

Aus der Abteilung für Pathologie des  
Bernhard-Nocht-Institutes für Tropenmedizin zu Hamburg

Wissenschaftlicher Direktor: Professor Dr. P. Racz

Immunhistochemisch morphologische Untersuchung eosinophiler nekrotischer  
Granulome in Darm und Leber bei *Akuter Schistosomiasis (Katayama Krankheit)*.  
Zur Bedeutung der Nekrose Eosinophiler Granulozyten in vivo.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt

von  
Kirsten Arndt  
aus Braunschweig

Hamburg, 2002

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 20. Januar 2003

Datum der letzten mündlichen Prüfung: 11. März 2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. C. Wagener

Referent: Prof. Dr. P. Racz

Koreferent: Prof. Dr. U. Helmchen

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Immunologie, Pathologie und Pathogenese der Akuten Schistosomias</b>	<b>7</b>
2.1.1	Pathophysiologie und Pathologie	7
2.1.2	Immunologische Granulome – Immunstatus	9
2.1.3	Granulomentwicklung in Abhängigkeit von der Immunologie	13
2.1.4	Pathomorphologie hyperergischer Granulome bei <i>Akuter Schistosomiasis</i>	19
<b>2.2</b>	<b>Die Rolle Eosinophiler Granulozyten im akuten hyperergischen Granulom</b>	<b>22</b>
2.2.1	Helminthotoxische Aktivität Eosinophiler Granulozyten	22
2.2.2	Nekrose und Lyse Eosinophiler Granulozyten	25
<b>2.3</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Auswahl der Gewebeproben aus Leber und Darm</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>Anfertigung von Paraffinschnitten und Aufbereitung für die Immunhistochemie</b>	<b>36</b>
<b>3.3</b>	<b>Histologische Färbeverfahren</b>	<b>37</b>
3.3.1	Konventionelle Färbungen an Paraffinschnitten	37
3.3.2	Immunhistochemische Verfahren an Paraffinschnitten	37
3.3.2.1	Peroxidase-Anti-Peroxidase-Methode (PAP)	42
3.3.2.2	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase-Methode (APAAP)	43
<b>3.4</b>	<b>Spezifika der verwendeten primären Antikörper</b>	<b>45</b>
3.4.1	Hämatoxylin & Eosin (H&E)	45
3.4.2	Immunhistochemische Marker	45
3.4.2.1	Enzymmarker-Darstellung der Eosinophilen Granulozyten	45
3.4.2.2	Marker für Immunglobuline	47
3.4.2.3	Marker für Makrophagen	49
3.4.2.4	Marker für Komplement	49
3.4.2.5	Marker für CD4 T-Lymphozyten	50
3.4.2.6	Marker für Dendritische Zellen	50
<b>3.5</b>	<b>Vorversuche zu ECP-EG2, MBP und EPO (APAAP) sowie C1q und C3d (PAP)</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>53</b>

<b>4.1</b>	<b>Lebergewebe und Darmgewebe</b>	<b>53</b>
4.1.1	Verteilung und Zustand der Eosinophilen Granulozyten im akuten hyperergischen Granulom	56
4.1.2	Die Monozyten- / Makrophagenzellreihe	61
4.1.3	T-Lymphozyten (CD4)	63
4.1.4	Komplement	64
4.1.5	Immunglobuline	66
4.1.6	Dendritische Zellen	68
4.1.7	Intraovale eosinophile Präzipitate	69
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>70</b>
5.1	Auswahl der Gewebeproben und Diskussion der Methoden	70
5.2	Diskussion der Ergebnisse	72
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>86</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNGEN</b>	<b>110</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>111</b>

# 1 Einleitung

Blut- und Gewebeseosinophilie ist ein wesentliches Merkmal parasitärer Infektionen. Eine massive Vermehrung von Eosinophilen Granulozyten wird in Verbindung mit einer Steigerung ihrer Aktivität insbesondere in Helmintheninfektionen regelmäßig beobachtet (Capron, 1991; Rothenberg, 1998; Janeway & Travers (eds.), Immunology, 1999). Im Falle der in tropischen Regionen der Erde verbreitet vorkommenden *Schistosomiasis* (*Bilharziose*) konnten eine Vielzahl von in vitro Studien und einige in vivo Untersuchungen auch helminthotoxische Eigenschaften Eosinophiler an Schistosomenlarven aufzeigen (Butterworth et al., 1974, 1979 (a) (b); Mc Laren et al., 1978; Weller et al., 1991; Scepek et al., 1994). In wenigen in vitro und in vivo Studien wurde darüberhinaus die schistosomiazidale Kapazität der Eosinophilen auch für Schistosomeneier untersucht und nahegelegt (James & Colley 1976, 1978; Racz et al. 1982 (a), (b); Kephart et al, 1988; Wiildenburg et al., 1994).

Bisher stand die durch exozytotische Degranulation der Eosinophilen vermittelte Ausschüttung toxischer Granulaproteine als angenommener Hauptpathomechanismus der Tötung von im Wirtsgewebe liegendebliebenen Schistosomeneiern im Mittelpunkt des Untersuchungsinteresses. Dies wird auch durch die wenigen Untersuchungen verdeutlicht, die sich mit der ausgeprägten granulomatösen Entzündungsreaktion, der als importierte Reisekrankheit auftretenden akuten und schweren Verlaufsform der *Schistosomiasis* (*Akute Schistosomiasis*, *Katayama Krankheit*) befassen, um die es in der vorliegenden Arbeit geht.

Viele Untersucher sehen bis heute in der durch Degranulation Eosinophiler getriggerten granulomatösen Gewebezellentzündung und Gewebezellnekrose im Umfeld der Schistosomeneier eine wesentliche Ursache typischer Organveränderungen in Leber, Darm oder Harnblase. Im Rahmen einer experimentellen Untersuchung an Hamstern, in der die morphologischen Unterschiede der Infektion durch verschiedene Schistosomenspezies untersucht worden sind, berichteten von Lichtenberg et al. (1973) neben einer Hepatozytennekrose von einer zentralen, Schistosomeneier umschließenden granulären eosinophilen Nekrose. Diese Nekrose mit exudativ-nekrotischem Charakter trat vor allem bei akuter, schwerer Infektion durch *Schistosoma japonicum* auf (Lichtenberg et al., 1973; Andrade, 1987). Im Falle einer akuten Infektion durch *Schistosoma mansoni* ließ sich diese Beobachtungen später als zentrale Ansammlung zugrundegehender Eosinophiler konkretisieren (von Lichtenberg &

Lehmann, 1986; von Lichtenberg 1987). Andere Untersucher berichteten im Zusammenhang mit *S. japonicum* in infizierten Mäusen über abszessähnliche Läsionen bei Prädominanz von Eosinophilen Granulozyten (Warren et al., 1975).

Die in der Untersuchung von von Lichtenberg & Lehman (1986) beobachtete Nekrose weist morphologische Ähnlichkeit mit dem von uns beobachteten Phänomen bei humaner *Akuter Schistosomiasis* auf. Im Untersuchungsmaterial aus Darm- und Lebergewebeproben konnten wir bereits mit Hilfe der zu Diagnosezwecken angefertigten Übersichtsfärbung (Hämatoxylin & Eosin) innerhalb durch eine schwere Überempfindlichkeitsreaktion geprägter sogenannter hyperergischer Eigranulome einen massiven Zerfall Eosinophiler Granulozyten sehen. Daneben schien das Areal nekrotischer Nekrobiose von großen Mengen extrazellulären Materials durchsetzt, das sich gleichermaßen spezifisch eosinophil anfärbbar zeigte wie das Zytoplasma intakter Eosinphiler.

Obleich es neben Zeichen einer Degranulation, bei der die Zellen typischerweise intakt bleiben, verschiedentlich auch Hinweise für Degeneration und Sterben von Eosinophilen in Schistosomeneigranulomen gab, findet man keine weiterführenden Untersuchungen, in denen die Überlebensfähigkeit von Eosinophilen in Schistosomeneigranulomen untersucht wurde. Das relativ seltene aber eindrucksvolle Phänomen der periovalen eosinophilen Nekrose ist bisher nicht näher beschrieben oder eingehender immunhistochemisch und immunologisch untersucht worden. Es hat bis heute keinen Eingang in die Lehrbuchliteratur gefunden.

Die pathomorphologische Untersuchung der durch das massive Zugrundegehen Eosinophiler Granulozyten gekennzeichneten nekrotischen Nekrobiose und die pathogenetische Bedeutung dieses im Zusammenhang mit *Akuter Schistosomiasis* wiederholt gesehenen Phänomens ist zentrales Thema der vorliegenden Arbeit.

Auch in anderen Parasitosen wie *Anisakiasis* (Pinkus et al., 1975; Dooley & Neafie, 1976), *Leishmaniase* sowie *Onchozerkiasis* nach chemotherapeutischer Behandlung ist ein Zerfall Eosinophiler in Parasitennähe bereits beschrieben worden (Racz et al., 1982 (a), (b); Wildenburg et al., 1994). Racz et al (1982 (b) sahen in der Nekrose Eosinophiler den Hauptpathomechanismus für das Sterben der Larven (Mikrofilarien) des Parasiten *Onchozerka volvulus* in vivo. Insbesondere in Anlehnung an die Beobachtungen von Racz et al. ergab sich für die vorliegende Arbeit die Frage, ob und

inwieweit das massive Sterben Eosinophiler Granulozyten für die Tötung von Schistosomeneiern in Granulomen von Bedeutung ist.

Die für diese Arbeit ausgewählten sechzehn Gewebeproben (von insgesamt 465 histologisch diagnostizierten Schistosomiasisfällen aus den Jahren 1983-1997) stammen aus der Klinischen Abteilung des Bernhard-Nocht-Institutes für Tropenmedizin (BNI) oder externen klinischen Einrichtungen. Sie waren Patienten entnommen worden, bei denen der anamnestisch und klinisch gestellte Verdacht einer schweren Erkrankung durch Schistosomen in der Abteilung für Pathologie des BNI histologisch abgeklärt werden sollte.

Hauptziel der vorliegenden morphologischen Untersuchung war es, mit immunhistochemischen Methoden die Verteilung Eosinophiler Granulozyten im hyperergischen Schistosomeneigranulom und insbesondere ihre räumliche Beziehung zu den Eiern zu untersuchen. Besondere Aufmerksamkeit wurde in diesem Zusammenhang der Frage gewidmet, in welchen Bereichen sich innerhalb der Überempfindlichkeitsgranulome aktivierte, zerfallende Eosinophile aufhalten und welche Bedeutung die zerfallsbedingte Freisetzung ihrer als toxisch bekannten Granulaproteine im Granulom für die Zerstörung der Eier und den Tod der Eilarven (Mirazidien) hat.

Für die *Akute Schistosomiasis* wird eine immunkomplexbedingte Pathogenese angenommen, wie sie für die Serumkrankheit beschrieben worden ist. Daher stellte sich auch die Frage nach der Verteilung von komplexbildenden Immunglobulinen und Komplement im Granulom. Die hyperergischen Granulome wurden daraufhin untersucht, ob Immunkomplexe - wie typischerweise bei schweren Infektionen gesehen - in Form von periovalen Hoespli-Präzipitaten vorkommen.

Zu diesem Zweck wurden die Gewebeproben histologisch aufgearbeitet und nach immunhistochemischen Standardmethoden mit verschiedenen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern markiert. Nach einer Literaturübersicht, die die Entwicklung der Forschung auf diesem Wissensgebiet beleuchten soll, folgen in weiteren Kapiteln die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung, eine kritische Auseinandersetzung mit den Methoden sowie eine Beurteilung der Bedeutung der gewonnenen Erkenntnisse .

## 2 Literaturübersicht

### Begriff

Die klinischen Symptome der akuten Verlaufsform der „*Schistosomiasis*“ („*Akute Schistosomiasis*“) waren in China lange als „*Yangtse Fieber*“ oder „*Urticarial Fever*“ bekannt. In Japan wurden die heute gebräuchlichen Begriffe „*Katayama Fieber*“ oder „*Katayama Krankheit*“ geprägt, die anfänglich ganz allgemein eine Erkrankung nach Infektion durch Schistosomen (Trematoden) bezeichneten (Girges 1934). Logan erkannte 1911 erstmals den Parasiten *Schistosoma japonicum* (*S. japonicum*) als menschenpathogenen Auslöser dieser akuten Erkrankung. Lawton folgte 1917 mit *S. mansoni*.

Der auch heute noch vereinzelt im südamerikanischen Sprachraum verwendete Begriff „*Toxämische Krankheit*“ wurde ursprünglich in Anlehnung an erste Beobachtungen bei Affen (Fairly 1920) und Menschen (Dias Rivera et al., 1956; Ferreira et al., 1966) geprägt, die nahelegten, dass Parasitentoxine eine Immunreaktion des Wirtsorganismus induzieren.

Später fand man, dass lösliche Eiantigene (soluble egg antigens (SEA)) (Boros & Warren, 1970; Warren, 1973) im Gewebe liegende Schistosomeneier vor allem bei nicht sensibilisierten Wirten durch eine überschüssige Immunreaktion (Diaz-Rivera et al., 1956; Hiatt et al., 1979) schwere, lokal begrenzte, durch Eosinophile Granulozyten geprägte zelluläre Entzündungsreaktionen (Warren et al., 1967) hervorrufen. So wird unter pathomorphologischen Gesichtspunkten auch von einer „*hyperergischen granulomatösen Reaktion*“ gesprochen.

Der häufig gebrauchte Begriff: „*Akute Schistosomiasis*“ wird in der Literatur nicht immer eindeutig verwendet. Es bleibt auf den ersten Blick oft unklar, ob das der *Serumkrankheit* ähnliche Syndrom mit akuter schwerer klinischer Symptomatik diskutiert wird, oder ob lediglich das akute Stadium als eine Phase im Verlauf einer Schistosomiasiserkrankung beschrieben wird, unabhängig von der Form der Erkrankung (Lenzi et al., 1987; Lambertucci, 1988; Borojevic, 1992, Corrêa-Oliveira et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff: „*Akute hyperergische Schistosomiasis*“ oder kurz: „*Akute Schistosomiasis*“ als Bezeichnung für ein akutes klinisches und granulomatös-entzündliches Überempfindlichkeitssyndrom verwendet, das seine stärkste Ausprägung typischerweise in der frühen (akuten) Phase der Erkrankung hat.

## **Epidemiologie**

Die *Schistosomiasis* zählt heute mit zunehmender Inzidenz neben der Malaria zu den wichtigsten tropischen parasitären Krankheiten des Menschen. Nach Angaben der WHO (1993) sind bereits etwa 200 Millionen Menschen - überwiegend in Endemiegebieten Afrikas, Teilen Süd-Ost Asiens und Südamerikas - durch den Parasiten infiziert. Es wird angenommen, dass etwa 20 Millionen Menschen weltweit schwer erkrankt sind und dass jährlich etwa 20.000 Menschen im Verlaufe einer Erkrankung sterben (WHO/CTD, 1998).

Da der Mensch im Lebenszyklus der Würmer über die Ausscheidung von vitalen Eiern mit Fäzes und Urin in Frischwasser die Quelle und als Hauptwirt infektiöser Larvenstadien - das Opfer der Infektion zugleich ist, wird die humane *Schistosomiasis* auch als eine „durch Menschen gemachte Erkrankung“ bezeichnet. Wasserversorgungsprojekte wie Dämme, Kanäle und Drainagen, die mit dem Ziel angelegt werden, die wirtschaftlichen und hygienischen Bedingungen der Menschen in den Entwicklungsländern zu verbessern, führen im Gegenteil nicht selten zur weiteren Verbreitung des kontaminierten Wassers und so zu einer steigenden Erkrankungshäufigkeit.

Als immunologisch bedingte Erkrankung gewinnt mit zunehmender Beliebtheit weltweiter Reisen auch die akute Verlaufsform der *Schistosomiasis* (*Akute Schistosomiasis*) hauptsächlich unter nicht sensibilisierten, erstmals infizierten Besuchern von Endemiegebieten an Bedeutung (Diaz-Rivera et al., 1956; Raso et al., 1986, Day et al., 1996, Whitty et al., 2000, Bialek & Knobloch, 2000).

Trotz einer Vielzahl von Fallberichten (Case records of the Massachusetts General Hospital weekly clinicopathologic exercises: Case 21 (1985); Junghanss & Weiss, 1992; Stuiver, 1984; Bou et al., 2001; u.v.m.), die über die Umstände einzelner akuter Schistosomiasiserkrankungen Auskunft geben, lassen sich aktuelle statistische Angaben darüber, wieviele Menschen weltweit an der akuten Form der *Schistosomiasis* und deren Komplikationen leiden oder daran versterben, nicht finden. Dies mag vor

allem daran liegen, dass die Krankheit leicht fehldiagnostiziert werden kann, da die Betroffenen binnen Tagen bis Wochen nach akutem Krankheitsbeginn (Hiatt et al., 1979; Lecture Notes on Tropical Medicine, 1995) mit dem Übergang in die chronische Phase der Infektion wieder beschwerdefrei sein können.

Am häufigsten erkranken Menschen nach einer Infektion durch *S. japonicum* vor *S. mansoni* an der *Akuten Schistosomiasis*. Über die akute Erkrankung bei *S. haematobium* gibt es nur wenige Informationen. Eine gegenüber den anderen Spezies vergleichsweise lange Inkubationszeit (einige Monate) erschwert die Diagnose zusätzlich.

Obwohl selten von Todesfällen sehr schwer erkrankter Patienten im Zusammenhang mit *Akuter Schistosomiasis* (Diaz-Rivera et al., 1956; Neves & Raso, 1965, Houpis et al., 1984) berichtet worden ist, wird einer sicheren Diagnosestellung mit der Möglichkeit der frühzeitigen Behandlung große Bedeutung beigemessen (Robson et al., 1994). Ziel ist es, insbesondere dauerhafte neurologische Schäden (Pitella 1997, Junker et al., 2001) durch Granulombildung um im Zentralnervensystem (ZNS) abgelegte Eier zu verhindern und eine Chronifizierung der Erkrankung mit Vernarbungen, beispielsweise in der Leber, zu vermeiden. Die Bedeutung einer Behandlung wird dadurch unterstrichen, dass reife Würmer im nicht sensibilisierten Organismus bis zu 30 Jahre Eier produzieren und ablegen können (Doherty et al., 1996).

## **2.1 Immunologie, Pathologie und Pathogenese der Akuten Schistosomias**

### **2.1.1 Pathophysiologie und Pathologie**

Es herrscht allgemein Konsens darüber, dass den schweren Symptomen der *Schistosomiasis* eine immunpathogene Genese zugrunde liegt (Warren, 1971; Warren et al., 1975). Die genauen Pathomechanismen, die zu den Symptomen der *Akuten Schistosomiasis* führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Die Symptome der Schistosomias sind vielfach unspezifisch und lassen sich gerade bei in Endemiegebieten lebenden Menschen aufgrund von vielfältigen epidemiologischen, immunologischen und physiologischen Interaktionen, insbesondere durch eine Reihe begleitender bakterieller und viraler Infektionen, oft nicht klar abgrenzen (Davis, 1996; Lambertucci et al., 2001; Andrade et al., 2001). Deutlicher tritt im Allgemeinen die Beziehung zwischen pathophysiologischer Ursache und klinischer Symptomatik bei unsensibilisierten erkrankten Besuchern von Endemiegebieten hervor, wennauch bei diesem Personenkreis die Symptomatik oft unterschiedlich stark ausgeprägt ist und zuweilen fehlen kann (Whitty et al., 2000). Centers for Disease Control (CDC, 1990) empfiehlt die Diagnose einer *Akuten Schistosomiasis* zu erwägen, wenn Fieber in Verbindung mit Eosinophilie (Gazinelli et al., 1985; Neves, 1986) eventuell zusammen mit Kopfschmerzen, Müdigkeit oder Magen-Darmbeschwerden bei Personen auftreten, die über eine zurückliegende Frischwasserexposition in einem Endemiegebiet berichten.

Als wichtigste pathologische Organveränderungen gelten eine schwere Hepatitis, ein akut entzündlicher Tumor der Milz sowie die akute katarrhalische Enterokolitis.

Die typische Pathologie der *Akuten Schistosomiasis* und Exazerbation der Symptomatik wird ab der vierten Woche post infectionem (p.i.) gemeinhin als Ausdruck eines Zusammenspiels zellulärer (T-Zellen) und humoraler Immunmechanismen gegen stark antigen wirkende Schistosomeneier gesehen (Hiatt et al., 1979; Andrade & Azevedo, 1987).

Die wichtigsten Komponenten dieser Reaktion sind:

- I. Generalisierte und lokale Freisetzung parasitotoxischer und wirttoxischer Proteine aus Eosinophilen bei Blut- und Gewebeeosinophilie (Gleich et al., 1979; Butterworth et al., 1979 (b); Ackermann et al., 1985)
- II. Bildung, Zirkulation und Ablagerung von Antigen/Antikörperkomplexen. Durch einen anfänglichen Überschuss von Antigenen gegenüber der Antikörperproduktion (Lecture Notes on Tropical Medicine, 1995) wird durch Kreislaufzirkulation des löslichen Eiantigens (SEA) (Nash et al., 1982) eine schwere, zunächst generalisierte (Urtikaria) und schließlich bei Ablagerung der Komplexe eine lokale (Myalgie, Arthralgie), der Serumkrankheit ähnliche Symptomatik begünstigt, die bei Einstellen eines Gleichgewichtes zwischen Antikörpern und Antigenen nach und nach verschwindet.
- III. Eine verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion und T-zellvermittelt Bildung von großen, durch Zellproliferation und Zellwanderung geprägten hyperergischen Granulomen, und dadurch bedingte Lymphknotenschwellung und Hepatosplenomegalie (Diaz-Rivera et al., 1956; Warren, 1973; Raso et al., 1986) sowie Kompression von Nerven und Gefäßen mit Symptomen in betroffenen Organen (ZNS, Leber, Lunge).

Hiatt et al. (1979) konnten an schwer durch *S. mansoni* Erkrankten zeigen, dass der Grad der Immunantwort eines Organismus einen wesentlichen Einfluss auf die Schwere der Symptomatik hat. Ihre Untersuchungen zeigten, dass die Symptomatik grundsätzlich die Intensität der Infektion (gemessen an der Zahl der im Stuhl ausgeschiedenen Eier) widerspiegelt. Daneben schienen gleichzeitig Beobachtungen von Clark et al., (1970) bestätigt, nach denen auch Erkrankte mit relativ milden Infektionen schwere Symptome haben können. Heute wird angenommen, dass der Grad der Immunantwort und die Infektionsintensität nicht nur die Schwere der Symptomatik prägt, sondern dass die immunologische Empfindlichkeit über einen Einfluss auf die Größenentwicklung der Eigranulome auch auf die Ausscheidung von Schistosomeneiern wirkt (Doenhoff, 1997; Karanja et al., 1997). In welcher Weise die Entwicklung der Granulomgröße, ihre zelluläre Zusammensetzung und die Eiausscheidung von dem Immunstatus des Wirtes beeinflusst werden, zeigt ein Überblick über die Forschungsergebnisse im Folgenden.

## 2.1.2 Immunologische Granulome – Immunstatus

### Immunologische Granulome

Nur etwa ein Drittel bis die Hälfte der von den adulten weiblichen Würmern in den Endästen der Mesenterialvenen (*S. mansoni*, *S. japonicum*) oder im Venensystem der Harnblase (*S. haematobium*) abgelegten Eier gelangen mit Hilfe einer leichten Schleimhautentzündung ins Lumen von Darm oder Harnblase (Vermund et al., 1983; Kresina et al., 1992). Verbleibende, zunächst noch unreife Eier werden über das aufsteigende Blut durch die Portalvenen in die Leber geschwemmt oder siedeln in nachgeschalteten Organen wie Lunge oder Gehirn. Andere Eier bleiben bei dem Versuch den Organismus zu verlassen in der Schleimhaut von Darm oder Harnblase liegen. Dabei aktivieren lösliche Eiantigene (Boros & Warren, 1970), die die Larve (Mirazidium) durch Mikroporen in der Eischale hindurch ins umliegende Wirtsgewebe abgibt, das mononukleäre Phagozytosesystem und induzieren über eine Überempfindlichkeitsreaktion des Immunsystems eine Granulombildung.

Immunologisch bedingte Granulome werden von Granulomen des Fremdkörpertyps unterschieden. Auf ein lebendes infektiöses Agens, wie ein Schistosomenei, bildet der befallene Organismus T-zellvermittelt mittels einer verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion ein immunologisches Granulom. Charakteristisch ist, dass jeder erneute Kontakt mit demselben infektiösen Agens zu einer in Geschwindigkeit und Ausprägung veränderten Immunantwort führt. Es kommt entweder zu einer schnelleren und verstärkten Immunantwort, die durch das aktivierte immunologische Gedächtnis ermöglicht wird, oder zu einer abgeschwächten verlangsamteten Immunreaktion (Immunmodulation). Unbelebte, nicht infektiöse Antigene (beispielsweise Barium) induzieren über die Freisetzung von Entzündungsmediatoren Granulome vom Fremdkörpertyp. Ein wiederholter Kontakt mit Barium löst eine immer gleich schnelle und gleich starke, hauptsächlich durch Makrophagen und Fibroblasten gekennzeichnete Abwehrreaktion aus, da das immunologische Gedächtnis nicht aktiviert wird. Fremdkörpergranulome sind daher weniger dynamisch.

Bisher konnte die Funktion von immunologisch bedingten akuten hyperergischen Schistosomeneigranulomen sowie die funktionelle Signifikanz der je nach Entwicklungsstadium verschiedenen morphologischen Granulomtypen noch nicht vollständig geklärt werden. Es wird angenommen, dass es sich bei der Bildung von

Granulomen um einen Kompromiss handelt, der es dem Wirt ermöglicht mit dem Parasiten zu leben (Brunet et. al, 1997; Pearce et al. 1999; in: Paul, Fundamental Immunology).

James und Colley (1978) schlossen aufgrund von in vitro gewonnenen Ergebnissen und in Anlehnung an Beobachtungen einer Ultrastrukturstudie (Bogitsh, 1971), dass die wesentliche Bedeutung von Granulomen darin liegt, unter Vermittlung von Eosinophilen Granulozyten Schistosomeneier zu zerstören.

Da Reis und Andrade (1987) vitale Eier innerhalb von Granulomen in verschiedenen Geweben noch bis zu 17 Tagen nach Chemotherapie fanden, sahen sie den Sinn der Granulome vornehmlich darin, den Wirtsorganismus vor der Ausbreitung toxischer Substanzen durch Schistosomeneier zu schützen (von Lichtenberg, 1964; Byram et al., 1979; Dunne & Doenhoff, 1983 (b); Amiri et al., 1992).

Andererseits kann, wie anfangs erwähnt, die Bildung von Granulomen für den Wirt auch schädlich sein (Cheever, 1993), wenn Schwellungen und Vernarbungen im Bereich der Granulome beispielsweise zur Kompression von Gefäßen oder Nerven führen.

Eine Reihe von experimentellen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Fähigkeit schützende Granulome zu bilden, wesentlich vom Immunstatus des Wirtorganismus abhängt. Für die Entwicklung großer hyperergischer Granulome bei *Akuter Schistosomiasis* scheint eine besondere immunologische Empfindlichkeit von großer Bedeutung zu sein. Es ist daher sinnvoll, die Erkenntnisse, die diese Zusammenhänge beleuchten, kurz näher zu betrachten.

### **Immunstatus**

Nachdem Warren et al. (1967) an *S. mansoni* gezeigt hatten, dass Eigranulome zellvermittelt gebildet werden, konnten Buchanan et al. (1973) anschließend die Bedeutung von T-Zellen im Prozess der Granulombildung hervorheben.

Von Lichtenberg et al. (1987) fanden bei immunkompetenten Wirten mit früher starker Immunantwort auf lösliche Eiantigene (SEA) große und floride, hauptsächlich aus Eosinophilen bestehende Eiläsionen mit zentraler Nekrose.

Byram et al., 1979 beobachteten, dass sich durch Stimulaton der T-Zellantwort in Mäusen nicht nur das Wachstum von Granulomen, sondern auch die Nekrosebildung

anregen ließ. Athymische und immunsupprimierte Mäuse hingegen zeigten sich nur vermindert oder gar nicht zur Granulombildung fähig (Byram & v. Lichtenberg, 1977; Phillips et al., 1980; Dunne, 1983 (b); Byram et al., 1979; Doenhoff et al., 1981; Fallon & Dunne, 1999). Solche immundefizienten Mäuse entwickelten nach Infektion durch *S. mansoni*, dem eine Hepatotoxizität zugeschrieben wird, eine Hepatozytennekrose in Einähe und eine Kachexie. Ihre Mortalität war im Vergleich zur immunkompetenten Kontrollgruppe deutlich höher.

Experimente mit *S. haematobium* und *S. bovis* sowie eine vergleichende Untersuchung an mit *S. japonicum* oder *S. mansoni* infizierten Hamstern (von Lichtenberg et al., 1973) bestärkten die Annahme, dass es auch Speziesverschiedenheiten der verschiedenen Schistosomenarten hinsichtlich der Gewebetoxizität ihrer Eier gibt. T-zelldefiziente Mäuse, die mit *S. japonicum* infiziert worden waren, zeigten in der Leber keine Zeichen der Destruktion. Durch *S. bovis* infizierte immunsupprimierte Mäuse lebten sogar länger als die immunkompetenten Kontrollmäuse (Cheever et al., 1985 (b); Murare et al., 1987).

### **Granulomgröße – Eiausscheidung**

In weiteren Experimenten wurde deutlich, dass die durch *S. mansoni* infizierten immunsupprimierten Mäuse eine geringere Anzahl Eier ausscheiden als immunkompetente Vergleichstiere (Doenhoff et al. 1981; Dunne et al., 1983 (a) + (b)). Diese Beobachtung führte zu dem Schluss, dass die Immuneffektormechanismen, die auf die Granulomgröße wirken, auch Einfluss auf die Eiausscheidung haben. Damian (1987) konnte an Pavianen zeigen, dass Granulome ein wichtiges Transportmedium für Eier sind, mit deren Hilfe sie erleichtert vom Ort der Ablage zum Ort der Ausscheidung (zum Beispiel Darmlumen) gelangen. Diese Annahme wurde durch die Beobachtung gestützt, dass der Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) als entzündungsförderndes Zytokin sowohl die Granulomentwicklung als auch die Eiausscheidung anregt (Amiri et al., 1992).

In einer neueren experimentellen Studie an durch *S. mansoni* infizierten Mäusen wurde eine signifikant positive Korrelation zwischen mittlerem Granulomdurchmesser und Zahl der ausgeschiedenen Eier im Stuhl beschrieben (Doenhoff, 1997). Dieses Erkenntnis scheint ein Ansatz der Erklärung für die Beobachtung von von Lichtenberg et al., (1973) zu sein, wonach sich im Verlauf einer Infektion durch *S. japonicum* mit einer stärkeren Eiausscheidung häufiger die Entwicklung großer florider Granulome in der Leber von Hamstern zeigte als nach einer Infektion durch *S. mansoni*. Ob ein Zusammenhang

zwischen der Größenentwicklung der Granulome und Zahl der ausgeschiedenen Eier auch für die *Akute Schistosomiasis* besteht, ist bisher noch nicht untersucht worden.

Die Annahme, dass die Eiausscheidung immunabhängig ist, wird auch durch die Ergebnisse einer Untersuchung an Personen unterstrichen, die gleichzeitig mit *S. mansoni* und HIV infiziert waren. Es konnte eine positive Korrelation zwischen der Zahl der Eier im Stuhl und der Anzahl von CD4+ Zellen gefunden werden. HIV-positive Patienten schieden im Vergleich zu nicht HIV-positiven Patienten eine bis zu 3-fach geringere Menge von Eiern mit dem Stuhl aus (Karanja et al., 1997).

Welchen Einfluss der immunologische Reifungsprozess des Wirtsorganismus im Verlaufe einer Schistosomeninfektion auf die zelluläre Zusammensetzung und auf die Dynamik der Entwicklung von Eigranulomen hat, soll im folgenden erläutert werden. Ein besseres Verständnis dieser Zusammenhänge kann die Entwicklung neuer Immunopharmakotherapien fördern, die dazu beitragen die Granulomentwicklung zu regulieren und darüber die Erkrankung kontrollieren.

### 2.1.3 Granulomentwicklung in Abhängigkeit von der Immunologie

In histologischen Schnitten imponieren immunologisch bedingte Eigranulome als runde, scharf begrenzte Zellaggregate, die sich im Verlaufe der Infektion, je nach Granulomphase, vom gerade dominierenden Zytokinprofil beeinflusst, in ihrer Zusammensetzung ändern (Moore et al., 1977; Chensue & Boros, 1979).

Gönnert (1955)	Von Lichtenberg et al. (1973)	Hsü et al. (1969)
1. Beginn der Eiablage. Erste Eier im Gewebe	I. Minimale Reaktion	1. Geringe Eireaktion
2. Geringe Zellinfiltration	IIa. Gemischte Entzündungsreaktion	
3. Primärabszess	IIb. Pseudoabszess	2. Exsudatives Stadium
4. Primärer Pseudotuberkel	IIIa. Epitheloidzellgranulom	3. Produktives Stadium
5. Sekundärabszess	IIIb. Histiogranulozytisches Granulom	4. Exsudativ-produktives Stadium
6. Sekundärabszess mit Parenchymnekrose	IIIc. Nekrotisches Granulom	
7. Beginnende Narbenbildung	Iva. Schrumpfung des Granuloms	5. Rückbildungsstadium
8. Sklerose	IVb. Narbengranulom	

**Tab. 1:** Gegenüberstellung dreier Klassifizierungssysteme der Schistosomeneigranulome (nach von Lichtenberg, 1973)

## **Initialstadium der Granulombildung (akute Phase der Infektion)**

Die Granulombildung beginnt mit einem granulomatösen Nidus unmittelbar nach der Eiablage. Antigenpräsentierende Monozyten und junge, aktivierte Makrophagen bilden einen ersten Ring um das noch unreife Ei (von Lichtenberg, 1987) - offenbar ohne sich an die Eischale über Adhäsion zu binden, wie jüngere Beobachtungen in einer Ultrastrukturstudie vermuten lassen (Mansy, 1998).

Obwohl T-Helfer (Th) Lymphozyten über die Ausschüttung von entzündungsfördernden Zytokinen (IL-2) durch ihre Th1-Klone neben  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  und NO die Granulomentwicklung noch zu Beginn der Eiablage beschleunigen (Cheever et al., 1985 (b)), haben sie keinen großen Anteil an den Zellen, die das frühe Granulom bilden. Während sich CD4 T-Lymphozyten eher im Inneren des Granuloms ansiedeln, halten sich CD8 T-Lymphozyten zusammen mit Plasmazellen überwiegend im äußeren Ring des Granuloms auf (von Lichtenberg 1987; Weinstock, 1992).

In der Frühphase der Granulombildung, in der die Immunantwort noch nicht ausgereift ist, kann es zu einer Fremdkörperreaktion gegen die ausgeschütteten Eiantigene kommen, in deren Verlauf Neutrophile Granulozyten Mikroabszesse bilden. Das Granulom wird nach und nach zellreicher und setzt sich am Ende der Phase hauptsächlich aus Eosinophilen Granulozyten und Makrophagen sowie einigen Lymphozyten zusammen. Untersuchungen zeigen, dass die Leukozyten des frühen Granuloms mit Hilfe verschiedener Adhäsionsmoleküle - vor allem ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) und Intergrins - ins Entzündungsgebiet gelockt werden und ein dichtes zelluläres Netzwerk um das Ei herum bilden (Ritter et al., 1993; Ritter & McKerrow, 1996; Fantone & Ward in: Rubin & Farber (eds.), Pathology, 1999). Darüberhinaus wird ein Zusammenspiel von Adhäsionsmolekülen und  $\text{TNF-}\alpha$  bei der Aufrechterhaltung der Entzündung angenommen (Lukacs et al., 1994).

Ergebnisse durchflusszytometrischer Analysen der PBMC (peripher blood mononuclear cells) Population an Patienten mit *Akuter Schistosomiasis* suggerieren, dass in der akuten Phase der Infektion eine signifikante Zellaktivierung vonstatten geht.

## **Reifestadium der Granulombildung (akute Phase der Infektion)**

In diesem hochdynamischen hochzellulären Teil der akuten Phase der Granulomentwicklung um die 6. bis 12. Woche post infectionem (p.i.) herum treten die pathomorphologischen Charakteristika immunologischer Granulome bei *Akuter Schistosomiasis* deutlich hervor (Tabelle 2). Die Entwicklung zur maximalen Größe der Granulome wird nun durch das Zusammenspiel von humoralen Faktoren wie Antikörpern (King et al., 1997), Komplement (Gleich, 1992) und zellulären Faktoren wie proinflammatorischen Th2-Zytokinen (IL-4, IL-5) bestimmt, deren Produktion nun ihr Maximum erreichen (Rumbley et al., 1999). Es wurde festgestellt, dass Eosinophile im akuten hyperergischen Granulom einen Anteil von bis zu 90 % der Granulomzellen ausmachen können (Rumbley et al., 1999). Im Zentrum der Granulome halten sich viele Eosinophile auf, die auf die Oberfläche der Eischale degranulieren. Die Mirazidien im Inneren der Eier sind in dieser Phase bereits teilweise zerstört. Um die zentrale Zone der Eosinophilen herum finden sich neben einigen Eosinophilen zunächst unreife Makrophagen, die im Verlauf der Entwicklung reifen. Da es sich bei den Eiern um schlecht verdauliches, persistierendes, antigenes Material handelt, wandeln sich Makrophagen als Ausdruck der verzögerten Immunität in Epitheloidzellen um. Durch die Fusion von Epitheloidzellen werden geordnete Riesenzellen vom Langerhanstyp gebildet, von denen angenommen wird, dass sie trotz geringerer Beweglichkeit gegenüber einzelnen Epitheloidzellen aufgrund erhöhter Produktion von toxischen Sauerstoffverbindungen effizientere Phagozytoseeigenschaften aufweisen (Riede in Riede N-U (Hrsg.), Allgemeine und Spezielle Pathologie, 1995). Ein paar Fibroblasten zeigen sich bereits im äußeren Ring des Granuloms. Mit Verlauf der Reifung der Granulome sterben zunehmend Eier.

Die Präsentation großer Mengen Eosinophiler und das ausgeprägte Wachstum der Granulome führte zu dem Schluss, dass ein Wechsel des Zytokinprofils stattgefunden haben musste. Man nahm an, dass zu diesem Zeitpunkt nicht mehr - wie im Initialstadium der Granulombildung - hauptsächlich Th1-Klone der T-Lymphozyten ihre proinflammatorischen Entzündungsmediatoren ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$ ; NO) freisetzen, sondern dass nun Th2-Zellen über die Ausschüttung von IL-4 und IL-5 und IL-13 dominieren. Von diesen Zytokinen konnte gezeigt werden, dass sie insbesondere für die Akkumulation von Eosinophilen, die Ausbildung einer für die *Akute Schistosomiasis* typischen Eosinophilie (IL-5) (Sher et al., 1990 ;Yoshida et al 1996; Brunet, 1999) und für die Erhaltung der zellulären Antwort und Entwicklung der Granulomgröße (IL-4, IL-

13) in Granulomen verantwortlich sind (Yamashita & Boros, 1992; Cheever et al., 1994, Chiaramonte et al., 1999).

In durchflusszytometrischen Untersuchungen (Rumbley et al., 1999) und experimentellen Studien an Mäusen (Sabin & Pearce, 1995; Sabin et al., 1996), die angelegt worden waren um die Quelle von Zytokinen nach einer Infektion durch *S. mansoni* zu bestimmen, konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass lokale Eosinophile unabhängig von T-Zellen einen wesentlichen Anteil typischer Th2-Mediatoren im frühen Granulom selbst produzieren. Es wird angenommen, dass Eosinophile dadurch befähigt sind sich selbst zu akkumulieren sowie die Th2 Antwort zu fördern (Sabin et al., 1996; Kita, 1996) und ihr eigenes Überleben sichern. Die Erkenntnis, dass Eosinophile in der akuten Phase der Granulombildung wesentlich für die Ausbildung eines Zytokinprofils und einer Immunopathologie verantwortlich sind, die bisher dem klonalen Wechsel von Th1 zu Th2 zugeschrieben worden ist, führte zu einer fundamentalen Neubewertung der Eosinophilen. In dieser Hinsicht scheint die neuere Praxis sinnvoll, Zytokine nicht mehr nach ihrer zellulären Herkunft sondern nach ihrem Zytokinprofil als T1 und T2 Zytokine zu benennen (Clerici & Shearer, 1994).

Die Ergebnisse weiterer Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung der Th2-Funktion für die Granulomentwicklung bei *Akuter Schistosomiasis* seit dem Th2-Zytokin IL-10 eine wichtige immunregulatorische Funktion zugeschrieben wird (Rezende 1997 (a); Wynn et al., 1995 (a) + (b), 1998). Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Gabe von rekombinanten IL-10 in vitro über einen hemmenden Einfluss auf Granulom-makrophagen zu einer Abnahme der akuten granulomatösen Überempfindlichkeit (Rezende et al., 1997(a)) und darüber zur Verkleinerung hyperergischer Granulome führt. Man nahm an, dass schwer an *Schistosomiasis* Erkrankte mit großen Granulomen weniger IL-10 produzieren (Falcao et al., 1998; Corrêa-Oliveira et al., 1998). Jüngste Untersuchungen an durch *S. mansoni* infizierten Mäusen deuten an, dass IL-10 bei IL-4 Mangel (abhängig von der Typ2-Antwort) eine schädliche Überreaktion der Typ1-Antwort (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , NO) (Brunet et al., 1997) mit Ausbildung großer, an Eosinophilen reicher Granulome und schwerem Verlauf der Erkrankung verhindern kann (Hoffmann et al., 2000; Patton et al., 2001). Die Autoren (Hoffmann et al., 2000) gehen davon aus, dass sowohl Typ1-Zytokine als auch Typ2-Zytokine potenziell pathogen sind, und sehen die Bedeutung von IL-10 als immunregulatorischen Faktor durch Beobachtungen unterstrichen, die zeigten, dass nur doppelt IL-10-/IL-4- defiziente Th1-polarisierte Mäuse eine schwere infektbezogene Pathologie zeigten

	<b>Initialstadium der Granulombildung</b>	<b>Reifestadium der Granulombildung</b>	<b>Modulationsphase</b>	<b>Chronisches Stadium</b>
	Eiablage ab 4.-5. Woche p.i.	6.bis 12.Woche p.i.	Um 16. Woche p.i.	Monate bis Jahre p.i
<b>Morphologie</b>	Granulomnidus/ Mikro-/Pseudo- abszess	Floride Entzündung/ max. Granulomgröße	Zelluläre Entzündung/ Granulomgröße ↓	Zellarme Granulome
	Unreife Eier	Reife, vitale Eier	Avitale Eier/ Schalenreste	Eischalenreste/ Eireste abgeräumt
	Dominanz von Makrophagen	Dominanz von Eosinophilen	Beginnende Fibrosierung	Fibroblastenproliferation/ Fibrozytenwall/ Narbe
<b>Typische Merkmale hyperergischer Granulome bei schwerer Erkrankung (Akute Schistosomiasis)</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gewebezellnekrose</li> <li>• Eosinophilennekrose</li> <li>• Hoeppli-Phänomen (periovale Immunkomplexe)</li> </ul>		
<b>Immunologie</b>	Th1-Dominanz <ul style="list-style-type: none"> <li>• entzündungsfördernde Mediatoren (TNF-<math>\alpha</math>, IFN-<math>\gamma</math>, NO) ↑</li> </ul>	Th2- Dominanz <ul style="list-style-type: none"> <li>• Maxim. Produktion von IL-4/IL-5</li> <li>• Begrenzung der Entzündung durch IL-10</li> </ul>	Th1-Dominanz <ul style="list-style-type: none"> <li>• entzündungsfördernde Zytokine ↓</li> <li>• entzündungshemmende Mediatoren ↑</li> </ul>	

**Tab. 2:** Phasen der Granulomentwicklung bei *Schistosomiasis*. Morphologische und immunologische Merkmale:

Abkürzungen: EO: Eosinophile Granulozyten; IC: Immunkomplexe; IFN- $\gamma$ : Interferon gamma; IL: Interleukin; NO: Stickstoffmonoxid; TNF- $\alpha$ : Tumornekrosefaktor alpha

## Modulationsphase

Zeitlich abhängig von der Schistosomenspezies kann es ab der vierten Woche nach Eiablage aufgrund einer Ökonomisierung der Immunantwort und Anpassung an die chronische Infektion zu einer Abnahme der Granulomgröße kommen (Andrade & Warren, 1964). Das Granulom wird zunehmend aus Fibrozyten gebildet. Je älter das Granulom ist, desto seltener werden Eosinophile in der äußeren fibrozytären Zone gefunden. Man nimmt an, dass sich der Wirt durch langsame Rückbildung der floriden Entzündung auf ein gemäßigtes Entzündungsniveau vor seiner eigenen starken Immunreaktion zu schützen versucht. Die Abnahme der immunologischen Empfindlichkeit gegen Eiantigene wird durch eine Stärkung der humoralen Immunität (Chensue & Boros, 1979; Cheever et al., 1985 (a) + (b)) und neuerlicher Ausrichtung der zellulären Immunität auf eine Dominanz der Th1-Zellklone bestimmt. Wie verschiedene in vitro Studien an *S. mansoni* zeigen konnten, werden im weiteren Verlauf der Granulomentwicklung weniger entzündungsfördernde Zytokine wie TNF- $\alpha$  (Amiri et al., 1992; Lukacs et al., 1994; Adewusi et al., 1996; Rezende et al., 1997 (a) + (b)) und mehr entzündungshemmende Mediatoren durch Monozyten und Makrophagen (Goes et al., 1994) ausgeschüttet. Es gibt auch Erkenntnisse, nach denen die Modulation durch vermehrte Freisetzung von ICAM-1 (Secor et al., 1994) angeregt wird. Das Ergebnis evolutionärer Selektion sichert dem Wirt das Überleben und den Würmern die weitere Reproduktion durch Vollendung ihres Lebenszyklusses.

Neuerdings werden Stimmen laut, die in Frage stellen, dass dieser als „Spontane Modulation“ bezeichnete Prozess (Boros et al., 1975) tatsächlich, wie bisher angenommen, immunologisch bedingt ist. Silva et al. (2000) fanden nach einer Infektion durch *S. mansoni* das typische morphologische Erscheinungsbild der Modulation zusammen mit großen Mengen extrazellulärer Matrix nur in hepatischen Granulomen. Zusammen mit der Beobachtung, dass Granulome in Darm und Lunge von infizierten Mäusen unabhängig vom Zeitpunkt der Infektion die gleichen morphologischen Merkmale aufwiesen oder bereits von Beginn der Infektion an Zeichen der Modulation zeigten, schlossen Silva et al. (2000), dass die Modulation eher durch lokale Faktoren bedingt sein könnte, als das Ergebnis einer immunologischen Entwicklung zu sein. Es gibt nur wenige, überwiegend ältere experimentelle Studien und Untersuchungen, die zu Diagnosezwecken oder post mortem unternommen worden sind, in denen die morphologischen Merkmalen hyperergischer Schistosomeneigranulome bei *Akuter Schistosomiasis* beschrieben werden. Eine Übersicht gibt Kapitel 2.1.4..

#### **2.1.4 Pathomorphologie hyperergischer Granulome bei Akuter Schistosomiasis**

Frühe pathomorphologischen Beschreibungen hyperergischer Eigranulome bei *Akuter Schistosomiasis mansonii* gehen auf Diaz-Rivera et al. (1956) zurück, die in einem humanen Leberbiopsat große, floride, durch Eosinophile geprägte periovale Granulome und diffuse interstitielle lymphoide Zellinfiltrate fanden.

Eine miliare Disseminierung homogener akuter Eigranulome in Leber, Lunge, Milz, Lymphknoten und Subserosa von Dünndarm und Dickdarm fand Bogliolo (1958) post mortem. Es wurde vermutet, dass sich aufgrund eines plötzlichen gleichzeitigen Beginns der Eiablage die Granulome überwiegend im gleichen Stadium der Entzündung befanden. Darüber hinaus wurden lokale Histiolyse und granulozytäre Exsudation in vergrößertem Gewebe von Milz und Leber gesehen.

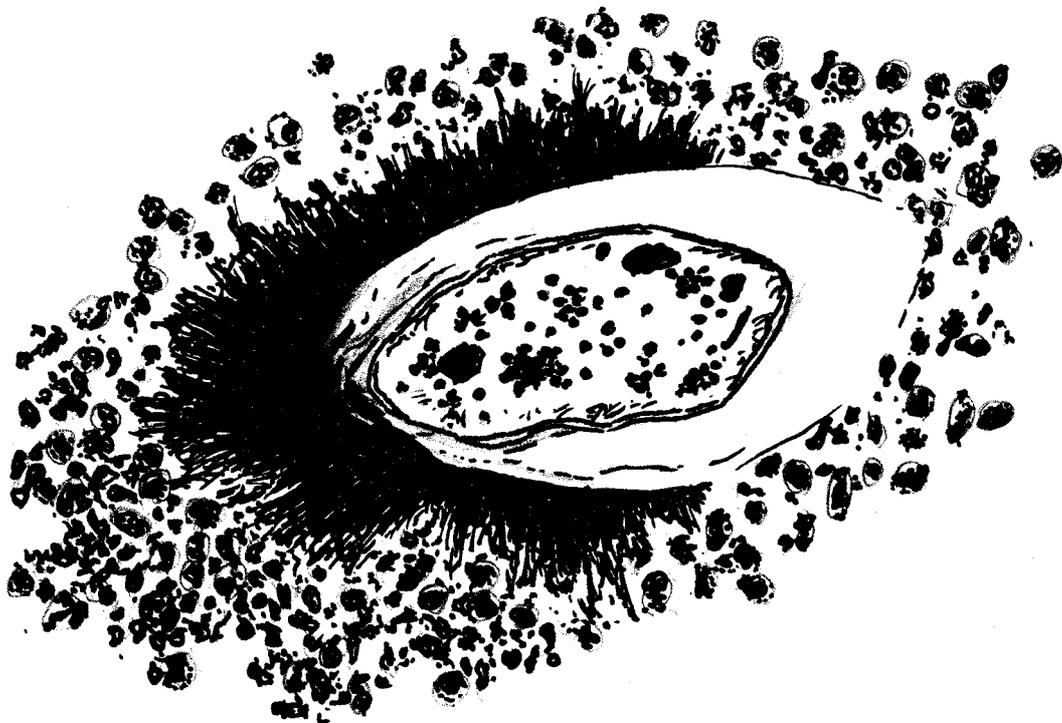
Zu Diagnosezwecken unternommene Untersuchungen sowie Experimente an Mäusen zeigten das Bild einer schweren Hepatitis mit fokaler, das Ei ringförmig umgebender lytischer oder koagulativer Leberzellnekrose mit zum Teil zentralen Neutrophilenabszessen und nachfolgend starker Infiltration von Eosinophilen (Neves & Raso, 1963; Neves & Bogliolo, 1965; Cheever et al., 1985 (b); Raso et al., 1986).

Andrade & Azevedo (1987) fanden das Bild einer die ersten reifen Eier umgebenden Hepatozytennekrose dem Bild ähnlich, das bei athymischen Mäusen gefunden wurde, die entweder mit *S. mansonii* (Byram & von Lichtenberg, 1977) oder mit *S. japonicum* (Cheever et al., 1985 (b)) infiziert worden waren. Darin sahen sie von Lichtenberg (1964) bestätigt, der annahm, dass die wesentliche Aufgabe der Granulome darin liegt, den Wirt vor der Ausbreitung von toxischen Eiantigenen im Gewebe zu schützen.

Die Kombination aus diffusen unspezifischen Veränderungen an Leber und Milz, Blut- und Gewebeeosinophilie sowie der Zirkulation und Ablagerung von Immunkomplexen führten zusammen mit einer typischen Symptomatik zu dem Schluss, dass es sich bei der *Akuten Schistosomiasis* um eine der Serumkrankheit ähnlichen Erkrankung handelt (Hiatt et al., 1979).

Auf Hoespli (1932) gehen die häufig bei *Akuter Schistosomiasis* gesehenen periovalen eosinophilen Präzipitate zurück (Abb.1). In vivo Untersuchungen bestätigten in vitro gewonnene Ergebnisse, die andeuteten, dass es sich bei der sogenannten „Sunburst-

Konfiguration“ um Immunpräzipitate handelt, die sich typischerweise strahlenkranzförmig um die Oberfläche reifer Eier herum ansammeln (von Lichtenberg et al., 1966; Smith & von Lichtenberg, 1967). Innerhalb der Eier wurden große Mengen IgG gefunden, während außerhalb der Eier zusätzlich Komplement und Granulozytendebris nachgewiesen werden konnten (Hirata et al., 1987). Dabei scheint die Bildung der Immunpräzipitate nicht nur von dem phasenweise wechselnden Antigen/Antikörperverhältnis im Eigranulom und der lokalen temporalen Konzentration der Antigene in Einähe (von Lichtenberg, 1964) abhängig zu sein, sondern auch vom Grad der Empfindlichkeit des Wirtes (He et al, 1993).



**Abb. 1:** Schistosomenei mit periovaler radiärer Anordnung von Immunkomplexen. „Sunburst-Konfiguration“. Modifiziert nach Hoespli (1932).

Eine Reihe von Beobachtungen zeigen, dass in Begleitung einer schwerer Infektion neben der vielfach gesehenen Gewebezellnekrose eine weitere Form der Nekrose vorkommt. Auf zunächst eher unspezifische Beschreibungen einer zentralen periovalen Nekrose mit exudativem Charakter (Hoepli, 1932, von Lichtenberg et al, 1973; Andrade 1987) folgend, verdichteten sich die Hinweise, dass es sich um ein Phänomen der massiven Nekrose Eosinophiler Granulozyten in Einähe handeln könnte (von Lichtenberg & Lehman, 1986; von Lichtenberg, 1987) (siehe Kap.1.2.1).

Eine eingehende histopathologische Untersuchung solcher auch von uns beobachteten zentralen eosinophil anfärbbaren Nekroseareale in hyperergischen Granulomen bei *Akuter Schistosomiasis* ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Die besondere helminthotoxische Bedeutung der Eosinophilen Granulozyten soll im folgenden Kapitel beleuchtet werden.

## **2.2 Die Rolle Eosinophiler Granulozyten im akuten hyperergischen Granulom**

### **2.2.1 Helminthotoxische Aktivität Eosinophiler Granulozyten**

#### **Ausstattung Eosinophiler Granulozyten**

Eosinophile Granulozyten sind typischerweise Schleimhaut bewohnende Zellen mit einer Vielzahl von Oberflächenrezeptoren. Sie produzieren und beherbergen neben derzeit zwanzig bekannten Zytokinen und Chemokinen (Eokine), Wachstumsfaktoren sowie große Mengen gewebetoxischer Granulabestandteile. Hierzu zählen kationische Proteine wie das „major basic protein“ (MBP), das „eosinophil cationic protein“ (ECP) sowie die „eosinophil peroxidase“ (EPO) (Näheres zu den kationischen Proteinen in Kapitel 2.4.2.1: Enzymmarkerdarstellung der Eosinophilen Granulozyten):

#### **Antiparasitäre Funktion Eosinophiler**

Der Ausstattung entsprechend, werden Eosinophilen Granulozyten verschiedene Funktionen zugeschrieben, so ein Einfluss auf die Immunregulation (Weller & Kaiser, 1997) und eine Reparaturfunktion. Eine massive Vermehrung Eosinophiler kann für den Organismus wegen proinflammatorischer Effekte schädlich sein - dies zeigen Untersuchungen allergischer Erkrankungen (Gleich & Adolphson, 1986) - und wegen antiparasitischer insbesondere antihelminthischer Effekte (Capron, 1991; Rothenberg, 1998) wiederum hilfreich sein. Eosinophilie wird als eine durch T-Lymphozyten (Basten & Beeson, 1970) vermittelte, erhöhte Produktion von Eosinophilen im Knochenmark (Janeway & Travers (eds.), Immunology, 1999) und (abnorme) Akkumulation (Rothenberg, 1998) qualitativ veränderter Zellen (David et al., 1980) im Blut und Gewebe charakterisiert. Vieles spricht dafür, dass der Wirtsorganismus mit Hilfe der massiven Vermehrung von Eosinophilen in die Lage versetzt wird Parasiten zu zerstören.

Obwohl Coles (1902) vor knapp einhundert Jahren eine deutliche Zunahme Eosinophiler im Blut an *S. haematobium* Infizierter nachweisen konnte, ist bis heute nicht hinreichend geklärt, welchen Sinn eine Abundanz der Eosinophilen bei *Akuter Schistosomiasis* hat und welche Risiken sich daraus für den Wirt ergeben.

Ergebnisse einer Reihe von in vitro und in vivo Untersuchungen legen nahe, dass sich sowohl humane als auch murine aktivierte Eosinophile über spezifische hochaffine Oberflächenrezeptoren für Antikörper (Fc) (Gounni et al., 1994) und Komplement (C1q, C3b/C4b (CRI), IC3b (CR3, C5a)) an unreife Vorstufen der Schistosomen (Schistosomula) binden und diese dann anschließend durch Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und helminthotoxischen Proteinen angreifen und töten (Butterworth et al, 1974, 1979 (a) (b), Mc Laren et al., 1978, 1981; Ackerman et al. 1985; Weller et al., 1991; Deardorff et al., 1991; Sceppek et al., 1994 ). Butterworth et al. (1979 (a)) nahmen an, dass die kationischen Proteine zur Ausbildung einer starken Bindung zwischen Eosinophilen und dem Parasiten beitragen.

Die Ergebnisse einer insgesamt eher geringen Zahl von Untersuchungen schienen zu bestätigen, dass Eosinophile sowohl in vitro (James & Colley, 1976, 1978; Sher et al, 1980; de Brito et al., 1984, Kephart et al., 1988) als auch in vivo (Bogitsh, 1971; Li Hsü et al., 1980; Racz et al., 1982 (a), (b), Feldman et al., 1990; Wildenburg et al, 1994, 1995) als Effektorzellen nicht nur Schistosomenlarven (Schistosomula) angreifen, sondern auch Eier zerstören und deren Eilarven töten. Diese Annahmen basierten zunächst auf folgenden Beobachtungen:

- Bogitsh (1971) fand in einer Ultrastrukturstudie viele zum Teil unreife Eosinophile sowohl innerhalb der Eier als auch an deren Schalenoberfläche gebunden.
- In vitro zeigten sich kultivierte Eosinophile, die aus durch *S. mansoni* infizierten Mäusen gewonnen worden waren sowohl außerhalb auf der Oberfläche, als auch innerhalb zerstörter Eier neben veränderten Mirazidien (James & Colley, 1976) James & Colley nahmen daraufhin an, dass Eosinophile über Degranulation toxische Proteine freisetzen, die wesentlich dazu beitragen, dass die Eischale zerstört und anschließend das Mirazidium getötet wird.
- Li Hsü et al. (1980) konnten in vivo im humanen Leber- und Gallenblasengewebe eines durch *S. mansoni* infizierten und subakut erkrankten Patienten dagegen keine Eosinophilen innerhalb der Eier in der Nähe angegriffener Mirazidien finden. Die Autoren schlossen daraus, dass durch intakte Eosinophile granuläre Enzyme freigesetzt werden, die über Mikroporen in der Eischale ins Innere des Eies vordringen und auf diese Weise das noch lebende Mirazidium töten, bevor vornehmlich Riesenzellen mit der Hilfe einiger Eosinophiler die Eischale aufbrechen und abräumen.

## Zweifel an einer dominanten Effektorfunktion Eosinophiler Granulozyten

Im Gegensatz zu dem bisher Gesagten gibt es aber auch einige Zweifel an einer überragenden helminthotoxischen Rolle Eosinophiler Granulozyten:

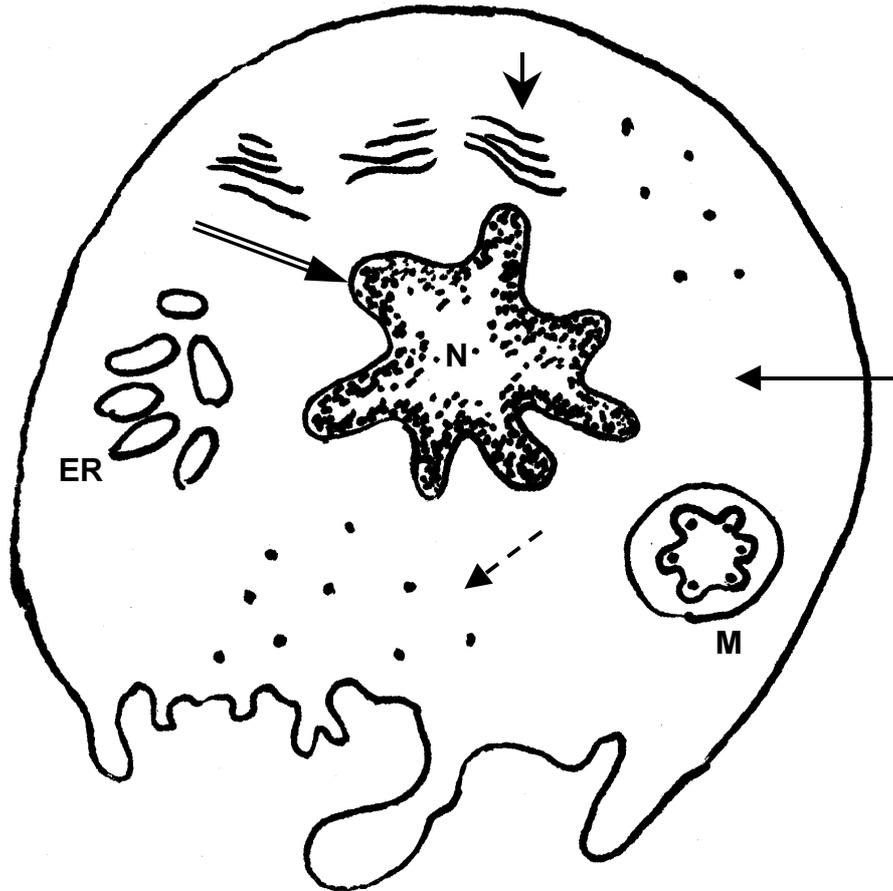
- Es wurde beispielsweise die Fähigkeit Eosinophiler in Frage gestellt, Schistosomula auch in vivo töten zu können. Bloch (1984) beobachtete, dass in vivo weniger Eosinophile an Schistosomula binden als in vitro.
- Anhand von Mausmodellen schien sich zu zeigen, dass sich Eosinophile hauptsächlich um bereits tote Schistosomula ansammeln (Andrade & Reis, 1984). Lozzi et al. (1996) fragten, ob die Bindung von Eosinophilen an Schistosomula eine Voraussetzung für den Tod der Larven sei oder eine Folge deren Absterbens.
- Li Hsü et al (1980) bemerkten, dass sich die toxische Reaktion Eosinophiler auf Schistosomeneier in vivo von der in vitro unterscheidet und darüber hinaus im Menschen und in der Maus verschieden sind.
- Eine weitere Hypothese ist, dass Eosinophile Granulozyten sich erst nach dem Tod des Mirazidiums um das Ei herum versammeln und ihre Granulaproteine dann auf die Eioberfläche ausschütten. So wurde unter anderem bezweifelt, dass Eosinophile für das Töten der Mirazidien innerhalb der Eier verantwortlich sind (Damian 1987; Lenzi et al., 1987; 1997).
- An athymischen Mäusen zeigte sich, dass ein durch einen IL-5 Mangel provoziertes Ausbleiben einer Eosinophilie - wie sie für die Entwicklung einer *Akuten Schistosomiasis* typisch ist - keine Auswirkungen auf die Granulomgröße hatte. Die Tiere zeigten darüber hinaus keine schwerere Infektion als für Eosinophile suffiziente Mäuse. Sowohl Urban (1992), als auch Weller & Kaiser (1997) bemerkten, dass diese Erkenntnisse gegen eine dominante helminthotoxische Funktion und gegen eine schwere eiinduzierte pathologische Reaktion der Eosinophilen bei parasitären Infektionen sprechen.

- Trotz der erwähnten grundsätzlichen Zweifel am zytotoxischen Potenzial der Eosinophilen wird aufgrund der Erkenntnisse aus einer Reihe von in vitro und in vivo Studien die exozytotische Degranulation, bei der die degranulierenden Zellen intakt bleiben, gemeinhin als wesentlicher Mechanismus der durch Eosinophile verursachten Zytotoxizität auf Schistosomenlarven und Schistosomeneier betrachtet. Die Bedeutung des Zelltodes für das Sterben der Parasiten ist bisher vergleichsweise wenig beforscht worden.

## **2.2.2 Nekrose und Lyse Eosinophiler Granulozyten**

### **Massive eosinophile nekrotische Nekrobiose**

In der vorliegenden Arbeit wird sich schwerpunktmäßig mit degenerativen Veränderungen und dem Tod Eosinophiler Granulozyten beschäftigt. Ist der Stress, der durch externe Noxen ausgelöst wird, für eine Zelle zu groß, reagiert sie mit Funktions- und Strukturänderungen (Kern und Zytoplasma), die schließlich irreversibel zum Tod der Zelle führen. Lyse und Nekrose sind Formen des nicht programmierten, provozierten oder auch „accidental celldeath“ genannten Zelltodes, um den es in der vorliegenden Arbeit geht. Anhand der Literatur gelingt eine Differenzierung von Lyse und Nekrose nur schwer, da die Begriffe manchmal widersprüchlich oder undefiniert verwendet werden. Begriffskombinationen wie „nekrotische abszessartige Prozesse“ (Warren et al., 1975) oder „lytische Nekrose“ (Byram & von Lichtenberg, 1977) sowie „Lyse (Nekrose)“ (Persson & Erjefält, 1997 (a), (b)) verwirren und zeigen das Differenzierungsdilemma. Das von uns beobachtete diffus eosinophil angefärbte und schwerwiegend veränderte Areal des Gewebes imponiert durch ein homogenes Erscheinungsbild, das scheinbar auch durch lokale Faktoren mitgeprägt wird. Da häufig nur Reste von Eosinophilen Granulozyten zu identifizieren waren, konnte der Anteil der Zellen, die in Form einer Koagulationsnekrose beziehungsweise einer Lyse zugrundegehen oder noch intakt waren lichtmikroskopisch nicht eindeutig bestimmt werden. Aus diesem Grund bevorzugen wir den etwas weiter gefassten Begriff „nekrotische Nekrobiose“ für die untersuchte Gewebereaktion und verzichten auf eine eingehende Analyse der Unterschiede zwischen Lyse und Nekrose im Folgenden. Lichtmikroskopische und ultrastrukturelle Merkmale der Koagulationsnekrose zeigt im Überblick Abbildung 2.



**Abb. 2:** Lichtmikroskopisch (LM) oder elektronenmikroskopisch (EM) sichtbare Zeichen der Nekrose Eosinophiler Granulozyten modifiziert nach: Rubin & Farber (authors & eds.), Pathology (1999). *Zytoplasma (LM)*: erscheint stärker eosinophil (erhöhte Anfärbbarkeit durch Eosin). *Zytoplasma (EM)*: erhöhtes Zytoplasmavolumen (Pfeil); disaggregierte Ribosomen (gestrichelter Pfeil); erweitertes Endoplasmatisches Retikulum (ER); Mitochondrien (M) geschwollen, kalzifiziert Ansammlungen von Zytoskelett (Pfeilspitze). *Kern (LM / EM)*: erscheint zunächst stärker basophil durch Chromatinkondensation (Doppelpfeil) und Kernschrumpfung (Pyknose), später Kernfragmentierung (Rhexis) und Lyse.

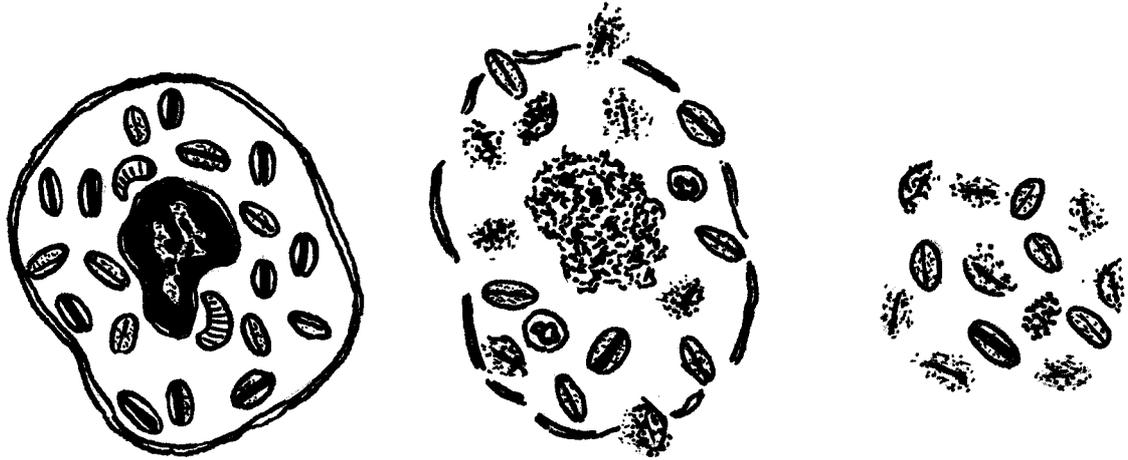
## **Sterben Eosinophiler Granulozyten in Parasitosen**

In nur wenigen pathomorphologischen in vivo Untersuchungen wurden als Nekrose oder Lyse bezeichnete Zelltodprozesse Eosinophiler Granulozyten als möglicher Pathomechanismus in Parasitosen untersucht (Ross & Klebanoff, 1966; Racz et al., 1982 (a), (b); Wildenburg et al., 1994; Persson & Erjefält, 1997 (a), (b)).

In morphologischen Untersuchungen an Eiern von *S. mansoni* und Larven von *Onchozerca volvulus* wurden hauptsächlich freie Granulaproteine, jedoch nur wenige intakte Eosinophile in der Nähe der Parasitenoberfläche gefunden (Kephart et al., 1984; Li Hsu et al., 1980). Folgende Theorien wurden diskutiert:

- 1) Eosinophile degranulieren auf den Parasiten und verlassen danach den Ort der Ausschüttung im Gewebe
- 2) Eosinophile sterben nach der Degranulation.

Der Klärung dieser Frage ist in einer experimentellen elektronenmikroskopischen Studie von Weiler et al. (1996) nachgegangen worden, in der die Überlebensfähigkeit von ans Antigen gebundenen Eosinophilen unter Vermittlung von Immunglobulinen untersucht worden ist. Eine Vielzahl über Antikörper (IgA, IgG) ans Antigen gebundener Eosinophiler setzten Plasmamembrangebundene Granula frei und zeigten Zeichen eines Verlustes der Zellintegrität. Aus ihren Beobachtungen schlossen Weiler et al. (1996), unter der Annahme, dass jede haufenförmige Ansammlung (Cluster) freier extrazellulärer eosinophiler Granula (cluster of free extracellular granules: Cfegs) im Gewebe auf nur einen einzigen Eosinophilen Granulozyten zurückzuführen ist, dass bis zu 50 % der Eosinophilen bis hin zur Lyse degeneriert sein mussten (Abb. 3). Es wurde vermutet, dass sich unter Vermittlung von Antikörpern sowohl die Zahl der Bindungen an die verwendeten Antigene (Sepharose Kügelchen) erhöht hatte und dass darüberhinaus auch die exozytische Degranulation der Zellen angeregt worden war. Beides, so der Schluss der Autoren, fördert das Sterben der Eosinophilen. Als Ursache des Todes Eosinophiler wurde eine Stärkung der durch Adhäsionsmoleküle (Kaneko et al., 1995) vermittelten Bindung Eosinophiler an Antikörper auf der Parasitenoberfläche angenommen.



**Abb. 3:** Lyse eines Gewebeeosinophilen und Freisetzung von Haufen freier eosinophiler Granula in den Extrazellularraum. Die Granula zeigen verschiedene Grade der Auflösung was auf die Freisetzung von Granulaproteinen hindeutet. Nach Persson & Erjefält (1997 (a), (b)), Lyse Eosinophiler in allergischen Atemwegserkrankungen.

Die Rolle der Lyse Eosinophiler bei der Tötung von Parasiten in vivo haben Racz et al., (1982 (a), (b)) in licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen an humanen Lymphknoten von durch *Onchozerc* *volvulus* infizierten Patienten untersucht. Nach Behandlung mit Diethylcarbamazine (DEC) zeigte die Mehrheit der als Mikrofilarien (Mf) bezeichneten Larven nach Bindung Eosinophiler Granulozyten durch Eosinophilen-Parasiten-Adhärenzreaktion (EPA) an ihrer Oberfläche Zeichen starker Degeneration. Man fand, dass Eosinophile mit engem Kontakt zu lebenden als auch toten Mikrofilarien lysieren und Granula freisetzen, die sich an der Oberfläche des Parasiten zusammenklumpen. Die Eosinophilen imponierten elektronenmikroskopisch durch große zytoplasmatische Vakuolen, wie sie typischerweise bei aktivierten Eosinophilen im Zusammenhang mit Eosinophilie gesehen werden. Im Nekroseareal ließen sich Eosinophile und ihre Granula in unterschiedlichen Intaktheitsgraden nachweisen. Darüberhinaus fand sich freies elektronendichtes Material, das Cores der Granula beinhaltete. Die Ergebnisse wurden im Rahmen einer Folgestudie an mit Ivermectin behandelten an *Onchozerc* *kiasis* Erkrankten bestätigt. Auch dort wurden in der Nähe der Mikrofilarien sowohl intakte als auch nekrotische Eosinophile mit intakten und degenerierenden Granula gesehen. In vitro Modelle konnten die Beteiligung von Cfgs bei der Bekämpfung von Parasiten nicht stützen (Villalta et al., 1987). Dagegen schlossen Racz et al. (1982 (a)) aus ihren Ergebnissen, dass die Freisetzung von Granula durch Nekrose vor der klassischen Degranulation und der tubulovesikulären

Exkretion der wichtigste Mechanismus der durch Eosinophile vermittelten Zytotoxizität in vivo ist.

Es gibt einige Hinweise dafür, dass Ansammlungen freier Granula, wie sie nach plötzlichem Sterben Eosinophiler in Parasiteninfektionen gesehen wurden (Wildenburg et al., 1994; Weiler et al., 1996), auch bei allergischen Erkrankungen als Ausdruck einer Aktivierung von Schleimhauteosinophilen angesehen werden können und in vivo für die Auslösung von Asthma, Allergischer Rhinitis und Atopischer Dermatitis verantwortlich sind. (Persson & Erjefält, 1997, 1998; Rothenberg, 1998). Cheng et al., 1993 folgerten aus der Beobachtung von degenerierenden Eosinophilen und membrangebundenen freien Granula im Gewebe, dass die „zytolytische Degranulation“ der Eosinophilen der Hauptpathomechanismus der Proteinfreisetzung in der Atopischen Dermatitis ist.

Im Rahmen einer experimentellen Untersuchung an Hamstern, in der die morphologischen Unterschiede der Infektion durch verschiedene Schistosomenspezies untersucht worden ist, fanden von Lichtenberg et al. (1973) im exudativen Stadium der Granulomentwicklung neben einer Hepatozytennekrose vor allem bei *S. japonicum* auch eine zentrale, das umgebende granuläre eosinophile Nekrose. An einer akuten Infektion durch *S. mansoni* ließ sich diese Beobachtungen später als zentrale Ansammlung von Eosinophilen im Zustand der Nekrose konkretisieren (von Lichtenberg & Lehmann, 1986; von Lichtenberg 1987). Dieses Phänomen ist bisher nicht näher beschrieben und untersucht worden und hat bis heute keinen Eingang in die Lehrbuchliteratur gefunden. Die Nekrose weist morphologische Ähnlichkeit mit der von uns gesehenen eosinophilen Nekrose bei *Akuter humaner Schistosomiasis* auf. Es handelt sich dabei offenbar um einen massiven Zerfall Eosinophiler Granulozyten und Freisetzung eosinophiler Granulaproteine auf das Ei. Die pathomorphologische Untersuchung dieser ausgedehnten periovalen zentralen Nekrose Eosinophiler Granulozyten und die pathogenetische Bedeutung dieses Phänomens in der *Akuten Schistosomiasis* ist zentrales Thema der vorliegenden Arbeit.

## 2.3 Fragestellung

Zusammenfassend ergibt sich die folgende Fragestellung, deren Untersuchung in den folgenden Kapiteln nachgegangen werden soll:

- Wo kommen innerhalb der hyperergischen Schistosomeneigranulome intakte Eosinophile Granulozyten vor und wo befinden sich Eosinophile im Prozess der Degeneration?
- Kommt es durch Nekrose von Eosinophilen Granulozyten zu einer Freisetzung kationischer Granulaproteine (ECP-EG2, MBP) auf die Oberfläche der Schistosomeneier?
- Wo halten sich aktivierte Eosinophile Granulozyten im Granulom auf und wie ist die aktivierte und sezernierte Form von ECP (ECP-EG2) im Granulom verteilt?
- Binden degenerierende Eosinophile Granulozyten und aus Eosinophilen freigesetzte Granulaproteine in akuten hyperergischen Granulomen in vivo an Schistosomeneier?
- Welche Bedeutung hat die massive Nekrose Eosinophiler Granulozyten und Freisetzung eosinophiler Proteine auf die Zerstörung der Eischale und die Tötung der Mirazidien?
- Wie sind an der Immunkomplexbildung beteiligte Immunglobuline und Komplement im akuten hyperergischen Granulom konzentriert und verteilt? Welche Bedeutung hat diese Verteilung für die Entwicklung der granulomatösen Entzündungsreaktion?
- Wo befinden sich Zellen der Makrophagenlinie im akuten hyperergischen Granulom?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Auswahl der Gewebeproben aus Leber und Darm

Die verwendeten Gewebeproben aus der Dickdarmschleimhaut und der Leber waren Patienten bioptisch entnommen worden, die sich besuchsweise in für *Schistosomiasis* bekannten Endemiegebieten aufgehalten hatten und die teilweise eine akute unspezifische klinische Symptomatik präsentierten. Die Entnahme erfolgte aus diagnostischen Gründen endoskopisch unter den Bedingungen des aktuellen Standes der klinischen Medizin. Die in 4%-igem gepufferten Formalin konservierten Biopsate wurden von der Klinischen Abteilung des Tropeninstitutes zur Aufarbeitung und histopathologischen Abklärung an die Pathologische Abteilung des Bernhard-Nocht-Institutes (Professor Dr. P. Racz) übermittelt. Für die vorliegende Untersuchung wurden von insgesamt 465 histologisch bestätigten Schistosomiasisfällen aus einem Zeitraum von fünfzehn Jahren (1983–1997) Gewebeproben von sechzehn Fällen untersucht, die definierte Auswahlkriterien erfüllten. Vierzehn Biopsate stammten aus der Dickdarmschleimhaut und zwei Gewebeproben aus der Leber von Patienten, die entweder durch *Schistosoma mansoni* oder durch *Schistosoma japonicum* infiziert worden waren. Ausgewählt wurden Proben, die bereits in der Übersicht eine schwere granulomatös entzündliche Reaktion mit starker Präsenz Eosinophiler im Bereich vitaler Eier oder Eireste zeigten oder zusätzlich eine zentrale periovale eosinophile Nekrose präsentierten (Tabelle.3). Die Anfertigung tieferer Schnittstufen diente einerseits der weiteren Suche nach eosinophilen Nekrosen auch in Gewebeproben, in denen eine Nekrose in der Übersicht zunächst nicht identifiziert worden war, und andererseits der immunhistochemischen Markierung und morphologischen Untersuchung dieses Phänomens bei *Akuter Schistosomiasis*.

Eingangsbuchnr./ Geschlecht/ Alter:	Gewebe	Befunde/ Diagnose
1037/83/ männlich/ 45 Jahre	Dickdarm- schleimhaut	In einem Abschnitt mit deutlicher Becherzellverminderung in reichlichem Stroma mehrfach Kapillaren, die dicht mit eosinophilen Leukozyten ausgefüllt sind. Ein großes histiozytär-epitheloidzelliges Granulom. Im Zentrum struktureloses schwach eosinophiles Material mit eingestreuten Eosinophilen und eosinophilem Schutt. In der Umgebung beträchtliche Vermehrung von eosinophilen Leukozyten. Diagnose: offenbar Schistosomeneigranulom
1074/83/ männlich/ 45 Jahre	Lebergewebe zwei Gewebe- stücke	Lobulär gegliedertes Lebergewebe  Teilweise Leberzellnekrosen und Leberzellen mit Lochkernen. Einige Sinusoiden mit ein, zwei Granulozyten. Geringe kollagene Fibrose der Portalfelder. Ebenda einige Eosinophile Granulozyten. Ein größeres Granulom, vorwiegend aus Eosinophilen Granulozyten und Makrophagen bestehend.  In einem Portalfeld des zweiten Gewebstückes ein großes Granulom mit Nekrose. Das Granulom umgeben von Eosinophilen Granulozyten und Makrophagen. Am Rand des Granuloms Kapselbildung aus kollagenen Fasern. Diagnose: Leberbeteiligung bei <i>Bilharziose</i>
1086/83/ männlich/ 37 Jahre	Dickdarm- schleimhaut	aus Mucosa und Submucosa mit stark erhöhter Anzahl von Eosinophilen Granulozyten in der Propria mucosae. Zwei Schistosomeneigranulome mit eosinophiler Nekrose sowie reichlich Eosinophilen Granulozyten und Makrophagen in der Submucosa. Diagnose: <i>Bilharziose</i>

1284/83/ männlich/ 26 Jahre	Dickdarm- schleimhaut	aus Mucosa und Submucosa. Gering erhöhte Anzahl von Plasmazellen und Eosinophilen Granulozyten in der Propria mucosae. Ebenda mehrere Granulome aus Epitheloidzellen, Fibroblasten und Eosinophilen Granulozyten um Schistosomeneier. Mehrere Granulome mit eosinophiler Nekrose. Diagnose: <i>Bilharziose</i>
1293/83/ männlich/ 22 Jahre	Zwei Stücke Dickdarm- schleimhaut	mit muscularis mucosae. Stroma verbreitert, mäßig Rundzellen mit wenigen Eosinophilen. Einige Herde mit dichten Ansammlungen von Eosinophilen, in einem größeren Herd Einschmelzungen des Gewebes, ausgefüllt von massenhaft Eosinophilen. Darin deformierte Schale, wahrscheinlich eines Eies. Diagnose: offenbar floride <i>Bilharziose</i> .
108/84/ männlich/ 47 Jahre	Dickdarm- schleimhaut	aus Mucosa und Submucosa mit einem Schistosomen-eigranulom in der Submucosa sowie erhöhter Anzahl von Eosinophilen in der Propria mucosae. Eigranulom mit eosino-philer Nekrose um das vitale Schistosomenei sowie Epithel-oidzellen und viele Eosinophile. Diagnose: <i>Bilharziose</i> (vitale Schistosomeneier)
561/84/ männlich/ 24 Jahre	Dickdarm- schleimhaut	aus Mucosa und Submucosa mit erhöhter Anzahl von Plasmazellen und Eosinophilen in der Propria mucosae. In der Submucosa Schistosomeneigranulom mit periovaler eosinophiler Gewebsnekrose. Umgeben von Epitheloidzellen und Fibroblasten. Diagnose: <i>Bilharziose</i> mit stärkerer Immunantwort
580/84/ weiblich/ 22 Jahre	Leber- gewebe	Hypertrophie und Hyperplasie der Sternzellen. Darin oft Schistosomenpigment. Erhöhte Anzahl von Eosinophilen in den Sinusoiden. Einige Plasmazellen, leichte Proliferation der Gallengänge und Schistosomeneigranulome innerhalb von Portalfeldern. Im Zentrum der Granulome vitales Schistosomenei, umgeben von einer eosinophilen Nekrose mit vielen Eosinophilen. Die Granulome bestehend aus Epitheloidzellen und kleinen Lymphozyten. Diagnose: Granulomatöse Hepatitis bei akuter <i>Bilharziose</i>

1101/87 männlich/ 35 Jahre	Dickdarm- schleimhaut	aus Mucosa und Submucosa mit regelrecht geformten und gelagerten Drüsen sowie mit stark erhöhter Anzahl von Eosinophilen in der Propria mucosae. In der Submucosa mehrere Granulome mit zentralen eosinophilen Nekrosen, umgeben von Eosinophilen Granulozyten und Epitheloidzellen. Diagnose: <i>Bilharziose</i> mit starker Wirtreaktion.
1067/88/ männlich/ 33 Jahre	Dickdarm- schleimhaut	Am unteren Rand eines der drei kleinen Gewebstücke ein Teil eines Nekroseherdes mit blass angefärbtem nekrotischen Material. Peripher radiär gestellte Epitheloidzellen. Zwei Eianschnitte mit scharf intensiv rot konturiertem Saum (im Sinne eines Splendore-Hoepli Phänomes). Die Eier umgeben von reichlich Zellschutt, anscheinend vorwiegend bestehend aus zerfallenden Eosinophilen Granulozyten. Diagnose <i>Bilharziose</i> mit sehr aktiver zellulärer Immunität.
1377/88/ männlich/ 25 Jahre	Dickdarm- schleimhaut	Zwei Stücke Dickdarmschleimhaut mit Mucosa und Submucosa. Unauffällige Schleimhaut mit Lymphfollikel. Im zweiten Gewebstück leichte Vermehrung von Eosinophilen Granulozyten im Schleimhautstroma. Dichte Ansammlungen von Eosinophilen in drei mittelgroßen Gefäßen der oberen Submucosa. Dort großer, offenbar aus konfluierenden Eigranulomen bestehender Entzündungsherd mit intensiver Einstreuung von Eosinophilen. Zum Teil intensiv rote Anfärbung auf der Oberfläche erhaltener Eier im Sinne eines Hoepli-Phänomens. Diagnose: <i>Schistosomiasis</i> mit lebhafter zellulärer Reaktion des Gewebes.
757/92/ weiblich/ 31 Jahre	Dickdarm- schleimhaut	mit regelrecht geformten Krypten. In der Lamina propria stark erhöhte Anzahl von Eosinophilen Granulozyten. Ebenda ein Schistosomeneigranulom. Weitere fünf Granulome in der Submucosa. Innerhalb der Granulome ausgedehnte eosinophile Nekrosen. Die Nekrosen umgebend Makrophagen. In der Mitte der Granulome vitale Schistosomeneier. Diagnose: <i>Bilharziose</i> mit sehr ausgedehnter Gewebereaktion

157/94/ weiblich/ 24 Jahre	Dickdarm- schleimhaut	Mit regelrecht gefomten und gelagerten Krypten sowie mit gering erhöhter Anzahl von Eosinophilen Granulozyten in der Lamina propria. In der Submucosa viele große Schistosomeneigranulome mit sehr starker Beteiligung von Eosinophilen Granulozyten.
579/94/ männlich/ Alter unbekannt	Dickdarm- schleimhaut	Aus Mucosa und Submucosa, mit regelrecht geformten Krypten sowie stark erhöhte Anzahl von Eosinophilen Granulozyten in der Lamina propria. Ebenda einige vitale Schistosomeneier. Die Mehrheit der Eier sind in der Submucosa. Sie sind vital und von einer dichten zellulären Infiltration umgeben, vorwiegend bestehend aus Eosinophilen Granulozyten und Plasmazellen. Diagnose: <i>Bilharziose</i> .
401/96/ weiblich/ 55 Jahre	Dickdarm- schleimhaut	Mit regelrecht geformten Krypten sowie mit mehreren Schistosomeneigranulomen, überwiegend in der Submucosa. Die Eigranulome enthalten vitale Schistosomeneier. Um die Schistosomeneier eosinophile Nekrosen sowie Proliferation von Makrophagen. Um diese Proliferation in der Lamina Propria viele Eosinophile Granulozyten.  Diagnose: <i>Akut-hyperergische Schistosomiasis</i>
55/97/ männlich/ 15 Jahre	Zwei Streifen Dickdarm- schleimhaut	Im Stroma des ersten Gewebstückes Einblutungen mit reichlich feinkörniger Hämosiderinbildung. An einer Stelle ungemein zahlreiche Eosinophile Granulozyten. Anhängend mechanisch stark alteriertes Gewebe, offenbar bestehend aus Mucosa und Submucosa. Dieses Gewebe anscheinend dicht von jetzt zerquetschten Eosinophilen Leukozyten infiltriert, sonst keine Einzelheiten, auch keine Schistosomeneier, mehr zu erkennen.

Tabelle 3. Anonymisierte Angaben der ausgewählten Fälle: Geschlecht, Alter, histopathologische Befunde und Diagnosen.

### **3.2 Anfertigung von Paraffinschnitten und Aufbereitung für die Immunhistochemie**

Zur bestmöglichen Erhaltung des nicht länger als 24 Stunden in 4%-igem Formalin (Lilly) fixierten Gewebes folgte auf eine Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe bei 38 ° Celsius ein schonendes Einbettungsverfahren.

1. 70 % Äthanol für 1,5 Stunden
2. 96 % Äthanol für 1,5 Stunden
3. 96 % Äthanol für 1,5 Stunden
4. 100 % Äthanol für 1,5 Stunden
5. 100 % Äthanol für 1,5 Stunden
6. 100 % Äthanol für 1,5 Stunden
7. Xylol für 1 Stunde
8. Xylol für 1 Stunde
9. Xylol für 1,5 Stunden
10. Dreimal über je 1,5 Stunden in Paraplast (tissueewax, medite) bei 60 ° Celsius
11. Einbettung der Gewebestücke in Paraplast

Anschließend Anfertigung von 3 µm dicken Paraffinschnitten am Schlittenmikrotom. Strecken der Paraffinschnitte im etwa 42° warmen Wasserbad und danach Aufbringen der Schnitte auf Objektträger. Anheften der Schnitte durch Denaturierung der Proteine im Wärmeschrank über Nacht (optimal 48 Stunden). Entparaffinieren in Xylol, und Rehydrieren in einer absteigender Alkoholreihe. Weiterverarbeitung der Schnitte in verschiedenen Färbeverfahren wie folgt:

### **3.3 Histologische Färbeverfahren**

#### **3.3.1 Konventionelle Färbungen an Paraffinschnitten**

Für jedes Präparat wurden je nach darzustellender Schnittebene eine oder mehrere Hämatoxylin und Eosinfärbungen (H&E) nach Standardmethoden durchgeführt.

Die Aufarbeitung der paraffinierten Gewebeproben mit Hilfe der H&E Färbung dienten zunächst der Diagnosestellung und später für die vorliegende Arbeit als Übersichtsfärbung zur Orientierung.

#### **3.3.2 Immunhistochemische Verfahren an Paraffinschnitten**

Eine immunhistochemische Aufarbeitung der Gewebeproben erfolgte sowohl mit Hilfe der Peroxidase-Anti-Peroxidase-Methode (PAP) nach Sternberger (1979) als auch nach der Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase-Methode (APAAP) nach Cordell et al. (1984). Die einzelnen Arbeitsschritte und die Verfahren zur Herstellung der Reagenzien wurden den Handbüchern I und II über immunhistochemische Färbemethoden der Firma Dakopatts GmbH, Hamburg (1988) entnommen. Ergänzend dazu wurden die in der Abteilung erworbenen Erfahrungen mit den Färbemethoden genutzt.

Zum Vorbereiten der PAP-Methode, die überwiegend zum Nachweis von Immunglobulinen und Komplement im Paraffinschnitt bei polyklonalen Antikörpern angewendet wird, wurde zwecks Ausschalten der Endogenen-Peroxidase-Reaktion im Rahmen der PAP-Methode eine 20-minütige Inkubation der Schnitte in einem Methanolbad mit 1% Wasserstoffperoxid vorgenommen.

Danach wurde versucht, die unspezifische Hintergrundaktivität durch Inkubation mit normalem 1:3 in Spülpuffer verdünntem Schweineserum (DAKO X 901) zu reduzieren. Alle Verdünnungen und Spülgänge erfolgten mit dem salzreichen Puffergemisch (Tris/NaCl-Spülpuffer pH 7,4).

Polyklonalen Brückenantikörpern aus Kaninchen oder Maus wurde 1% Humanserum zugefügt, um unspezifische Reaktionen zwischen Kaninchen- und Maus-Antikörpern mit Hilfe von Humanantigenen in der Lösung bereits vor der Reaktion mit dem zu untersuchenden Gewebe ablaufen zu lassen.

Für das APAAP-Verfahren wurden die Antikörper in Trishydromethylaminomethan-Puffer (Tris-Puffer) bei einem pH von 7,4 verdünnt. Die Schnitte wurden zwischen den einzelnen Arbeitsschritten in Tris-Puffer (pH 7,4) gewaschen und das chromogene Reagenz in Tris-Puffer (pH 8,2) angesetzt. Zwecks Hemmung der unspezifischen Hintergrundaktivität wurden die Schnitte entweder zwei Minuten in Citratpuffer (pH 6,0) gekocht oder mit Proteinase K inkubiert. Die Inkubation der Schnitte mit den Antikörperlösungen erfolgte in Feuchtkammern bei Raumtemperatur.

Als Substrat wurde ein Naphtolphosphatsalz und als Chromogen 5%-ige Neufuchsinlösung zugefügt. Daraus ergab sich die rote Färbung. Als Substrat für die Peroxidasereaktion diente Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB), das zu einem braunen Farbstoff oxidiert.

## Herstellung der Reagentien für die immunhistologische Untersuchung

### Puffer

- Citratpuffer (pH 6,0) (zum Kochen für die APAAP-Reaktion)  
4,2 g Zitronensäure in 2 l aqua tridest gelöst. Mit Natronlauge auf pH 6,0 titriert
- Tris/NaCl Spülpuffer (pH 7,4) (für alle Spülvorgänge und zum Verdünnen)  
0,5 l Tris/NaCl in 2 l 0,9% NaCl. pH 7,4 mit HCl einstellen

Herstellen des Tris/NaCl:

5 g NaCl  
6 g Tris  
1 l aqua tridest  
pH mit HCl auf 7,4 einstellen

### Für APAAP-Reaktion

- Vorbehandlung durch:
  - 1.) zwei Minuten Kochen in Citratpuffer (pH 6,0) oder
  - 2.) Proteinase K

0.002 g Proteinase K  
20 µl CaCl<sub>2</sub>  
200 µl Tris  
200 ml Tridest

- Antikörper

Primärer AK: Spezifische Verdünnungen mit Tris-Puffer (pH 7,4) siehe Tab.4: (Darstellung der verwendeten Primärantikörper im formalinfixierten Material)

Sekundärer AK: 7,4 ml PBS  
(1:20) 0,2 ml Humanserum (AB-Serum)  
0,4 ml DAKO 259 Kaninchenantikörper gegen Maus

Tertiärer AK: 7,64 PBS  
(1:40) 0,2 ml Humanserum  
0,16 ml APAAP-Komplex (monoklonaler Mausantikörper gegen Kaninchen (Imunotech))

Substrate

- Neufuchsin-Substrat (für APAAP)

Substratansatz A:

31,25 ml Propandiol  
(aus 21,028 g 2-Amino-2 -Methylpropan-1,3diol auf 1 l aqua dest)  
87,5 ml aqua tridest  
0,05 g Levamisole

Substratansatz B:

0,0625 g Naphtol-AS-Bi-Phosphat  
750 µl DMF (Dimethylformamid)

Substratansatz C:

625 µl 4% ige NaNO<sub>2</sub>  
(0,025 g in 625 µl Ampuva (Natriumnitritlösung))  
250 µl 5% ige Neufuchsinlösung (5 g Neufuchsin auf 100 ml 2HCL)

Substratansätze A und C zusammenkippen. Unter Zugabe von B (pH= 8,7 mit HCL einstellen und Lösung filtrieren)

- DAB-Substrat (für PAP)

Lösen von 6 mg 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (Dab, Walter) in 10 ml 0,5 M Tris-Puffer (pH 7,6).

Die Chromogene wurden unmittelbar vor dem Gebrauch hergestellt und einmal gefiltert

Die Arbeitsschritte zur Durchführung immunhistochemischer Färbungen werden im Folgenden erläutert. Alle Reaktionsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Antikörperlösungen wurden auf in Feuchtkammern liegende Objektträger im Bereich der Schnitte pipettiert. Spülen der Objektträger zwischen den einzelnen Inkubationsphasen mit Tris-Puffer pH 7,4

### 3.3.2.1 Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode (PAP)

- 1.) je Schritt 7 Min Entparaffinieren der Schnitte und Rehydrierung nach Standardmethoden. (Entparaffinieren bis Aqua dest oder in absteigender Alkoholreihe bis zu 70 %igen Alkohol)
- 2.) 20-30 Min. Blockade der endogenen Peroxidase in einem Methanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bad mit 1%-iger Peroxidase (1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf 100 ml Methanol) (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : 30%, Merck)
- 3.) 10 Min. Spülpuffer (pH 7,4)
- 4.) 10 Min. Reduzieren der unspezifischen Hintergrundbindungen mit normalem Schweineserum (DAKO X 901) 1:3 in Spülpuffer verdünnt. Überschüssiges Serum wurde abgekippt, nicht gespült
- 5.) Über Nacht: Inkubation mit dem gewünschten Primärantikörper nach Tabelle 4. (Darstellung der verwendeten Primärantikörper im formalinfixierten Material)
- 6.) 10 Min. Spülpuffer (pH 7,4)
- 7.) 30 Min. Inkubation mit dem sekundären 1:50 verdünnten bivalenten Schwein-Anti-Kaninchen IgG (Dakopatts Z196)
- 9.) 15 Min. Spülpuffer (pH 7,4)
- 10.) 30 Min. Präparate mit 1:100 verdünnten PAP-Komplex (pH 7,4) (Meerrettichperoxidase-Kaninchen-anti-Meerrettichperoxidase-Komplex (Dakopatts rabbit Z113) für 30 Minuten unter Abdunkelung, da der PAP-Komplex bei Lichteinfluss instabil ist
- 11.) 10 Min. Spülpuffer (pH 7,4) (im Dunkeln)
- 12.) 5 bis 15 Min. Inkubation mit dem Chromogen (DAB) unter mikroskopischer Kontrolle des Färbeverhaltens
- 13.) 10 Min. Spülpuffer (pH 7,4)
- 14.) 2 bis 3 Min. Gegenfärben der Kerne in Hämalaun nach Meyer
- 15.) 10 Min Bläuen unter Leitungswasser
- 16.) Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis zum Xylol und unter leichtem Druck. Eindeckelung mit Kaisers Glyzeringelantine (Merck)

### **3.3.2.2 Alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-Methode (APAAP)**

- 1.) Entparaffinieren der Schnitte und Rehydrierung wie unter PAP-Technik beschrieben
- 2.) 2 Min. Hemmung der unspezifischen Hintergrundaktivität durch Kochen der Schnitte in Citratpuffer (pH 6,0) oder Inkubation mit Proteinase K.
- 3.) Über Nacht Inkubation mit dem Primärantikörper nach Tab. 4 (in Tris-Puffer verdünnter monoklonaler Maus anti-Human (AH) Antikörper)
- 4.) 5 Min. Spülpuffer (pH 7,4)
- 5.) 30 Min. Inkubation mit sekundären Antikörper 1:20 (Alkalische-Phosphatase-konjugierter Kaninchen-anti-Maus IgG Antikörper- DAKO Z 259)
- 6.) 5 Min. Spülpuffer (pH 7,4)
- 7.) 30 Min. Inkubation mit dem tertiären monoklonalen Maus-anti-Kaninchen Antikörper (APAAP-Komplex (Dianova) 1:40 verdünnt)
- 8.) 5 Min. Spülpuffer (pH 7,4)
- 9.) 10 Min. Sekundärer Antikörper (1:20)
- 10.) 5 Min. Spülpuffer (pH 7,4)
- 11.) 10 Min. Tertiärer Antikörper (1:40)
- 12.) 5 Min. Spülpuffer (pH 7,4)
- 13.) 5 bis 15 Min. Inkubation und Sichtbarmachung des spezifisch gewebsständig gebundenen Enzyms mit dem Neufuchsin-Substrat unter mikroskopischer Kontrolle der Färbereaktion (Magentarot). Blockierung der gewebeeigenen alkalischen Phosphatase durch Levamisole
- 14.) 5 Min. Spülpuffer (pH 7,4)
- 15.) 2 Min. Kernfärbung in Hämalaun nach Meyer
- 16.) 10 Min. Bläuen der Schnitte in Leitungswasser
- 18.) Entwässerung der Schnitte
- 17.) Eindeckelung der Präparate in Kaisers Glyzeringelantine (Merck)

Primärer Antikörper	Antigen	Spezifität	Klon	Behandlung	Herkunft/Bezugsquelle/Bestellnr.:
AH-ECP-EG2	Sezernierte-/aktivierte Form des ECP	Freies ECP, EDN, EPX	EG-2	VD: 1:100 VB: keine Ink.: ÜN / RT	Kabi Pharmacia (10-9196-01)
AH-MBP	MBP	MBP (aktivierte/nicht aktivierte Eosinophile)	BMK-13	VD: 1:10 VB: P(K) Ink.: ÜN / RT	Cymbus Biotech./DIANOVA (CBL 419)
AH-CD4	T-Lymphozyten	CD4 T-Helferz., IZ,TZ	1 F6	VD: 1:40 VB: Kochtopf in EDTA-Puffer Ink.: ÜN / RT	Medac Diagnostica (NCL-CD4-1F6)
AH-CD68	CD 68	Makrophagen (EZ, RZ), Dendritische Z., Monozyten	PG-M1	VD: 1:10 VB: 2 Min. Kochtopf Citratpuffer (pH 6,0) Ink.: ÜN / RT	DAKO/AS (M0876)
AH-IgE	IgE	IgE, PZ	polyklonal	VD: 1:50 Ink.: ÜN / Kühlschrank	DAKO/AS (A0094)
AH-IgG	IgG	IgG, PZ	polyklonal	VD: 1:1000 Ink.: ÜN / Kühlschrank	DAKO/AS (A0423)
AH-IgA	IgA	IgA, PZ	polyklonal	VD: 1:300 Ink.: ÜN / Kühlschrank	DAKO/AS (A0262)
AH-C1q	Komplement C1q	C1q aus humanem Plasma	polyklonal	VD: 1:40 VB: 15 Min. P(K) Ink.: ÜN / RT	DAKO/AS (A0136)
AH-C3d	Komplement C3d	Freies C3d/ C3d Epitope des Komplementmoleküls	polyklonal	VD: 1:50 VB: 15 Min. P(K) Ink.: ÜN / RT	DAKO/AS (A0063)
AH-P55	Dendritische Zellen (DZ)	EBV induz.; DZ	Angabe nicht verfügbar	VD: 1:350 VB: 2 Min. Kochtopf Citratpuffer (pH 6,0) Ink.: ÜN / RT	R. Steinmann, Rockefeller University/ New York

**Tabelle 4.:** Darstellung der verwendeten Primärantikörper im formalinfixierten Material

Abkürzungen: AH = anti-human; DZ = Dendritische Zellen; ECP = eosinophil cationic protein; EDN = eosinophil derived neurotoxin; EPX = eosinophil protein X; EZ = Epitheloidzellen; Ink. = Inkubation; IZ = Inducerzellen; MBP = major basic protein, P(K) = Proteinase K; PZ = Plasmazellen; RT = Raumtemperatur; RZ = Riesenzellen; TZ = Thymozyten; VB = Vorbehandlung; VD = Verdünnung; ÜN = über Nacht

### **3.4 Spezifika der verwendeten primären Antikörper**

Die paraffinierten Gewebeproben wurden zur Orientierung und als Übersichtsfärbung zunächst mit Hämatoxylin & Eosin (H&E) markiert. Weiterführende immunhistochemische Verfahren auf der Basis nachgewiesener Antikörper-/Antigenreaktionen dienten dazu, zusätzliche Informationen über die Verteilung und Beziehung markierter Strukturen im Gewebe und in den untersuchten Granulomen zu erhalten. Die Spezifika der in der Übersichtsfärbung (H&E) und in den immunhistochemischen (APAAP/PAP) Verfahren verwendeten Marker werden im folgenden kurz erläutert. Eine Übersicht zeigt Tabelle 4.

#### **3.4.1 Hämatoxylin & Eosin (H&E)**

Der durch Oxidation von Hämatoxylin (nach Meyer) gewonnene Farbstoff Hämatein markiert in Kombination mit Aluminium, Eisen, Chrom oder Kupfer Zellkerne blau. Die anschließende Gegenfärbung durch Eosinlösung kontrastiert die Kernfärbung durch Markierung des Zytoplasmas in kräftigem Rot. Kollagenfasern oder Muskelzellen werden in blasserem Rot dargestellt.

#### **3.4.2 Immunhistochemische Marker**

##### **3.4.2.1 Enzymmarker-Darstellung der Eosinophilen Granulozyten**

Die Granula der Eosinophilen Granulozyten beinhalten neben einem kationischen Protein (ECP) und einem Kernprotein (major basic protein (MBP)) mit helminthotoxischer Wirkung auch eine eosinophile Peroxidase (EPO), die in Kombination mit Wasserstoffperoxid und Halogeniden als starkes Oxidans sowohl für Schistosomula (Klebanoff et al., 1983) als auch für Wirtszellen toxisch ist. Es konnte an Eosinophilen von Spendern mit Eosinophilie gezeigt werden, dass die zytotoxische Kapazität der Eosinophilen gegen antikörperbesetzte Parasiten mit der Aktivierung der Eosinophilen zunimmt (Bass et al., 1980; Winqvist et al., 1982; Moqbel et al., 1983; Gleich & Adolphson, 1986; Gleich et al., 1993). Es wird weiter angenommen, dass die Schwere der Erkrankung mit der Anwesenheit aktivierter Eosinophiler korreliert. Von besonderem Interesse war es daher, die Rolle der Eosinophilen bei der Bildung und Entwicklung akuter hyperergischer Granulome näher zu betrachten. Insbesondere beschäftigte uns die Frage, welche Bedeutung der massiven Nekrose aktivierter

Eosinophiler bei der Freisetzung helminthotoxischer Proteine und Zerstörung der Schistosomeneier zukommt.

An Paraffinschnitten der untersuchten Gewebe aus Leber und Darm wurden monoklonare Enzymmarker zum Nachweis für das Kernprotein major basic protein (MBP) und das Matrixprotein ECP-EG-2 (eosinophil protein clone 2) eingesetzt.

## **ECP-EG2**

Das eosinophil cationic protein (ECP) ist auf molekularer Basis etwa zehn mal stärker aktiv und toxisch als MBP. Die Helminthotoxizität von ECP wurde in vitro sowohl an Schistosomula (Mc Laren et al., 1981, Ackerman et al., 1985) als auch an Eiern von *S. mansoni* (Sher et al., 1980; Kephart et al., 1988) beobachtet. Der monoklonale Antikörper EG2 bindet nach Herstellerangaben an die sezernierte Form von ECP, die, wie verbreitet angenommen, nur von aktivierten oder sezernierenden oder beide Eigenschaften aufweisenden Eosinophilen produziert wird (Tai et al., 1984; Azzawi et al., 1990; Bentley et al., 1992). Jahnsen et al., (1994) bezweifeln hingegen, dass der Marker ECP-EG2 immunhistochemisch zur Unterscheidung zwischen ruhenden und aktivierten degranulierenden Eosinophilen tauglich ist. EG2 bindet sowohl an ECP als auch an das vermutlich strukturell ähnliche eosinophil protein-X (EP-X) (Fredens et al., 1988), das als identisch mit eosinophil derived neurotoxin (EDN) angesehen wird und dem ein geringeres helminthotoxisches Potenzial beigemessen wird (Mc Laren et al., 1984).

Referenzen: Po-Chun et al., 1984

## **Marker für humanes major basic protein (MBP)**

Für das major basic protein des Kerns ist keine enzymatische Aktivität beschrieben. Es liegt in großen Mengen (basic) vor und ist sowohl gegen Parasiten als auch gegen Wirtszellen toxisch (Gleich et al., 1973, 1993; Butterworth et al., 1979 (b); Mc Laren et al., 1984). Bei dem verwendeten Marker handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper gegen MBP (Isotyp IgG1). Der Antikörper ist spezifisch für eosinophiles MBP und unabhängig vom Aktivierungszustand der Eosinophilen Granulozyten.

Referenzen : Moqbel R et al., 1992; Kroegel C.; Lung 1990

### 3.4.2.2 Marker für Immunglobuline

#### Immunglobuline E, G, A

Polyklonale Immunglobulinmarker wurden verwendet, um die Immunglobulinproduktion der Plasmazellen in der Leber und im Darm bei *Akuter Schistosomiasis* zu untersuchen. Dabei wurden Ablagerungen der Immunglobuline innerhalb der Schistosomeneier, auf der Eioberfläche, im Zentrum sowie in der Peripherie der hyperergischen Granulome untersucht und gefragt, welche Rolle einzelne Immunglobulinklassen in den verschiedenen Arealen der Granulome und um die Granulome herum spielen und welche Bedeutung sie für die Entwicklung und Unterhaltung der Granulome haben. Besonderes Interesse galt darüber hinaus der Komplexbildung aus Immunglobulinen und Eiantigenen im Granulom sowie der räumlichen Beziehung zu Komplement und Komplementrezeptor tragenden Entzündungszellen wie Eosinophilen Granulozyten.

#### IgE

Der verwendete polyklonale Kaninchenantikörper anti-IgE markiert humanes IgE spezifisch. Dabei wird die Epsilon-Kette des humanen IgE erkannt (DAKO Produktbeschreibung 2001). IgE hat kaum opsonierende Eigenschaften. Seine Stärke ist die Induktion einer Entzündungsreaktion. Dies geschieht durch die Bindung an Basophile Granulozyten und Mastzellen über hochspezifische  $Fc\epsilon$ -Rezeptoren ( $FC\epsilon RI$ ) und darüberhinaus durch Bindung an Antigene. Mastzellen werden durch die Bindung angeregt, Entzündungsmediatoren freizusetzen. Kennzeichen dafür ist die Induktion einer unmittelbaren anaphylaktischen Überempfindlichkeits- und Entzündungsreaktion, die zwar zum Zweck der Abwehr gegen Parasiten vorteilhaft ist, andererseits im Wirtsgewebe aber eine allergische Reaktion auslösen kann. Auch Eosinophile Granulozyten (Gounni et al., 1994) und Langerhanszellen (Wang et al, 1992) exprimieren den spezifischen Rezeptor  $FC\epsilon RI$  auf ihrer Oberfläche.

## **IgG**

Der polyklonale Kaninchenantikörper anti-IgG markiert die Gamma-Kette des humanen IgG spezifisch (DAKO, Produktbeschreibung 2001). IgG stellt 75% der Immunglobuline im Serum. Die vier Subklassen der IgG-Antikörper rekrutieren und aktivieren die Komplementkaskade je nach Spezifität durch Bindung an Komplement C1 q oder C 3 b (Bruggemann et al., 1987). Über verschiedene FC Rezeptoren binden IgG Subklassen darüber hinaus an Makrophagen, polymorph-nukleare Zellen und Lymphozyten (inklusive B-Zellen). Diese Bindungen führen durch Anregung der Phagozytoseaktivität (Indik et al, 1995) und Vermittlung einer antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) (Unkeless, 1989) schließlich zur Zerstörung des gebundenen Antigens. Darüberhinaus können Signale zur Ausschüttung von Zytokinen, Bildung von Zytokinrezeptoren, Sekretion von Immunglobulinen und Regulierung der Antigenpräsentation durch FC-Rezeptorbindung vermittelt werden.

## **IgA**

Der polyklonale Antikörper anti-IgA markiert die Alpha-Kette des humanen IgA sowie humane IgA produzierende Plasmazellen und ihre Vorläufer in paraffiniertem Material spezifisch (DAKO Produktbeschreibung 2001). IgA wird größtenteils in sekretorischer Form synthetisiert und ist das wichtigste Immunglobulin der Schleimhäute. Der größte Anteil IgA produzierender Plasmazellen findet sich in der Mukosa des Dünndarms und unterstreicht deren große Bedeutung für die Schleimhautimmunität. Nach Antigenkontakt wird gleichzeitig die Bildung von sekretorischem IgA und Plasma-IgA stimuliert (Lehner et al., 1994). IgA fördert keine Entzündungsreaktion, die die Intaktheit der Darmschleimhaut stören und damit deren Schutzfunktion beeinträchtigen würde. Die Aufgabe von sekretorischem IgA ist, das Eindringen von Pathogenen durch die Epithelbarriere zu verhindern. Durch Opsonierung von Antigenen und Bindung an spezifische Fc $\alpha$ R Oberflächenrezeptoren für IgA auf Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten werden Antigene für die Phagozytose vorbereitet. Diese Bindungen fördern die Immunkomplexbildung auf der Schleimhautoberfläche. IgA besitzt die Fähigkeit die Degranulation von Eosinophilen über den Fc $\alpha$ -Rezeptor zu induzieren. Darin zeigt sich die antiparasitäre Eigenschaft von IgA im Schleimhautgewebe, das von vielen Parasiten als Eintrittspforte in Wirtsorganismus genutzt wird.

### 3.4.2.3 Marker für Makrophagen

Makrophagen spielen als antigenpräsentierende Zellen und Phagozyten eine wichtige Rolle in immunologischen Granulomen. Das frühe akute Stadium der Granulomentwicklung bei *Schistosomiasis* wird durch junge Makrophagen dominiert. Von Interesse war es daher für uns, zu untersuchen, wie sich innerhalb akuter hyperergischer Granulome Makrophagen im Verlauf der Granulomentwicklung anordnen und entwickeln. Der monoklonale als anti-human (AH) Macrophage (CD 68) bezeichnete Marker (Maus IgG3  $\kappa$ ) markiert das CD 68-Epitop auf humanen reaktiven Makrophagen in kryostat- und paraffinebettetem Material. Es handelt sich um ein intrazytoplasmatisches Glykoprotein, das spezifisch für die Monozyten/ Makrophagenzellreihe ist.

Referenz: Falini B et al, 1993

### 3.4.2.4 Marker für Komplement

Die Komplementproduktion ist während der akuten Phase der Immunantwort erhöht. Inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , aber auch Immunkomplexe sind starke Induktoren einer Komplementreaktion, die wesentlich die Phagozytose von Pathogenen fördert.

#### Marker für C1q-Komplement

Der als C1q Komplement bezeichnete polyklonale Kaninchen-Komplementmarker markiert humanes Komplement (DAKO Produktbeschreibung 2001). Immunkomplexe (Ig/Ag) aktivieren das Komplementsystem über den klassischen Weg. Komplement C1q fördert über die Bindung an die FC Region von in Antigen/Antikörperkomplexen gebundenen Immunglobulinen (IgM, IgG) einerseits und durch die Bindung an spezifische Komplementrezeptoren auf der Oberfläche von Erythrozyten andererseits das Entfernen der zirkulierenden Immunkomplexe (IC) aus dem Blutkreislauf. Mononukleare Phagozyten binden an diese Erythrozyten-IC-Komplexe und bauen diese in Leber und Milz ab. (Fantone & Ward in: Rubin & Farber (eds.), Pathology, 1999). Die höchste Bindungsaktivität zeigt C1 q zeitgleich bei maximal erhöhtem IgM und Eosinophilie etwa zehn Wochen post infectionem (Lawley et al., 1979).

### **Marker für C3d-Komplement**

Bei dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper C3d handelt es sich um einen Marker, der sowohl mit freiem C3d als auch mit C3d Epitopen auf dem C3 Komplementmolekül reagiert. Es wird angenommen, dass C3d innerhalb von Immunkomplexen durch die Fähigkeit seines Rezeptors CRI (CD21) B-Lymphozyten über das Oberflächenmolekül CD 19 zu stimulieren (Krych et al., 1992) in die Immunregulation eingreift. Da zirkulierende Immunkomplexe (CIC) unspezifisch Komplement binden, korreliert der CIC-Spiegel nicht notwendigerweise mit dem C3d Spiegel (Boros, 1989).

Referenz: Peakmann M et al., 1987

### **3.4.2.5 Marker für CD4 T-Lymphozyten**

Der verwendete monoklonale Antikörper CD4-IgG1 aus der Maus erkennt das als CD4 (T4) bezeichnete transmembrane Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 59 kD. Das CD4 Antigen wird überwiegend auf T-Helferzellen expremiert, die etwa 45% der peripheren T-Lymphozyten ausmachen. Auch Thymozyten, Monozyten und Makrophagen expremieren dieses Glykoprotein in geringerer Dichte auf ihrer Oberfläche. Die Antigenerkennung ist auf die MHC II Klasse beschränkt. Das Oberflächenprotein CD4 ist der Rezeptor für das HIV gp 120. Dies begründet seine besondere Rolle bei der Replikation des HIVirus im befallenen Organismus.

### **3.4.2.6 Marker für Dendritische Zellen**

Dendritische Zellen gehören zu den wichtigsten Antigen präsentierenden Zellen. Sie rufen eine besonders starke Zellantwort hervor (Steinmann et al., 1991, Caux et al., 1999). Es wurde für den Nachweis sowohl von reifen Dendritischen Zellen als auch von interdigitierenden Dendritischen Zellen ein neuerer monoklonaler Marker (p55) verwendet. Seine Verwendbarkeit wird jedoch dadurch eingeschränkt, dass auch Kreuzreaktionen mit Kapillarendothelzellen vorkommen (Lotze & Jaffe., 1999). Wiederum markiert CD 68 Teile der Dendritischen Zellen in Kernnähe, reagiert aber deutlicher mit Makrophagen.

Referenzen: Langhoff E; University of Hershey; Hershey; PA

### **3.5 Vorversuche zu ECP-EG2, MBP (APAAP) sowie C1q und C3d (PAP)**

Der Nachweis kationischer Granulaproteine aus Eosinophilen mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper gegen den EG2-Klon des eosinophilic cationic protein (ECP-EG2), major basic protein (MBP) war wesentlicher Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Da in der Abteilung mit den oben genannten Markern sowie mit den ebenfalls verwendeten polyklonalen Markern gegen Komplement C1 q und C3d bisher keine Erfahrung vorlag, war es notwendig, einige Vorversuche zu unternehmen. Ziel dieser Vorversuche ist es gewesen, das Färbeverhalten der Marker und die optimalen Verdünnungen der Primärantikörper, Brückenantikörper und tertiären Antikörper (APAAP-Komplex, PAP-Komplex) zueinander zu bestimmen, um eine maximale spezifische Anfärbung mit möglichst geringer Hintergrundfärbung zu erzielen.

Nachfolgend sollen die Ergebnisse der Vorversuche kurz erläutert werden:

- 1) Eine Hemmung der unspezifischen Hintergrundaktivität wurde im Rahmen der APAAP-Technik durch zwei minütiges Kochen in Citratpuffer (pH 6,0) oder durch Inkubation mit Proteinase K angestrebt. Für die PAP-Technik erfolgte zu demselben Zweck eine Inkubation mit normalem Schweineserum.
  
1. Spezifische primäre Antikörper gegen Granulaproteine aus Eosinophilen (ECP-EG2, MBP) sowie Antikörper gegen Komplement (C1 q und C3d) wurden unter Einbeziehung der Empfehlungen der Hersteller sowie entsprechend der Angaben von AFIP Laboratory Methods in Histotechnology in mehreren Schritten in verschiedenen Verdünnungsstufen auf ausgewählte, für Eosinophile Granulozyten positive Schnitte aufgebracht. In weiteren Schritten wurden zusätzlich die Inkubationszeiten variiert. Eine optimale spezifische Färbung für die jeweiligen Primärantikörper konnte schließlich für jeden Primärantikörper wie folgt erreicht werden:

## **ECP-EG2**

Nachdem sich eine spezifische Färbung der Schnitte weder nach 2-minütigem Kochen in Citratpuffer (pH 6,0) noch nach Inkubation durch Proteinase K einstellte, wurde auf eine Vorbehandlung versuchsweise verzichtet. Der primäre Antikörper wurde in drei Verdünnungsstufen von 1:70, 1:100 und 1:120 auf ausgewählte, für Eosinophile positive Schnitte aufgebracht. Dabei zeigte sich ohne Vorbehandlung der Schnitte bei einer Verdünnung des primären Antikörpers ECP-EG2 1:100 (sek. AK. 1:20, tert. AK 1:40) und einer Inkubation des Substrats über 10 Minuten das beste spezifische Färberesultat.

## **MBP**

Nachdem sich nach Vorbehandlung der Schnitte durch Kochen in Citratpuffer (pH 6,0) im Rahmen der APAAP-Methode kein spezifischer Färbeerfolg zeigte, wurde eine Vorbehandlung mit Proteinase K getestet. Danach wurde der primäre Antikörper anti-MBP in verschiedenen Verdünnungsstufen von 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 (1:10 -1:20 von Fa. Dianova empfohlen) auf ausgewählte, für Eosinophile positive Schnitte aufgebracht. Bei einer Vorbehandlung mit Proteinase K, Inkubation des 1:10 verdünnten Primärantikörpers MBP über Nacht (Sekundärantikörper 1:20, Tertiärantikörper 1:40) und einer Inkubation des Substrats über 15 Minuten zeigte sich das beste spezifische Färberesultat.

## **C1q**

Die Färbeergebnisse waren weder nach Vorbehandlung durch Kochen in Citratpuffer (pH 6,0), noch durch Kochen in EDTA-Puffer (pH 8,0) oder ohne Vorbehandlung befriedigend. Das beste spezifische Färbeergebnis konnte nach stufenweiser Austestung der Verdünnung von 1:30, 1:40, 1:50 und 1:60 bei einer Verdünnung von 1:40 unter 15 minütiger Vorbehandlung durch Proteinase K erzielt werden.

## **C3d**

Das gleiche Prozedere (Vorbehandlung, Verdünnungsreihe) das für die Austestung des Antikörpers C1q unternommen worden war, zeigte bei einer Verdünnung von 1:50 nach einer 15 minütigen Inkubation durch Proteinase K die beste spezifische Markierung.

## 4 Ergebnisse

Es folgt die qualitative lichtmikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Markierungen durch die verwendeten monoklonalen und polyklonalen Antikörper. Es werden die Markierungsmuster der verschiedenen verwendeten Antikörper in akuten hyperergischen Schistosomengranulomen im Darmgewebe und der Leber dokumentiert und anhand fotografischer Abbildungen (Fotomikroskop der Firma Zeiss (Axiophot)) illustriert. Ziel ist es, die morphologischen Merkmale der in Übersicht gesehenen Granulome mit eosinophiler nekrotischer Nekrobiose zu beschreiben und darüber hinaus die Beziehung der zugrundegehenden eosinophilen Leukozyten zu den Schistosomeneiern zu untersuchen.

### 4.1 Lebergewebe und Darmgewebe

In allen untersuchten Gewebeproben aus der Leber und dem Darm waren bereits in Standardfärbung (H&E) eosinophile hyperergische Granulome mit einem oder mehreren Schistosomeneiern oder Eischalenfragmenten im Zentrum zu sehen. Einige Schnitte zeigten neben Granulomen mit eosinophiler Nekrose in derselben Schnittstufe Frühgranulome oder fortgeschrittene Granulome mit Zeichen spärlicher aber auch bereits ausgedehnter Fibrotisierung des Granulomgewebes. Einbettungen der Granulome in- und Interaktionen mit dem umliegenden Leber- und Darmgewebe stellten sich wie folgt dar:

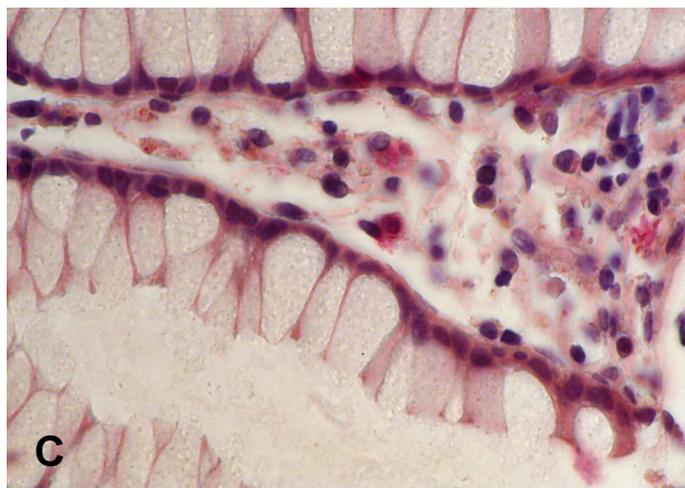
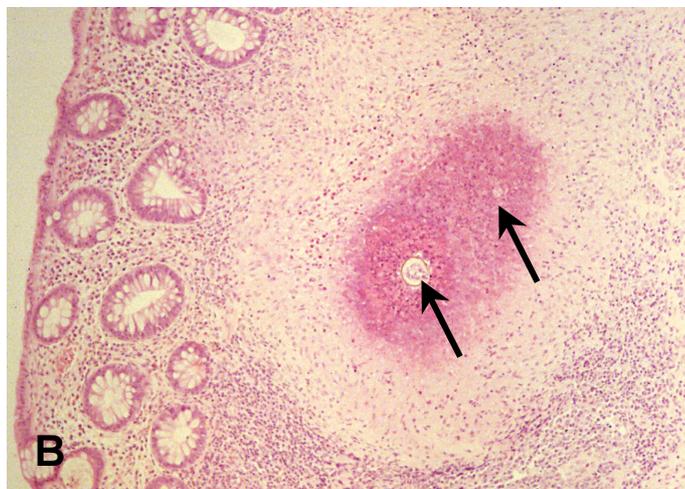
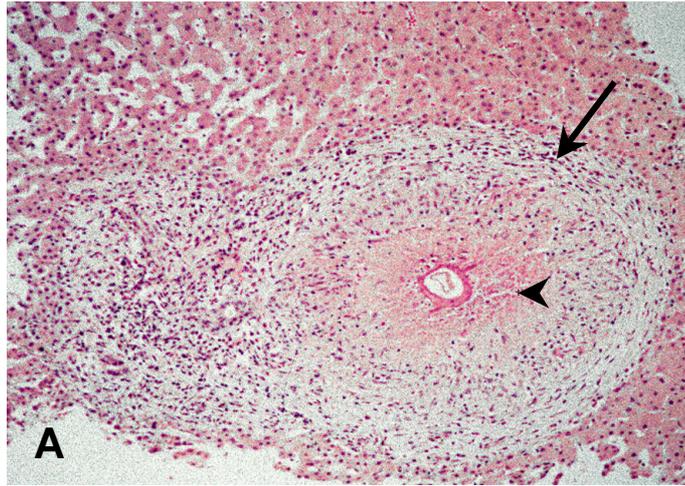
#### Lebergewebe

Eigranulome mit zentraler eosinophiler Nekrose fanden sich in der Übersicht im Bereich der Portalfelder aber auch der Leberläppchen (Abb. 4 (A)). Es bot sich das Bild einer granulomatösen Hepatitis mit stark erhöhter Anzahl Eosinophiler Granulozyten im Zentrum der Granulome sowie peripher in den Sinusoiden. Neben der Nekrose von Hepatozyten imponierten Hypertrophie und Hyperplasie von Sternzellen und Proliferation der Gallengänge als weitere Merkmale einer schweren Entzündungsreaktion im Lebergewebe.

## **Darmgewebe**

Die Biopsate stammten aus der Dickdarmschleimhaut, in allen Fällen bestehend aus Mukosa und Submukosa. Im Zentrum der hyperergischen Granulome lagen vitale Eier oder Eireste, teilweise umgeben von einer eosinophilen Nekrose (Abb. 4 (B)). Hyperergisch nekrotische Granulome waren überwiegend in der Submukosa zu finden. Ebenda zeigte sich neben regelrecht geformten Krypten mit Becherzellen eine massive Vermehrung von Eosinophilen und teilweise gering- bis mittelgradige Vermehrung von Plasmazellen (Abb. 4 (C); (Abb. 6 (D))).

Die zelluläre Zusammensetzung hyperergischer Granulome wird im Folgenden untersucht. Dazu wurden sowohl die histologische Übersichtsfärbung (H&E) (Kap. 3.4.1.) als auch immunhistochemische Färbungen (Kap. 3.4.2.) verwendet.



**Abb. 4:** (A) Lebergewebe: Beginnende Organisation eines hyperergischen Eigranuloms. Zentrale eosinophile Nekrose (Pfeilspitze). Fibroblastenring (Pfeil) (H&E, x10). (B) und (C) Dickdarmschleimhaut: (B) Ausgeprägte periovale Nekrose, die sich aus zwei nebeneinanderliegenden Arealen mit jeweils zentral gelegenem Ei zusammensetzt (Pfeil) (H&E, x40). (C) Erhöhte Anzahl Eosinophiler in der Lamina Propria (ECP-EG2, APAAP, x60).

#### **4.1.1 Verteilung und Zustand der Eosinophilen Granulozyten im akuten hyperergischen Granulom**

Im Zentrum der hyperergischen Granulome zeigten große Mengen von Eosinophilen Granulozyten lichtmikroskopisch Zeichen der Degeneration. Kern- und Plasmamembran erschienen aufgelöst und waren in ihrer Kontur vielfach nicht mehr sicher bestimmbar. Kerne zeigten sich darüber hinaus pyknotisch, fragmentiert oder lysiert. Die Zellen schienen massiv eosinophile granuläre Inhaltstoffe ins umliegende Gewebe freizusetzen. Manche Schnitte präsentierten nebeneinander liegende oder ineinander verschmelzende nekrotisch entzündliche Eiläsionen (Abb. 4 (B)). Teilweise umgab ein scheinbar weniger dichtes, helleres, ausgedehntes Areal nekrotisierender Eosinophiler eine dichtere, manchmal hyalin anmutende eosinophil gefärbte innere Nekrosezone konzentrisch (Abb. 5 (A); Abb. 5 (B)). Der innere, zum Teil homogen gefärbte Anteil der Nekrose zeigte mitunter Ähnlichkeit mit perioval fransenartig angeordneten hyalinen Immunpräzipitaten nach Hoeppli (Abb. 1), die vor allem im Rahmen schwerer hyperergischer Infektionen durch Schistosomen gesehen werden.

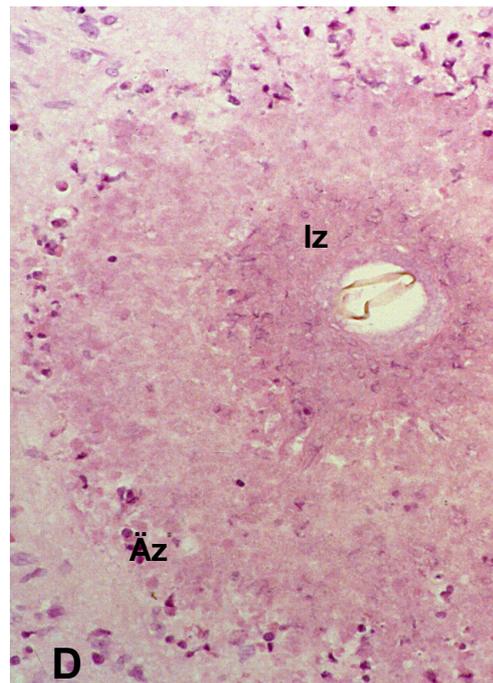
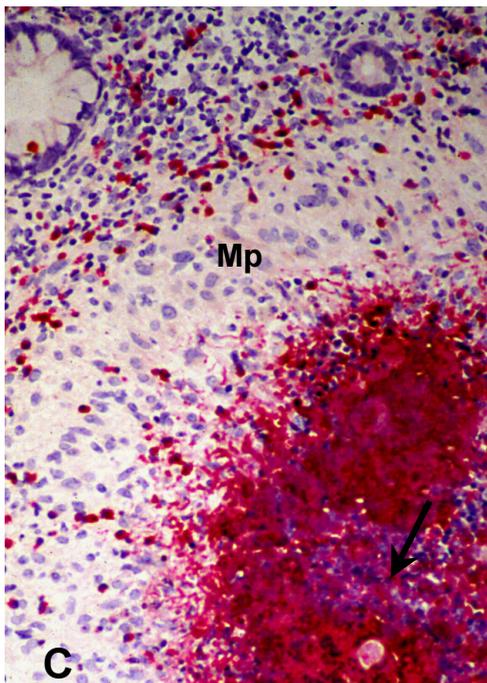
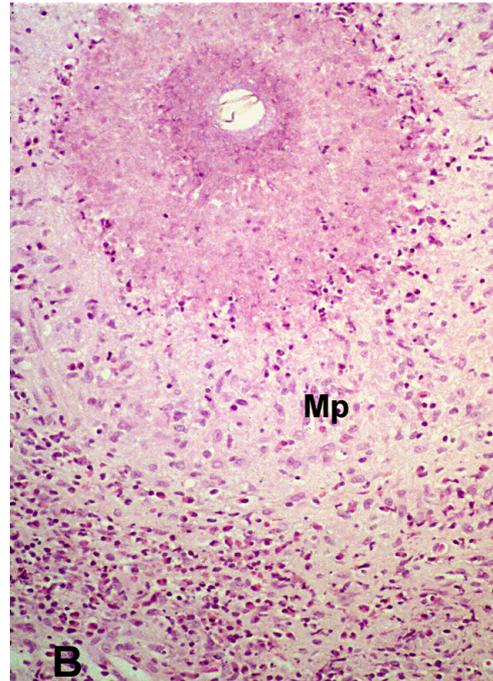
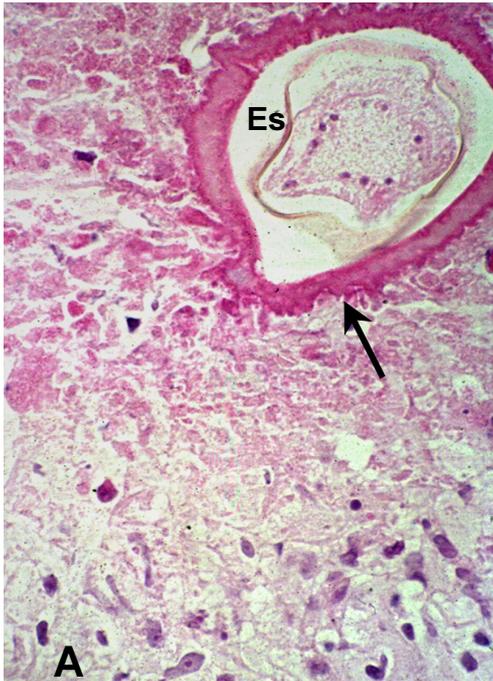
Die Mehrheit der intakt erscheinenden, in ihrer Zell- und Kernkontur bestimmbaren Eosinophilen Granulozyten umgab das nekrotische Zentrum des Granuloms, auf das sie gezielt zuzustreben schienen, ringförmig (Abb. 5. (C)). Selten ließen sich einzelne intakte Eosinophile innerhalb des ausgedehnten nekrotischen Areals inmitten großer Mengen freien Zellmaterials lichtmikroskopisch sicher abgrenzen.

Viele am äußeren Rand des Granuloms angeordnete Eosinophile müssen zunächst durch einen Ring aus jungen aktivierten und reifen Makrophagen hindurchwandern (Abb. 5 (B)), um schließlich im Randbereich des Nekroseareals zu degenerieren und dabei massiv eosinophile MBP positive- sowie ECP-EG2 positive Inhaltstoffe in Richtung des Eies ins Zentrum des Granuloms freizusetzen (Abb. 5 (C)); (Abb. 5 (D)). Sowohl MBP als auch ECP-EG2 wurden innerhalb intakter Eosinophiler Granulozyten im perinekrotischen Areal sowie in freigesetztem extrazellulären eosinophilen Material innerhalb der Nekrose intensiv spezifisch markiert (Abb. 7 (B)); (Abb. 6 (B)).

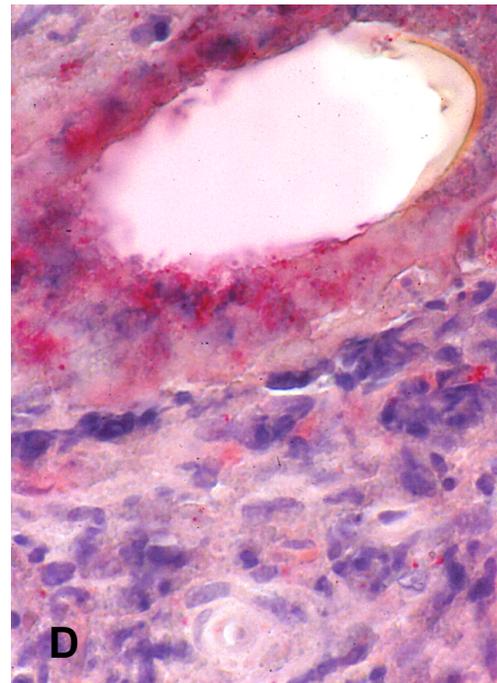
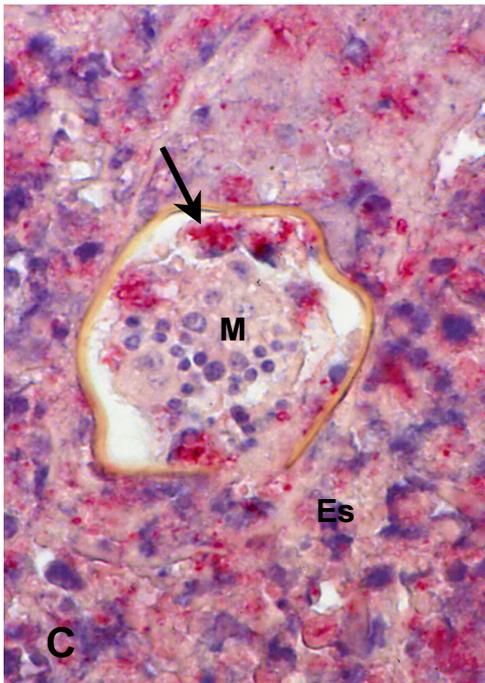
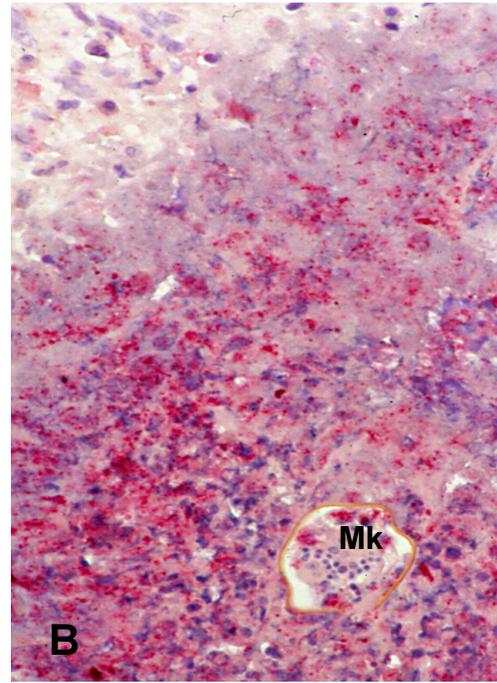
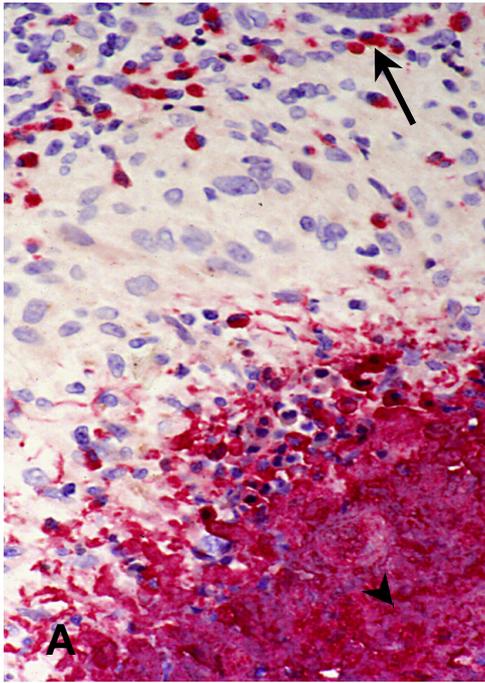
Auffällig war die gegenüber ECP-EG2 (Abb. 6 (B)) intensivere Markierung von major basic protein (MBP) (Abb. 6 (A)). ECP-EG2 positives eosinophiles Material schien in direktem Kontakt mit der äußeren Eischale zu stehen, an sie zu binden und sie anzugreifen. An einigen Stellen, die besonders intensiv durch ECP-EG2 markiert worden waren, ließ sich die Kontur der Eischale nicht mehr sicher bestimmen. Die Eischale schien in diesem Bereich unter dem Einfluss Eosinophiler in weiten Teilen aufgelöst zu sein (Abb. 6 (D)). Teilweise zeigten sich spezifisch markierte Proteine als haufenförmige eosinophile Ansammlungen auf der Oberfläche von Mirazidien oder an der inneren Eischale innerhalb aufgebrochener Eier liegend ( Abb. 6 (C)).

Deformierte Zellkerne, wahrscheinlich aus zugrundegegangenen Eosinophilen, fanden sich ohne erkennbare Beziehung zu den Ursprungszellen in verschiedenen Abschnitten der Nekrose. Während im Zentrum der Nekrose in unmittelbarer Nähe zu den Eiern Zellkerne häufig fragmentiert oder blass lysiert erschienen, zeigten sich Kerne am Rand des Nekroseareals eher pyknotisch und durch Kernchromatinkondensation stark basophil. Teilweise ließ sich ein erhaltener schmaler Zytoplasmasaum abgrenzen (Abb. 7 (B)); (Abb. 6 (A)).

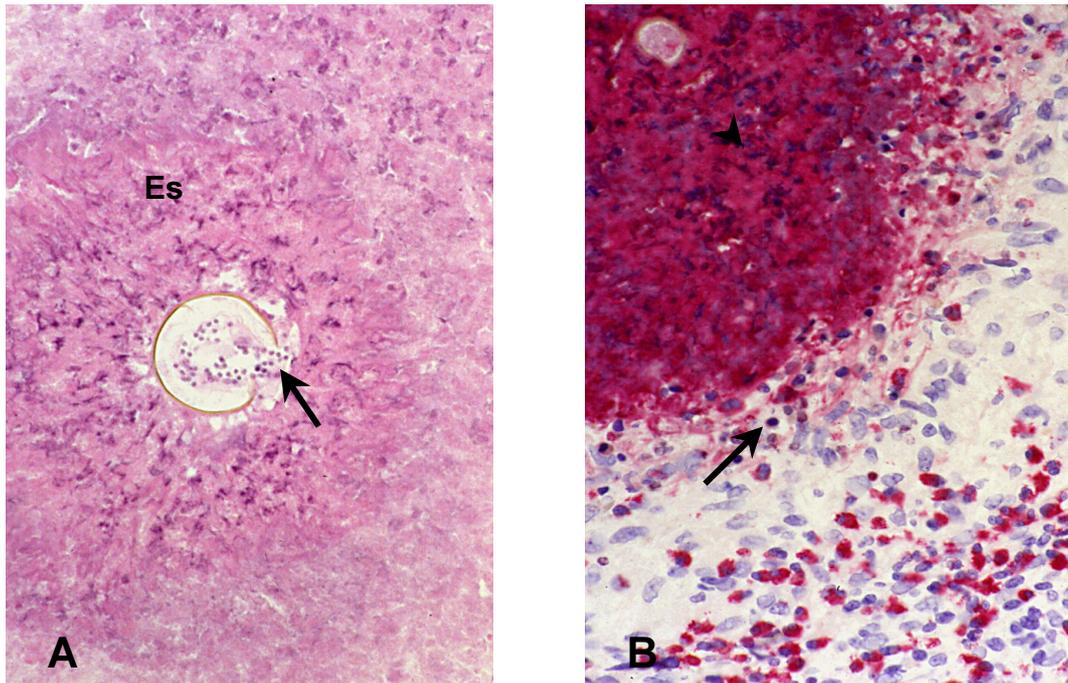
Fortgeschrittene hyperergische Granulome zeigten als Zeichen der Modulation eine beginnende Fibrosierung im äußeren Ring.



**Abb. 5:** (A) Lebergewebe: Deformiertes Schistosomenei. Die Eischale (Es) erscheint größtenteils aufgelöst. Innere hyalin anmutende eosinophil gefärbte Nekrosezone (Pfeil) (H&E, x100). (B), (C), (D) Dickdarmschleimhaut: Intakt erscheinende Eosinophile durchwandern ein breites Areal aus Makrophagen (Mp), bevor sie am Rand der zentralen Nekrose degenerieren. (B) Innere Nekrosezone (Iz), äußerere Nekrosezone (Äz) (H&E; x 20). (C) Innerhalb der Nekrose freies MBP positives Material (Pfeil) (MBP, APAAP, x 40). (D) (H&E, x40).



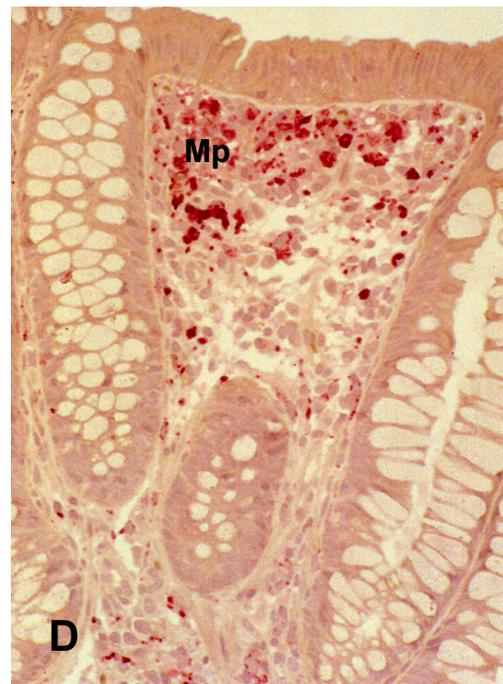
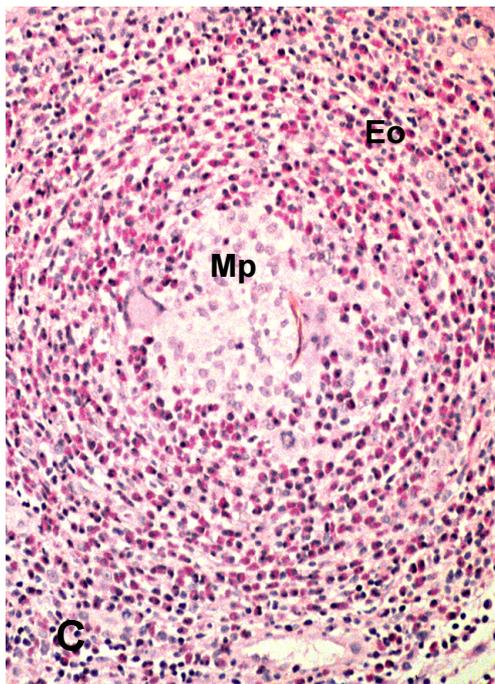
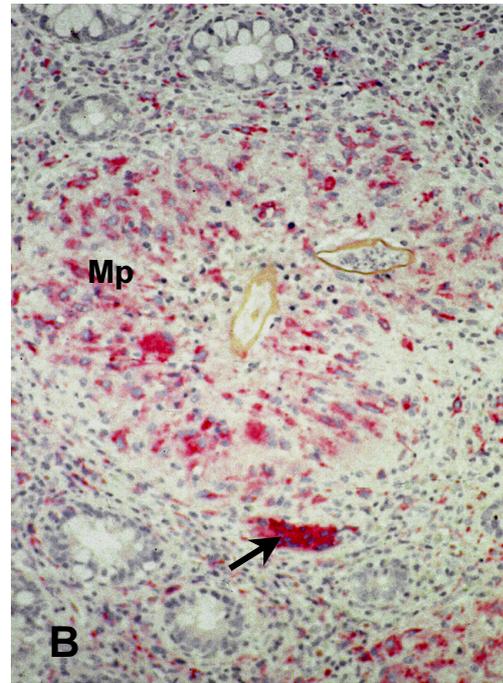
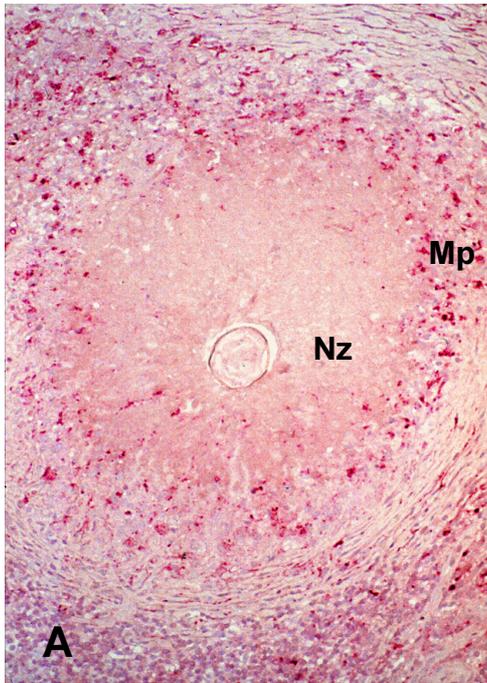
**Abb. 6:** (A) Dickdarmschleimhaut: Intensiv eosinophile Markierung des major basic proteins innerhalb intakter Eosinophiler sowie in freiem eosinophilen Material (Pfeilspitze) (MBP, APAAP, x40). (B) Selbes Präparat wie (A). Aufgebrochenes vitales Schistosomenei. Mirazidienkerne (Mk). Spezifische Markierung von freiem ECP-EG2 positivem Material innerhalb der Nekrose. Geringere Markierungsintensität im Vergleich zu (A) (ECP-EG2, APAAP, x40). (C) Das Ei inmitten von großen Mengen ECP-EG2 positivem Material. In Auflösung befindliche Eosinophile oder ECP-EG2 markierte Haufen von freien Granulaproteinen (Pfeil) innerhalb des Eies, mit Kontakt zu Eischale (Es) und Mirazidium (M) (ECP-EG2, APAAP, x100). (D) Konzentration von freiem ECP-EG2 auf der Oberfläche der Eischale scheint diese aufzulösen (ECP-EG2, APAAP, x100).



**Abb. 7:** Dickdarmschleimhaut: (A) Ein in Degeneration befindliches Ei mit aufgebrochener Eischale zeigt ein Mirazidium (Pfeil), das das Ei durch die Bruchstelle in der Schale (Es) hindurch ins Nekroseareal verlässt (H&E, x40). (B) Anderer Ausschnitt und stärkere Vergrößerung (x60) von Abb. 5 (C). Im Zentrum lysiert erscheinende Kernfragmente (Pfeilspitze). Am Nekroserand pyknotische, stark basophile Zellkerne zum Teil noch mit schmalem restlichen Zytoplasmasaum (Pfeil) (MBP, APAAP, x60).

#### **4.1.2 Die Monozyten / Makrophagenzellreihe**

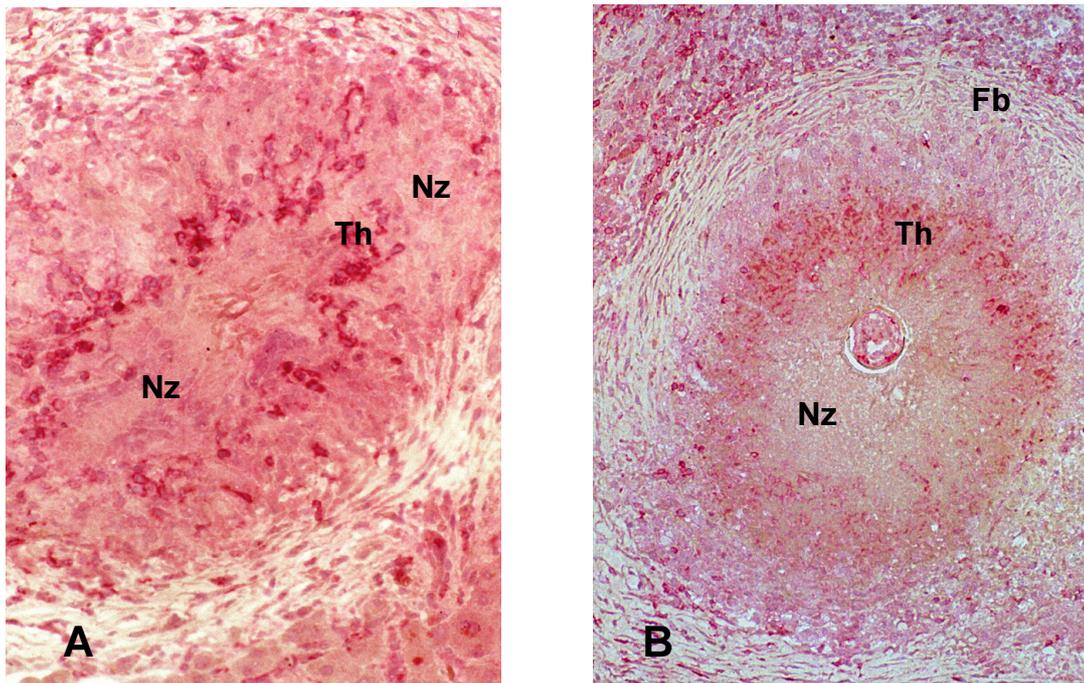
In sehr frühen Granulomen hielten sich viele aktivierte CD 68 positive Makrophagen im Zentrum des Granuloms auf (Abb. 8 (B)). Der Beginn der darauf folgenden frühen zellulären Phase der Granulomentwicklung war bereits gekennzeichnet durch eine massive Ansammlung überwiegend intakter Eosinophiler um ein nur noch kleines, durch junge Makrophagen geprägtes Zentrum mit Ei oder Eirest (Abb. 8 (C)). Eine Nekrose Eosinophiler Granulozyten konnte in diesen frühen Stadien der Granulomentwicklung noch nicht gesehen werden. In reiferen hochzellulären hyperergischen Granulomen, die mit mAk-CD 68 (Abb. 8 (A)) markiert worden waren, wurde durch die Stärke der Markierungsintensität deutlich, dass der überwiegende Teil aktivierter Makrophagen konzentrisch um die äußere Nekrosezone herum versammelt war (Abb. 8 (A) sowie Abb. 5 (B) und Abb. 5 (C)). Vereinzelt zeigten sich spezifische Anfärbungen auch innerhalb der Nekrose.



**Abb. 8:** Dickdarmschleimhaut: (A) Aktivierte mAk CD 68 markierte Makrophagen (Mp) umgeben die Nekrosezone (Nz), in der ein Schistosomenei liegt, ringförmig (CD 68, APAAP, x20). (B) Mukosaanschnitt mit Krypten. Frühes Granulom. Junge aktivierte Makrophagen umgeben ein vitales Ei (Mirazidienkerne) und ein totes Ei der Spezies *S. mansoni* konzentrisch. Mehrkernige Riesenzelle (Pfeil) (CD 68, APAAP, x20, Blaufilter). (C) Beginnende zelluläre Phase. Massive Ansammlung intakt erscheinender Eosinophiler (Eo) um ein kleines, aus jungen Makrophagen bestehendes Zentrum des Granuloms mit Eirest (H&E, x20). (D) Makrophagen als antigenpräsentierende Zellen. Zahlreich aktivierte Makrophagen in der Mukosa direkt unterhalb des Schleimhautepithels (CD 68, APAAP, x40).

### 4.1.3 T-Lymphozyten (CD4)

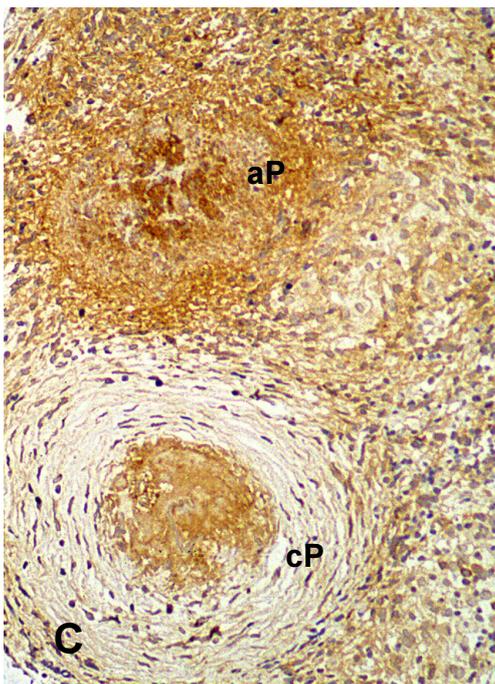
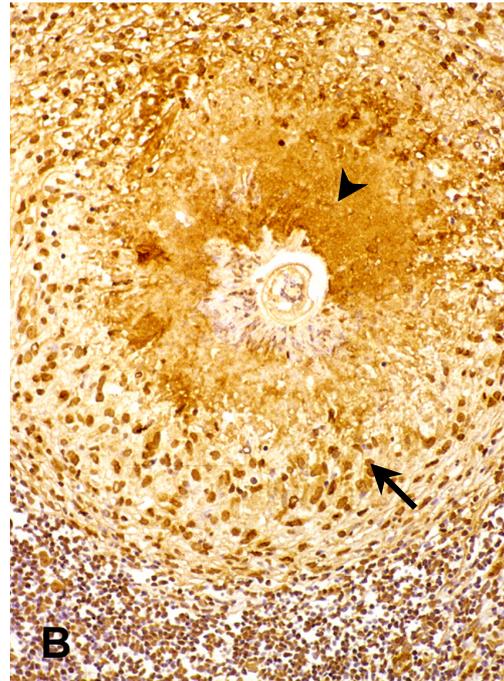
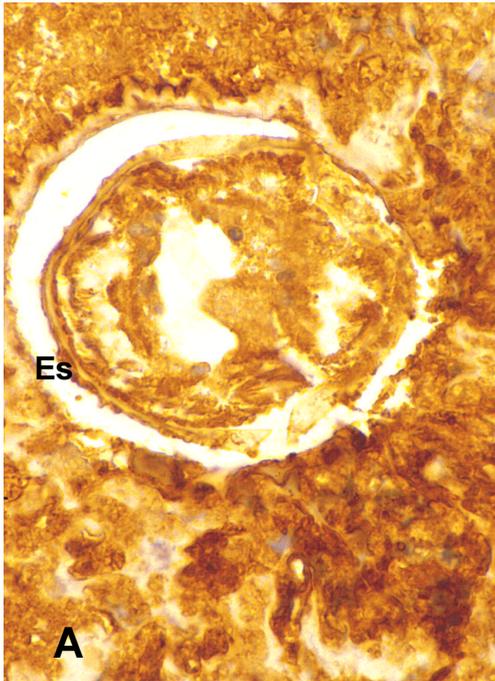
CD4 T-Helfer Lymphozyten zeigten sich in den untersuchten hyperergischen Granulomen nicht in unmittelbarer Nähe zu den Schistosomeneiern. Eine spezifische ringförmige Markierung von CD4 Helferzellen durch monoklonale Antikörper fand sich im mittleren bis äußeren Bereich der zentralen Nekrosezone der Granulome.



**Abb. 9:** (A) Lebergewebe. CD4 spezifische Markierung von T-Helferlymphozyten (Th), die mehrheitlich ringförmig in der Mitte eines nekrotischen Areals (Nz) um einen Eirest herum angeordnet sind (Pfeil) (CD4, APAAP, x40). (B) Dickdarmschleimhaut: *S. japonicum*. CD4 spezifische Markierung (Th) im äußeren Bereich der Nekrosezone (Nz), Fibroblastenring (Fb) (CD4, APAAP, x20, Blaufilter).

#### 4.1.4 Komplement

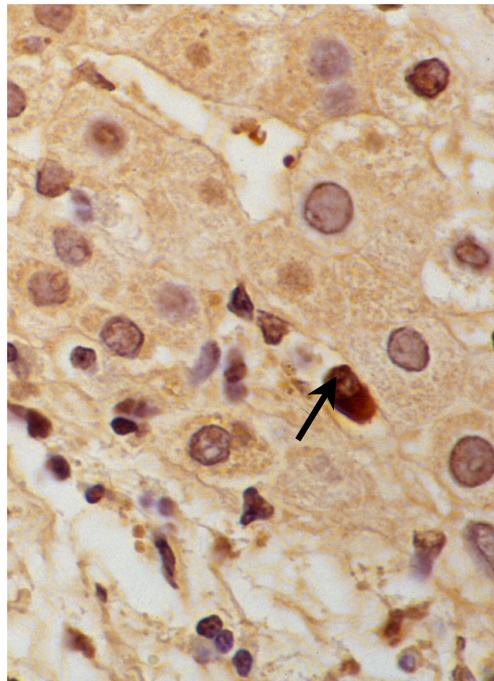
Die stärkste Anfärbung von gebundenem und freiem Komplement C3d und C1q zeigte sich inmitten der zentralen Nekrosezone, das Ei direkt umgebend. Dabei schien Komplement mit der Oberfläche der Eischale in Kontakt zu stehen. Innerhalb von Eiern mit Schalendefekten fand sich Komplement sowohl an der Innenseite der Eischale als auch im Ei verteilt (Abb. 10 (A)). In einem Präparat zeigte sich ein radiäres Areal, in dem freies Komplement nur spärlich angefärbt war. In einem Ring um die Nekrose herum konnten C1q gebundene Zellen - wahrscheinlich intakte Eosinophile - markiert werden (10 (B)). Bei einem direkten Vergleich hyperergischer Granulome im akuten Stadium mit solchen im chronischen Stadium der Entwicklung zeigte sich im Verlauf der Rückbildung die relativ schwach ausgeprägte Komplementreaktion. Diese war auf das Innere des Granuloms begrenzt. Die Komplementreaktion im akuten Stadium der Granulomentwicklung war zwar ebenfalls auf das Zentrum des Granuloms konzentriert, schien aber insgesamt viel dynamischer zu sein und in einem größeren Ausmaß das umliegende Gewebe mit einzubeziehen (Abb. 10 (C)).



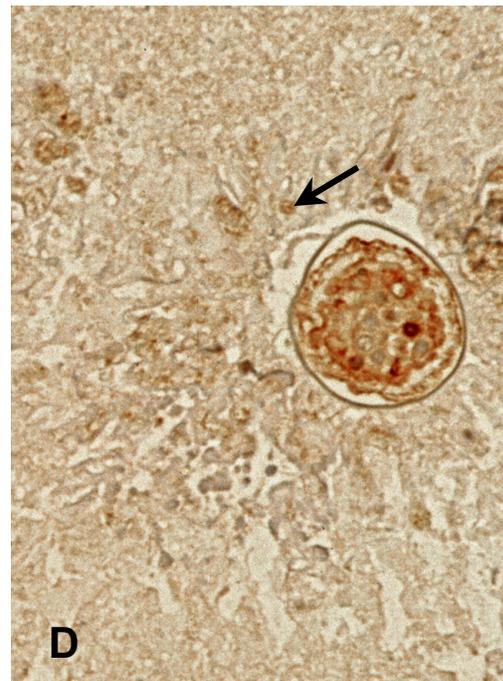
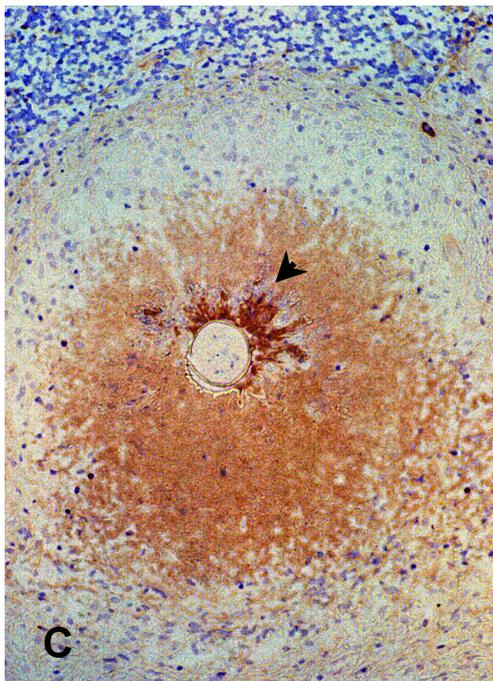
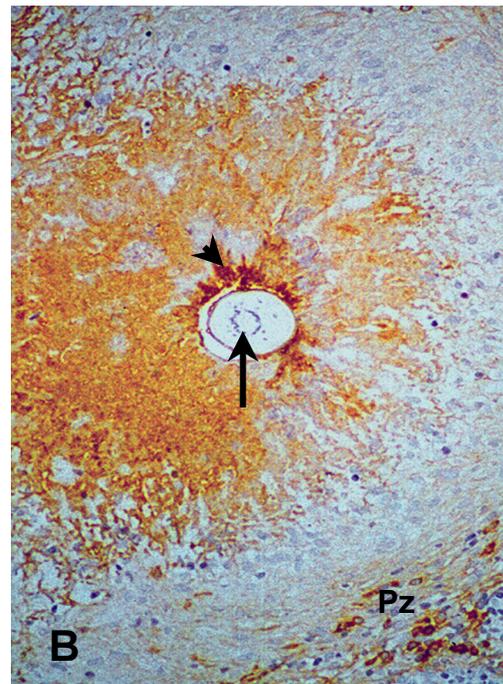
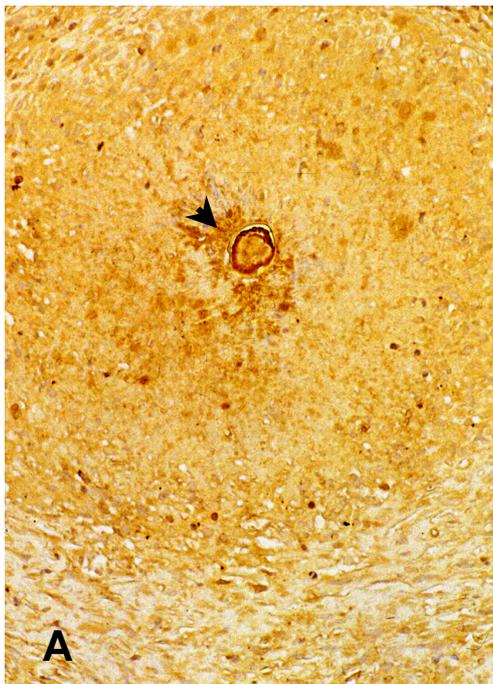
**Abb. 10:** (A), (B) Dickdarmschleimhaut: (A) C3d positive Markierung im Zentrum eines akuten hyperergischen Granuloms. Komplement besetzt die äußere Schale des Eies (Es) und dringt in das beschädigte Ei ein (C3d, PAP, x100). (B) Lymphatisches Gewebe. C1q markierte Zellen (Pfeil) streben auf die zentrale Nekrose zu. Im Bereich der Nekrose spezifisch markiertes freies Material (Pfeilspitze). Partiiell zeigt sich perioval eine nur schwache spezifische Anfärbung (C1q, PAP, x20). (C) Lebergewebe: Komplement C3d markierte hyperergische Granulome in der akuten Phase der Entwicklung (aP) und in der chronischen Phase (cP) (C3d, PAP, x20).

#### 4.1.5 Immunglobuline

Ig positive Plasmazellen (Abb. 11) sowie freie Immunglobuline wurden durch spezifische anti-IgM, anti-IgG und anti-IgA, anti-IgE Antikörper markiert. Bei allen anti-Ig-Antikörpern war die Markierungsintensität in direkter Nähe zum Schistosomenei am stärksten. Die Immunglobuline waren häufig in Form von fransenartigen Präzipitaten radiär um das Ei verteilt und schienen in Kontakt mit der Oberfläche der Eischale zu stehen. Es bot sich das Bild eines durch Immunglobuline gebildeten Strahlenkranzes (Abb. 6 (A); Abb. 6 (B); Abb. 6 (C); Abb. (6 (D)). Hoespli (1932) hat in ähnlicher Form um das Ei herum abgelagerte Immunkomplexe als „sunburst-konfiguration“ („Hoespli-Phänomen“) bezeichnet (vgl. Abb. 1 in Kapitel 2.1.4.). Zum Teil bildeten die fransenförmigen intensiv markierten Präzipitate zusammen mit dem Schistosomenei das Zentrum eines ausgedehnten schwächer spezifisch gefärbten Areals freier Immunglobuline (Abb. 12 (B)). Es zeigten sich Ig positive Anfärbungen auch innerhalb der Eier (Abb. 12 (D))



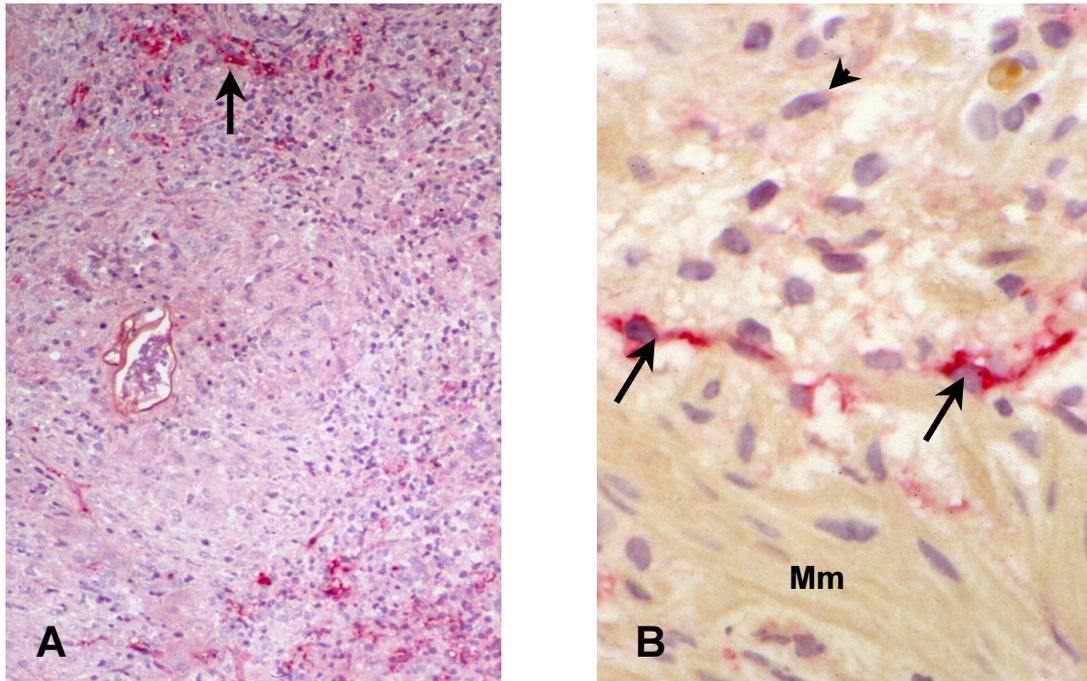
**Abb. 11:** Lebergewebe: IgE positive Plasmazelle (Pfeil) im Lebergewebe bei *Akuter Schistosomiasis* (IgE, APAAP, x100).



**Abb. 12:** Hyperergische Granulome in der Dickdarmschleimhaut: (A) Zentral gelegenes Ei der Spezies *S. japonicum*. IgM konzentriert in Einähe (Pfeilspitze) (IgM, APAAP, x20). (B) Aufgebrochene Schale eines Schistosomeneies. Mirazidium (Pfeil). Intensive strahlenförmige spezifische Markierung von IgG (Pfeilspitze) in Einähe inmitten eines ausgedehnten Areals schwächerer Markierung. Eine Vielzahl von Plasmazellen (Pz) in lymphozytärem Gewebe außerhalb des Granuloms (IgG, APAAP, x20). (C) Avitale Larve, ausgeprägte strahlenförmige periovale Anfärbung von IgA (Pfeilspitze) (IgA, APAAP, x20). (D) Konzentrierte Ansammlung von IgE innerhalb eines Eies. Um das Ei herum vereinzelt Reste von Zellen mit spezifischer IgE-Markierung (Pfeil) (IgE, APAAP, x100).

#### 4.1.6 Dendritische Zellen

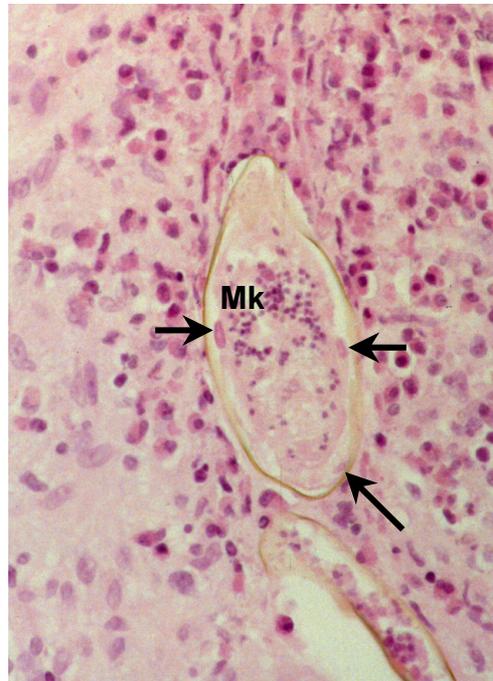
Im hyperergischen Granulom halten sich P55 positive Dendritische Zellen nicht in unmittelbarer Nähe zum Schistosomenei auf. Die Mehrheit der Dendritischen Zellen konnten im äußeren Ring des Granuloms markiert werden.



**Abb. 13:** Dickdarmschleimhaut: (A) Anschnitt von Mukosa und Submukosa. Dendritische Zellen im äußeren Ring des Granuloms (Pfeil). Deformierter Eischalenrest. (P55, APAAP, x20). (B) P55 markierte Dendritische Zellen (Pfeile). Aktivierte Makrophagen (Pfeilspitze). Muscularis mucosae (Mm) (P55, APAAP, x100).

#### 4.1.7 Intraovale eosinophile Präzipitate

In einem Präparat fanden sich eosinophile balkenförmige Präzipitate innerhalb eines Schistosomeneies der Spezies *Schistosoma mansoni*.



**Abb. 14:** Dickdarmschleimhaut. Balkenförmige eosinophile Einschlüsse (Pfeile) innerhalb eines Schistosomeneies der Spezies *S. mansoni*. Frühes zellreiches hyperergisches Granulom. Mehrheitlich intakte Eosinophile Granulozyten in Einähe und eine Vielzahl von reifen Makrophagen im Zentrum des Granuloms verteilt. Reifes, vitales Ei (Mirazidienkerne (Mk)) (H&E, x40).

# 5 Diskussion

## 5.1 Auswahl der Gewebeproben und Diskussion der Methoden

Bevor die Ergebnisse der Untersuchungen einer kritischen Auseinandersetzung unterzogen werden, zunächst ein Blick auf die angewendeten Methoden:

Bei den Gewebeproben, die für die vorliegende Arbeit ausgewählt wurden, handelt es sich um zu diagnostischen Zwecken entnommenes bioptisches Material aus der Darmschleimhaut sowie aus der Leber. Die Biopsate wurden in der Klinischen Abteilung des Bernhard-Nocht-Institutes für Tropenmedizin (BNI) zu Hamburg entnommen oder der Abteilung für Pathologie des BNI in Form von fixiertem Frischmaterial oder als Paraffinblock aus externen klinischen Einrichtungen zur Begutachtung eingesandt. Dass es sich bei der eosinophilen Nekrose im Zusammenhang mit *Schistosomiasis* um ein seltenes Phänomen handelt, wird durch die Tatsache illustriert, dass im Untersuchungszeitraum von fünfzehn Jahren (1983-1997) von 465 histologisch bestätigten Schistosomiasisfällen nur in sechzehn Fällen die Kriterien für eine weitere Untersuchung (vgl. Kapitel 3.1.) im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfüllt waren. Ausgewählt wurden Präparate, die in der für die Diagnosestellung angefertigten Übersichtsfärbung (H&E) zunächst durch eine stark erhöhte Anzahl Eosinophiler Granulozyten innerhalb von Eigranulomen auffielen. Von diesen sechzehn Präparaten zeigten acht Präparate bereits in der Übersichtsfärbung eine zentrale granuläre eosinophile Nekrose. In drei Präparaten konnte erst in tieferen immunhistochemisch aufgearbeiteten Schnittstufen Nekrosen gesehen werden; fünf Präparate zeigten eine floride Entzündung ohne zentrale Nekrose. Um das Ziel dieser Arbeit zu erreichen, die hyperergische granulomatös-entzündliche Reaktion bei *Akuter Schistosomiasis* zu beschreiben, stand eine ausreichende Menge Untersuchungsmaterial zur Verfügung. Es wurden 112 Schnitte angefertigt und untersucht.

Dass akute hyperergische Schistosomeneigranulome in der Abteilung für Pathologie des Bernhard-Nocht-Institutes für Tropenmedizin nicht häufig gesehen werden kann zum einen daran liegen, dass im Falle eines Verdachts auf *Akute Schistosomiasis* den behandelnden Medizinern eine Reihe nicht invasiver diagnostischer Möglichkeiten (u.a. Einachweis im Stuhl, Ultraschall) zur Verfügung stehen, so dass eine Biopsie in der Regel nur dann vorgenommen wird, wenn Zweifel an der Diagnose auf anderem Wege

nicht ausgeräumt werden können. Zum anderen können aufgrund einer typischerweise wenig spezifischen klinischen Symptomatik auch Fehldiagnosen nicht ausgeschlossen werden. Dieses kann dazu führen, dass eine akute Erkrankung in der frühen Phase nicht erkannt wird und unbehandelt eventuell von schweren Komplikationen begleitet in das chronische Stadium der Erkrankung übergeht. Wird schließlich eine Biopsie vorgenommen, so verzichtet man seit einigen Jahren zunehmend häufig auf eine tiefe Gewebsentnahme unter Einbeziehung der Submukosa, um das Auftreten von Blutungskomplikationen zu vermeiden. Gerade in dieser Gewebeschicht kommen die Schistosomeneigranulome jedoch typischerweise vor. Das Material aus dem Darm, über das in der vorliegenden Arbeit verfügt werden konnte, bestand in allen Fällen sowohl aus Mukosa und Submukosa.

In der CD4 Färbung konnte in einigen Fällen kein befriedigendes Färbeergebnis erzielt werden. Der Marker reagiert unserer Erfahrung nach besonders empfindlich, wenn Gewebeproben länger als 24 Stunden fixiert werden. Es stand kein Frischmaterial zur Verfügung, das mit Hilfe von Gefrierschnitten zum Vergleich hätte aufgearbeitet werden können.

Wir haben darauf verzichtet, für die lichtmikroskopisch untersuchten Granulome allein anhand morphologischer Merkmale eine genauen Stadieneinteilung nach den gängigen Klassifizierungssystemen (Kapitel 2.1.2, Tab. 1) zu versuchen. Zum einen scheinen die Mittel der Routinehistologie allein - ohne eine Quantifizierung der Zellpopulationen vorzunehmen - für eine exakte Abgrenzung der Entwicklungsstadien nicht ausreichend zu sein, zum anderen wurden bei der Stadieneinteilung in den verschiedenen Modellen unterschiedliche Schwerpunkte gesetzt. Das Gesamtergebnis der vorliegenden deskriptiven Arbeit, das die Bedeutung der Nekrose Eosinophiler Granulozyten im akuten hyperergischen Eigranulom unterstreicht, bleibt unserer Ansicht nach dadurch unberührt, wie auch durch die Tatsache, dass nur eine relativ geringe Anzahl von Fällen untersucht werden konnte.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

Eosinophile Granulozyten stellen in vielen Parasitosen sowohl im Blut als auch im Gewebe den Hauptzelltyp. Diese Beobachtung führte früh zu der Annahme, dass Eosinophilen als Effektorzellen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Parasiten zukommen muss. Schwere granulomatös-entzündliche Organveränderungen legten darüber hinaus den Schluss nahe, dass eine massive Vermehrung dieser Leukozytengruppe auch eine schädigende Wirkung auf den beherbergenden Organismus haben kann.

Eine wesentliche Beobachtung der vorliegenden lichtmikroskopischen Untersuchung war die ausgeprägte, periovale eosinophil gefärbte Nekrose im Zentrum hyperergischer Granulome. Begleitet wurde die Gewebereaktion von teilweise schwerer, klinisch unspezifischer Symptomatik, wie sie für eine akute Verlaufsform der *Schistosomiasis* (*Katayama Krankheit*) nach Infektion durch *Schistosoma japonicum* und *Schistosoma mansoni* typisch ist. Bereits in Übersichtsfärbung deutete sich an, dass dieses Phänomen im wesentlichen durch das massive Zugrundegehen Eosinophiler Granulozyten geprägt ist. Vor dem Hintergrund schwerer, ebenfalls durch die Vermehrung von Eosinophilen geprägter, entzündlicher Erkrankungen mit Organbeteiligung wie „Eosinophile Myokarditis“, oder „Tropische Myokarditis“ schien es interessant, die Morphologie eosinophiler Granulome bei der *Akuten Schistosomiasis* genauer zu untersuchen und deren pathogenetische Bedeutung zu hinterfragen.

Beobachtungen von von Lichtenberg lieferten für unsere Untersuchung wichtige Anhaltspunkte. Zunächst wurde ganz allgemein, ohne eine genaue Spezifizierung der betroffenen Zellen vorzunehmen, von einer zentralen eosinophilen Nekrose in exsudativen Granulomen bei schwer an *Schistosomiasis japonicum* erkrankten Hamstern berichtet (von Lichtenberg et al (1973)). Später fand man auch massive periovale Ansammlungen Eosinophiler Granulozyten mit Nekrose bei Infektionen mit *S. mansoni* (von Lichtenberg & Lehmann, 1986; von Lichtenberg, 1987). Da eine Lyse und Nekrose Eosinophiler in vivo bereits in anderen Parasitosen im Zusammenhang mit dem Sterben der Parasiten beschrieben worden war, beschäftigte uns die Frage, welche Bedeutung das beobachtete massive Zugrundegehen Eosinophiler Granulozyten bei der Zerstörung von Schistosomeneiern und der Tötung der Eilarven (Mirazidien) in akuten hyperergischen Granulomen hat. Zu diesem Zweck wurden paraffinierte Darm- und Lebergewebeproben immunhistochemisch aufgearbeitet und qualitativ untersucht.

## **Granulomsynchronisation**

Zunächst fiel die mangelnde Synchronisation der untersuchten Granulome auf. Granulome im beginnenden Reifestadium mit eosinophiler Nekrobiose wurden teilweise in einer Schnittebene neben weniger zellreichen, reiferen Granulomen gesehen. Dies schien darauf hinzudeuten, dass die Patienten sich nicht mehr in der Frühphase der Erkrankung befunden haben als ihnen die Gewebeproben entnommen worden waren, sondern bereits der wiederholten Eiablage durch die reifen Würmer ausgesetzt waren. Nach Bogliolo wären kurz nach Beginn der Eiablage in der frühen Phase der Erkrankung alle akuten hyperergischen Granulome in ein und derselben frühen Entwicklungsphase zu erwarten gewesen (Bogliolo, 1958). Darüber hinaus illustrierte das bunte Bild von Granulomen in verschiedenen Reifestadien den dynamischen Prozess der Entzündung und zeigte teilweise eine beginnende Abnahme der immunologischen Empfindlichkeit (Modulation). Wir können Beobachtungen von de Silva et al. (2000) nicht bestätigen, wonach Granulome im Darm in allen Entwicklungsstadien der Infektion gleiche morphologische Merkmale zeigen. Die daraus abgeleitete Annahme, dass die Modulation möglicherweise kein immunologischer Prozess ist, sondern durch lokale Faktoren bedingt ist, scheint bei akuter Erkrankung durch Schistosomen nicht wahrscheinlich zu sein. Dass der Infektionsbeginn bereits mehr als acht Wochen zurücklag, bevor Gewebeproben entnommen wurden, wird darüber hinaus auch dadurch illustriert, dass in allen hyperergischen Granulomen im periovalen Areal Immunglobuline und Komplement nachgewiesen werden konnten, was auf eine lokale Ansammlung von Immunkomplexen in reiferen Granulomen hinweist. Eine Konzentration von Immunkomplexen in Einähe wird nach Bell (Lecture notes on tropical medicine, 1995) so interpretiert, dass das Immunsystem des Wirtsorganismus langsam ein Gleichgewicht zwischen der Menge der Antigene und Antikörper erreicht. Die anfänglich durch einen Überschuss von Antigenen entstandenen Immunkomplexe verlassen die Zirkulation und versammeln sich nun in Einähe, von wo aus sie die zelluläre Entzündungsreaktion fördern.

## **Eosinophile Nekrose / Nekrose Eosinophiler Granulozyten**

Die Vielzahl immunologischer Granulome und die Qualität der zellulären Zusammensetzung der Eigranulome spiegeln das Bild einer schweren Entzündungsreaktion. Sowohl im untersuchten Lebergewebe als auch im Darmgewebe dominierten Eosinophile Granulozyten das Bild der im Gewebe verteilt liegenden hyperergischen Eigranulome. Innerhalb ausgedehnter zentraler Nekroseareale fanden sich dichteste Konzentrationen degenerierender Eosinophiler sowie große Mengen freien zellulären Materials in unmittelbarer Nähe zu vitalen Eiern als auch zu Eiern mit Schalendefekten oder zu Schalenresten. Das freie eosinophile Material ließ sich gleichermaßen spezifisch anfärben wie das Zytoplasma innerhalb in ihrer Zell- und Kernkontur bestimmbarer intakter Eosinophiler Granulozyten, die in einem dynamischen Prozess vom äußeren Ring des Granuloms durch einen Wall aus jungen und reifen Makrophagen in Richtung auf das Ei im Zentrum zuzustreben schienen (Abb. 7 (B)).

Es bestand eine signifikante Positivität für monoklonale Antikörper gegen Matrixproteine der Eosinophilengranula wie ECP-EG2 (Eosinophiles kationisches Protein Klon 2: markiert nach Herstellerangaben die aktivierte und sezernierte Form von ECP) sowie das Kernprotein MBP (major basic protein). Die MBP- und ECP-EG2 Positivität legt nahe, dass es sich bei dem extrazellulären eosinophilen Material innerhalb der Nekrose um Ansammlungen freier Granula und deren auf die Eioberfläche ausgeschütteten Granulaproteine handelt, die auf Schistosomeneier toxisch wirken.

Auffällig war die gegenüber ECP-EG2 (Abb. 6 (B), Abb. 6 (C)) intensivere Markierung von major basic protein (MBP) innerhalb des Nekroseareals (Abb. 6 (A)). Es ist bekannt, dass MBP in größeren Mengen innerhalb der Eosinophilen vorliegt, als ECP. Daher ist anzunehmen, dass die Markierungsintensität positiv mit der Menge der markierten Eosinophilenproteine korreliert.

## **Aktivierte Eosinophile**

Lichtmikroskopisch sind morphologische Zeichen der Aktivierung Eosinophiler wie unregelmäßige Oberfläche, lichtdichte Matrix mit zytoplasmatischen Vakuolen und veränderte, verdichtete oder auch entleerte Granula nur unsicher oder gar nicht zu bestimmen. Mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper wurde versucht, nicht nur die Verteilung und Konzentration von Granula und Granulaproteinen im Granulom bestimmen, sondern darüber hinaus auch den Aktivierungszustand der Granulomeosinophilen untersuchen. Dass der anti-ECP-EG2 Antikörper an sezernierte eosinophile kationische Proteine bindet, die ausschließlich von aktivierten Eosinophilen und nicht von normalen Bluteosinophilen freigesetzt werden, konnten Untersuchungen von Tai et al. (1984), Azzawi et al. (1992) und Bentley et al. (1992) zeigen. In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich eine positive Anfärbung mit monoklonalem ECP-EG2 sowohl im Zytoplasma intakter Eosinophiler in einem breiten, die Nekrose ringförmig umgebenden Areal, als auch in degerierenden Eosinophilen sowie in freiem extrazellulären eosinophilen Material inmitten der Nekrose. Einschränkend muss beachtet werden, dass der EG2 Klon des ECP sowohl an aktivierte Eosinophile als auch an EPX/EDN bindet (Fredens et al., 1988). Eine spezifische Gegenmarkierung von EPX/EDN ist nicht vorgenommen worden. Intakte ECP-EG2 positive Eosinophile schienen sich zielgerichtet von der Peripherie auf das Zentrum der Granulome hin auszurichten und auf das Ei zuzuströmen. Wir beobachteten eine massive Degeneration Eosinophiler, beginnend am Rande der Nekrose. Kennzeichnend war der Verlust der Zellintegrität und Verteilung von pyknotischem und fragmentiertem Kernmaterial sowie freiem eosinophilen Material in der gesamten Nekrose. Eine jüngere Untersuchung wirft jedoch Zweifel auf, dass der monoklonale Antikörper anti-ECP-EG2 immunhistochemisch zuverlässig zwischen aktivierten sezernierenden und ruhenden Eosinophilen differenziert (Jahnsen et al., 1994). Unabhängig von den Spezifika der Marker werden die Lyse von Gewebeeosinophilen und die haufenförmige Ansammlung freier Granula im Extrazellularraum als ultimative Zeichen der Aktivierung gesehen (Persson & Erjefält 1998, Erjefält et al. 2001). In Anlehnung an diese bei der Untersuchung allergischer Hauterkrankungen in vivo gewonnenen Erkenntnisse schließen wir, dass sich die in ihrer Zellkontur nicht mehr bestimmbar, als Cluster von Granula imponierenden Eosinophilen in allen Bereichen der durch sie dominierten nekrotischen Nekrosbiose im Zustand der Aktivierung zeigen.

## **Toxisches Potenzial Eosinophiler gegen Schistosomeneier in vivo**

Die Ergebnisse verschiedener in vitro und in vivo Studien deuten darauf hin, dass Eosinophile nicht nur mit Hilfe von Komplement und Antikörpern an Schistosomenlarven (Mc Laren & Ramalho-Pinto, 1979; Butterworth et al., 1979 (a),(b), 1984) und Schistosomeneier (James & Colley, 1978; Hsu et al., 1980; de Brito et al., 1984) binden, sondern dass sie diese nachfolgend auch durch Degranulation ihrer toxischen Granulaproteine auf die Oberfläche der Parasiten töten können.

Es werden aber auch immer wieder Zweifel an einer überragenden helminthotoxischen Funktion Eosinophiler Granulozyten in vivo geäußert. So schien es einige Hinweise dafür zu geben, dass sich die toxische Reaktion Eosinophiler auf Schistosomeneier in vivo von der in vitro Reaktion unterscheidet und darüber hinaus im Menschen und in der Maus verschieden sind (Li Hsü et al, 1980). Bloch et al (1984), stellten fest, dass Eosinophile in vivo aufgrund einer metabolisch veränderten Oberfläche von Schistosomula schwerer an den Parasiten binden, als in vitro. Eine weitere Hypothese ist, dass Eosinophile sich erst nach dem Tod des Mirazidiums um das Ei herum versammeln und anschließend ihre Granulaproteine auf die Eioberfläche ausschütten. So wurde von einigen Untersuchern bezweifelt, dass Eosinophile für das Töten der Mirazidien innerhalb der Eier verantwortlich sind (Damian 1987; Lenzi et al., 1987, 1997).

In vitro fanden James & Colley (1976) innerhalb aufgebrochener Eier Eosinophile, die aus Mäusen isoliert worden waren, zusammen mit veränderten Mirazidien. Sie schlossen, dass die in das Ei eingewanderten Eosinophilen etwas mit dem Tod der Larven im Eiinneren zu tun haben mussten. Li Hsü et al. (1980) bestätigten diese in vitro gemachte Beobachtung in vivo nicht. Sie fanden in Granulomen aus der Gallenblase eines Patienten, der an subakuter *Schistosomiasis* litt, intakte Eier mit vitalen Mirazidien, die von degranulierenden Eosinophilen umgeben waren. Die Autoren nahmen daher an, dass Eosinophile toxische Proteine durch Mikroporen hindurch in die Eier hinein abgeben und auf diesem Wege das Mirazidium töten, bevor vornehmlich Riesenzellen mit einigen Eosinophilen in späteren Granulomentwicklungsstadien (Produktives Stadium, Rückbildungsstadium) die Eischale aufbrechen und Makrophagen die Reste abräumen. Die Unterschiede in den Beobachtungen in vitro und in vivo wurden damit zu erklären versucht, dass sich der Tötungsmechanismus der Eosinophilen als Effektorzelle in vitro von dem in vivo unterscheidet und dass Mauseosinophile ein

anderes zytotoxisches Verhalten gegen Schistosomeneier haben, als humane Eosinophile.

In der vorliegenden Untersuchung sahen wir im Reifestadium der Entwicklung vornehmlich im Zentrum großer hyperergischer Granulome reichlich aktivierte Eosinophile mit deutlichen Zeichen der zellulären Degeneration. Freies MBP positives Material und ECP-EG2 positives Material schien an vielen Stellen in direktem Kontakt mit der Schale der Schistosomeneier zu stehen (Abb.6 (C)), Abb. 6 (D)). Dort, wo die Eischale durch ECP-EG2 positives Material besetzt war, ließ sich die Zellkontur in teilweise ausgedehnten Abschnitten nicht mehr abgrenzen. Spezifisch markierte Granula und Granulaproteine drangen in diesem Bereich in das Eiinnere ein (Abb. 6 (D)). Innerhalb aufgebrochener Eier zeigten die Larven oft deutliche Zeichen der Degeneration (Abb.7 (A), Abb. 5 (A)). Diese Beobachtungen an hyperergischen Granulomen der Reifephase bestärkten uns in der Überzeugung, dass zugrundegehende Eosinophile durch massive Freisetzung von Granula zunächst die Schale der Schistosomeneier zerstören und nachfolgend das Mirazidium töten. Gestützt wird diese Annahme auch durch die Beobachtung, dass eosinophile Proteine innerhalb aufgebrochener Eier in haufenförmigen Ansammlungen an die Oberfläche der Mirazidien binden. Wenn jeder solcher Cluster freier extrazellulärer Granulaproteine (Cfegs), wie angenommen (Weiler et al., 1996) mit dem Sterben von jeweils einem Eosinophilen Granulozyten freigesetzt wird, ist vorstellbar, dass einige Eosinophile in unmittelbarer Nähe zu der Larve, möglicherweise auch erst innerhalb des Eies, zugrundegehen und ihre eosinophilen Granula und Proteine dabei auf das Mirazidium freisetzen (Abb. 6 (C)). Wir halten die Annahme von Li Hsü et al. (1980), dass toxische Enzyme Eosinophiler durch Mikroporen intakter Eischalen hindurch in die Eier eindringen und dort die lebende Larve angreifen, ebenfalls für wahrscheinlich. Im Falle der *Akuten Schistosomiasis* könnte es sich aber nur um einen untergeordneten Mechanismus der Parasitentoxizität handeln.

In vielen in vitro und in vivo Studien wurde die Degranulation der Eosinophilen Granulozyten als Pathomechanismus der Tötung von Schistosomen und anderen Parasiten untersucht. Obwohl die Bedeutung der Nekrose Eosinophiler im Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen bereits vor 30 Jahren erkannt und die Zyto- und Gewebetoxizität der Eosinophilen beschrieben worden ist, scheint das lokale Sterben von Eosinophilen bei Parasiteninfektionen in den in vitro Studien als auch in der Mehrheit der wenigen in vivo Untersuchungen, die es gibt, keine wesentliche Rolle zu spielen.

Unsere Ergebnisse bestätigen Beobachtungen, wonach im akuten Stadium florider Schistosomeninfektionen neben einer Gewebenekrose auch exsudative Granulome mit periovaler eosinophiler Nekrose und dichter Eosinophileninfiltration gesehen worden waren (von Lichtenberg et al. (1973); von Lichtenberg und Lehman (1986); von Lichtenberg (1987); Andrade (1987). Obwohl zentrale granuläre Nekrosen mit exsudativem Charakter schon mehrfach in Leber, Darm sowie im Zentralnervensystem gesehen wurden, sind ihre morphologischen Merkmale bisher nicht näher beschrieben worden. Auch die pathogenetische Bedeutung wurde offenbar nicht eingehender untersucht. Einiges spricht dem morphologischen Bild nach dafür, dass es sich bei der beobachteten eosinophilen periovalen nekrotischen Nekrobiose um dasselbe Phänomen handelt, das bei erhaltener Gewebestruktur auf einen massiven Zerfall Eosinophiler Granulozyten zurückzuführen ist, wie wir in vivo mit Hilfe von spezifischen Eosinophilenmarkern für Granulaproteine MBP und ECP-EG2 zeigen konnten. Interessanterweise hat das eindrucksvolle Phänomen bis heute noch keinen Eingang in die Standardwerke der Tropenkrankheiten (Cook (ed), Manson`s Tropical Diseases, (1996)), der Immunologie (Paul (ed.), Fundamental Immunology, (1999); Janeway & Travers (eds.), Immunology, (1997)), der Tropenpathologie (Doerr & Seifert (eds.), Tropical Pathology, (1995)) sowie der Pathologie (Rubin & Farber (eds.), Pathology; (1999); Robbins u.a. (eds), Pathologic Basis of Diseases, (1999)) gefunden.

Eine lokale Nekrose Eosinophiler wurden auch in anderen Parasitosen wie *Anisakiasis* (Pinkus et al., 1975) und *Leishmaniase* beschrieben. Für *Onchozerkiasis* haben Racz et al., (1982 (a),(b) im Rahmen zweier in vivo Studien an Lymphknoten von durch Diäthylcarbamin (DEC) behandelten Patienten das massive Zugrundegehen Eosinophiler Granulozyten untersucht. Dabei bestätigten die Ergebnisse einer Ultrastrukturstudie die Annahme aus der vorangegangenen lichtmikroskopischen Untersuchung, dass es sich bei dem im Nekroseareal vorhandenen eosinophilen Material in unmittelbarer Nähe und auf der Oberfläche vitaler und toter Larven (Mikrofilarien) sowohl um intakte Eosinophile als auch um Haufen (Cluster) intakter freier extrazellulärer Granula (Cfegs) sowie um deren Granulabestandteile handelt. In vivo wurde wiederholt gesehen, dass Eosinophile und auch deren Granula in der Nähe von Parasiten ganz verschiedene Intaktheitsgrade aufweisen (Dvorak AM, 1994; Wildenburg et al., 1994). Dies wird als Zeichen der Freisetzung von Proteinen aus den Granula interpretiert (Persson & Erjefält, 1998).

In der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Racz et al. (1982 (b)) zeigte die Mehrheit der Larven nach Bindung von Eosinophilen mit Hilfe der Eosinophilen-Parasiten-Adhärenzreaktion (EPA) Zeichen starker Degeneration. Racz et al. (1982 (b)) sahen im Widerspruch zu in vitro Studien in der Nekrose und nicht in der Degranulation der Eosinophilen Granulozyten den wichtigsten Mechanismus der durch Eosinophile verursachten Zytotoxizität bei durch DEC behandelter *Onchozerkiasis* in vivo. In einer Folgestudie wurden ähnliche Resultate auch nach der Behandlung mit Ivermectin erzielt (Wildenburg et al., 1994). Bisher wurde nur in wenigen in vitro Modellen zur Parasiteninfektionen ein Zusammenhang zwischen Nekrose und der Freisetzung von Cfgs (Villalta et al, (1987) oder dem Einfluss von Immunglobulinen auf die Antigenbindung und der damit verbundenen Degeneration der Eosinophilen untersucht (Weiler et al., 1996). Ergebnisse in vivo deuten darauf hin, dass es sich bei der Lyse oder Nekrose von Eosinophilen und der Freisetzung von Granula um einen wichtigen Beitrag zur Parasitenbekämpfung handelt.

Wir meinen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unter besonderer Berücksichtigung der Beobachtungen von Racz et al. (1982 (a), (b)) den Schluss zulassen, dass es sich bei der Nekrose um den Hauptmechanismus der durch Eosinophile vermittelten Toxizität gegen Schistosomeneier bei *Akuter Schistosomiasis* handelt. Daneben scheint die Degranulation, bei der die Eosinophilen nach Freisetzung ihrer toxischen Granula weiterhin funktionsfähig bleiben, für den Tod der Eier weniger bedeutsam zu sein. Bisher ist das wichtige Phänomen der Nekrose Eosinophiler in vivo bei Parasiteninfektionen unserer Ansicht nach nicht angemessen gewürdigt und nur wenig untersucht worden. Dies gilt insbesondere für das massive lokale Sterben Eosinophiler im Zusammenhang mit einer Erkrankung an der akuten Form der *Schistosomiasis*, was Gegenstand der vorliegenden Untersuchung ist.

Weiterführende in vivo und in vitro Modelle zum Studium der Nekrose Eosinophiler und der Degeneration Eosinophiler Granula im Zusammenhang mit *Akuter Schistosomiasis* könnten neue Aspekte über die Freisetzung und Verteilung von toxischen Granulaproteinen fördern. Eine quantitative Beurteilung könnte Erkenntnisse über das Verhältnis der Menge degranulierender und degenerierender Eosinophiler ermöglichen. Vielleicht gelingt es, mehr Klarheit darüber zu gewinnen, welche Mechanismen an der Adhäsion sowie der Aktivierung Eosinophiler bei *Akuter Schistosomiasis* beteiligt sind und welchen Sinn eine Abundanz von Eosinophilen und Nekrose in hyperergischen Schistosomeneigranulomen hat.

## **Periovale und intraovale eosinophile Präzipitate**

### *Periovale eosinophile Präzipitate*

In einigen Leber- und Darmpräparaten fiel bereits in H&E-Färbung ein ringförmiges, das Ei direkt umgebende Nekroseareal auf. Dieses war kräftiger eosinophil markiert, als der äußere Anteil der Nekrose (Abb. 7 (B)). In einem Leberpräparat zeigte sich in unmittelbarer Einähe ein solcher innerer Nekrosering hyalin leuchtend und gegenüber dem äußeren eher blass gefärbten Nekroseareal scharf begrenzt (Abb.5 (A)). Es stellte sich die Frage, ob es sich um ein Phänomen unterschiedlicher Dichte eosinophiler zellulären Materials handelt, oder um eine als „sunburst-Konfiguration“ (Hoepli, 1932) bezeichnete Ansammlung von Immunkomplexen, die auch im Rahmen schwerer Infektionen durch *S. japonicum* und *S. mansoni* gesehen wird. Obwohl sich im Nekrosezentrum neben den eosinophilen Granulaproteinen ECP-EG2 und MBP auch komplexbildende Antikörper IgE, IgG, IgA, IgM und Komplement C1q, C3d spezifisch anfärben ließen, scheint es eher wahrscheinlich, dass das Phänomen durch eine lokale Verdichtung eosinophiler Granula und ihrer toxischen Proteine begründet wird, als durch eine Konzentration von Immunkomplexen nach Hoepli. In Anlehnung an Beobachtungen von Kephart et al. (1988) und den von uns gesehenen Immunglobulin- und Komplementablagerungen in unmittelbarer Einähe kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Immunkomplexe zusammen mit Granula oder Granulaproteinen an der Bildung der stark eosinophilen nekrobiotischen Präzipitate beteiligt sind. Kephart et al. (1988) konnten an Gewebeproben von durch *S. mansoni* infizierten Patienten zeigen, dass es sich bei den zunächst als Hoepli-Phänomen interpretierten fransenartigen periovalen Präzipitaten zu einem Teil um Ablagerungen von MBP handelte. Die größten Mengen von Immunglobulinen IgG, IgM, IgA, IgE und Komplement C1q und C3d in freier oder gebundener Form konnten in Einähe am Ort der stärksten Antigenkonzentration und der größten Eosinophilenkonzentration radiär um die Eier herum verteilt nachgewiesen werden. Wir schließen aus diesen Beobachtungen in Anlehnung an Erkenntnisse über Schistosomula: Eosinophile binden in Gegenwart von Komplement über eine Eosinophilen-Parasiten-Ädhärenzreaktion erleichtert an durch Immunglobuline besetzte Schistosomeneier. Ob, wie in vitro gesehen, die Festigung dieser Bindung mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen (Kaneko et al., 1995) einerseits und die Erhöhung der Zahl der Bindungen mit Hilfe von Immunglobulinen andererseits (Weiler et al., 1996) auch das Sterben Eosinophiler in vivo fördert, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

### *Intraovale eosinophile Präzipitate*

Neben den beschriebenen periovalen eosinophilen Präzipitaten zeigten sich in der Übersichtsfärbung (H&E) im Darmgewebe inmitten eines frühen Granuloms eosinophile Einschlüsse auch innerhalb eines vitalen Schistosomeneies der Spezies *S. mansoni* (Abb. 14). Diese balkenförmigen Einschlüsse, deren Natur und genaue Funktion noch ungeklärt sind, wurden bisher im Tiermodell (Hamster (von Lichtenberg et al., 1973)), (Maus (Hirata et al., 1986, 1999)) nur für die Spezies *S. japonicum* beschrieben. Da in der vorliegenden Untersuchung keine Serienschnitte des Präparates zu Verfügung standen, ließen die Beobachtungen keine klaren Schlüsse darüber zu, ob sich die Einschlüsse, wie im Mausmodell beschrieben, tatsächlich zwischen Vitellinmembran und Eischale (Hirata et al., 1999) befanden. Von Lichtenberg et al., (1973) nahmen an, dass es sich bei den Einschlüssen um intraovale Immunpräzipitate handelte und prägten den Begriff vom „Reversen Hoeppli-Phänomen“. Obwohl wir im humanen Darmgewebe wie Hirata et al. (1986 (a)) im Lebergewebe von Mäusen Immunglobuline auch innerhalb von Schistosomeneiern nachweisen konnten (Abb.12 (D)), lässt sich aus dieser Beobachtung kaum die Herkunft und Bedeutung der eosinophilen Präzipitate erklären. Hirata et al., (1999) fanden im Rahmen einer experimentellen Studie an Mäusen, in deren Leber in Kultur gezüchtete, mit infizierten Milzzellen inkubierte *S. japonicum* Eier injiziert worden waren, Einschlüsse innerhalb reifer Eier. Solche Einschlüsse zeigten sich selbst in Mäusen mit deutlich verminderter Antikörperproduktion. Die Autoren schlossen, dass die intraovalen Präzipitate weder durch eine Antikörper/ Antigen-Interaktion bedingt sind, noch dass sie spontan von den Eiern produziert werden. Man nahm an, dass die Einschlüsse durch eine Auseinandersetzung von Entzündungszellen wie Eosinophile Granulozyten oder Makrophagen mit Eiantigenen im immunologischen Prozess entstehen könnten. Weitere immunhistochemische Untersuchungen könnten mehr Klarheit darüber schaffen, ob und inwieweit die Ausprägung der zellulären granulomatösen Reaktion an der Ausbildung solcher Präzipitate beteiligt ist und welche Rolle diese bei der Granulomformation und der Zerstörung von Schistosomeneiern spielen.

Abschließend lässt sich sagen: Im Zentrum des immunologischen Geschehens bei *Akuter Schistosomiasis* steht die Auseinandersetzung der Eosinophilen Granulozyten als Effektorzellen mit den Eiantigenen. Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit lassen für uns überzeugend den Schluss zu, dass es sich bei der Nekrose um den wichtigsten Mechanismus der durch Eosinophile vermittelten Zytotoxizität gegen Schistosomeneier *in vivo* handelt.

## 6 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, die zelluläre Zusammensetzung hyperergisch entzündlicher Schistosomeneigranulome zu untersuchen. Diese werden hauptsächlich im Rahmen schwerer Infektionen durch *Schistosoma mansoni* oder *Schistosoma japonicum* bei nicht sensibilisierten, erstmals infizierten Personen gesehen. Das klinische Korrelat der akuten Form der *Schistosomiasis* (*Akute Schistosomiasis*) ist als *Katayama Krankheit* bekannt. Im Mittelpunkt des Interesses standen große zellreiche Granulome mit einer zentralen, periovalen eosinophil gefärbten Nekrose. Neben der häufig vorkommenden Gewebezellnekrose wurde diese Form der Nekrose bisher nur in wenigen Untersuchungen im Zusammenhang mit subakuter oder akuter *Schistosomiasis* gesehen; sie ist bisher nicht näher beschrieben worden. Histopathologische Untersuchungen zur Spezifizierung der zugrundegehenden Zellpopulation sowie der Aufklärung möglicher Folgen der nekrotischen Nekrobiose für den durch das Schistosomenei verkörperten Parasiten sind nicht unternommen worden. Eosinophilie ist ein wesentliches Merkmal von Parasitosen wie den Helminthosen, zu denen auch die Schistosomeninfektionen gerechnet werden. Eosinophile Granulozyten stellen den Hauptzelltyp in Schistosomeneigranulomen. Dieser Zellgruppe wurde daher besondere Aufmerksamkeit geschenkt und eine angenommene Beteiligung an der eosinophilen Nekrose sowie ihre antiparasitären Eigenschaften auf Schistosomeneier untersucht.

Bei dem für die Studie verwendeten Material von insgesamt sechzehn Fällen, das unter 465 Fällen histologisch diagnostizierter *Schistosomiasis* den Auswahlkriterien entsprach, handelt es sich um paraffinierte Gewebeproben aus humanem Lebergewebe und Darmgewebe, bestehend aus Mukosa und Submukosa, welches zu Diagnosezwecken entnommen worden war. Die angefertigten Gewebeschnitte wurden erst zur Übersicht konventionell gefärbt und schließlich zur Darstellung einzelner Zellpopulationen immunhistochemisch mit Hilfe spezifischer monoklonaler oder polyklonaler Antikörper markiert.

Innerhalb ausgedehnter eosinophiler nekrotischer Granulome zeigten die Schistosomeneier mehrheitlich deutliche Zeichen der Degeneration. Sie waren typischerweise von freiem eosinophilem extrazellulärem Material umgeben, das sich gleichermaßen spezifisch anfärben ließ wie das Zytoplasma intakter Eosinophiler Granulozyten, die sich nur außerhalb der Nekrose sicher abgrenzen ließen. Durch vier Beobachtungen wurde im Wesentlichen nahegelegt, dass es sich bei dem

markierten extrazellulären Material um durch Eosinophile freigesetzte Granula und Granulaproteine handelt, die auf Helminthen toxisch wirken.

1. Massive Vermehrung von Eosinophilen Granulozyten im einahen Gewebe.
2. Positivität des extrazellulären Materials für spezifische Antikörper gegen die Granulaproteine MBP und ECP-EG2.
3. Zellschutt, pyknotisches und fragmentiertes Kernmaterial im gesamten zentralen Nekroseareal der Granulome.
4. Von eosinophilem Material besetzte Eioberflächen und Schalendefekte.

Veränderte Larven (Mirazidien) innerhalb der Eier wurden in allen Fällen im Zusammenhang mit deutlichen Eischalendefekten gesehen. Einzelne zerfallende Eosinophile oder haufenförmiges angeordnetes freies ECP-EG2- und MBP positives Material fand sich auch innerhalb von Eiern mit Schalendefekten. Weiterhin ließen sich radiär um die Schistosomeneier herum ausgedehnte Ansammlungen von Komplement C1q und C3d als auch auch der Immunglobuline IgG, IgE, IgA markieren.

Die Beobachtungen führten zu folgenden Schlussfolgerungen:

1. Eosinophile Granulozyten festigen in Gegenwart von Komplement und Immunglobulinen ihre Bindung an Schistosomeneier.
2. Die nekrotische Nekrobiose ist ein wichtiger Weg der Granulafreisetzung durch Eosinophile Granulozyten neben der exozytotischen Degranulation.
3. Über Nekrose freigesetzte Granula zerstören die Eischale, dringen in das Ei ein und töten schließlich das Mirazidium.
4. Bei der immunologisch vermittelten Nekrose Eosinophiler Granulozyten mit nachfolgender Freisetzung von Granula im Falle der *Akuten Schistosmiasis* handelt es sich um den Hauptmechanismus der durch Eosinophile vermittelten Zytotoxizität gegen Schistosomeneier in vivo.

Die massive eosinophile Nekrobiose stellt ein seltenes aber wichtiges morphologisches Phänomen im Rahmen einer akuten und schweren Infektion durch Schistosomen dar. Besondere Bedeutung gewinnt die durch eine ausgeprägte Überempfindlichkeitsreaktion gegen Eiantigene geprägte granulomatös-entzündliche Erkrankung wegen teilweise schwerer Komplikationen. Neben lokalen Gewebeschädigungen an den Orten der Eiablage in der Harnblase und Darm können insbesondere Absiedelungen von Eiern über ableitende Gefäße in nachgeschaltete

Organe wie Leber, Lunge und Gehirn ernste Symptome hervorrufen. Zu nennen sind insbesondere die portale Hypertension in der Leber, epileptische Anfälle oder eine Querschnittsymptomatik, bedingt durch Schwellungen und Vernarbungen des Gewebes mit folgender Thrombosierung von Gefäßen und Kompression von Nerven im Gehirn und Rückenmark. Da im Zusammenhang mit *Akuter Schistosomiasis* von uns auch eine lokale Gefäßbeteiligung im Sinne einer Eosinophilen Vaskulitis beobachtet worden ist, wäre es interessant und wichtig, zu untersuchen, ob und unter welchen Umständen es zu einer Ausbreitung der Gefäßentzündung im gesamten Organismus kommen kann. In diesem Zusammenhang stellt sich auch die Frage, ob, beziehungsweise wie oft eine systemische Vermehrung von Eosinophilen als Trigger für Herzmuskelentzündungen fungiert, wie bei *Tropischer Myokarditis* und *Eosinophiler Myokarditis*. Über die vorliegende retrospektive morphologische Studie hinaus - auf klinische und immunologische Daten konnte nicht zurückgegriffen werden - sind weitere immunologische Untersuchungen notwendig. Es gilt unter anderem, mehr Klarheit darüber zu gewinnen, welchen Sinn eine Abundanz Eosinophiler hat und welche Mechanismen zu einer überschießenden Immunreaktion führen, die in einer lokalen massiven nekrotischen Nekrobiose von Eosinophilen gipfelt.

## 7 Abkürzungen

APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
BNI	Bernhard-Nocht-Institut
CDC	Centers for Disease Control
Cfegs	Clusters of free extracellular granules
DEC	Diethylcarbamazin
ECP	Eosinophil Cationic Protein
EM	Elektronenmikroskop
EPA	Eosinophilen-Parasiten-Adhärenzreaktion
EPX	Eosinophil Protein X
EDN	Eosinophil Derived Neurotoxin
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony-Stimulating Factor
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IC	Immunkomplex
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LM	Lichtmikroskop
LZ	Lymphozyt
MBP	Major Basic Protein
Mf	Mikrofilarien
MZ	Mastzelle
NK	Natural Killer Cell
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PZ	Plasmazelle
SEA	Soluble Egg Antigens
TGF	Transforming Growth Factor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentralnervensystem

## 8 Literaturverzeichnis

Ackerman SJ, Gleich GJ, Loegering DA, Richardson BA, Butterworth AE (1985): Comparative toxicity of purified granule cationic proteins for schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Amer J Trop Med Hyg*; 34:735-745

Adewusi O, Nix N, Lu X, Colley D, Secor W (1996): *Schistosoma mansoni*: relationship of tumor necrosis factor-alpha to morbidity and collagen deposition in chronic experimental infection. *Exp Parasitol*; 84:115-123

Amiri P, Locksley RM, Parslow TG, Sadick M, Ritter D, McKerrow JH (1992): Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg laying in schistosome-infected scid mice. *Nature*; 356:604-607

Andrade ZA (1987): Pathology of human *Schistosomiasis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (Rio de Janeiro), 82: (Suppl. IV) 17-23

Andrade ZA, De Azevedo TM (1987): A contribution to the study of acute *Schistosomiasis* (an experimental trial). *Mem Inst Oswaldo Cruz* (Rio de Janeiro), 82 (3):311-317

Andrade ZA, Reis MG (1984): Estudo sobre o papel dos eosinófilos na destruição dos esquistossômulos do *Schistosoma mansoni* in vivo. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 79:371-373

Andrade ZA, Warren KS (1964): Mild prolonged *Schistosomiasis* in mice: alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene*; 58:53-58

Andrade ZA, Berthillon P, Parana R, Grimaud JA, Trepo C (2001): *Schistosomiasis mansoni* and viral B hepatitis in woodchucks. *J Hepatol* (Jan), 34(1):134-9

Azzawi M, Johnston PW, Majumdar S, Kay AB, Jeffery PK (1992): T lymphocytes and activated eosinophils in airway mucosa in fatal asthma and cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* (Jun), 145(6):1477-1482

Bass DA, Grover WH, Lewis JC, Szejda P, de Chatelet LR, Mc Call CE (1980): Comparison of human eosinophils from normals and patients with eosinophilia. *J Clin Invest*; 66:1265-1273

Basten A, Beeson PB (1970): Mechanism of eosinophilia. II Role of the lymphocyte. *J Exp Med*; 131:1288

Bell DR (1995): Blood flukes-schistosomes. In: Bell DR (ed), *Lecture Notes on Tropical Medicine*; 4<sup>th</sup> edn. Blackwell Science: Oxford u.a., pp. 221-239

Bentley AM, Menz G, Storz C, Robinson DS, Bradley B, Jeffery PK, Durha SR, Kay AB (1992): Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. *Am Rev Respir. Dis (Aug)*, 146(2):500-506

Betjes M, Haks M, Tuk C, Beelan H (1991): Monoclonal antibody EBM11 (anti-CD 68) discriminates between dendritic cells and macrophages after short-term culture. *Immunobiology*; 183:79-87

Bialek R, Knobloch J (2001): *Schistosomiasis* in german children. *Eur J Pediatr (Jul)*, 159(7):530-4

Bienenstock J (1999): *Mucosal Immunology*. Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR (eds), 3<sup>rd</sup> edn.: Academic Press: San Diego (u.a.)

Bloch EH (1984): In vivo microscopy of *Schistosomiasis*. IV. The dynamics of the host-parasite responses to *Schistosoma mansoni* in the hypodermal tissues as observed in transparent chambers in two susceptible hosts during primary and challenged infections. *Am J Trop Med Hyg*; 33:899-910

Bogitsh BJ (1971): *Schistosoma mansoni*. Cytochemistry of eosinophils in egg-caused early hepatic granulomas in mice. *Exp Parasitol*. 29:493-500

Bogliolo L (1958): Subsídios Para o Conhecimento da Forma Hépto-Esplênica e da Forma Toxêmica da Esquistossomosose Mansônica. Serviço Nacional De Educação Sanitaria Ministerio Da Saude. Rio De Janeiro- Brasil; pp. 11-291

- Borojevic R (1992): Experimental murine *Schistosomiasis* mansoni: establishment of the chronic phase of the disease. Mem Inst Osw Cruz; 87 (Supplm. IV):171-174
- Boros DL (1989): Immunopathology of *Schistosoma* mansoni Infection. Clinical Microbiology Reviews; pp. 250-269
- Boros DL, Pelley RP, Warren KS (1975): Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in *Schistosomiasis* mansoni. J Immunol; 114:1437-1441
- Boros DL, Warren KS (1970): Delayed hypersensitivity type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by soluble factor isolated from *S. mansoni* eggs. J Exp Med; 132:488-507
- Bou A, Gascon, Eugenia Valls M, Corachan M (2001): Katayama fever in Spanish tourists: analysis of 25 cases. Med Clin (Barc)) (Febr) 17; 116(6):220-222
- Brito de PA, Kazura JW, Mahmoud AAF (1984): Host granulomatous response in *Schistosomiasis* mansoni: antibody and-cell-mediated damage of parasite eggs in vitro. J Clin Invest; 74:1715
- Bruggemann M, Williams GT, Bindon CI et al (1987): Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. J Exp Med; 166:1351-1361
- Brunet LR, Beall M, Dunne DW, Pearce EJ (1999): Nitric oxide and the Th2 response combine to prevent severe hepatic damage during *Schistosoma* mansoni infection. J Immunol (Nov) 1, 163(9):4976-84
- Brunet LR, Finkelman FD, Cheever AW, Kopf MA, Pearce EJ (1997): IL-4 protects against TNF-alpha mediated cachexia and death during acute *Schistosomiasis*. J Immunol; 159:777-785
- Buchanan RD, Colley DG (1973): *Schistosoma* mansoni infection in mice depleted of thymusdependend lymphocytes. II Pathology and altered pathogenesis. Am J Pathol; 71:207-218
- Butterworth AE (1984): Cell-mediated damage to helminths. Adv Parasitol; 23:142-235

Butterworth AE, Sturrock RF, Houba V, Rees PH (1974): Antibody-dependent cell-mediated damage to schistosomula in vitro. *Nature*; 252:503

Butterworth AE, Vadas MA, Wassom DL, Dessein A, Hogan M, Sherry B, Gleich GL, David JR (1979 (a)): Interactions between human eosinophils and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. II The Mechanism of irreversible eosinophil adherence. *J Exp Med*; 150:1456

Butterworth AE, Wassom DL, Gleich GJ, Loegering DA, David DR (1979 (b)): Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by major basic protein. *J Immunol*; 122:221-229

Byram JE, von Lichtenberg F (1977): Altered schistosome granuloma formation in nude mice. *Am J Trop Med Hyg*; 26:944-956

Byram JE, Doenhoff MJ, Musallam R, Brink LH, Von Lichtenberg F (1979): *Schistosoma mansoni* infections in T-cell deprived mice, and the ameliorating effect of administering chronic infection serum. II. Pathology. *Am J Trop Med Hyg*; 28:274-285

Capron M (1991): Eosinophils and parasites. *Ann Parasitol Hum Comp*, 66 Suppl 1:41-45

Case records of the Massachusetts General Hospital weekly clinicopathologic exercises: Case 21 (1985). A 21 year old man with fever, diarrhea and weakness of the legs during a sojourn in Kenya. *New England Journal of Medicine*; 312:1376-1383

Caux C, Lebecque S, Liu Y, Banchereau J (1999): Developmental pathways of human myeloid dendritic cells. In: Lotze M, Thomson A. „Dendritic Cells: Biology and Clinical Applications“. Academic Press, San Diego, pp. 63-90

Centers for Disease Control (1990): Acute *Schistosomiasis* in US travelers returning from Africa. *JAMA*: Vol 263, No. 16:2165-2166

Cesmeli E, Vogelaers D, Voet D, Duyck P, Peleman R, Kunnen M, Afschrift M (1997): Ultrasound and CT changes of liver parenchyma in acute *Schistosomiasis*. *Br J Radiol*; 70(835):758-760

Cheever AW, Byram JE, Hieny S, von Lichtenberg F, Lunde MN, Sher A (1985 (a)): Immunopathology of *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* infection in B-cell depleted mice. *Parasite Immunology*; 7:399-413

Cheever AW, Byram JE, von Lichtenberg F (1985 (b)): Immunopathology of *Schistosoma japonicum* infection in athymic mice. *Parasite Immunol*; 7:387-398

Cheever AW, Lewis FA, Wynn TA (1997): *Schistosoma mansoni*: unisexual infections sensitize mice for granuloma formation around eggs. *Parasitology Research*; 83:57-59

Cheever AW, Williams ME, Wynn TA et al (1994): Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non T-cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J Immunol*; 153:753-759

Cheever AW, Xu Y, Sher A, Finkelman FD, Cox TM, Macedonia JG (1993): *Schistosoma japonicum*-infected mice show reduced hepatic fibrosis and eosinophilia and selective inhibition of IL-5 secretion by CD4+ cells after treatment with anti-IL-2 antibodies. *Infect Immunol*; 61:1288-1292

Cheng J, Ott N, Peterson E, George T, Leiferman KM (1993): Dermal eosinophiles in atopic dermatitis undergo cytolytic degeneration. *J Invest Dermatol Abstr*; 100:545

Chensue SW, Boros DL (1979): Population dynamics of T and B lymphocytes in the lymphoid organs, circulation, and granulomas of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*; 28:291-299

Chiaromonte MG, Schopf LR, Neben TY, Cheever AW, Donaldson DD, Wynn TA (1993): IL-13 is a key regulatory cytokine for Th2 cell-mediated pulmonary granuloma formation and IgE responses induced by *Schistosoma mansoni* eggs. *J Immunol*; 162:920

Clark WD, Cox PM, Jr Ratner LH, Correa-Coronas R (1970): Acute *Schistosomiasis mansoni* in 10 boys: an outbreak in Caguas, Puerto Rico. *Ann Intern. Med*; 73:379-385

Clerici M, Shearer G (1994): The Th1-Th2 hypothesis. *Immunol Today*; 15:575-581

Coles (1902): The blood in cases affected with filariasis and *Bilharzia haematobia*. *Br Med J*; 1:1137-1138

Cook GC (1996): Manson's Tropical Diseases, 20<sup>th</sup> edn. Cook GC (ed). Saunders, London (u.a.)

Corrêa-Oliveira R, Malaquias LCC, Falcão PL, Viana IRC et al (1998): Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. *Braz J Med Biol Res*; 31(1):171-177

Damian RT (1987): The exploitation of host immune responses by parasites. *J Parasitol*; 73:3-13

Damian RT, De la Rosa MA, Murfin DJ, Rawlings CA, Weina PJ, Xue YP (1992): Further development of the baboon as a model for acute *Schistosomiasis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 87(Supplm. IV):261-269

David JR, Vadas MA, Butterworth AE, Azevedo de Brito P, Carvalho EM et al (1980): Enhanced helminthotoxic capacity of eosinophils from patients with eosinophilia. *New England Journal of Medicine*; 303:1147-1152

Davis A (1996): *Schistosomiasis*. In: Cook GC (ed), Manson's Tropical Diseases, 20<sup>th</sup> ed. Saunders. London (u.a.), pp. 1413-1456

Day JH, Grant AD, Doherty JF, Chiodini PL, Wright SG (1996): *Schistosomiasis* in travelers returning from sub-Saharan Africa. *BMJ*; 313:268-269

Deardorff TL, Jones RE, Kayes SG (1991): Adherence of eosinophils to the epicuticle of infective juveniles of *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae). *J Helminthol Soc Wash*; 58:361-367

De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennit B, Frigdor CG, De Vries JE: (1991): Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*; 174:1209-1220

Diaz-Rivera RS, Ramos-Morales F, Koppisch E, Garcia- Palmieri MR, Cintron-Rivera AA; Marchand EJ, Gonzalez O, Torregrosa MV (1956): Acute Manson's *Schistosomiasis*. *American Journal of Medicine*; 918-943

Doenhoff MJ (1997): A role for granulomatous inflammation in the transmission of infectious disease: *Schistosomiasis* and tuberculosis. *Parasitology*; 115:113-125

Doenhoff MJ, Pearson D, Dunne DW, Brickle Q, Lucas S, Bain J, Musallam R, Hassounah O (1981): Immunological control of hepatotoxicity and parasite egg excretion in *Schistosoma mansoni* infections: stage specificity of the reactivity of immune serum in T-cell deprived mice. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine and Hygiene*; 75:41-53

Doerr W, Seifert G (1995): *Tropical Pathology*. Doerr W, Seifert G (eds). Vol. 8, 2<sup>nd</sup> edn. Springer

Doherty JF, Moody AH, Wright SG (1996): Katayama fever: an acute manifestation of *Schistosomiasis*. *BMJ*; 26; 313 (7064):1071-1072

Dooley JR, Neafie RC (1976): Anisakiasis. In: *Pathology of Tropical and Extraordinary Diseases*; Binford CH and Connor DH (eds). pp. 475-481. Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC

Dunne DW, Doenhoff MJ (1983 (b)): *Schistosoma mansoni* egg antigens and hepatocyte damage in infected T cell- deprived mice. *Contrib Microbiol Immunol*; 7:22-29

Dvorak AM (1994): Eosinophils. In: Gleich GJ, Kay AB (eds), *Allergy and Inflammation*. Dekker, pp. 159-210

Egesten A, Alumets J, von Mecklenburg C, Plamegren M, Olssen I (1986): Localization of eosinophil cationic protein, major basic protein and eosinophil peroxidase in human eosinophils in immunoelectron microscopic technique. *J Histochem Cytochem*; 34:1399

El-Garem AA (1998): *Schistosomiasis*. *Digestion*; 59:589-605

Erjefält JS, Persson CGA (2000): New aspects on degranulation and fates of airway mucosal eosinophils. *Am J Resp Crit Care Med*; 161:2074-2085

Erjefält JS, Greiff L, Andersson M, Ädelroth E, Jeffrey PK, Persson CGA (2001): Degranulation patterns of eosinophil granulocytes as determinants of eosinophil driven disease. *Thorax* (May), 56:341-344

Fairley NH (1920): A comparative study of experimental bilharziasis in monkeys contrasted with hitherto described lesions in man. *J Path Bacteriol*; 23:289-314

Falcao PL, Malaquias LC, Martins-Filho OA, Silveira AM, Passos VM, Prata A, Gazzinelli G, Coffman RL, Correa-Oliveira R (1998): Human *Schistosomiasis* mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. *Parasite Immunol*; 20 (10):447-454

Falini B et al (1993): PG-M1: A new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the CD 68 molecule. *Am J Pathol*; 142:1359-72

Fallon PG, Dunne DW (1999): Tolerization of mice to *Schistosoma manoni* egg antigens causes elevated type 1 and diminished type 2 cytokine responses and increased mortality and acute infection. *The Journal of Immunology*; 162:4122-4132

Fantone JC, Ward PA (1999): Inflammation. In: Rubin E, Farber JL (eds): *Pathology*, 2<sup>nd</sup> edn: Lippincott-Raven, Philadelphia

Feldman GM, Dannenberg AM, Seed JL (1990): Physiologic oxygen tensions limit oxidant-mediated killing of schistosome eggs by inflammation cells and isolated granulomas. *J Leucocyte Biol*, 47:344

Ferreira H, Oliveira CA, Bittencourt D, Katz N, Carneiro LFC, Grinbaum E, Veloso C, Dias RP, Alvarenga RJ, Dias CB (1966): A fase aguda da esquistossomose mansoni. Consideracoes sobre 25 casos observados em Belo Horizonte. *J Bras Med*; 11:54-67

Flores Villanueva PO, Chikanguno SM, Harris TS, Stadecker MJ (1993): IL-10 inhibits macrophage co-stimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *Immunology*; 151:1224-1243

Forssman U, Ugucioni M, Loetscher P, et al (1997): Eotaxin-2, a novel CC chemokine that is selective for the chemokine receptor CCR3, and acts like eotaxin on human eosinophil and basophil leucocytes. *J Exp Med*; 185:2171-2176

Fredens K, Dybdahl H, Dahl R, Baandrup U (1988): Extracellular deposit of cationic proteins ECP and EPX in tissue infiltrations of eosinophils related to tissue damage. *APMIS* 96; 711-719

Gazzinelli G, Labertucci JR, Katz N, Rocha RS, Lima MS, Colley DG (1985): Immune responses during human *Schistosomiasis* mansoni. XI Immunologic status of patients with acute infections and after treatment. J Immunol; 135:2121-2127

Girges, R (1934): *Schistosomiasis*. John Bale and Danielson, London.

Gleich GJ, Adolphson CR (1986): The eosinophil leucocyte: structure and function. Adv Immunol; 39:177-253

Gleich GJ, Loegering SA, Maldonado JE (1973): Identification of a major basic protein in guinea pig eosinophil granules. J Exp Med; 137:1459-1461

Gleich GJ, Frigas E, Loegering DA et al. (1979): Cytotoxic properties of eosinophil major basic protein. J Immunol; 123:2925-2927

Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM (1992): Eosinophils. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R (eds). Inflammation. 2<sup>nd</sup> edn. Raven Press, New York; 663-700

Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM (1993): The biology of the eosinophilic leukocyte. Annu Rev Med; 44:85-101

Gönnert R (1955): *Schistosomiasis*-Studien IV. Zur Pathologie der *Schistosomiasis* der Maus. Z Tropenmed Parasitol; 6:279-336

Goes AM, Rezende SA, Gazzinelli G, Doughty BL (1994): Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* egg antigens in human *Schistosomiasis*. IV. A role for prostaglandin-induced inhibition of in vitro granuloma formation. Parasite Immunology; 16:11-18

Gounni AS et al (1994): High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. Nature; 367:183-186

Greiff L, Erjefält JS, Andersson M, Svensson C, Persson CG (1998): Generation of clusters of free eosinophil granules (Cfegs) in seasonal allergic rhinitis. Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, University Hospital Lund, Sweden.

- Grzych J-M, Pearce E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Hieny S, Lewis F, Sher A (1991): Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine *Schistosomiasis* mansoni. *J Immunol.* 146:1322-1340
- Hamada A, Greene GM (1987): C1q enhancement of IgG-dependent eosinophile-mediated killing of schistosomula in vitro. *J Immunol*; 138:1240-1245
- He YX, Hsu SY, Hsu HF (1993): The hoepli phenom in *Schistosomiasis* japonica: historical findings and additional investigation in bovines. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*; 24 (1):74-79
- Henderson WR, Chi EY (1985): Ultrastructural characterization and morphometric analysis of human eosinophil degranulation. *J Cell Sci*; 73:33-48
- Hiatt RA, Sotomayor ZR, Sanchez G, Zambrana M, Knight WB (1979): Factors in pathogenesis of acute *Schistosomiasis*. *J Infect Dis*; 139:659-666
- Hiatt RA, Ottesen EA, Sotomayor ZR, Lawley TJ (1980): Serial observations of circulating immune complexes in patients with acute *Schistosomiasis*. *J Infect Dis*; 142:665-670
- Hirata M, Hieda T, Tsutsumi H (1986): Immunoglobulins inside *Schistosoma japonicum* eggs from the livers of mice. *Journal of Pathology*; 72:578-582
- Hirata M, Hieda T, Kato H, Tsutsumi H (1987): Intraovular IgG in eggs isolated or trapped in liver tissues in *Schistosoma japonicum* infected rabbits. *Japanese Journal of Parasitology*; 36:63-67
- Hirata M, Kage M, Hara T, Nakao M, Fukuma T (1997): Inhibitory effect of circulating egg antigens on *Schistosoma japonicum* egg-induced granuloma formation. *J Parasitol*; 83:842-847
- Hirata M, Nakashima T, Fukuma T (1999): Characteristics of eosinophilic inclusions within *Schistosoma japonicum* eggs. *Parasitology*; 118:269-274
- Hoepli R (1932): Histological observations in experimental *Schistosomiasis* japonica. *Chin Med J*; 46:1179-86

Hoffmann KF, Cheever AW, Wynn TA (2000): IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine *Schistosomiasis*. *J Immunol* (Jun) 15; 164(12): 6406-16

Houpi J, Oexmann J, Martin J, Jacobi G, Reardon J, Waterman G (1984): Acute *Schistosomiasis* with transverse myelitis in American students returning from Kenya. *MMWR-Morbidity & Mortality Weekly Report*; 33:445-447

Hsü HF, Davis JR, Hsü SYL (1969): Histopathological lesions of rhesus monkeys and chimpanzees infected with *Schistosoma japonicum*. *Z Tropenmed Parasitol*; 20:184-205

Indik ZK, Park JG, Hunter S, Schreiber AD (1995): Structure function relationships of Fc $\gamma$  receptors in phagocytosis. *Semin Immunol*; 7:45-54

Ioachim HL: (1983): *Pathology of Granulomas*. Ioachim HL (ed). Raven Press, New York

Jahnsen FL, Brandtzaeg P, Halstensen TS (1994): Monoclonal antibody EG2 does not provide reliable immunohistochemical discrimination between resting and activated eosinophils. *J Immunol Methods*; 175:23-36

James SL, Colley DG (1976): Eosinophil-mediated destruction of *Schistosoma mansoni* eggs. *Journal of Reticuloendothelial Society*; 20:359-374

James SL, Colley DG (1978): Eosinophil-mediated destruction of *Schistosoma mansoni* eggs in vitro. II. The role of cytophilic antibody. *Cell Immunol* (Jun), 38(1):35-47

James SL, Colley DG (1978): Eosinophil-mediated destruction of schistosoma eggs. III Lymphokine involvement in the induction of eosinophil functional abilities. *Cell Immunol* (Jun), 38(1):48-58

James SL, Colley DG (1978): Eosinophil-mediated destruction of schistosoma eggs. IV. Effects of several inhibitory substances on eosinophil function. *Cell Immunol* (Jun), 38(1):59-67

Janeway CH jr, Travers P (1997): *Immunologie*. Janeway CA jr., Travers P (eds). 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Jankovic D, Sher A (1996): Initiation and regulation of CD4+ T-cell function in host-parasite models. *Chemical Immunology*; 63:51-65

Jones RE, Finkelmann FD, Hester RB, Kayes SG (1994): *Toxocara canis*: Failure to find IgE receptors (Fc  $\epsilon$  R) on eosinophils from infected mice suggests that murine eosinophils do not kill helminth larvae by IgE-dependent mechanism. *Exp Parasitol*; 78:63

Junghanss T, Weiss N (1992): Acute *Schistosomiasis* in travellers to the tropics. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*; 117:935-940

Junker J, Eckhardt, Husstedt J (2001): Cervical intramedullar *Schistosomiasis* as a rare cause of acute tetraparesis. *Clin Neurol Neurosurg (Apr)*, 103 (1):39-42

Kaneko M, Horie S, Kato M, Gleich GJ, Kita H (1995): A crucial role for  $\beta$ 2 integrin in the activation of eosinophils stimulated by IgG. *J Immunol*; 155:2631-2641

Karanja DMS, Colley DG, Nahlen BL, Ouma JH, Secor WE (1997): Studies on *Schistosomiasis* in Western Kenya. I. Evidence for immune facilitated excretions of schistosome eggs from patients with *Schistosoma mansoni* and Human Immunodeficiency Virus co-infections. *Am J Trop Med Hyg*; 56:515-521

Kephart GM, Gleich GJ, Connor DH, Gibson DW, Ackerman SJ (1984): Deposition of eosinophil granule major basic protein onto microfilariae of *Onchocerca volvulus* in the skin of patients treated with diethylcarbamazine. *Lab Invest*; 50:51-61

Kephart GM, Andrade ZA, Gleich GJ (1988): Localization of eosinophil major basic protein onto eggs of *Schistosoma mansoni* in human pathologic tissue. *Am J Pathol*; 133:389-396

King CL, Xianli J, Malhotra I, Liu S, Mahmoud AAF, Oettgen HC (1997): Mice with a targeted deletion of the IgE gene have increased worm burdens and reduced granulomatous inflammation following primary infection with *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*; 158:294-300

Kita H (1996): The eosinophil: a cytokine-producing cell ?. *J Allergy Clin Immunol*; 97:889-892

Klebanoff SJ, Henderson WR jr., Jong EC, Jörg A, Locksley RM (1983): Role of peroxidase in eosinophil function. In: Yoshida T, Torisu M (eds): Immunobiology of the eosinophil. Elsevier Science Publishing Co Inc, New York-Amsterdam-Oxford pp.261-281

Knobloch J (1996): Tropen- und Reisemedizin. Knobloch J (Hrsg.). Gustav-Fischer Verlag, Jena (u.a.)

Kopf M, Brombacher F, Hodgkin P, Ramsay AJ, Milbourne EA, Dai WJ, Ovington KS, Behm CA, Köhler G, Young IG, Matthaei KI (1996): IL-5 deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity*; 4:15-24

Kresina TF et al. (1992): Cytokines, hepatic fibrosis and *Schistosomiasis*. *Rhode Island Med*; 75:191-195

Kroegel C (1990): *Lung*; 168(Suppl):5-17

Lambertucci JR (1988): Treatment of the acute (toxaemic) phase of *Schistosomiasis* with oxamniquine. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 82:350-351

Lambertucci JR, Rayes AA, Barata CH, Teixeira R, Gerspacher-Lara R (1997): Acute schistosomiasis: report on five singular cases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 92 (5):631-635

Lambertucci JR, Rayes AA, Serufo JC, Nobre V (2001): Pyogenic abscess and parasitic diseases. *Rev Inst Med Trop Med Sao Paulo (Mar-Apr)*, 43 (2):67-74

Lawley TJ, Ottesen EA, Hiatt RA, Gazze LA (1979): Circulating immune complexes in acute *Schistosomiasis*. *Clin Exp Immunol*; 37:221-227

Lawton, FB (1917): *Med J Aust*; 2:247

Lenzi HL, Sobral ACL, Lenzi JA (1987): „In vivo“ kinetics of eosinophils and mast cells in experimental murine *Schistosomiasis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 82 (Suppl. IV): 67-76

Lenzi HL, Pacheco RG, Pelajo-Machado M, Panasco MS et al (1997): Immunological System and *Schistosoma mansoni*: Co-evolutionary Immunobiology. What is the eosinophil role in parasite-host relationship? Mem Inst Oswaldo Cruz; 92 (Suppl II):19-32

Leptak CL, McKerrow JH (1997): Schistosome egg granulomas and hepatic expression of TNF-alpha are dependent on immune priming during parasite maturation. J Immunol; 158:301-307

Lichtenberg von F (1962): Host response to eggs of *S. mansoni*. I. Granuloma formation in the unsensitized laboratory mouse. Am J Pathol; 41:711-731

Lichtenberg von F (1964): Studies on granuloma formation. III. Antigen sequestration and destruction in the schistosome pseudotubercle. Am J Pathol; 45:75-93

Lichtenberg F von (1987): Consequences of infections with schistosomes. In: Rollinson D & Simpson AJG (eds) *The Biology of Schistosomes: From Genes to Latrines*. Academic Press: London, 185-232

Lichtenberg F von , Lehmann JS (1986): Parasitic diseases of the genitourinary system. In: Walsh PC, Gittes RF, Perlmutter AD, Stamey TA (eds). *Campbells Urology*, 5 th edn. WB Saunders, Philadelphia, pp. 983-1024

Lichtenberg F von, Smith JH, Cheever AW (1966): The Hoespli phenomenon in *Schistosomiasis*. Comparative pathology and immunopathology. Am J Trop Med Hyg; 15: 856-95

Lichtenberg von F, Erickson DG, Sadun EH (1973): Comparative histopathology of schistosome granuloma in hamsters. Am J Pathol; 72:149-175

Li Hsü SY, Hsü HF, Mitros FA, Helms CM, Solomon RI (1980): Eosinophils as effector cells in the destruction of *Schistosoma mansoni* eggs in granulomas. Ann Trop Med Parasitol. 74:179-183

Logan, OT (1912): Chin Med J; 26:240

Lotze M, Jaffe R (1999): Cancer. In: Lotze M, Thomson A. „Dendritic Cells: Biology and Clinical Application“, Academic Press, San Diego, 325-338

Loutan L, Farinelli T, Robert CF (1996): Acute *Schistosomiasis* or Katayama syndrome: apropos of 2 miniepidemics. *Schweiz Med Wochenschr* (Aug) 31; 126 (35):1482-6

Lozzi SP, Machado CRS, Gerken SE, Mota-Santos TA (1996): Involvement of regional lymphnodes after penetration of *Schistosoma mansoni* cercariae in naive and infected mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 91:491-498

Lukacs NW, Chensue SW, Strieter RM, Warmington K, Kunkel SL (1994): Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF-alpha inducible intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol*; 152:5883-5889

Majino G, Joris I (1995): Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* (Jan); 146(1):3-15

Mansy SS (1998): Cellular constituent and intercellular adhesion in *Schistosoma mansoni* granuloma: an ultrastructural study. *J Egypt Soc Parasitol*; 28 (1):169-181

Matthaei KI, Foster PS, Young IG (1997): The role of interleukin-5 (IL-5) in vivo: studies with IL-5 deficient mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 92(Suppl. II):63-68

McLaren DJ, Ramalho-Pinto FJ (1979): Eosinophil-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro: synergistic effect of antibody and complement. *J Immunol*; 123: 1431-1438

McLaren DJ, Mackenzie CD, Ramolho-Pinto FJ (1977): Ultrastructural observations on the in vitro interaction between rat eosinophils and some parasite helminths (*Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis*, and *Nippostrongylus brasiliensis*). *Clin exp Immunol*; 30:105-118

McLaren DJ, Ramalho-Pinto FJ, Smithers SR (1978): Ultrastructural evidence for complement and antibody-dependent damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophils in vitro. *Parasitology*; 77:313

McLaren DJ, McKean JR, Olsson I, Venge P, Kay AB (1981): Morphological studies on the killing of *Schistosoma mansoni* by eosinophil and neutrophil cationic protein in vitro. *Parasite Immunology*, 3:359-373

McLaren DJ, Peterson CGB, Venge P (1984): *Schistosoma mansoni*: further studies of the interaction between schistosomula and granulocyte-derived cationic proteins in vitro; *Parasitology*; 88:491-503

Moore DL, Grove DJ, Warren KS (1977): The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantitation of cell populations. *J Pathol*; 121:41-50

Moqbel R et al (1992): *Clin Exp Allergy*; 22:265-273

Moqbel R, Sass-Kuhn SP, Goetzl EJ, Kay AB (1983): Enhancement of neutrophil-and eosinophil-mediated complement-dependent killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro by leukotriene B<sub>4</sub>. *Clin Exp Immunol*; 52:519-527

Murare HM, Doenhoff MJ (1987): Parasitological observations of *Schistosoma bovis* in normal and T-cell deprived mice. *Parasitology*; 95:507-516

Nash TE, Cheever AW, Ottesen EA, Cook JA (1982) Schistosome infections in humans: perspectives and recent findings. *Annals Of Internal Medicine*;97:740-754

Neves J (1986): *Esquistossomose mansoni*. Clínica da forma aguda ou toxêmica. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica

Neves J, Raso P (1963): Estudo crítico do tratamento da forma toxêmica da esquistossomose mansoni.Considerações anátomo-clínicas. *O Hospital Setembro de*; 3:167-211

Neves J, Raso P (1965): Estudo anátomo-clínico de um caso de forma toxêmica da esquistossomose mansoni que evoluiu para a forma hepato-esplênica em 130 dias (fibrose hepática tipo Symmers). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*; 7:256-266

Neves J, Raso P, De Matos Pinto D, Da Silva SP, Alvarenga RJ (1993): Ischaemic colitis (necrotizing colitis, pseudomembranous colitis) in acute *Schistosomiasis mansoni*: report of two cases. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene*; 87: 449-452

Ovington KS, Behm CA (1997): The enigmatic eosinophil: Investigation of the biological role of eosinophils in parasitic helminth infection. Mem Inst Oswaldo Cruz, 92 Suppl. II:93-104

Patton EA, Brunet LR, LA Flamme AC, Pedras-Vasconcelos J, Kopf M, Pearce EJ (2001): Severe *Schistosomiasis* in the absence of interleukin-4. (IL-4) is IL-12 independent. Infect Immunol 2001; 69(1):589-92

Paul WE (1999): Fundamental Immunology. 4<sup>th</sup> edn., Paul WE (ed). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia

Peakmann M, Lobo Yeo A, Senaldi G Nilsson M, Tee DEH, Vergani D (1987): Quantitation of C3d in biological fluids by enzyme-linked immunosorbent assay. J Immunol Methods; 104:51-6

Pearce EJ, La Flamme A, Sabin E, Brunet LR (1998): The initiation of the Th2 responses during infection with *Schistosoma mansoni*. Adv Exp Med Biol; 452:67-73

Pearce EJ, Scott PA, Sher A (1999): Immune Regulation in Parasitic Infection and Disease. In: Paul (ed). Fundamental Immunology, 4<sup>th</sup> edn. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 1271-1294

Persson CGA, Erjefält JS (1997 (a)): Eosinophil lysis and free granules: an in vivo paradigm for cell activation and drug development. Trends Pharmacol Sci Apr, 18 (4):117-23

Persson CGA, Erjefält JS (1997 (b)): „Ultimate activation“ of eosinophils in vivo: lysis and release of clusters of free eosinophil granules (Cfegs). Thorax; 52:569-574

Philipps SM, Reid WA, Doughty BL, Bentley AG (1980): The immunologic modulation of morbidity in *Schistosomiasis*. Studies in athymic mice and in vitro granuloma formation. Am J Trop Med Hyg; 29:820-831

Pinkus GS, Coolidge C, Little MD (1975): Intestinal anisakiasis: First case report from North America. Am J Med; 59:114-120

Pitella JE (1997): Neuro*Schistosomiasis*. Brain Pathol; 7 (1):649-662

Rabello ALT, Pinto da Silva RA, Rocha RS, Katz N (1994): Abdominal ultrasonography in acute clinical *Schistosomiasis* mansoni. Am J Trop Med Hyg; 50 (6):748-752

Rabello MMA, Garcia RA, Pinto da Silva RA, Rocha RS, Chaves A, Katz N (1995): Humoral immune response in acute *Schistosomiasis* mansoni: relation to morbidity. Clin Inf Dis; 21:608-615

Racz, P, Tenner-Racz K., Büttner DW, Safar P (1982 (a)): Immunopathologic reactions of lymph nodes in parasitic infections. Fortschritte der Zoologie, Band 27 Zbl Bakt, Suppl 12. Immune reactions to parasites. Gustav Fischer Verlag; pp. 161-167

Racz, P, Tenner-Racz K, Büttner DW, Albiez EJ (1982 (b)): Ultrastructural evidence for eosinophil parasite adherence (EPA) reaction in human onchocercal lymphadenitis in the early period following diethylcarbamazine treatment. Trop Med Parasitol; 33:213-218.

Raso P, Pedroso ERP, Neves J: (1986) Patologia da forma aguda, toxêmica, da esquistossomose mansoni. Rev Soc Bras Med Trop; 19:45-55

Reis MG, Andrade ZA (1987). Functional significance of perioval granuloma in *Schistosomiasis*. Braz Med Biol Res; 20:55-62

Rezende SA, Miranda TCL, Ferreira MG, Goes AM (1993): In vitro granuloma modulation induced by immunocomplexes in human *Schistosomiasis* mansoni. Brazilian Journal of Medical and Biological Research; 26:207-211

Rezende SA, Silva-Teixeira DN, Drummond SC, Goes AM (1997 (a)): IL-10 plays a role in the modulation of human granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma* mansoni eggs induced by immune complexes. Scan J Immunol; 46:96

Rezende SA, Lambertucci JR, Goes AM (1997 (b)): Role of immune complexes from patients with different clinical forms of *Schistosomiasis* in the modulation of in vitro granuloma research. Mem Inst Oswaldo Cruz; 92 (5):683-687

Riede N-U (Hrsg.) (1995): Allgemeine und spezielle Pathologie, 4. Auflage. Thieme, Stuttgart/ New York

Riede N-U (1995): Entzündungspathologie. In Riede N-U (Hrsg.). Allgemeine und spezielle Pathologie, 4. Auflage: Thieme, Stuttgart/ New York

Ritter DM, Rosen S, Singer M , McKerrow JH (1993): ICAM-1 expression is upregulated during egg deposition in *Schistosoma mansoni* infection. J Immunol; 150:6A

Ritter DM, McKerrow JH (1996): Intercellular adhesion molecule I is the major adhesion molecule expressed during schistosome granuloma formation. Infect Immun; 64:4706-4713

Robbins (u.a.) (1999): Pathologic of Disease. Cotran, Kumar, Robbins (eds). 6 th edn. WB Saunders, Philadelphia

Robson JMB, Sullivan JJ, Nicolaidis NJ, Htut T (1994): *Schistosomiasis*-a need for increasing vigilance. Commun Dis Intell; 18:652-654

Rocha MOC, Pedroso ERP, Greco DB, Lambertucci JR, Katz N, Rocha RL et al. (1996) Pathogenic factors of acute *Schistosomiasis mansoni*: correlation of worm burden, IgE, blood eosinophilia and intensitiy of clinical manifestations. Tropical Medicine and International Helath 1996; Vol. I, 2:213-220

Roitt IM (1995): Immunology. Roitt IM, Brostorff J, Male DK (eds). 4<sup>th</sup> edn: Mosby, St. Louis (u.a.)

Rollinson (1997): Advances in Parasitology. Baker JR, Muller R, Rollinson D (eds.), Vol 39: Academic Press, San Diego (u.a.)

Rothenberg ME (1998): Eosinophilia. New England Journal of Medicine; 338(22):1592-600

Rubin E, Farber JL (1999): Cell Injury. In: Rubin E, Farber JL (eds): Pathology,.3<sup>rd</sup> edn: Lippincott-Raven, Philadelphia/ New York

Rubin E, Farber JL (1999): Pathology. Rubin E, Farber JL (eds). 3<sup>rd</sup>. edn: Lippincott-Raven, Philadelphia/ NewYork

Rumbley CA, Sugaya H, Zekavat SA, El Refaei M, Perrin PJ, Phillips SM: (1999) Activated eosinophiles are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. *J Immunol*; 162 (2):1003-1009

Sabin EA, Pearce EJ (1995): Early IL-4 production by non-CD4+ cells at the site of antigen deposition predicts the development of a T helper 2 cell response to *Schistosoma mansoni* eggs. *J Immunol*; 155:4844-4853

Sabin EA, Kopf MA, Pearce EJ (1996): *Schistosoma mansoni* egg induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. *J Exp Med*; 184:1871-1878

Secor WE, Dos Reis MG, Ramos EAG, Matos EP, Reis EAG, Do Carmo TMA, Harn DA (1994): Soluble intercellular adhesion molecules in human *Schistosomiasis*: correlation with disease severity and increased responsiveness to egg antigens. *Infect Immunol*, 621:2695

Scepek S, Moqbel R, Lindau M (1994): Compound exocytosis and cumulative degranulation by eosinophils and their role in parasite killing. *Parasitol Today*; 10: 276-278

Schwartz E, Rozenman J, Perelman M (2000): Pulmonary manifestations of early schistosome infection among nonimmune travelers. *Am J Med (Dec)* 15, 109(9): 718-22

Sher A, Coffman RL, Hieny S, Scott P, Cheever AW (1990 (a)): Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. *Proc Nat Acad Sci USA*; 87:61-65

Silva LM, Fernandes AL, Barbosa A, Oliveira IR, Andrade ZA (2000): Significance of schistosomal granulomatous modulation. *Mem Inst Oswaldo Cruz (May-Jun)*; 95(3): 353-61

Smith JH, Lichtenberg von F (1967): The Hoespli phenomenon in schistosomiasis. II Histochemistry. *Am J Pathol*; 50:993-1007

Steinman R (1991): The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*; 9:271-296

Stuiver PC (1984): Acute *Schistosomiasis* (Katayama fever). *British Med J*; 288:221-222

Tai PC, Spry CJF, Peterson C, Venge P, Olsson (1984) I: Monoclonal antibodies distinguish between storage and secreted forms of eosinophil cationic protein. *Nature*; 309:182-184

Thors C, Linder E: (1998): Cross reacting antibodies against keyhole limpet haemocyanin may interfere with the diagnosis of acute *Schistosomiasis*. *Parasite Immunol*; 20 (10):489-496

Unkeless JC (1989): Function and heterogeneity of human Fc receptors for IgG. *J Clin Invest*; 83:355-361

Urban JF, Madden KB, Svetic A, Cheever A, Trotta PP et al. (1992): The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunol Rev*; 127:205-220

Vermund SH, Bradley DJ, Riuiz-Tiben (1983) Survival of *Schistosoma mansoni* in the human host estimates from a community-based prospective study in Puerto Rico. *Am J Trop Med Hyg*; 32:1040-1048

Villalta F, Pankratz HS, Kierszenbaum F (1987): Extracellular killing of *Trypanosoma cruzi* amastigotes by human eosinophils. *Protozool*; 34:285-290

Walsh GM (1997): Human eosinophils: their accumulation, activation and fate. *Br. J Haematol*; 97:701

Wang B, Rieger A, Kilgus O et al: (1992): Human epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via FcεRI. *J Exp Med*; 175:1353-1365

Wardlaw AJ, Moqbel R, Kay AB (1995): Eosinophils: biology and role in disease. *Adv Immunol*; 60:151-266

Warren KS (1971): Worms. In M. Samter (ed.). *Immunological diseases*, 2<sup>nd</sup> edn. Little, Brown, Boston, pp. 668-686

Warren KS (1973): The pathology of schistosome infections. *Helminthological Abstracts Series A*; 42:590-633

Warren KS: (1975) Hepatosplenic *Schistosomiasis* mansoni: an immunologic disease. Bulletin of the New York Academy of Medicine; 51:545-550.

Warren KS (1978): The pathology, pathobiology and pathogenesis of *Schistosomiasis*. Nature; 273:609-612

Warren KS (1982): The secret of the immunopathogenesis of *Schistosomiasis*: in vivo models. Immunol Rev; 61:189-213

Warren KS, Domingo EO, Cowan RBT (1967): Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. Am J Pathol; 51: 735-756

Warren KS, Boros DL, Hang LM, Mahmoud AAF (1975): The *Schistosoma japonicum* egg granuloma. Am J Pathol; 80:79

Weiler CR, Kita H, Hukee M, Gleich GJ (1996): Eosinophil viability during immunoglobulin-induced degranulation. J Leucocyte Biol; 60:493-501

Weinstock JV (1992): The pathogenesis of granulomatous inflammation and organ injury in *Schistosomiasis*: Interactions between the schistosome ova and the host. Immunol Invest; 21:455-475

Weinstock JV (1999): Mucosa immune response to parasitic infections. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, Mc Ghee JR (eds) Mucosal Immunology, 2nd edn. Academic Press, San Diego (u.a.), pp. 709-718.

Weller PF (1991): The immunobiology of eosinophils. New Engl J Med; 324:1110-1117

Weller PF (1992): Eosinophilia in Travelers. Medical Clinics of North America, Vol 76 No 6 (Nov):1413-1432

Weller PF, Goetzl EJ (1979): The regulatory and effector roles of eosinophils. Adv Immunol; 27:339-371

Weller PF, Kaiser L (1997): Human eosinophil-lymphocyte interactions. Mem Inst Oswaldo Cruz; 92(Suppl. II):173-182

Whitty CJ, Mabey DC, Armstrong M, Wright SG, Chiodini PL (2000): Presentation and outcome of 1107 cases of *Schistosomiasis* from Africa diagnosed in a non-endemic country. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (Sept-Oct); 94 (5):531-4

WHO Expert Committee of the Control of *Schistosomiasis* (1993): Public Health Impact of *Schistosomiasis*: Disease and Mortality. *Bulletin of the World Health Organization*; WHO 71 (6):657-662

WHO Division of Control of Tropical Diseases- *Schistosomiasis* Control 1998.

<http://www.who.int/Sfgate/cgi-bin/SFgate> and

<http://www.who.int/tdr/disease/schisto/Default.htm>

Wildenburg G, Darge K, Knab J, Tischendorf FW, Bonow I, Büttner DW (1994): Lymph nodes of onchocerciasis patients after treatment with ivermectin: reaction of eosinophil granulocytes and their cationic granule proteins. *Trop Med Parasitol*; 45:87-96

Wildenburg G, Krömer M, Bonow I, Büttner DW (1995): Distribution of effector cells in nodules of *Onchocerca volvulus*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Gustav Fischer Verlag, Jena* (u.a.); 282:221

Winqvist I, Olofsson I, Persson AM, Hallberg T (1982): Altered density, metabolism and surface receptors of eosinophils in eosinophilia. *Immunology*; 47:531-539

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR (1980): Cell death. The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*; 68:251

Wynn TA, Cheever AW (1995 (a)): Cytokine regulation of granuloma formation in *Schistosomiasis*. *Current Opinion In Immunology*; 7:505-511

Wynn TA, Eltoun I, Oswald IP, Cheever AW, Sher A (1994) : Endogenous interleukin 12 (IL-12) regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni* and exogenous IL-12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology. *Exp med*; 179:1551-1561

Wynn TA, Jancovic D, Hieny S, Zioncheck K, Jardieu P, Cheever AW, Sher A (1995): IL-12 exacerbates rather than suppresses T helper 2-dependent pathology in the absence of endogenous IFN- $\gamma$ . *J Immunol*; 154:3999

Wynn TA, Cheever AW, Jankovic D et al. (1995 (b)): An IL-12 based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature*; 376:594-596

Wynn TA, Cheever AW, Williams ME, Hieny S, Caspar P, Kuhn R, Muller W, Sher A (1998): IL-10 regulates liver pathology in acute murine *Schistosomiasis mansoni* but is not required for immune down-modulation of chronic disease. *J Immunol*; 160 (9);4473-4480

Yamashita T, Boros DL (1992): IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine *Schistosomiasis mansoni*. *J Immunol*; 149:3659

Yoshida T, Ikuta K, Sugaya H, Maki K, Takagi M, Kanazawa H, Sunaga S et al. (1996): Defective B-cell development and impaired immunity against *Angiostrongylus cantonensis* in IL-5Ra-deficient mice. *Immunity* 4:483-494

## 9 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und sehr verehrten Lehrer, Herrn Professor Doktor Paul Racz, für die freundliche Überlassung des Themas, die unkomplizierte Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der erforderlichen Arbeitsmittel sowie der intensiven wissenschaftlichen Betreuung, die mir zuteil geworden ist. Frau Doktor Klara Tenner-Racz danke ich für zahlreiche konstruktive Anregungen und Hilfestellungen in wissenschaftlichen und technischen Fragen.

Bei den Kolleginnen und Mitarbeiterinnen des histologischen Labors Birgit Raschdorff, Petra Meyer, Hanh-Thi Matzen, Sabine Harder und Christine Trumfheller bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme und die kompetente Unterstützung bei der Lösung praktischer Probleme. Frau Gudrun Großschupff danke ich darüber hinaus für die geduldige Einarbeitung in die Arbeitstechniken und Frau Kirstin Evers sei Dank für ihre Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls den Doktorantinnen der Abteilung für Pathologie Eva Kahn und Anja Floto, die neben der Durchführung ihrer eigenen Arbeiten bereit waren, wissenschaftliche Fragestellungen mit mir zu erörtern.

Herrn Privatdozent Doktor Georg Kreuzpaintner danke ich herzlich für die Vermittlung der Dissertation und die Beratung bei klinischen Fragestellungen.

Den Mitarbeiterinnen der hauseigenen Bibliothek danke ich für ihre freundliche Unterstützung.

Und schließlich gilt mein ganz herzlicher Dank meinem Mann Carsten und meinem kleinen Sohn Moritz, die unter - nach eigenen Aussagen - „immensen Entbehrungen“ immer wieder Geduld und Verständnis aufgebracht haben, um mich in liebevoller Weise nach Kräften bei meiner Arbeit zu unterstützen.

## 10 Lebenslauf

### Zur Person:

Name: Kirsten Arndt  
geb. Brandes  
Geburtsdatum/ort: 31. Juli 1964 in Braunschweig  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: verheiratet/ ein Kind seit Januar 2000

### Ausbildung und berufliche Tätigkeiten

1980 Mittlere Reife in Hamburg  
1980-1983 Berufsausbildung mit Abschluss als Bankkauffrau  
1983-1988 Bankkauffrau bei der Hamburger Sparkasse in Hamburg  
1988-1991 Studium der Betriebswirtschaftslehre über den zweiten Bildungsweg an der Hochschule für Wirtschaft und Politik (HWP) zu Hamburg. (Dipl. Betriebswirtin/ Erwerb der allgemeinen Hochschulzugangsberechtigung)  
1992-1999 Studium der Humanmedizin in Hamburg und Johannesburg (RSA) mit Erlangung der Teilapprobation.  
Seit 1996 Doktorantin in der Abteilung für Pathologie am Bernhard-Nocht-Institut (BNI) für Tropenmedizin zu Hamburg bei Professor Dr. P. Racz.  
2003 Promotion

Hamburg, im Dezember 2003