaquin, Primaquin und Ferroquin greifen in die unterschiedlichen Entwicklungsstufen der Schistosomen ein und konnten in ihrer vorbeschriebenen antischistosomalen Aktivität bestätigt werden. Methylenblau und WR99210 dürfte besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden, da diese Wirkstoffe keine vorbeschriebene antischistosomale Aktivität hatten. MB z.B. zeigte sowohl in dieser Arbeit als auch in darauffolgenden Untersuchungen durch Koehne et al. innerhalb der Arbeitsgruppe Kreidenweiss des Tropeninstitutes der Eberhard Karls Universität in Tübingen eine antischistosomale Wirkung gegen juvenile Entwicklungsstadien von *Schistosoma ssp. in vitro* und adulten Schistosomen *in vivo* (73). Proguanil, ein antiplasmodialer DHFR-Inhibitor, sollte bei deutlichem antischistosomalen Effekt ebenfalls für weitere Untersuchungen in Betracht gezogen werden.

Für die Beurteilung der Lebendigkeit der Schistosomula-Kulturen wurden drei unterschiedliche Messverfahren angewandt. Abschließend kann keine eindeutige Aussage darüber getätigt werden, welche der drei Messmethoden am besten und effektivsten die Lebendigkeit der Schistosomula *in vitro*

abgebildet hat. Generell kann man sagen, dass sich die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse bei höheren Durchlaufzahlen verbessern würde. Da alle drei Messmethoden auf unterschiedlichen Ebenen der Beurteilung der Lebendigkeit von *Schistosomula* ansetzen, fällt ein pauschalisierter Vergleich schwer. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass aktive Substanzen wie z.B. MQ, AU, PQ, FQ, AQ, MB, PYRO und WR in allen drei Messverfahren reproduzierbare Ergebnisse geliefert haben und inaktive Wirkstoffe wie z.B. AT, DOXY, CYCLO und CLINDA in allen drei Messverfahren erkannt wurden. Sowohl der Resazurin-Assay als auch der Laktat-Assay bieten einen vielversprechenden, neuen Ansatz zur Beurteilung der Lebendigkeit der *in vitro* *Schistosomula*-Kulturen neben der Lichtmikroskopie.

## 5 Zusammenfassung

Die Schistosomiasis zählt zu den am häufigsten vernachlässigten Tropenerkrankungen (NTD) weltweit. Es handelt sich um eine akut und chronisch verlaufende, parasitäre Erkrankung, die durch eine Infektion mit Trematoden der Gattung *Schistosoma* hervorgerufen wird. Die Übertragung erfolgt durch infektiöses Süßwasser und führt zu einer erheblichen Verkürzung der Lebenserwartung sowie körperlichen und kognitiven Beeinträchtigungen.

Praziquantel (PZQ) ist seit 1980 das am häufigsten eingesetzte Medikament zur Therapie und Prävention der Schistosomiasis und zurzeit die einzige Therapieoption. PZQ ist gegen den adulten Wurm, jedoch nicht gegen die juvenilen Entwicklungsstufen von *Schistosoma ssp.* wirksam. Reinfektionen in Endemiegebieten sind häufig und Behandlungen in einem frühen Entwicklungsstadium nicht möglich. Der weit verbreitete und langjährige Einsatz von PZQ, z.B. in großangelegten Kontrollprogrammen, birgt zudem das Risiko der Entstehung von PZQ-resistenten Schistosomen, was die Forschung nach neuen Therapiemöglichkeiten unerlässlich macht.

Substanzen mit antiplasmodialer Aktivität haben in klinischen Studien eine Wirkung gegen die Schistosomiasis gezeigt und sind ein guter Startpunkt für neue, medikamentöse Therapiekonzepte. Sie sind auch von besonderem Interesse, da z.B. in sub-Sahara Afrika Koinfektionen von *Schistosoma ssp.* und *Plasmodium ssp.* vorhanden sind und eine gleichzeitige Therapie beider Infektionen von Vorteil ist.

Der Lebenszyklus von *Schistosoma ssp.* lässt sich unter standardisierten Laborbedingungen mit Süßwasserschnecken als Zwischenwirt und der Maus als Endwirt vollständig abbilden. Für die Untersuchung der antiplasmodialen Substanzen auf antischistosomale Aktivität wurde ein dreistufiger Testansatz aufgesetzt. In einem ersten Schritt erfolgte das Screening der Wirkstoffe hinsichtlich ihrer Aktivität gegen das Larvenstadium Schistosomula von *S. mansoni*, welches sich in hoher Anzahl *in vitro* kultivieren lässt und Tierversuche vermeidet.

In der vorliegenden, experimentellen Doktorarbeit wurden zwei wichtige Aspekte analysiert:

Zum einen wurden 19 Substanzen aus der Malariatherapie und -forschung darauf untersucht, ob sie einen Effekt gegen das *Schistosoma mansoni*-Larvenstadium Schistosomula zeigten und ob sie eine definierte, antischistosomale Aktivität hatten. Als Ergebnis konnten acht Substanzen mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ )  $< 10 \mu\text{M}$  als grundsätzlich vielversprechende Wirkstoffe mit antischistosomaler Aktivität für weiterführende Studien priorisiert werden: Mefloquin, Auranofin, Pyronaridin, Methylenblau, Primaquin, Amodiaquin, Ferroquin und WR99210. Diese Beispiele demonstrieren das Potential antiplasmodialer Substanzen für neuartige Therapien gegen die Schistosomiasis und sollten in weiteren klinischen Studien getestet werden.

Zum anderen wurden zwei alternative Messmethoden zur Beurteilung der Lebendigkeit der Schistosomula nach Wirkstoffexposition getestet und verglichen. Die Mikroskopie gilt als Goldstandard zur Beurteilung von morphologischen Veränderungen, ist jedoch ein subjektives und deskriptives Messverfahren, welches keinen hohen Durchsatz an Substanzen zum Aktivitätsscreening erlaubt. Neben der Mikroskopie erfolgte die objektive Vitalitätsbeurteilung mittels Fluorometrie mit dem Zellaktivitätsmarker Resazurin und einem neu etablierten Laktat-Assay.

Es zeigte sich, dass die beiden neuen Messverfahren schnelle, zuverlässige und konstante Resultate erbracht und in weiterführenden Versuchen reproduzierbare Ergebnisse geliefert haben. Sie stellen eine wertvolle Ergänzung zur Beurteilung der Lebendigkeit der *in vitro* Schistosomula-Kulturen neben der Lichtmikroskopie dar und sollten in zukünftigen Untersuchungen Anwendung finden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. WHO Schistosomiasis (Bilharzia) [Internet]. [cited 2022 Mar 12]. Available from: [https://www.who.int/health-topics/schistosomiasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/schistosomiasis#tab=tab_1)
2. WHO Schistosomiasis fact sheet 2022 [Internet]. 2022 [cited 2022 Mar 10]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>
3. Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop* [Internet]. 2000 Oct 23 [cited 2022 Mar 13];77(1):41. Available from: [/pmc/articles/PMC5633072/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11511111/)
4. WHO Expert Committee. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. WHO Technical report series. 2002;912:1–57.
5. Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research [Internet]. Vol. 82, *Acta Tropica*. 2002. Available from: [www.parasitology-online.com](http://www.parasitology-online.com)
6. Ed. D. Rollinson, A. J. G. Simpson. *The Biology of Schistosomes. From Genes to Latrines*. Ed. D. Rollinson and A. J. G. Simpson. 472 pages. ISBN 0 12 593692 3. Academic Press, London, 1987. £37.00. *Parasitology* [Internet]. 1988 Dec [cited 2022 Mar 13];97(3):506–506. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/abs/biology-of-schistosomes-from-genes-to-latrines-ed-d-rollinson-and-a-j-g-simpson-472-pages-isbn-0-12-593692-3-academic-press-london-1987-3700/9623C48DF8FC5E25FA55559C85C54673>
7. Manson P. *Manson's Tropical Diseases*. Cook GC, Zumla AI, editors. Vol. Twenty-second. Saunders, Elsevier; 2008. 1425–1455 p.
8. World Health Organisation [Internet]. 2021 [cited 2022 Mar 30]. *Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: treating millions of people, despite the pandemic*. Available from: <https://www.who.int/news/item/08-12-2021-schistosomiasis-and-soil->

- transmitted-helminthiasis-treating-millions-of-people-despite-the-pandemic
9. World Health Organisation. The control of Schistosomiasis. 1985 [cited 2022 Mar 12]; Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39529/WHO\\_TRS\\_728.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39529/WHO_TRS_728.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
  10. Vickers D, Ross AG, Olds GR, Shah SM, Mcmanus DP. Katayama syndrome [Internet]. Vol. 7. 2007. Available from: <http://infection.thelancet.com>
  11. Schistosomiasis | GSA [Internet]. [cited 2022 Mar 12]. Available from: <https://www.eliminatesthechisto.org/working-together/schistosomiasis>
  12. Nelwan ML. Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control. *Curr Ther Res Clin Exp* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2022 Mar 31];91:5–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.curtheres.2019.06.001>
  13. Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. Vol. 368, *Lancet*. Elsevier B.V.; 2006. p. 1106–18.
  14. Centers for Disease Control and Prevention. CDC - DPDx - Schistosomiasis Infection [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/index.html>
  15. Liu R, Dong HF, Guo Y, Zhao QP, Jiang MS. Efficacy of praziquantel and artemisinin derivatives for the treatment and prevention of human schistosomiasis: a systematic review and meta-analysis. 2011 [cited 2022 May 31]; Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/201>
  16. di Bella S, Riccardi N, Giacobbe DR, Luzzati R. History of schistosomiasis (bilharziasis) in humans: from Egyptian medical papyri to molecular biology on mummies. *Pathog Glob Health* [Internet]. 2018 Jul 4 [cited 2021 Nov 24];112(5):268. Available from: [/pmc/articles/PMC6225400/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3225400/)
  17. Wei O. Internal organs of a 2100-year-old female corpse. *Lancet*. 1973 Nov 24;2:1198-pp.
  18. Wilfred Thomas B, Rolleston HD, Physician FC, George S, Hospital S. Note on the presence of “*Bilharzia haematobia*” in egyptian mummies of the twentieth dynasty [1250-1000 B.C.]. *Br Med J* [Internet]. 1910 Jan 1

- [cited 2022 Mar 12];1(2557):16. Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2330583/>
19. Contis G, David AR. The epidemiology of Bilharzia in Ancient Egypt: 5000 years of schistosomiasis. *Parasitology Today*. 1996 Jul;12(7):253–5.
  20. Barakat RMR. Epidemiology of Schistosomiasis in Egypt: Travel through Time: Review. *J Adv Res [Internet]*. 2013 Sep [cited 2022 Mar 12];4(5):425. Available from: </pmc/articles/PMC4293883/>
  21. Shaker Y, Samy N, Ashour E. Hepatobiliary schistosomiasis. *J Clin Transl Hepatol*. 2014;2(3):212–6.
  22. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. In: *The Lancet*. Elsevier B.V.; 2014. p. 2253–64.
  23. Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit. Leitlinie: Diagnostik und Therapie der Schistosomiasis (Bilharziose) Ziele und Kontext. AWMF online [Internet]. 2017 Oct [cited 2022 Apr 12]; Available from:  
[www.who.int/schistosomiasis/epidemiology/global\\_atlas\\_maps/en/index.html](http://www.who.int/schistosomiasis/epidemiology/global_atlas_maps/en/index.html)
  24. Kiehl W, Robert Koch-Institut. Steckbriefe seltener und importierter Infektionskrankheiten. 2011.
  25. Id EJ, Sanyang Id AM, Camara Y, Papa A, Id S, Baldeh I, et al. Prevalence and risk factors of schistosomiasis among primary school children in four selected regions of The Gambia. 2021 [cited 2022 Apr 27]; Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009380>
  26. Taman A, El-Beshbishi S. Laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni: Current status and future trends. *Asian Pac J Trop Med [Internet]*. 2019 Jun 1 [cited 2022 May 23];12(6):243. Available from:  
<https://www.apjtm.org/article.asp?issn=1995-7645;year=2019;volume=12;issue=6;spage=243;epage=249;aulast=Taman>
  27. Ross AGP, Bartley PB, Sleight AC, Olds R. Schistosomiasis. *J Med [Internet]*. 2002 [cited 2022 May 20];346(16). Available from:  
[www.nejm.org](http://www.nejm.org)



28. Bärenbold O, Garba A, Colley Id DG, Fleming Id FM, Assaré RK, Tukahebwa EM, et al. Estimating true prevalence of *Schistosoma mansoni* from population summary measures based on the Kato-Katz diagnostic technique. 2021 [cited 2022 May 23]; Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009310>
29. Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis Mansoni New schistomicidal and molluscidal compounds View project [Internet]. 1971. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/18489942>
30. Utzinger J, Becker SL, van Lieshout L, van Dam GJ, Knopp S. New diagnostic tools in schistosomiasis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015 Jun 1;21(6):529–42.
31. Sturrock RF. *Schistosomiasis Epidemiology and Control: How Did We Get Here and Where Should We Go?* Vol. 96, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2001.
32. Lodh N, Mwansa JCL, Mutengo MM, Shiff CJ. Diagnosis of *Schistosoma mansoni* without the Stool: Comparison of Three Diagnostic Tests to Detect *Schistosoma mansoni* Infection from Filtered Urine in Zambia. 2013;89(1):46–50.
33. Gray DJ, Ross AG, Li YS, McManus DP. Diagnosis and management of schistosomiasis. *BMJ* [Internet]. 2011 May 17 [cited 2022 Jul 18];342(7807). Available from: <https://www.bmj.com/content/342/bmj.d2651>
34. Utzinger J, Booth M, N’Goran EK, Müller I, Tanner M, Lengeler C. Relative contribution of day-to-day and intra-specimen variation in faecal egg counts of *Schistosoma mansoni* before and after treatment with praziquantel. *Parasitology* [Internet]. 2001 [cited 2022 Jul 18];122(5):537–44. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/abs/relative-contribution-of-daytoday-and-intraspecimen-variation-in-faecal-egg-counts-of-schistosoma-mansoni-before-and-after-treatment-with-praziquantel/E8074869D174EA9BA46EABD17C1B0483>

35. Doenhoff MJ, Chiodini PL, Hamilton J v. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? *Trends Parasitol.* 2004 Jan 1;20(1):35–9.
36. de Vlas SJ, Engels D, Rabello ALT, Oostburg BFJ, van Lieshout L, Polderman AM, et al. Validation of a chart to estimate true *Schistosoma mansoni* prevalences from simple egg counts. *Parasitology* [Internet]. 1997 [cited 2022 May 23];114(2):113–21. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/abs/validation-of-a-chart-to-estimate-true-schistosoma-mansoni-prevalences-from-simple-egg-counts/16B8A6B16F5BBC2A8FC07A5F2A70AD09>
37. Doenhoff MJ, Butterworth AE, Hayes RJ, Sturrock RF, Ouma JH, Koech D, et al. Seroepidemiology and serodiagnosis of schistosomiasis in Kenya using crude and purified egg antigens of *Schistosoma mansoni* in ELBA [Internet]. Vol. 87. 1993. Available from: <https://academic.oup.com/trstmh/article/87/1/42/1944059>
38. Doenhoff MJ, Chiodini PL, Hamilton J v. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? *Trends Parasitol.* 2004 Jan 1;20(1):35–9.
39. Stothard JR, Stanton MC, Bustinduy AL, Sousa-Figueiredo JC, van Dam GJ, Betson M, et al. Diagnostics for schistosomiasis in Africa and Arabia: A review of present options in control and future needs for elimination. *Parasitology.* 2014 Dec 12;141(14):1947–61.
40. Cai YC, Xu JF, Steinmann P, Chen SH, Chu YH, Tian LG, et al. Field comparison of circulating antibody assays versus circulating antigen assays for the detection of schistosomiasis japonica in endemic areas of China. 2014 [cited 2022 Jul 13]; Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/138>
41. de Oliveira EJ, Kanamura HY, Takei K, Hirata RDC, Valli LCP, Nguyen NY, et al. Synthetic peptides as an antigenic base in an ELISA for laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008 Apr;102(4):360–6.
42. Standley CJ, Lwambo N, Lange CN, Kariuki HC, Adriko M, Stothard JR. Performance of circulating cathodic antigen (CCA) urine-dipsticks for

- rapid detection of intestinal schistosomiasis in schoolchildren from shoreline communities of Lake Victoria [Internet]. 2010. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/3/1/7>
43. Coulibaly JT, N’Gbesso YK, Knopp S, N’Guessan NA, Silué KD, van Dam GJ, et al. Accuracy of Urine Circulating Cathodic Antigen Test for the Diagnosis of *Schistosoma mansoni* in Preschool-Aged Children before and after Treatment. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2013 [cited 2022 May 23];7(3):e2109. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002109>
  44. Colley DG, Binder S, Campbell C, King CH, Tchuem LA, N’goran K, et al. A Five-Country Evaluation of a Point-of-Care Circulating Cathodic Antigen Urine Assay for the Prevalence of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2013;88(3):426–32. Available from: <http://score.uga.edu/>
  45. Ochodo EA, Gopalakrishna G, Spek B, Reitsma JB, van Lieshout L, Polman K, et al. Circulating antigen tests and urine reagent strips for diagnosis of active schistosomiasis in endemic areas. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015 Mar 11;2015(3).
  46. Gomes LI, Johannes Enk M, Rabello A. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* Diagnosing schistosomiasis: where are we? [cited 2022 May 23]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0231-2013>
  47. Lène Gueganid H, Fillaux J, Na Charpentier E, Robert-Gangneux F, Chauvin P, Guemas E, et al. Real-time PCR for diagnosis of imported schistosomiasis. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007711>
  48. ten Hove RJ, Verweij JJ, Vereecken K, Polman K, Dieye L, van Lieshout L. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2008 Feb 1 [cited 2022 May 27];102(2):179–85. Available from: <https://academic.oup.com/trstmh/article/102/2/179/1921044>

49. Wichmann D, Panning M, Quack T, Kramme S, Burchard GD, Greveling C, et al. Diagnosing Schistosomiasis by Detection of Cell-Free Parasite DNA in Human Plasma. Available from: [www.plosntds.org](http://www.plosntds.org)
50. Rollinson D. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta Trop*. 2013;128;2:423–40.
51. King CH, Bertsch D. Meta-analysis of Urine Heme Dipstick Diagnosis of *Schistosoma haematobium* Infection, Including Low-Prevalence and Previously-Treated Populations. Available from: <http://www.nandinidendukuri>.
52. da Silva VBR, Campos BRKL, de Oliveira JF, Decout JL, do Carmo Alves de Lima M. Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine. *Bioorg Med Chem [Internet]*. 2017 [cited 2022 May 19];25(13):3259–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28495384/>
53. Thetiot-Laurent SAL, B. *Chemotherapie gegen Schistosomiasis*. Wiley - *Angewandte Chemie*. 2013;
54. Salvador-Recatai V, Greenberg RM. Calcium channels of schistosomes: unresolved questions and unexpected answers. *WIREs Membr Transp Signal [Internet]*. 2012;1:85–93. Available from: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/Default.htm>
55. Greenberg RM. Are Ca<sup>2+</sup> channels targets of praziquantel action? *Int J Parasitol*. 2005 Jan 1;35(1):1–9.
56. Xie Y, Li Y, Wu Y, Liu C, Li X, Li X, et al. Synthesis of fluorescent derivatives of praziquantel: cell-imaging and interaction with *Schistosoma japonicum cercariae*. *Org Biomol Chem [Internet]*. 2013 Sep 28 [cited 2022 May 19];11(36):5989–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23925274/>
57. Keiser J, Utzinger J. Antimalarials in the Treatment of Schistosomiasis. *Curr Pharm Des*. 2012;
58. Mnkugwe RH, Minzi O, Kinung'hi S, Kamuhabwa A, Id EA. Efficacy and safety of praziquantel and dihydroartemisinin piperazine combination for treatment and control of intestinal schistosomiasis: A randomized, non-

- inferiority clinical trial. 2020 [cited 2022 May 18]; Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008619>
59. Ross AGP, Chau TN, Inobaya MT, Olveda RM, Li Y, Harn DA. A new global strategy for the elimination of schistosomiasis. Vol. 54, International Journal of Infectious Diseases. Elsevier B.V.; 2017. p. 130–7.
  60. Ho WE, Peh HY, Chan TK, Wong WSF. Artemisinins: Pharmacological actions beyond anti-malarial. Pharmacol Ther. 2014 Apr 1;142(1):126–39.
  61. Pérez Del Villar L, Burguillo FJ, Ló Pez-Abá J, Muro A. Systematic Review and Meta-Analysis of Artemisinin Based Therapies for the Treatment and Prevention of Schistosomiasis. 2012 [cited 2022 May 18]; Available from: [www.plosone.org](http://www.plosone.org)
  62. Hou XY, Mcmanus DP, Gray DJ, Balen J, Luo XS, He YK, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of safety and efficacy of combined praziquantel and artemether treatment for acute schistosomiasis japonica in China. Bull World Health Organ. 2008;86(10).
  63. Abou-El-Naga IF. Schistosoma mansoni sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPases (SERCA): role in reduced sensitivity to praziquantel. 2020 [cited 2022 May 19]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s10863-020-09843-7>
  64. Wang W, Wang L, Liang YS. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. 2012;
  65. Cioli D. Praziquantel: Is there real resistance and are there alternatives? Curr Opin Infect Dis. 2000 Dec;13(6):659–63.
  66. Botros SS, Bennett JL. Praziquantel resistance. Expert Opin Drug Discov. 2007 Oct;2(SUPPL. 1).
  67. Gryseels B, Mbaye A, de Vlas SJ, Stelma FF, Guisse Â F, van Lieshout L, et al. Are poor responses to praziquantel for the treatment of Schistosoma mansoni infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. 2001.
  68. Collyer BS, Turner HC, Hollingsworth TD, Keeling MJ. Vaccination or mass drug administration against schistosomiasis: a hypothetical cost-

- effectiveness modelling comparison. 2019 [cited 2022 May 20]; Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3749-4>
69. Bergquist VR, Colley DG. Schistosomiasis Vaccine: Research to Development. *Parasitology Today*. 1998 Mar 1;14(3):99–104.
  70. Riveau G, Schacht AM, Dompnier JP, Deplanque D, Seck M, Waucquier N, et al. Safety and efficacy of the rSh28GST urinary schistosomiasis vaccine: A phase 3 randomized, controlled trial in Senegalese children. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006968>
  71. Rollinson D, Knopp S, Levitz S, Stothard JR, Tchuem Tchuente LA, Garba A, et al. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta Trop*. 2013 Nov 1;128(2):423–40.
  72. Jordan P. From Katayama to the Dakhla Oasis: the beginning of epidemiology and control of bilharzia. *Acta Trop*. 2000 Oct 23;77(1):9–40.
  73. Koehne E, Zander N, Rodi M, Held J, Hoffmann W, Zoleko-Manego R, et al. Evidence for in vitro and in vivo activity of the antimalarial pyronaridine against *Schistosoma*. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2021 [cited 2022 Apr 27]; Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009511>
  74. Panic G, Duthaler U, Speich B, Keiser J. Repurposing drugs for the treatment and control of helminth infections. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2014;4(3):185–200.
  75. Rathore D, Jani D, Nagarkatti R, Kumar S, Kumar S, Woodnutt -CovX G, et al. Heme detoxification and antimalarial drugs-Known mechanisms and future prospects. *Drug Discov Today Ther Strateg* [Internet]. 2006; Available from: [www.drugdiscoverytoday.com](http://www.drugdiscoverytoday.com)
  76. Xiao S hua, Sun J. *Schistosoma* hemozoin and its possible roles. Vol. 47, *International Journal for Parasitology*. Elsevier Ltd; 2017. p. 171–83.
  77. Utzinger J, Shu-Hua X, Tanner M, Keiser J. Artemisinin for schistosomiasis and beyond. *Curr Opin Investig Drugs* [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2022 May 30];8(2):105–16. Available from: <https://europepmc.org/article/med/17328226>
  78. Schlitzer M. Malaria chemotherapeutics part I: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development. Vol. 2, *ChemMedChem*. 2007. p. 944–86.

79. Lam NS, Long X, Su XZ, Lu F. Artemisinin and its derivatives in treating helminthic infections beyond schistosomiasis. *Pharmacol Res* [Internet]. 2018;133:77–100. Available from: [www.elsevier.com/locate/yphrs](http://www.elsevier.com/locate/yphrs)
80. Keiser J, Chollet J, Xiao SH, Mei JY, Jiao PY, Utzinger J, et al. Mefloquine—An Aminoalcohol with Promising Antischistosomal Properties in Mice. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2009 [cited 2022 Jul 28];3(1):e350. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000350>
81. Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit (DTG).
82. Keiser J, N NA, Adoubryn KD, Silué KD, Vounatsou P, Hatz C, et al. Efficacy and Safety of Mefloquine, Artesunate, Mefloquine-Artesunate, and Praziquantel against *Schistosoma haematobium*: Randomized, Exploratory Open-Label Trial. 2010;1205. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/50/9/1205/314730>
83. Stich A, Schlitzer M. Wirkstoffe zur Therapie und Prophylaxe der Malaria [Internet]. 2008 [cited 2022 Jun 10]. Available from: <https://www.arzneimitteltherapie.de/heftarchiv/2008/05/wirkstoffe-zur-therapie-und-prophylaxe-der-malaria.html>
84. Mbanzulu KM, Zanga JK, Mukendi JPK, Mbaya Ntita F, Matangila JR, Muhindo HM, et al. The impact of artesunate-amodiaquine on *Schistosoma mansoni* infection among children infected by plasmodium in rural area of Lemfu, Kongo Central, Democratic Republic of the Congo. *Biomed Res Int*. 2018;2018.
85. Kato K, Miura M, Mitsui Y. In vitro effects of amodiaquine on paired *Schistosoma mansoni* adult worms at concentrations of less than 5 µg/mL. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2013 [cited 2022 Oct 10];108(2):192–6. Available from: <http://www.scielo.br/j/mioc/a/7DvLKs576XLmBZf7JWNxcNM/abstract/?lang=en>
86. Dive D, Biot C. Ferrocene Conjugates of Chloroquine and other Antimalarials: the Development of Ferroquine, a New Antimalarial. *ChemMedChem* [Internet]. 2008 Mar 14 [cited 2022 Aug 3];3(3):383–91.

Available from:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cmdc.200700127>

87. Barends M, Jaidee A, Khaohirun N, Singhasivanon P, Nosten F. In vitro activity of ferroquine (SSR 97193) against *Plasmodium falciparum* isolates from the Thai-Burmese border. *Malar J* [Internet]. 2007 Jun 27 [cited 2022 Aug 3];6(1):1–5. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-6-81>
88. Keiser J, Vargas M, Rubbiani R, Gasser G, Biot C. In vitro and in vivo antischistosomal activity of ferroquine derivatives. *Parasit Vectors* [Internet]. 2014 Sep 4 [cited 2022 Aug 3];7(1):1–7. Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-424>
89. Chaires JB, Travers A. Pyronaridine: An update of its pharmacological activities and mechanisms of action. *Biopolymers* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2022 Aug 3];112(4):e23398. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bip.23398>
90. Bailly C. Pyronaridine: An update of its pharmacological activities and mechanisms of action. *Biopolymers* [Internet]. 2021; Available from: <https://doi.org/10.1002/bip.23398>
91. Xue J, Jiang B, Liu CS, Sun J, Xiao SH. Comparative observation on inhibition of hemozoin formation and their in vitro and in vivo anti-schistosome activity displayed by 7 antimalarial drugs. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2022 Aug 3];31(3):161–9. Available from: <https://europepmc.org/article/med/24812850>
92. Holtfreter MC, Loebermann M, Klammt S, Sombetzki M, Bodammer P, Riebold D, et al. *Schistosoma mansoni*: Schistosomicidal effect of mefloquine and primaquine in vitro. *Exp Parasitol*. 2011 Jan 1;127(1):270–6.
93. Campbell S, Soman-Faulkner K. Antiparasitic Drugs. *StatPearls* [Internet]. 2019 Jul 24 [cited 2022 Oct 14]; Available from: <http://europepmc.org/books/NBK544251>



94. de Mori RM, Aleixo MAA, Zapata LCC, Calil FA, Emery FS, Nonato MC. Structural basis for the function and inhibition of dihydroorotate dehydrogenase from *Schistosoma mansoni*. *FEBS J* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2022 Aug 3];288(3):930–44. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.15367>
95. Roder C, Thomson MJ. Auranofin: Repurposing an Old Drug for a Golden New Age. *Drugs R D* [Internet]. 2015 Mar 14 [cited 2022 Aug 3];15(1):13. Available from: </pmc/articles/PMC4359176/>
96. Kuntz AN, Davioud-Charvet E, Sayed AA, Califf LL, Dessolin J, Arnér ESJ, et al. Thioredoxin Glutathione Reductase from *Schistosoma mansoni*: An Essential Parasite Enzyme and a Key Drug Target. *PLoS Med* [Internet]. 2007 [cited 2022 Aug 3];4(6):e206. Available from: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.0040206>
97. Sannella AR, Casini A, Gabbiani C, Messori L, Bilia AR, Vincieri FF, et al. New uses for old drugs. Auranofin, a clinically established antiarthritic metallodrug, exhibits potent antimalarial effects in vitro: Mechanistic and pharmacological implications. *FEBS Lett*. 2008 Mar 19;582(6):844–7.
98. Angelucci F, Sayed AA, Williams DL, Boumis G, Brunori M, Dimastrogiovanni D, et al. Inhibition of *Schistosoma mansoni* Thioredoxin-glutathione Reductase by Auranofin. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2009 Oct 16 [cited 2022 Nov 13];284(42):28977–85. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820382661/fulltext>
99. Schirmer RH, Coulibaly B, Stich A, Scheiwein M, Merkle H, Eubel J, et al. Redox Report Communications in Free Radical Research Methylene blue as an antimalarial agent. *Redox Report* [Internet]. 2013; Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=yrrer20>
100. Ebenezer K, Patnaik S, Natarajan MM, James J. Methylene blue unresponsive methemoglobinemia. *Indian Journal of Critical Care Medicine* [Internet]. 2014; Available from: [www.ijccm.org](http://www.ijccm.org)
101. Serrão VHB, Romanello L, Cassago A, de Souza JRT, Cheleski J, DeMarco R, et al. Structure and kinetics assays of recombinant

- Schistosoma mansoni dihydrofolate reductase. *Acta Trop.* 2017 Jun 1;170:190–6.
102. Fidock DA, Wellems TE. Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites insensitive to WR99210 but does not affect the intrinsic activity of proguanil. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1997 Sep 9 [cited 2022 Aug 8];94(20):10931. Available from: [/pmc/articles/PMC23535/](#)
  103. Rastelli G, Sirawaraporn W, Sompornpisut P, Vilaivan T, Kamchonwongpaisan S, Quarrell R, et al. Interaction of pyrimethamine, cycloguanil, WR99210 and their analogues with Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase: structural basis of antifolate resistance. *Bioorg Med Chem.* 2000 May 1;8(5):1117–28.
  104. Kremsner PPG, Krishna PS. Antimalarial combinations. *The Lancet.* 2004 Jul 17;364(9430):285–94.
  105. Dias MV, Castro AP, Campos CC, Souza-Silva TG, Gonçalves RV, Souza RLM, et al. Doxycycline hyclate: A schistosomicidal agent in vitro with immunomodulatory potential on granulomatous inflammation in vivo. *Int Immunopharmacol.* 2019 May 1;70:324–37.
  106. Santos MP, Gonçalves-Santos E, Gonçalves R v., Santos EC, Campos CC, Bastos DSS, et al. Doxycycline aggravates granulomatous inflammation and lung microstructural remodeling induced by Schistosoma mansoni infection. *Int Immunopharmacol.* 2021 May 1;94:107462.
  107. Lell B, Kremsner PG. Clindamycin as an antimalarial drug: Review of clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2002 [cited 2022 Aug 4];46(8):2315–20. Available from: <https://journals.asm.org/journal/aac>
  108. Obonyo CO, Juma EA. Clindamycin plus quinine for treating uncomplicated falciparum malaria: a systematic review and meta-analysis. *Malar J* [Internet]. 2012 [cited 2022 Aug 8];11:2. Available from: [/pmc/articles/PMC3280165/](#)
  109. Pukrittayakamee S, Chantra A, Vanijanonta S, Clemens R, Looareesuwan S, White NJ. Therapeutic Responses to Quinine and Clindamycin in Multidrug-Resistant Falciparum Malaria. *Antimicrob*

- Agents Chemother [Internet]. 2000 [cited 2022 Aug 8];44(9):2395.  
Available from: /pmc/articles/PMC90075/
110. Held J, Westerman R, Kremsner PG, Mordmüller B. In vitro activity of mirincamycin (U24729A) against *Plasmodium falciparum* isolates from gabon. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2010 Jan [cited 2022 Aug 8];54(1):540–2. Available from:  
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01090-09>
  111. Starzengruber P, Fuehrer HP, Swoboda P, Ganesh D, Haque R, Khan WA, et al. Mirincamycin, an old candidate for malaria combination treatment and prophylaxis in the 21st century: In vitro interaction profiles with potential partner drugs in continuous culture and field isolates. *Malar J* [Internet]. 2014 Jun 10 [cited 2022 Aug 8];13(1):1–6. Available from:  
<https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-13-228>
  112. Ramirez B, Bickle Q, Yousif F, Fakorede F, Mouries MA, Nwaka S. Schistosomes: challenges in compound screening.  
<http://dx.doi.org/10.1517/174604412S1S53> [Internet]. 2007 Oct [cited 2022 Aug 23];2(SUPPL. 1). Available from:  
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17460441.2.S1.S53>
  113. Manneck T, Braissant O, Haggemüller Y, Keiser J. Isothermal microcalorimetry to study drugs against *Schistosoma mansoni*. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2011 Apr [cited 2022 May 30];49(4):1217–25.  
Available from: <https://journals.asm.org/journal/jcm>
  114. Mansour NR, Bickle QD. Comparison of Microscopy and Alamar Blue Reduction in a Larval Based Assay for Schistosome Drug Screening. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2010; Available from:  
<http://www.gatesfoundation.org/Pages/home.aspx>
  115. Abdulla MH, Ruelas DS, Wolff B, Snedecor J, Lim KC, Xu F, et al. Drug Discovery for Schistosomiasis: Hit and Lead Compounds Identified in a Library of Known Drugs by Medium-Throughput Phenotypic Screening. Available from: <http://www.msdiscovery.com/>
  116. Howe S, Zöphel D, Subbaraman H, Unger C, Held J, Engleitner T, et al. Lactate as a novel quantitative measure of viability in *Schistosoma*

- mansoni drug sensitivity assays. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Feb 1;59(2):1193–9.
117. alamarBlue Assays for Cell Viability | Thermo Fisher Scientific - DE [Internet]. [cited 2022 May 31]. Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/fluorescence-microplate-assays/microplate-assays-cell-viability/alarblue-assay-cell-viability.html#anchor3>
  118. Rampersad SN. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors* [Internet]. 2012;12:12347–60. Available from: [www.mdpi.com/journal/sensors](http://www.mdpi.com/journal/sensors)
  119. Thompson DP, Morrison DD, Pax RA, Bennett JL. Changes in glucose metabolism and cyanide sensitivity in *Schistosoma mansoni* during development. *Mol Biochem Parasitol.* 1984 Sep 1;13(1):39–51.
  120. Shapiro TA, Talalay P. *Schistosoma mansoni*: Mechanisms in regulation of glycolysis. *Exp Parasitol.* 1982 Dec 1;54(3):379–90.
  121. Krautz-Peterson G, Simoes M, Faghiri Z, Ndegwa D, Oliveira G. Suppressing Glucose Transporter Gene Expression in Schistosomes Impairs Parasite Feeding and Decreases Survival in the Mammalian Host. *PLoS Pathog* [Internet]. 2010;6(6):1000932. Available from: [www.plospathogens.org](http://www.plospathogens.org)
  122. Faghiri Z, Camargo SMR, Huggel K, Forster IC, Ndegwa D. The Tegument of the Human Parasitic Worm *Schistosoma mansoni* as an Excretory Organ: The Surface Aquaporin SmAQP Is a Lactate Transporter. *PLoS One* [Internet]. 2010;5(5):10451. Available from: [www.plosone.org](http://www.plosone.org)
  123. L-Lactate Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric) (ab65330/K607-100) | Abcam [Internet]. [cited 2022 Jun 1]. Available from: <https://www.abcam.com/l-lactate-assay-kit-colorimetricfluorometric-ab65330.html>
  124. Manneck T, Haggemüller Y, Keiser J. Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology.* 2010 Jan;137(1):85–98.

125. Lombardo FC, Pasche V, Panic G, Endriss Y, Keiser J. Life cycle maintenance and drug-sensitivity assays for early drug discovery in *Schistosoma mansoni*. *Nature Protocols* 2019 14:2 [Internet]. 2019 Jan 4 [cited 2022 Oct 27];14(2):461–81. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41596-018-0101-y>
126. Peak E, Chalmers IW, Hoffmann KF. Development and validation of a quantitative, High-throughput, Fluorescent-based bioassay to detect schistosoma viability. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Jul;4(7).

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der Abteilung Innere Medizin VII, Institut für Tropenmedizin, Reisemedizin und Humanparasitologie der Universität Tübingen, unter Betreuung von Dr. rer. nat. Andrea Kreidenweiss und Professor Dr. med. Peter G. Kremsner, durchgeführt. Die Konzeption der Experimente erfolgte durch Dr. rer. nat. Andrea Kreidenweiss. Sämtliche Versuche wurden, nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Stephanie Howe, Harini Subbaraman und Annette Knoblich, von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich. Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Berlin, den

## 8 Veröffentlichungen

Rohdaten der hier vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht. Diese wurden durch Dr. rer. nat. Andrea Kreidenweiss ausgewertet:

Koehne E, Zander N, Rodi M, Held J, Hoffmann W, Zoleko-Manego R, Ramharter M, Mombo-Ngoma G, Kreamsner PG, Kreidenweiss A. Evidence for *in vitro* and *in vivo* activity of the antimalarial pyronaridine against *Schistosoma*. PLoS Negl Trop Dis. 2021 Jun 24;15(6): e0009511. doi: 0.1371/journal.pntd.0009511. eCollection 2021 Jun.

## 9 Danksagung

Ich möchte meinen besonderen Dank meiner Betreuerin Andrea Kreidenweiss aussprechen, für Ihre Geduld und Ihre Ausdauer, mich bei der Fertigstellung dieser Dissertation zu unterstützen. Ohne Sie wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen. Des Weiteren möchte ich mich bei dem IZKF-Promotionskolleg für das Stipendium bedanken, das mich finanziell und fachlich unterstützt hat. Ich möchte mich ebenfalls bei meinen Laborkollegen bedanken, besonders bei Stephanie, Harini, Patrick und Annette, für die gute Einarbeitung, fachliche Unterstützung und die tollen Stunden der Zusammenarbeit.

Ich möchte meiner lieben Familie von Herzen danken, die mich immer darin bestärkt hat, meinen Weg zu gehen und meine Ausbildung und diese Arbeit in dem Rahmen möglich gemacht hat.

Ich danke meinen Freunden, vor allem meinen Tübingern/innen, die den Dr. med. mit Bravour vorgemacht haben, meiner Schöneberger Crew in Berlin, die diese Arbeit seit Jahren mitverfolgt hat sowie Vicky und Martin, die mich immer wieder liebevoll daran erinnern haben und Speis und Trank für Leib und Seele bereitgestellt haben. Zu guter Letzt möchte ich Alex meinen besonderen Dank aussprechen, der der Arbeit zum Ende hin den nötigen Aufschwung gegeben hat. Ohne euch wäre es nicht gegangen, vielen vielen Dank!

Ich möchte meiner lieben Fay von ganzem Herzen danken für ihr Adlerauge und das Korrigieren der schriftlichen Arbeit.

Zum Schluss möchte ich meinem Partner Daniel meinen größten Dank aussprechen, ohne ihn hätte ich diese Arbeit nicht fertig geschrieben und dabei eine der schönsten Zeiten meines Lebens verbracht. Vielen vielen Dank dafür.



## **10 Lebenslauf (entfernt)**

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.





## 11 Appendix

Tabelle 5: Mikroskopische Beurteilung der Lebendigkeit der Schistosomula pro Mikrotitereinsenkung in der No-Drug-Kontrolle nach 7 Tagen aller Ansätze mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

Wirkstoffe	No Drug-Kontrolle Mittelwert $\pm$ Standardabweichung Schistosomula/Mikrotitereinsenkung
Mefloquin	90,59 $\pm$ 11,64
Auranofin	91,60 $\pm$ 5,34
Primaquin	94,42 $\pm$ 1,94
Chinin	97,43 $\pm$ 1,51
Ferroquin	93,47 $\pm$ 4,37
Amodiaquin	92,90 $\pm$ 3,06
Chloroquin	88,06 $\pm$ 11,53
Atovaquon	93,79 $\pm$ 2,76
Artesunat	93,89 $\pm$ 3,25
4-cis-Mirincamycin	89,32 $\pm$ 3,19
4-trans-Mirincamycin	92,03 $\pm$ 1,85
Tigecyclin	92,83 $\pm$ 2,35
Doxycyclin	95,36 $\pm$ 1,74
Methylblau	95,04 $\pm$ 1,31
Pyronaridin	96,23 $\pm$ 2,33
WR99210	95,82 $\pm$ 2,47
Proguanil	91,46 $\pm$ 4,47
Cycloguanil	92,33 $\pm$ 5,54
Clindamycin	95,33 $\pm$ 2,63

Tabelle 6: Anzahl der Schistosomula pro Mikrotitereinsenkung für jeden Ansatz (A, B, C) mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

Wirkstoff	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung Schistosomula/Mikrotitereinsenkung		
	A	B	C
Auranofin	104,25 $\pm$ 11,29	100,25 $\pm$ 11,79	105,06 $\pm$ 14,41
Primaquin	93,88 $\pm$ 10,21	101,56 $\pm$ 11,11	112,81 $\pm$ 11,16
Chinin	100,56 $\pm$ 13,51	102,00 $\pm$ 13,52	101,50 $\pm$ 15,16
Ferroquin	97,13 $\pm$ 15,83	96,38 $\pm$ 7,74	101,31 $\pm$ 11,09
Amodiaquin	96,44 $\pm$ 10,54	92,31 $\pm$ 10,23	101,94 $\pm$ 12,61
Chloroquin	101,50 $\pm$ 10,22	113,88 $\pm$ 19,21	115,94 $\pm$ 16,61
Atovaquon	103,00 $\pm$ 11,16	94,00 $\pm$ 13,62	108,88 $\pm$ 16,62
Artesunat	87,63 $\pm$ 11,87	105,00 $\pm$ 17,85	111,06 $\pm$ 8,98
4-cis-mirincamycin	97,38 $\pm$ 16,03	99,75 $\pm$ 12,59	93,31 $\pm$ 10,49

<b>4-trans-Mirincamycin</b>	99,63±13,67	105,06±25,17	95,50±10,36
<b>Tigecyclin</b>	107,50±13,79	105,13±14,22	97,25±14,42
<b>Doxycyclin</b>	100,31±11,03	98,94±16,06	91,94±14,64
<b>Methylenblau</b>	103,19±11,67	97,88±7,69	105,63±12,60
<b>Pyronaridin</b>	101,00±21,18	96,31±14,75	103,56±9,99
<b>WR99210</b>	99,38±41,77	96,06±8,20	96,19±9,53
<b>Proguanil</b>	102,38±7,65	94,44±11,11	93,19±16,12
<b>Cycloguanil</b>	98,94±14,37	96,56±11,54	106,44±9,23
<b>Clindamycin</b>	95,56±13,49	97,63±14,96	103,88±8,67

Tabelle 7: Anzahl der Schistosomula pro Mikrotitereinsenkung von Mefloquin als Positiv-Kontrolle pro Durchlauf mit Mittelwert ± Standardabweichung (N=9)

<b>Mefloquin</b>	<b>Mittelwert±Standardabweichung Schistosomula/Mikrotitereinsenkung</b>
<b>1</b>	105,81±15,73
<b>2</b>	101,13±11,49
<b>3</b>	107,50±17,36
<b>4</b>	103,75±13,09
<b>5</b>	104,75±16,65
<b>6</b>	97,75±10,24
<b>7</b>	103,56±12,18
<b>8</b>	101,00±16,41
<b>9</b>	93,13±13,05

Tabelle 8: Angabe der minimalen letalen Konzentration [µM] sowie der errechneten IC<sub>50</sub>-Werte [µM] für MQ (N=9) nach 7 Tagen Inkubation für jeden Ansatz und jede Messmethode

<b>Ansatz</b>	<b>Minimale letale Konzentration, Mikroskopie nach 7 Tagen [µM]</b>	<b>Mefloquin IC<sub>50</sub>-Werte nach 7 Tagen Inkubation</b>		
		<b>Mikroskopie IC<sub>50</sub> [µM]</b>	<b>Resazurin-Assay IC<sub>50</sub> [µM]</b>	<b>Laktat-Assay IC<sub>50</sub> [µM]</b>
<b>1</b>	2,47	1,67	1,25	0,00
<b>2</b>	2,47	2,14	2,62	3,55
<b>3</b>	2,47	2,25	1,83	2,76
<b>4</b>	22,2	1,90	1,74	5,09
<b>5</b>	22,2	5,53	4,64	0,00
<b>6</b>	2,47	1,78	1,62	1,92
<b>7</b>	2,47	1,48	1,52	0,00
<b>8</b>	22,2	2,04	3,37	0,00
<b>9</b>	7,4	1,81	3,14	0,01

Tabelle 9: Angabe der lichtmikroskopisch beurteilten minimalen letalen Konzentration [ $\mu\text{M}$ ] für jedes Medikament nach 7 Tagen Inkubation für jeden Ansatz (A, B, C)

Wirkstoff	Minimale letale Konzentration [ $\mu\text{M}$ ], Mikroskopie nach 7 Tagen		
	A	B	C
Auranofin	0,37	0,37	0,37
Primaquin	12,50	25,00	25,00
Chinin	200,00	200,00	-
Ferroquin	50,00	25,00	25,00
Amodiaquin	25,00	50,00	50,00
Chloroquin	100,00	12,50	50,00
Atovaquon	-	-	100,00
Artesunat	25,00	50,00	50,00
4-cis-Mirincomycin	300,00	100,00	100,00
4-trans-Mirincomycin	300,00	100,00	-
Tigecyclin	300,00	300,00	100,00
Doxycyclin	-	-	-
Methylenblau	33,30	1,24	3,70
Pyronaridin	11,11	3,70	3,70
WR99210	100,00	33,30	33,30
Proguanil	300,00	300,00	100,00
Cycloguanil	-	-	-
Clindamycin	-	-	-