

Universität Ulm

Medizinische Fakultät

Zentrum für Innere Medizin

Sektion Infektiologie und klinische Immunologie

Dr. med. Georg Härter

Kommissarischer Sektionsleiter

**Wirksamkeit ausgewählter Substanzen auf das Wachstum
von Metazestoden des *Echinococcus multilocularis***

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von

Ibrahim El-battrawy

Najran

2012

Amtierender Dekan: Professor Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. Peter Kern

2. Berichterstatter: Professor Dr. rer. nat. Holger Barth

Tag der Promotion: 08.02.2013

Inhaltsverzeichnis:

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis:.....	III
1. Einleitung:.....	1
1.1. Echinokokkose:.....	1
1.2. Lebenszyklus, Diagnostik, Epidemiologie und Risikofaktoren:.....	1
1.3. Therapie:.....	3
1.3.1. Medikamentöse Therapie:.....	4
1.4. Das <i>in vitro</i> Kultursystem der Larven von <i>E. multilocularis</i> :.....	5
1.5. Einfluss einzelner Wirkstoffe auf das Wachstum der <i>E. multilocularis</i> -Larve:.....	7
1.6. Kombiniertes Einfluss von Wirkstoffen auf <i>E. multilocularis</i> :.....	9
1.7. Tabellarische Zusammenfassung: Effekte getesteter Substanzen auf <i>E. multilocularis in vitro/vivo</i> :.....	11
1.8. Kurzcharakteristika der verwendeten Anthelminthika:.....	12
1.8.1. Metabolismus:.....	13
1.8.2. HepG2-Zellen und Metabolismus von Substanzen <i>in vitro</i> :.....	15
1.9. Zielsetzung:.....	15
2. Material und Methodik:.....	17
2.1. Gewinnung von Echinococcus Metazestoden (Larvengewebe):.....	17
2.2. Kultivierung der Vesikel:.....	17
2.3. Überblick über das benutzte Kulturmodell:.....	18
2.4. Versuchsdurchführung:.....	18
2.5. Spiegelmessung ABZ und ABZSO bei Kombination mit RTV:.....	21
2.6. Störfaktoren:.....	21
2.7. Prüfung verschiedener Substanzen gegen <i>Echinococcus multilocularis</i> :.....	23
3. Ergebnisse:.....	25
3.1. Wirkung von Albendazol auf Vesikel ohne Feeder-Zellen:.....	25
3.2. Wirkung von ABZ mit Feeder-Zellen:.....	26
3.3. Beeinflussung des Metabolismus von ABZ:.....	27
3.4. Einfluss von Praziquantel im Kultursystem:.....	29
3.5. Kombination von ABZ und PZQ in unterschiedlichen Konzentrationen:.....	30

3.6.	Einfluss von Ivermectin im Kultursystem:.....	32
3.7.	Kombination von 0,1 µg/ml ABZ mit unterschiedlichen Konzentrationen von IVM:	33
3.8.	Zusammenfassung der Ergebnisse der untersuchten Substanzen und deren Kombinationen:	36
4.	Diskussion:	38
4.1.	Wirkung von ABZ verschiedener Konzentration bei An-/Abwesenheit von Feeder-Zellen:.....	38
4.2.	Beeinflussung des Metabolismus von ABZ durch den Protease-Hemmer RTV:.....	39
4.3.	Einfluss von PZQ in der Kombination mit ABZ:.....	41
4.4.	Einfluss von IVM in der Kombination mit ABZ:.....	42
4.5.	Einsatzpunkte untersuchter Kombinationen:	45
5.	Zusammenfassung:.....	47
6.	Literatur:	49
	Danksagung:	62
	Lebenslauf:	63

Abkürzungsverzeichnis:

Abb	: Abbildung
ABC	: ATP Binding cassette
ABZ	: Albendazol
ABZSN	: Albendazol Sulfon
ABZSO	: Albendazol Sulfoxid
CaCO ₂ -Zellen	: Human Cancer Colon Cells
CT	: Computertomographie
CYP	: Cytochrom-P450
DMSO	: Dimethylsulfoxid
<i>E. granulosus</i>	: Echinococcus granulosus
Elisa	: Enzyme-linked immuno sorbent assay
<i>E. multilocularis</i>	: Echinococcus multilocularis
<i>EmAP</i>	: Echinococcus multilocularis spezifischer alkalischer Phosphatase
<i>E. oligarthus</i>	: Echinococcus oligarthus
<i>E. vogeli</i>	: Echinococcus vogeli
HepG2-Zellen	: Humane Leberzellen
HIV	: Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC-System	: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IVM	: Ivermectin
MBZ	: Mebendazol
mg/d	: Milligramm/Tag
mg/kg	: Milligramm pro Kilogramm
µg/kg	: Mikrogramm pro kilogramm
µg/ml	: Mikrogramm pro Milliliter
mM	: Millimolar
MRP	: Multidrug resistance associated Proteine
NTX	: Nitazoxanid
PBS	: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
P-gp	: P-Glykoprotein

PNM : Parasitenmasse, Infiltration oder Beteiligung von
Nachbarorganen, Metastasen

PZQ : Praziquantel

RTV : Ritonavir

TNM : Tumor-Nodes-Metastases

z.B. : Zum Beispiel

ZNS : Zentralnervensystem

1. Einleitung:

1.1. Echinokokkose:

Die Echinokokkose ist eine Krankheit, die durch Bandwürmer (Cestoda), die zur Familie der Taenidae gehören, verursacht wird. Vier Spezies der Echinokokken verursachen beim Menschen Infektionen. Am häufigsten sind *E. granulosus* (Hundebandwurm) und *E. multilocularis* (Kleiner Fuchsbandwurm). Die beiden anderen Spezies, *E. vogeli* und *E. oligarthus*, verursachen beim Menschen selten Infektionen (polyzystische Echinokokkose). Da bei dem Menschen in Zentraleuropa hauptsächlich die durch *E. multilocularis* verursachte alveoläre Echinokokkose vorkommt, beziehen sich die folgenden Angaben auf *E. multilocularis*. Die Inkubationszeit der alveolären Echinokokkose beträgt 10-15 Jahre (Ammann and Eckert, 1996). Unbehandelt beträgt die Letalität mehr als 90% (Ammann and Eckert, 1996).

1.2. Lebenszyklus, Diagnostik, Epidemiologie und Risikofaktoren:

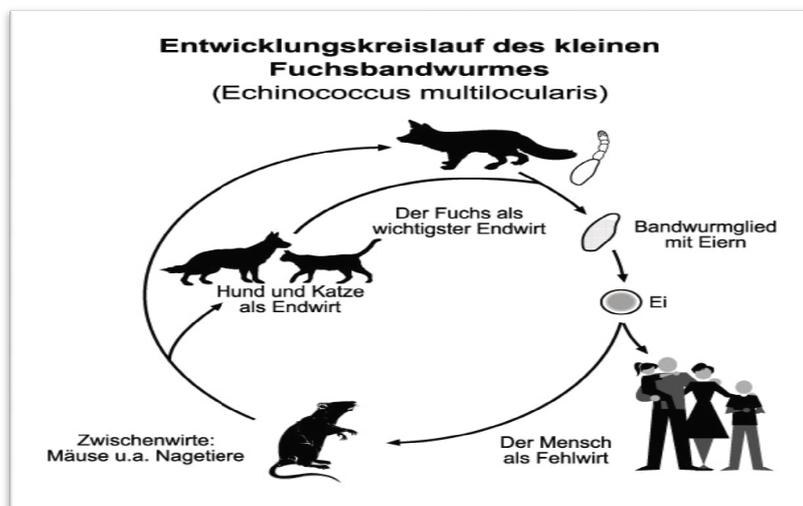


Abbildung 1: Lebenszyklus des *Echinococcus multilocularis*. (Quelle: www.animedica.de)

Das Larvenstadium beim Fuchsbandwurm nennt man Metazestode. Sie entwickelt sich im menschlichen Körper langsam. Sie wächst infiltrativ und invasiv vergleichbar mit einem „malignen Tumor“. Die Leber ist das primäre Zielorgan und das parasitische Larvengewebe findet sich überwiegend im rechten, größeren Leberlappen (Kern, 1994). Diese Metazestoden können metastasenartig auch andere Organe, wie z.B. Lunge, Pankreas, Knochen oder ZNS (Kern et al., 2000a), befallen. Nur bei einem Teil der Erkrankten macht sich die Krankheit durch unspezifische Symptome wie Oberbauchschmerzen, Ikterus und andere seltene Erscheinungen, z.B. Fieber, Schüttelfrost und Anämie, bemerkbar (Kern et al., 2000a), (Kern, 2010). Die meisten Patienten haben über viele Jahre keine Symptome.

Bei bestehendem Verdacht auf eine Infektion mit *E. multilocularis* ist die Sonografie durch einen erfahrenen Untersucher das diagnostische Mittel der Wahl (Kern et al. 2000a). An zweiter Stelle kann das CT eingesetzt werden, um weitere Informationen zu bekommen und eventuell mehrere Läsionen nachzuweisen. An dritter Stelle steht die Kernspintomographie, wie z.B. bei unsicheren Fällen (Kern et al., 2000a), (Reuter et al., 2000). Ein weiteres diagnostisches Mittel ist der serologische Nachweis. Mittels Enzyme-linked immuno sorbent assay (Elisa) können in 95% der Fälle Antikörper gefunden werden (Gottstein et al., 1993). In Zweifelsfällen muss der Erregernachweis durch die feingewebliche Untersuchung sowie molekulare Diagnostik gesichert werden (Kern et al., 1995), (Kern et al., 2000a).

In Europa ist der Rotfuchs der wichtigste Endwirt für *E. multilocularis*. Der Fuchsbandwurm ist in den gemäßigten bis kalten Zonen verbreitet (Veit et al., 1995), (Kern et al., 2004). Durch das von Prof. Kern geleitete Register von 1998 über *E. multilocularis* zeigte sich ein endemisches Vorkommen in Frankreich und Deutschland gefolgt von der Schweiz und Österreich (Kern et al., 2003). Es wurden insgesamt 132 Fälle mit alveolärer Echinokokkose in Deutschland bis Dezember 2000 dokumentiert. Allein in den 5 Jahren von 1996-2000 wurden 48 Infizierte mit *E. multilocularis* in Deutschland registriert im Vergleich zu 26 Fällen in den Jahren 1991-1995. Dies zeigte die Gefährlichkeit des möglichen Fortschreitens der Erkrankung und der ansteigenden Infektionsrate an.

Die Prävalenz der alveolären Echinokokkose in Europa wird mit 0,5 bis 6,6 Fällen pro 100.000 Einwohnern angenommen (Eckert and Deplazes, 1999).

Bei Infektion mit *Echinococcus* sp. bzw. bei direktem oder indirektem Erregernachweis ist nach §7 Abs. 3 IfSG eine nichtnamentliche Meldung direkt an das Robert Koch-Institut zu leisten. Es wurden 30 neue Fälle im Jahr 2011 gemeldet. 17 Fälle waren aus Bayern und Baden-Württemberg.

Die wichtigste Form der Prophylaxe besteht in verbesserten Hygienemaßnahmen, besonders in der Landwirtschaft, da Landwirte am höchsten von den Infektionen betroffen sind (Kern et al., 2004). Zur Reduktion der Infektion wurde die regelmäßige Entwurmung von Haustieren (Hunde und Katzen) in bestimmten (z.B. 3- monatlichen) Intervallen mit Praziquantel (PZQ) empfohlen (Kern et al., 2004).

1.3. Therapie:

Da sich die alveoläre Echinokokkose als ein tumorartiges Gewebe hauptsächlich in der Leber verbreitet, wurde eine Einteilung analog der TNM-Klassifikation (Tumor-Nodes-Metastases) für die alveoläre Echinokokkose erstellt. Es wurde die PNM-Klassifikation (P=Parasitenmasse, N=Infiltration oder Beteiligung von Nachbarorganen, M=Metastasen) entwickelt. Eine retrospektive Studie verifiziert die klinische Relevanz dieser Einteilung. Diese PNM-Klassifikation gilt als eine wichtige Einteilung bei der Diagnostik und Therapie der alveolären Echinokokkose (Kern et al., 2006), (Brunetti et al., 2010).

Das primäre Ziel der Therapie von Patienten im operablen Krankheitsstadium ist die komplette chirurgische Resektion (R0) der parasitären Läsionen (Anon, 1996), (Brunetti et al., 2010). Wichtig ist die en-bloc-Entfernung der Parasitengeschwulst. Das Verfahren (Segmentresektion, Hepatolobektomie oder Hemihepatektomie) ist durch die bildgebende Diagnostik zu planen. Um die Erkrankung kurativ zu behandeln, sollte man analog zur Tumorchirurgie Sicherheitsabstände berücksichtigen (Kern et al., 2000b). Da Lymphknoten makroskopisch unauffällig aussehen, aber mikroskopisch befallen sein können, sollte man diese mit entfernen (Buttenschoen et al., 2009). Die operative Entfernung der Parasitengeschwulst ist mindestens durch eine zeitlich begrenzte Chemotherapie

mit Benzimidazolen von zwei Jahren zu unterstützen. Die Langzeitchemotherapie ist bei Inoperabilität oder nach unvollständiger Resektion und in seltenen Fällen nach Lebertransplantation indiziert (Kern et al., 2000b), (Anon, 1996), (Brunetti et al., 2010).

Zwei Chemotherapeutika sind für die Therapie von *E. multilocularis* empfohlen: Mebendazol (MBZ, Vermox forte[®]) und Albendazol (ABZ, Eskazole[®]). Diese Medikamente werden oral verabreicht. Mebendazol wurde 1977 erstmals zur Therapie der alveolären Echinokokkose eingesetzt. Die Dosierung liegt heute bei dreimal täglich 40-50mg/kg Körpergewicht (Schantz et al., 1982), (Kern, 1983). ABZ und MBZ zeigten etwa die gleiche Wirksamkeit, allerdings hat ABZ Vorteile (Reuter et al., 2000). Bis 1992 berichteten wenige vergleichende Studien von stärkerer Progression der *E. multilocularis* unter MBZ-Therapie im Vergleich zu ABZ-Therapie (Wilson et al., 1992), (Reuter et al., 1998).

1.3.1. Medikamentöse Therapie:

Während MBZ seit 1977 zur Therapie der Infektion mit *E. multilocularis* verwendet wird, ist ABZ erst seit 1992 verfügbar. Nebenwirkungen von Benzimidazolen wie Hepatotoxizität, Cholestase, Alopezie, Zytopenie und gastrointestinale Symptome können ein Grund zum Abbruch der Behandlung sein (Ammann and Eckert, 1996), (Reuter et al., 1998). Eine erhöhte Prävalenzrate von alveolärer wie auch zystischer Echinokokkose wurde in Nordwestchina gefunden (Li et al., 2010). In einem Militärkrankenhaus waren zwischen 1992 und 2006 1312 Patienten mit Echinokokken infiziert (davon 268 mit *E. multilocularis* postoperativ gesichert). Dies zeigt die Wichtigkeit der Suche nach weiteren Therapiemöglichkeiten (Kern, 2010), da alle bisherigen Therapieoptionen keine ausreichende Wirkung zeigen und die Patienten unter Nebenwirkungen leiden.

1.4. Das *in vitro* Kultursystem der Larven von *E. multilocularis*:

Um eine Untersuchung der Interaktion von *E. multilocularis* mit dem Wirt zu ermöglichen, war lange Zeit die Anzüchtung von *E. multilocularis* im Zwischenwirt, z.B. Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*), üblich (Hemphill et al., 2002). Dazu wurde Metazestodengewebe intraperitoneal oder intrahepatisch injiziert. Dieses Prinzip wurde z.B. genutzt, um verschiedene Medikamente im Experiment zu untersuchen. Diese *in vivo* Untersuchungen waren allerdings sehr aufwändig und ihre Aussagen limitiert. Aus diesen Gründen wurde die Entwicklung eines *in vitro* Kulturmodells vorangetrieben. Jentoft und Rausch (Rausch and Jentoft, 1957) konnten ein Wachstum von Metazestodengewebe unter Verwendung von u. a. humaner Aszitesflüssigkeit, malignen humanen Epithelzellen und humanem Plasma nachweisen und damit die Machbarkeit eines solchen *in vitro* Kultursystems beweisen. Nach über 30 Jahren wurden daraufhin drei Ansätze weiterentwickelt und getestet:

Im ersten Ansatz von Hemphill et al. (Hemphill and Gottstein, 1995) wurden Metazestodenblöcke und Vesikel-Suspensionen in Anwesenheit von CACO2- (Human Cancer Colon Cells) als Feeder-Zellen kultiviert. Vesikel sind bläschenartige Strukturen, welche sich auf der Oberfläche der Metazestodengewebeblöcke bilden und sich nach einigen Wochen abschnüren. Feeder-Zellen wurden zur Bereitstellung von Wachstumsfaktoren für Entwicklung der Vesikel und damit als Fütterzellen eingesetzt. Das Metazestodengewebe wurde infizierten Mäusen entnommen, steril gewaschen und auf verschiedenen Flaschen verteilt, die bereits vorkultivierte CACO2-Zellen enthielten. Es erfolgte ein regelmäßiger Mediumwechsel und morphologische Beobachtung der Vesikel und Metazestoden mit einem Lichtmikroskop und einem Elektronenmikroskop. Zusätzlich wurde die Konzentration von *Echinococcus multilocularis* spezifischer alkalischer Phosphatase (*EmAP*) in Vesikelflüssigkeit, Metazestodenextraktionen und Mediumüberstände bestimmt. In Anwesenheit von Feeder-Zellen zeigte sich eine Beschleunigung des Wachstums um das dreifache (von 20 auf 60 Vesikel) nach etwa 35 Tagen. Das Wachstum wurde über mehrere Wochen beobachtet, wobei es nach ungefähr 90 Tagen zu einem Absterben der Vesikel kam. Beim

morphologischen Vergleich der im *in vitro* Kultursystem entstandenen Vesikel mit jenen aus Tiermodell konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Die Vesikel bestehen aus einer äußeren azellulären Lamellarschicht, welche aus einer Glycocalyx besteht und einer inneren Keimschicht. Die innere Keimschicht besteht aus verschiedenen Zellarten wie Muskelzellen, Bindegewebszellen und Glykogenspeichern. Die äußere Lamellarschicht spielt eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Nährstoffen und bei der Abgabe von Abfallstoffen. Die Keimschicht ist ein wichtiger Ansatzpunkt bei der Bekämpfung der Parasiten und der Suche neuer Therapieoptionen. Diese Vesikel zeigten in Anwesenheit von Feeder-zellen eine Entwicklung von Brutkapseln (Konglomerate von Protoskolizes), die sich wie in der Maus aus der Keimschicht bildeten. In Abwesenheit von Feeder-Zellen sind Vesikel schon ab dem ersten Tag geschädigt und nach etwa 20 Tagen abgestorben.

Der zweite Ansatz beschrieb die Kultivierung des Metazestodengewebes in Anwesenheit von Leberzellen als Feeder-Zellen (Jura et al., 1996). Dieses Metazestodengewebe wurde in Anwesenheit von humanen oder murinen Leberzellen angezüchtet, die zusammen mit dem Metazestodengewebe in Kollagen eingebettet wurden. Es zeigte sich eine Vermehrung von Vesikeln auf das 12-fache innerhalb von 21 Tagen. Damit bietet diese bessere Vorteile im Vergleich zu den bisher erwähnten Methoden. Das gewachsene Parasitengewebe sowie die Vesikel waren identisch mit denen der infizierten Tiere. Protoskolizes entstanden nur in Anwesenheit von murinen Leberzellen. Dieses Modell spielt bei den Untersuchungen von verschiedenen Medikamenten *in vitro* eine unverzichtbare Rolle.

In einem dritten Ansatz (Spiliotis et al., 2004) wurden Vesikel unter reduzierten axenischen Bedingungen untersucht. Axenische Bedingungen bedeuten, dass die Kultivierung in Abwesenheit von Wirtszellen erfolgt. Dazu wurden reduzierende anaerobe Bedingungen durch Zugabe von reduzierenden Agenzien (L-Cystein, Bathocuproin-disulfonsäure und β Mercaptoethanol) und Ersatz der Gasphase des Kulturgefäßes durch Stickstoff geschaffen, was für das Langzeitüberleben entscheidend war. Langzeitüberleben und Wachstum als auch Differenzierung der Metazestodenvesikel im reduzierten axenischen Medium konnten jedoch nur erreicht werden, wenn konditioniertes Medium verwendet wurde, welches vorher

zur Kultivierung von Wirtszellen verwendet worden war. Rattenhepatozyten-Medium erwies sich als das beste unter den verschiedenen verwendeten konditionierten Medien. Damit beschreibt dies ein Langzeitüberleben im Kultursystem ohne Co-Kultivierung mit Feeder-Zellen und bei Vorhandensein von reduzierenden anaeroben Bedingungen.

1.5. Einfluss einzelner Wirkstoffe auf das Wachstum der *E. multilocularis*-Larve:

Neben ABZ und MBZ (Eckert and Pohlenz, 1976) (Schantz et al., 1982) (Kern, 1983) (Jura et al., 1998) gibt es einige Substanzen, die *in vitro* und *in vivo* eine gute Wirkung auf *E. multilocularis* zeigten. Der Einfluss der untersuchten Substanzen auf *E. multilocularis*-Larven wurde mittels biochemischer, lichtmikroskopischer, elektronenmikroskopischer und bildgebender Verfahren beurteilt.

ABZ hat eine unzureichende Lipophilie und damit auch nur geringe Penetration in das Gewebe. Es zeigt keinen parasitoziden Effekt auf Metazestoden *in vitro* (Lacey, 1990). Auch Mebendazol wirkt lediglich parasitostisch. Es konnte im Verlauf beobachtet werden, dass es beim Absetzen einer Behandlung mit Benzimidazolen zu einer Progression der *E. multilocularis* Infektion kam (Ammann et al., 1990). In bis 97% der Fälle kann eine Reduktion des Metazestoden unter Therapie mit Benzimidazolen erreicht werden (Reuter et al., 2000). Eine vollständige Remission kann jedoch nicht erreicht werden.

In vitro zeigte sich eine gute Wirkung von Amphotericin B auf Metazestodengewebe (Reuter et al., 2003). Auch im Heilversuch beim Menschen ließ Amphotericin B eine gute Wirkung auf das Parasitenwachstum vermuten (Reuter et al., 2003).

Nitazoxanid (NTX) konnte eine Wirksamkeit *in vitro* gegen *E. multilocularis* nachweisen (Stettler et al., 2003), (Reuter et al., 2006). Metazestodegewebe wurde mit NTX, ein Breitspektrum-Antibiotikum aus der Klasse der Thiazolide, behandelt (Stettler et al., 2003). Es wurden biochemische, lichtmikroskopische und

elektronenmikroskopische Verfahren zur Bewertung des Einflusses der benutzten Substanzen verwendet. NTX zeigte im Vergleich zu äquivalenten Konzentrationen von ABZ einen früheren Wirkungseintritt. Außerdem war NTX *in vitro* parasitozid im Vergleich zu ABZ (Reuter et al., 2006). Tizoxanid und Tizoxanid-glucose, Metabolite von NTX, wurden *in vitro* gegen *E. multilocularis* untersucht (Stettler et al., 2003). Der Effekt der Metabolite war im Wesentlichen identisch zum Effekt von NTX. ABZSO und Albendazol Sulfoxid (ABZSN), Metabolite von ABZ, entfalteten gegen Metazestoden *in vitro* den gleichen Effekt (Ingold et al., 1999). Weil ABZ und MBZ parasitostatisch sind und nicht in jedem Fall effektiv gegen *E. multilocularis* wirken, wurde durch Modifikation von Metaboliten von ABZ versucht, eine bessere Alternative zu finden. Es wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Hemmung des Abbaus von ABZ und seiner Metaboliten bei der Kombination mit anderen Substanzen versucht, einen besseren und längeren schädigenden Effekt von ABZ auf Vesikel von *E. multilocularis* zu erreichen. Die Hemmung des Abbaus erfolgte u. a. durch Hemmung von Metabolismusenzymer (CYP-Enzyme).

Durch die von Stettler et al. 2001 entwickelte biochemische Messung der *EmAP* Aktivität konnte der Effekt der untersuchten Substanzen objektiviert werden. Diese biochemische Messung von *EmAP* erfolgt mittels ELISA. Die *EmAP* ist ein wichtiger Bestandteil der Metazestodenmembran. Durch Kontakt des ELISA Reagenz mit freier *EmAP* kommt es zu einer Farbreaktion, die optisch gemessen werden kann.

Man konnte eine erhöhte Aktivität von *E. multilocularis* spezifischer alkalischer Phosphatase der Mediumüberstände beobachten, wenn eine verstärkte Schädigung von Metazestodengewebe eingetreten war. Die Werte der beobachteten alkalischen Phosphatase der mit Albendazol Sulfoxid (ABZSO) behandelten Metazestoden stiegen langsamer an als die der mit NTX behandelten Metazestoden, was eine langsamere Schädigung der Metazestoden mit ABZSO als mit NTX andeutet.

Weiterhin erkannte man eine Zerstörung der Laminarschicht im Falle von Nitazoxanid als auch die fortschreitende Ablösung von der Keimschicht. Diese wurde mittels Lichtmikroskopie und Elektronenmikroskopie verifiziert. Stettler et al. 2003 applizierten Metazestodengewebe in Mäuse, welche *in vitro* für 14 Tage mit NTX behandelt wurden. Die Mäuse zeigten kein erneutes Wachstum an

Metazestodengewebe, was auf den parasitoziden Effekt von NTX *in vitro* zurückzuführen ist.

Methiazole, ein Benzimidazolderivat, wurde zur Behandlung von *E-multilocularis*-Vesikel *in vitro* untersucht. Ein kompletter Zerfall der Vesikel wurde nach 18 bis 21 Tagen, je nach benutzter Konzentration, beobachtet. Dennoch ließ sich ein erneutes Wachstum von Vesikeln nach Abbruch der Behandlung nachweisen (Reuter et al., 2006).

Itraconazole ist ein systemisch wirkendes Antimykotikum und wird bei Pilzkrankungen u.a. Aspergillose und Candidose eingesetzt. Die Verstoffwechslung erfolgt über Cytochrom CYP3A4. Ebenfalls hat es sich *in vitro* als wirksam gegen *E-multilocularis*-Vesikel erwiesen (Reuter et al., 2006).

Die Kernspintomographie eröffnet einen neuen interessanten Ansatz bei der Beobachtung des Wachstums von Metazestoden *in vivo*. Die Metazestoden wurden zu Beginn der Versuchsreihe mit Zytostatika (Vincristin, Navelbine und Methotrexat) *in vitro* behandelt. Anschließend wurde das Gewebe Mäusen appliziert. Unter Kernspintomographie-Kontrolle wurde schließlich das Metazestodenwachstum untersucht. Bei Metazestodengewebe, das mit Vincristin und Navelbine *in vitro* vorbehandelt worden war, konnte kernspintomographisch keine Hemmung des Metazestodenwachstums beobachtet werden. Bei dem Metazestodengewebe, das mit Methotrexat *in vitro* behandelt worden war, zeigte sich eventuell sogar eine Beschleunigung des Parasitenwachstums (Hübner et al., 2010).

1.6. Kombiniertes Einfluss von Wirkstoffen auf *E. multilocularis*:

Es gibt einige Kombinationen von Substanzen, die eine synergistische Wirkung gegen Larven und /oder Vesikel von *E. multilocularis* zeigten.

Taylor et al. testeten sowohl PZQ als auch ABZ *in vivo* gegen *E. multilocularis* (Taylor et al., 1988). Dabei wurde die Gewichtsänderung der Parasitengewebe der infizierten Mäuse beurteilt. PZQ zeigte erst in sehr hoher Dosierung (500mg/kg)

einen signifikanten Gewichtsverlust gegenüber den unbehandelten Mäusen. Jedoch war die Gewichtsänderung der Parasitengewebe bei ABZ schon in viel niedrigerer Dosierung (10-50mg/kg) signifikanter als bei PZQ. Eine Kombination beider Substanzen gleicher Konzentration (50mg/kg ABZ+500mg/kg PZQ) war nicht effektiver als die Wirkung der Einzelsubstanzen.

In Mausversuch wurde die Kombination von NTX und ABZ untersucht (Stettler et al., 2004). Es wurden dabei die Spiegel, als Messparameter, der Metaboliten von NTX und ABZ bestimmt. Metabolite sind Zwischenprodukte, welche in einem enzymatischen, biochemischen Stoffwechselfvorgang entstehen. In diesem Versuch wurden drei Messreihen durchgeführt. Die ersten zwei waren für Mäuse, die mit Metazestodengewebe infiziert waren, und die nachfolgende Behandlung mit ABZ, NTX und ABZ in Kombination mit NTX zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Im ersten Experiment fing die Behandlung direkt nach der Infektion an. Im zweiten Experiment erst zwei Monate nach der Infektion. Im dritten Experiment wurde NTX als Monosubstanz 2 Monate nach der Infektion an Mäusen getestet. Die Erfassung der Auswirkungen erfolgte per Licht- und Elektronenmikroskop. Die Spiegel der verschiedenen Metaboliten ABZSO (Metabolit von ABZ), Tizoxanid und Tizaxonid-Glucose (Metabolite von NTX) wurden bestimmt. Die stärkste Wirkung wurde auf Metazestoden der Mäuse, die 2 Monate nach der Infektion mit ABZ und NTX in Kombination behandelt wurden, erzielt. Eine direkte Behandlung nach der Infektion zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle. Stettler et al. führten die verstärkte Schädigung auf Metazestoden *in vivo* wahrscheinlich auf den Metabolismus beider Substanzen (ABZ und NTX) über gleiche Enzyme oder Enzymkomplexe zurück. NTX hat vermutlich eine stärkere Affinität und wird stärker zu den Zwischenprodukten Tizoxanid und Tizaxonid-Glucose metabolisiert. Gleichzeitig bleibt die Konzentration der anderen Substanz (ABZ) bzw. ihrer Metaboliten (ABZSO) länger erhöht. Die Erhöhung des Metaboliten ABZSO lag bei etwa um das vierfache der Monotherapie. Diese Interaktion von ABZ und NTX um das gleiche Enzym verstärkte die schädigende Wirkung von ABZ auf das Metazestodengewebe. Bei der Kombination dieser zwei Substanzen *in vitro* zeigte sich sogar ein parasitozider Effekt. Dieser Effekt bestätigte sich bei der nachfolgenden Injektion des behandelten Gewebes intraperitoneal in Mäuse. Dabei fand man kein Wachstum von Metazestodengewebe (Reuter et al., 2006).

Eine antagonistische Wirkung von Substanzkombinationen gegen *E. multilocularis*-Vesikel wurde ebenfalls beobachtet. So zeigte die gleichzeitige Gabe von ABZ und Amphotericin B eine antagonistische Wirkung, eine sequenzielle Gabe jedoch eine synergistische Wirkung (Reuter et al., 2010).

1.7. Tabellarische Zusammenfassung: Effekte getesteter Substanzen auf *E. multilocularis in vitro/vivo*:

Tabelle 1: Effekte getesteter Substanzen auf *Echinococcus multilocularis*:

Substanz	Effekt auf <i>E. multilocularis</i> -Larven	Quelle
Vincristin und Navelbine	Metazestodenwachstum nach Reinfektion des <i>in vitro</i> behandelten Gewebes	Hübner et al. 2010
Methotrexat	Eventuell beschleunigtes Wachstum nach Reinfektion des <i>in vitro</i> behandelten Gewebes	Hübner et al. 2010
Amphotericin B plus Albendazol	Nach gleichzeitiger Gabe antagonistische Wirkung, nach sequenzieller Gabe synergistische Wirkung	Reuter et al. 2010
Ivermectin	Kein schädigender Effekt	Reuter et al. 2006
Methimazole	Schädigender Effekt	Reuter et al. 2006
Itraconazole	Schädigender Effekt	Reuter et al. 2006
Artemether	Kein schädigender Effekt	Reuter et al. 2006
Caspofungin	Kein schädigender Effekt	Reuter et al. 2006
Miltefosine	Kein schädigender Effekt	Reuter et al. 2006
Nitazoxanid plus Albendazol	Parasitozider Effekt, Kein Metazestodenwachstum nach Reinfektion des <i>in vitro</i> behandelten Gewebes	Reuter et al. 2006
Amphotericin B	Schädigender Effekt	Reuter et al. 2003
Nitazoxanid	Schädigender Effekt	Stettler et al. 2003

1.8. Kurzcharakteristika der verwendeten

Anthelminthika:

ABZ, ein Benzimidazol, wurde bei SmithKline Animal Health Laboratories 1972 entwickelt und wird weltweit als Anthelminthikum genutzt. Es hemmt durch spezifische Bindung an β -Tubulin die Polymerisation von Mikrotubuli. Galtier et al. 1986 und Souhaili-EI Amri 1987 beschrieben, dass ABZ in Leberzellen von Schafen durch das Enzym Flavinmonooxidase und Cytochrom-P450-Enzym (CYP) sulfoxidiert wird. Nach dieser Sulfoxidation folgt eine irreversible Sulfonierung mit der Bildung des inaktiven Zwischenproduktes Albendazol Sulfon (ABZSN) (Galtier et al., 1991). Dieser Sulfonierungsschritt erfolgt durch CYP1A1/2 (Souhaili-EI Amri et al., 1988), (Delatour et al., 1991), (Asteinza et al., 2000). 2000 wurde CYP3A4 als das Hauptenzym zur Bildung vom aktiven Metabolit ABZSO durch Sulfoxidation bei Menschen beschrieben (Rawden et al., 2000).

Die anthelmintische Aktivität von PZQ wurde erstmals 1972 gemeinsam bei Merck AG und Bayer AG nachgewiesen. PZQ hat eine sehr starke Wirkung auf alle Schistosomenspezies (Klasse der Trematoden zugeordnet) und verschiedensten Cestoden. Die anthelminthische Wirkung beruht auf einer Schädigung des Teguments. *In vitro* können bereits bei sehr geringen Konzentrationen fokale Vakuolisierung und damit Desintegration bestimmter Stellen des Teguments beobachtet werden (Becker et al., 1980a) (Becker et al., 1980b). Das Anthelminthikum PZQ wird ebenfalls zum größten Teil über CYP3A4-Enzym zum inaktiven Metabolit verstoffwechselt.

Ivermectin (IVM) wurde von Merck 1975 entwickelt und primär in der Veterinärmedizin gegen Parasiten eingesetzt. IVM hat seine antiparasitäre Wirkung durch die hohe Affinität zu Glutamat gesteuerten Chloridkanäle (Duce and Scott, 1985), (Cully et al., 1994), (Arena et al., 1995), (Cheeseman et al., 2001). Die erste Anwendung von IVM in der Humanmedizin war 1987 gegen Onchozerkiasis. Später wurde die Anwendung auch auf Metazestoden von *E. granulosus* bei Schafen ausgeweitet (Hokelek et al., 2002). IVM ist eine Substanz, die über CYP3A4-Ezym bei Menschen metabolisiert wird.

Ritonavir (RTV) ist kein Anthelminthikum und wurde von Abbott Firma 1992 entwickelt. RTV wird zur Therapie der HIV Infektion eingesetzt. Es ist einer der wichtigsten CYP-Inhibitoren, was der Grund für die Untersuchung in Kombination mit anderen Substanzen war. Die hauptsächlichliche Hemmung wird auf CYP3A4 und CYP2D6 ausgeübt. Eine klinische Beobachtung stammt von Zingg (2004), der bei einem Patienten mit HIV und *E. multilocularis* infiziert war, RTV und ABZ zusammen verabreichte. Er beobachtete ein langsames Fortschreiten der Echinokokkose. Viele Berichte bei Immunsupprimierten Patienten beschrieben ein schnelleres Fortschreiten des *E. multilocularis* (Grüner, unveröffentlicht).

1.8.1. Metabolismus:

Medikamente werden über verschiedene Wege in ihre Zwischenprodukte verstoffwechselt und aus dem Körper ausgeschieden. Dabei spielen CYP-Enzyme sowie ABC-Transporter (ATP Binding cassette) die Hauptrolle. Hinzu kommt, dass eine Überlappung zwischen Substraten von P-Glykoproteine (P-gp) und CYP-Enzyme (3A4) festzustellen ist (Wacher et al., 1995).

A: Cytochrom-P450-Enzym (CYP):

CYP sind Hämproteine, welche enzymatische Aktivität besitzen. Sie kommen in allen Formen des Lebens vor. Beim Menschen wurden 60 verschiedenen CYPs gefunden. CYPs spielen eine wichtige Rolle bei der Verstoffwechslung wasserunlöslicher Stoffe durch Oxidation, damit sie dadurch besser wasserlöslich werden und schneller aus dem Körper ausgeschieden werden können.

B: P-Glykoproteine (P-gp):

P-gp sind wichtige Effluxmembrantransporter (ABC Transporter). Sie bestehen aus zwei ähnlichen Komponenten. Diese P-gp sind besonders an der luminalen Membran von proximalen Tubuluszellen, Epitelzellen des Intestinaltraktes, der kanalikuläre Membran der Hepatozyten und der endothelialen Membran von Kapillaren wie z.B. der Bluthirnschranke expremiert (Thiebaut et al., 1987), (Sugawara et al., 1988), (Cordon-Cardo et al., 1989), (Cordon-Cardo et al., 1990). Diese Proteine sind für die Sekretion von Substanzen zuständig, sodass sie für eine verminderte Aufnahme von Substanzen im Gastrointestinaltrakt (Van

Asperen et al., 1998), (Schellens et al., 2000), (Benet and Cummins, 2001), reduzierten Transport über die Bluthirnschranke (Schinkel et al., 1996), (Lankas et al., 1997) und verstärkte Elimination über das biliäre und renale System (Schinkel et al., 1997) (Hunter and Hirst, 1997), (Van Asperen et al., 1998), (Smit et al., 1998) verantwortlich sind. Dadurch sind sie unter anderem fähig, Komponenten wie Zytostatika aus der Zelle zu transportieren (Germann, 1996), (Shapiro and Ling, 1998), (Litman et al., 2001), (Matheny et al., 2001), (Borst and Elferink, 2002). Dieser Mechanismus ist die Ursache der Multiresistenz der Säugertieretumorzellen (Juliano and Ling, 1976). Dadurch wird die Konzentration von Zytostatika in Tumorzellen erniedrigt. Verschiedene weitere Medikamente sind Substrate dieser P-gp wie z.B. HIV-Proteaseinhibitoren, kardiovaskuläre Medikamente, Steroide und antiparasitäre Substanzen (Shapiro and Ling, 1998), (Litman et al., 2001), (Matheny et al., 2001).

Verschiedene präklinische und klinische Studien zeigten den Beitrag der P-gp bei der Erniedrigung der oralen Bioverfügbarkeit von Medikamenten (Van Asperen et al., 1998), (Schellens et al., 2000) (Matheny et al., 2001). Gerade im Intestinaltrakt erfolgt eine verminderte Resorption ins Blut durch das Zurückpumpen der schon in die Darmzelle aufgenommenen Substanz.

Durch den Effekt auf die Bluthirnschranke können diese P-gp die Neurotoxizität bestimmter Medikamente wie z.B. IVM erniedrigen (Schinkel et al., 1996), (Matheny et al., 2001), aber auf der anderen Seite auch die Wirksamkeit anderer Medikamente wie z.B. HIV-Protease-inhibitoren verschlechtern (Matheny et al., 2001), (Borst and Elferink, 2002). Damit spielen P-gp eine wichtige Rolle bei Substratinteraktionen (Yu, 1999), (Matheny et al., 2001).

C: Multidrugresistanceproteine (MRP):

Zweite große Gruppe der ABC-Familie sind die MRP-Transporter. Es sind bis jetzt 8 Untertypen bekannt. Das MRP2 wurde ursprünglich als kanalikulärer, multispezifischer Anionenmembrantransporter identifiziert (Borst and Elferink, 2002). Diese befinden sich an der luminalen Membran von Epithelzellen der Leber, Niere und Intestinaltrakt (König et al., 1999), (Litman et al., 2001), (Borst and Elferink, 2002). MRP2 spielt eine große Rolle beim Transport von glukuronidiertem Bilurubin in die Galle und bei weiteren biliären, intestinalen und

renalen Transporten verschiedener Komponenten (König et al., 1999), (Borst and Elferink, 2002).

1.8.2. HepG2-Zellen und Metabolismus von Substanzen *in vitro*:

In der vorliegenden Arbeit wurden die verschiedenen Anthelminthika in Anwesenheit von HepG2-Zellen *in vitro* als Feeder-Zellen untersucht. Dabei handelt es sich um eine gut differenzierte humane Hepatom-Zelllinie, die wie Hepatozyten eine Polarisierung aufweisen (Knowles et al., 1980), (Javitt, 1990). Sie bilden wie *in vivo* CYP-Enzyme (Westerink and Schoonen, 2007). Weiter sind die verwendeten Leberzellen in der Lage Strukturen zu bilden, die den Gallekanälchen der Hepatozyten entsprechen. Diese Strukturen befinden sich zwischen den Zellen, werden Pseudokanalikuli genannt und sind durch „tight-junctions“ abgedichtet. Sie stellen sich als runde Strukturen mit Microvilli dar (Chiu et al., 1990), (Sormunen et al., 1993). Die apikale Membran der Pseudocanaliculi enthält unter anderem Aktin, Villin, spezifische apikale Proteine und ABC-Transporter wie z.B. den oben beschriebenen MRP2 (Cantz et al., 2000) oder P-gp (Lee and Piquette-Miller, 2001). Der *in vivo* bekannte Metabolismus wie z.B. die Verstoffwechslung von Phospholipiden, Cholesterin und Gallensalzen, Sekretion von hepatischen Proteinen sowie die für Hepatozyten typische Sekretionswege sind in HepG2-Zellen vorhanden (Bouma et al., 1989), (Axelson et al., 1991), (Gibbons et al., 1994), (Cooper et al., 1994), (Westermann et al., 1996). Diese Pseudokanalikuli sind wie auch der Golgiapparat dazu fähig Gallensäure zu speichern. Somit sind die *in vivo* vorhandenen Effluxtransporter und CYP-Enzyme, welche für den Metabolismus von Substanzen notwendig sind, auch *in vitro* (HepG2-Zellen) vorhanden. In Bezug auf diese Arbeit ist das wichtig, weil Effluxtransporter und CYP-Enzyme eine erhebliche Rolle bei Interaktionen von Substanzkombinationen auf Vesikel von *E. multilocularis* spielen.

1.9. Zielsetzung:

Nebenwirkungen von Benzimidazolen wie Hepatotoxizität, Cholestase, Alopezie, Zytopenie und gastrointestinale Symptome können ein Grund zum Abbruch der

Behandlung alveolärer Echinokokkose beim Menschen sein (Ammann and Eckert, 1996), (Reuter et al., 1998). Außerdem führten Benzimidazole in beschriebenen Fällen zum Tode (Opatrny et al., 2005). Der parasitostatische Effekt dieser Substanzen ermöglicht ein erneutes Wachstum der *E. multilocularis* nach Absetzen der Therapie (Ammann et al., 1990) (Reuter et al., 2004). Eine alternative Therapie und Reduzierung der Dosierung verwendeter Benzimidazole sind aus diesen Gründen sinnvoll. Mit einer Kombinationstherapie kann die Dosis der Einzelsubstanzen reduziert und eine bessere Wirkung bei vermutlich geringerer Nebenwirkung erzielt werden.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, der Effekt von Wirkstoffen auf das Larvenwachstum des *E. multilocularis* im Kultursystem zu untersuchen. Dies erfolgte durch mikroskopische und makroskopische Beobachtung der Intaktheit bzw. Schädigung und der Bestimmung der Anzahl an Vesikel in einem bestimmten Zeitraum und unter Behandlung mit verschiedenen Pharmaka. Folgende Anthelminthika wurden dabei getestet: Albendazol, Ivermectin und Praziquantel. Es wurden unterschiedliche Dosierungen verwendet, um die geringste notwendige Dosis zu finden. Des Weiteren wurde der Metabolismus der Substanzen im Kultursystem mit Hepatozyten gezielt moduliert und die damit verbundene Veränderung der Wirksamkeit beurteilt.

2. Material und Methodik:

2.1. Gewinnung von Echinococcus Metazestoden (Larvengewebe):

Es wurde Parasitengewebe eines Patienten verwendet. Dieses Material wurde in kleine Blöcke zerkleinert und mongolischen Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*) mittels einer Kanüle intraperitoneal injiziert.

Nach 6 bis 8 Wochen wurden die Versuchstiere getötet. Leber und Peritoneum der Versuchstiere waren nach dieser Zeit voller Metazestodengewebe. Dieses Metazestodengewebe wurde unter sterilen Bedingungen aus dem Peritoneum herausgelöst und in kleine Stücke geschnitten. Diese Metazestodenblöcke wurden dann nach dreimaligem Waschen mit Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, Biochrom) unter sterilen Bedingungen auf Kulturflaschen verteilt.

2.2. Kultivierung der Vesikel:

HepG2-Zellen sind von humanen Leberzellen abgeleitete Zelllinien und liefern notwendige Wachstumsfaktoren für die Metazestoden. Als Medium wurde Dulbecco's Modified Eagles Medium (Biochrom AG, Berlin) verwendet, dem 10%-iges fetales Kälberserum (FCS, PAA Laboratories, Linz, Österreich), (Hemphill und Gottstein, 1995), 5%-iges Penicillin/Streptomycin (P/S) und 0.55%-iges Moxifloxacin (Avalox) zugesetzt wurde. P/S und Moxifloxacin dienen der Prophylaxe einer bakteriellen Kontamination. Jura konnte zeigen, dass die HepG2-Zellen für das Wachstum der *In-vitro*-Kulturen wichtig sind, da sie möglicherweise essentielle Zytokine produzieren (Jura et al., 1998).

Nachdem die Gewebeblöcke gleichmäßig auf die Kulturflaschen verteilt wurden, wurde Medium hinzugefügt. Anfänglich wurden 200 ml Medium in die Flaschen gegeben. Aufgrund des starken Wachstums wurde das Medium zweimal pro Woche gewechselt, um eine ausreichende Versorgung sicherzustellen. Nach etwa

einer Woche bildeten sich auf der Oberfläche der Gewebeblöcke neue Vesikel, innerhalb von 2 bis 5 Wochen nahmen sie an Größe und Anzahl zu und bildeten Schwestervesikel, die sich vom Gewebeblock lösten. Diese schwammen frei im Medium und nahmen ebenfalls weiter an Größe zu.

Die freien Vesikel wurden dann zur Durchführung der Versuchsreihen entnommen. Die Kulturflaschen wurden unter sterilen Bedingungen bei 37°C, 5% CO₂-Anteil und 90% Sättigung im Brutschrank kultiviert. Aus ungeklärten Gründen verloren einige Vesikel an Größe und Turgor. Möglicherweise wurden sie beim Wechseln des Mediums beschädigt. Diese wurden nicht in die Versuchsreihen aufgenommen.

2.3. Überblick über das benutzte Kulturmodell:

Das von uns benutzte *in vitro* Kultursystem wies im Gegensatz zum oben beschriebenen System von Jura (Seite 6) Unterschiede auf. In unserem *in vitro* Modell wurden ausschließlich humane Leberzellen benutzt. Diese humanen Leberzellen wurden im Gegensatz zu Jura nicht in Kollagen eingebettet. Das in dieser Arbeit verwendete System ist in Anlehnung an das von Hemphill et al. 1995 beschriebene Modell zur *in vitro* Untersuchung des Larvengewebes gut für die hier durchgeführten Messungen geeignet. Da die Laminarschicht eine mechanische Barriere für Arzneistoffe darstellt, kann der Effekt eines Pharmakons direkt anhand seiner Wirkung auf die Hauptbarriere bewertet werden. Der Verlauf der Vesikel und des Metazestodengewebes wurde in unserem System quantitativ und lichtmikroskopisch beurteilt. Die Arbeitsgruppe von Hemphill setzte zusätzlich zum Lichtmikroskop ein Elektronenmikroskop und biochemische Messung von *EMAP* zur genaueren Beurteilung ein. Hemphill konnte zusätzlich nachweisen, dass Metazestoden und Vesikel in Anwesenheit von FCS metabolisch aktiver sind als ohne. FCS wurde in unserem *in vitro* Modell sowie im Modell von Jura benutzt.

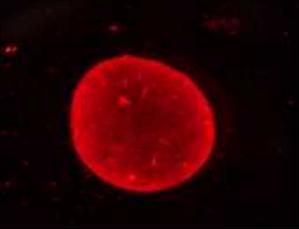
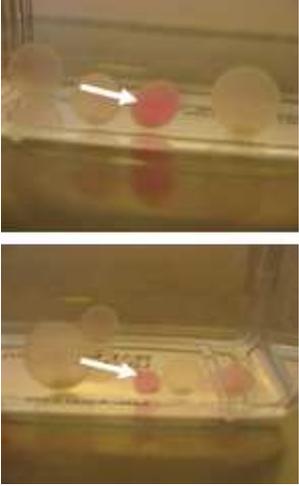
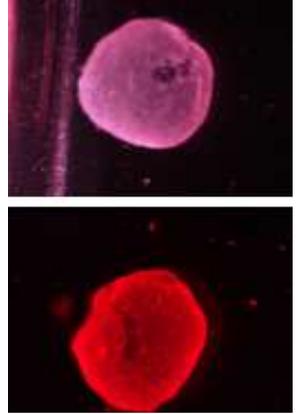
2.4. Versuchsdurchführung:

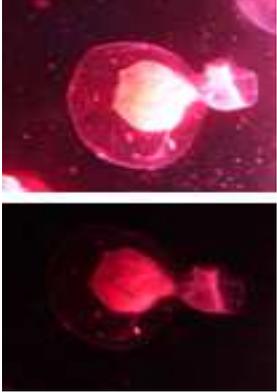
Vor Beginn eines Versuches wurden Versuchsflaschen HepG2-Zellen angezchtet. Dies dauerte 3-5 Tage, bis eine ausreichende Menge vorhanden

war. Danach konnten Vesikel aus der Kultivierung überführt werden. In jede Flasche wurden 5 Vesikel gegeben. Hierbei musste sorgfältig auf Unversehrtheit der Vesikel geachtet werden. Bei der Überführung beschädigte Vesikel wurden umgehend entfernt und durch intakte ersetzt. Für die unterschiedlichen Konzentrationen der getesteten Substanzen wurden jeweils 2 Ansätze verwendet. Die Negativkontrolle wurde nur mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt. Die Konzentration an DMSO war genauso hoch wie bei den anderen Vesikeln, die mit den verschiedenen Substanzen behandelt wurden. Hier erfolgte der Medienwechsel (50 ml Medium) 3-mal wöchentlich unter sterilen Bedingungen. Beim Wechsel war einmaliges Waschen mit PBS erforderlich, um zerstörte HepG2-Zellen zu entfernen und um die Durchlässigkeit der Laminarschicht für das Medium beurteilen zu können. Die Bewertung der Vesikel erfolgte täglich über einen Zeitraum von 21 Tagen.

Die Vesikel wurden makroskopisch und mikroskopisch bewertet. Eine Verlaufsbeobachtung erfolgte während des Versuches täglich. Die Bewertung der Vesikel geschah anhand einer Skala von 1 bis 5. Mit 1 wurden Vesikel gekennzeichnet, die vollständig intakt waren, mit 5 solche, die sehr stark geschädigt waren. Eine vollkommene Schädigung konnte anhand einer durchsichtigen Laminarschicht bzw. einer geschrumpften inneren Keimschicht von verschiedenen Bewertern einfach bewertet werden. Bei der täglichen Beobachtung der Vesikel wurde der Durchschnitt der 5 Vesikel jeder Flasche genommen.

Tabelle 2: Skalenwerte und ihre Beschreibung.

Skalenwert	Beschreibung	Abbildung
1 (0%-ige Schädigung)	Vesikel vollkommen intakt, normaler Turgor, glatte Oberfläche.	 <p data-bbox="1059 555 1353 584">Abbildung 2: Skalenwert {1}.</p>
2 (25%-ige Schädigung)	Die Vesikel haben den gleichen Turgor wie normale intakte Vesikel. Ein Unterscheidungskriterium bei diesem Stadium war nur das in die Vesikel eingedrungene rote Medium, dies war jedoch nur beim Medienwechsel und beim Waschen mit PBS zu beobachten.	 <p data-bbox="1059 1122 1353 1151">Abbildung 3: Skalenwert {2}.</p>
3 (50%-ige Schädigung)	Der Turgor der Vesikel ist vermindert, die Oberfläche ist nicht mehr glatt und es fallen erste kleine Risse und Unregelmäßigkeiten auf.	 <p data-bbox="1059 1615 1353 1644">Abbildung 4: Skalenwert {3}.</p>
4 (75%-ige Schädigung)	Der Turgor nimmt mehr und mehr ab und die Vesikel beginnen stark zu schrumpfen. In diesem Stadium wird die Laminarschicht an verschiedenen Stellen der Oberfläche durchsichtig.	 <p data-bbox="1059 1899 1353 1928">Abbildung 5: Skalenwert {4}.</p>

5 (100%-ige Schädigung)	Die Laminarschicht ist noch intakt, aber fast vollständig durchsichtig, die Keimschicht im Inneren ist eingefallen. Dies ist Ausdruck einer sehr starken Schädigung der Vesikel.	 <p data-bbox="1062 607 1355 629">Abbildung 6: Skalenwert {5}.</p>
-------------------------	--	---

2.5. Spiegelmessung ABZ und ABZSO bei Kombination mit RTV:

Mit 400 µl des Zellkulturmediums wurde eine Proteinfällung mittels 400 µl Acetonitril vorgenommen. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und die Überstände in das HPLC-System (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) injiziert. Im HPLC-System erfolgte eine isokratische Auftrennung der Analyte mit einem Phosphatpuffer auf einer Reversed Phase Chromatographiesäulesäule. Die Detektion der Analyte erfolgte über einen Ultraviolett-Detektor.

2.6. Störfaktoren:

In allen Versuchen achteten wir darauf, die Größe der Bläschen möglichst gleich zu wählen. Dieses Vorgehen beruhte auf der Überlegung, dass die Größe der Bläschen möglicherweise einen Einfluss auf die Wirkung der Medikamente hat, da durch eine größere Oberfläche auch mehr Kontakt zum Wirkstoff besteht. Diese Überlegung konnte nach langem Beobachten subjektiv bestätigt werden. Es zeigte sich, dass größere Vesikel schneller geschädigt wurden.

Die Vesikel des Metazestodengewebes reagieren sehr sensibel auf physikalische Reize, sodass beim Pipettieren und Anlegen der Vesikel in die Substanzflaschen große Vorsicht geboten ist, um die Intaktheit der Vesikel zu erhalten. Aus diesem Grund wurden die Vesikel direkt nach dem Anlegen Intaktheit überprüft. Vor jedem

Wechsel des Mediums wurden der Zustand der Vesikel erfasst, um nach erfolgtem Medienwechsel überprüfen zu können, ob der Grad der Schädigung noch gleich war.

Die mikroskopische und makroskopische Kontrolle und Bewertung der Vesikel während des Versuchs war eher eine subjektive Methode. Die vollständige Schädigung der Vesikel (5 auf dem Skalensystem) war allerdings eindeutig und auch von unabhängigen Beobachtern nicht mit anderen Schädigungsgraden verwechselbar. Somit war der Endpunkt des Versuches objektiv definiert.

Eine weitere mögliche Fehlerursache ist die nicht immer exakt gleiche lokale Verteilung der HepG2-Zellen in den Flaschen und der möglicherweise daraus resultierenden Unterschiede der Enzymaktivität in den verschiedenen Flaschen.

In verschiedenen Publikationen zeigten die von uns verwendeten HepG2-Zellen im Bezug auf ihre Ionenkanäle und andere Transportsysteme eine gute Vergleichbarkeit mit menschlichen Hepatozyten. Hinsichtlich des Blutkreislaufes mit seinen verschiedenen Komponenten wie Elektrolyte, Glucose und Aminosäuren unterschieden sich jedoch die Versuchsbedingungen von der *In-vivo*-Situation. Die Konzentration von Elektrolyten und Glucose spielt insofern eine Rolle, dass einige der getesteten Medikamente ihre Wirkung teilweise aufgrund des osmotischen Drucks entfalten. Aus diesem Grund können die Ergebnisse nicht 1:1 auf *In-vivo*-Bedingungen übertragen werden.

Ein weiterer Unterschied zu *In-vivo*-Bedingungen ist die Abwesenheit einer Immunabwehr im *In-vitro*-Versuch. *In vivo* ist diese jedoch von Bedeutung. Obwohl nachgewiesen ist, dass die HepG2-Zellen fast alle CYP-Enzyme der normalen Leberzellen enthalten, ist ihre Aktivität *in vitro* nachweislich geringer. Somit ist der Metabolismus der unterschiedlichen Substanzen *in vitro* langsamer.

2.7. Prüfung verschiedener Substanzen gegen

Echinococcus multilocularis:

Albendazol:

Albendazole (ABZ) wurde für die bei der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) in Pulverform erworben und bei Raumtemperatur aufbewahrt. ABZ wurde in unterschiedlichen Konzentrationen von 0,01 µg/ml bis 10 µg/ml getestet. ABZ gehört zu den Benzimidazolcarbamaten und wird aus 4-n-propylthio-o-phenylendiamin und Carboxymethylcyanamid hergestellt. Es besteht aus einem Imidazolring, welcher an einen Benzolring gebunden ist (Van den Bossche et al. , 1982).

Ivermectin:

Ivermectin (IVM) ist ein Makrolid aus der Gruppe der Avermectine. Es wurde bei der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) in Pulverform erworben und im Kühlschrank bei 8°C aufbewahrt. Die getesteten Konzentrationen lagen zwischen 0,1 µg/ml und 10 µg/ml. IVM ist ein semisynthetisches Derivat des Avermectins B₁ und enthält ein Gemisch aus 80% 22,23-Dihydroavermectin B_{1a} und 20% 22,23-Dihydroavermectin B_{1b} (Campbell, 1985), (Goudie et al., 1993).

Praziquantel:

Praziquantel (PZQ) wurde ebenfalls bei der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) in Pulverform erworben und im Kühlschrank bei 8°C aufbewahrt. Es wurden Konzentrationen zwischen 0.1 µg/ml und 10 µg/ml getestet. PZQ entsteht in einer vierstufigen Synthese aus Isochinolon (Andrews et al., 1983). Der chemische Name lautet 2-(cyclohexylcarbonyl)-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinolin-4-on, (C₁₉H₂₄N₂O₂).

Beeinflussung des Metabolismus von Anthelminthika durch den Protease-inhibitor RTV:

Ritonavir (RTV) ist ein Proteaseinhibitor. Es wurde die Reinform des Medikamentes (ohne Hilfsstoffe) verwendet, welche bei der Firma Molekula in

Pulverform erhältlich war und im Kühlschrank bei 8°C aufbewahrt wurde. Die verwendeten Konzentrationen lagen zwischen 1 µg/ml und 10 µg/ml.

RTV ist ein Medikament zur Therapie von HIV-Infektionen. Die Dosierung bei der HIV-Therapie liegt im Bereich von 100 – 200 mg/d. Unter der Annahme, dass die Bioverfügbarkeit 60 – 80 % beträgt, ergibt sich für die durchgeführten Versuche eine Konzentration von etwa 1 µg/ml.

Die oben genannten Substanzen wurden mit DMSO vermengt. Es wurde darauf geachtet, dass die Konzentration des DMSO im gesamten Medium 1% nicht überschreitet, um eine toxische Wirkung auf die Hepatozyten und Vesikel zu vermeiden.

3. Ergebnisse:

3.1. Wirkung von Albendazol auf Vesikel ohne Feeder-Zellen:

Zunächst wurde ABZ in den Konzentrationen 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml ohne HepG2-Zellen getestet, um die Notwendigkeit dieser Zellen in den folgenden Versuchen beurteilen zu können.

Es zeigte sich, dass selbst bei der Negativkontrolle, in der sich kein Medikament befand, schon nach 12-13 Tagen eine 50% Schädigung der Vesikel erreicht wurde und erreichte eine 90% Schädigung nach etwa 21 Tagen. Bei den Konzentrationen 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml wurde eine 50% Schädigung der Vesikel nach ca. 3-4 Tagen erreicht und nach 8 Tagen bei der Konzentration 0.01 µg/ml.

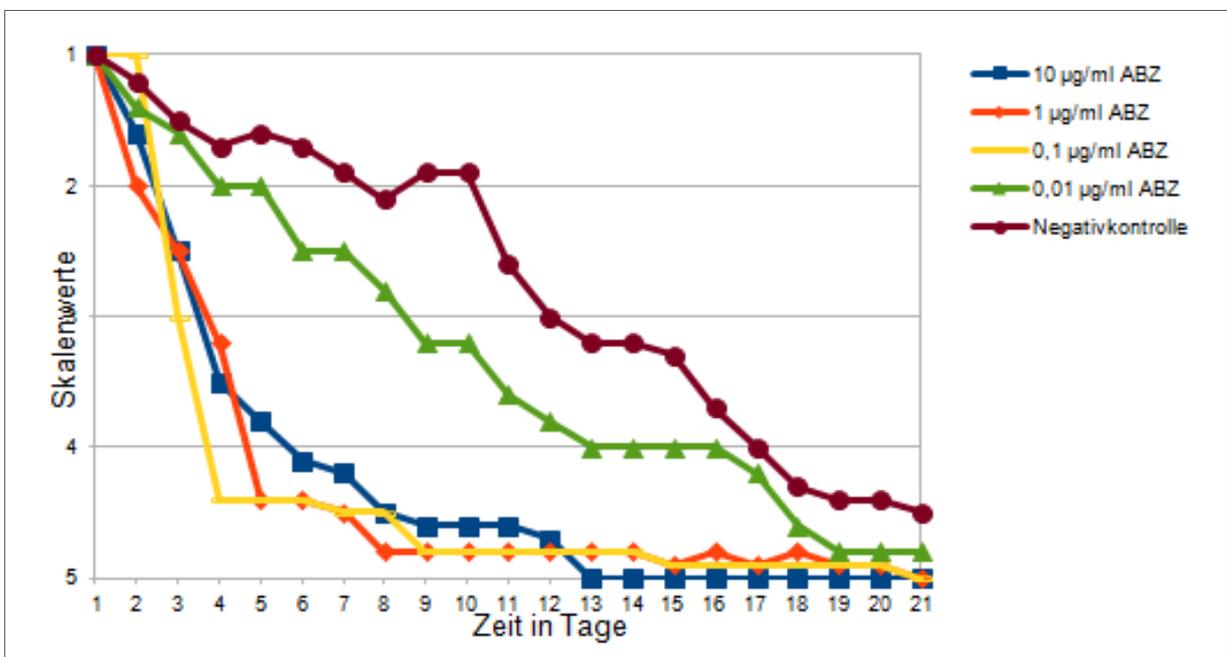


Abbildung 7: Wirkung der verschiedenen Konzentrationen Albendazol (ABZ) auf Vesikel von *Echinococcus multilocularis* ohne Feeder Zellen.

HepG2-Zellen sind daher für das Wachstum der Vesikel erforderlich.

3.2. Wirkung von ABZ mit Feeder-Zellen:

In diesem Versuch wurde ABZ als alleinige Substanz verwendet. Es wurden die Konzentrationen 1 µg/ml und 10 µg/ml getestet, und zum Vergleich gab es eine Negativkontrolle.

Wie man der Grafik (Abb. 8) entnehmen kann, zeigte sich bei einer Konzentration von 10 µg/ml ABZ bereits nach etwa 2 Tagen die erste Veränderung, an den Tagen 5-6 wurde die 50%-Schädigung der Vesikel erreicht.

Bei einer Konzentration von 1 µg/ml ergab sich eine Schädigung von 50% nach 9-10 Tagen

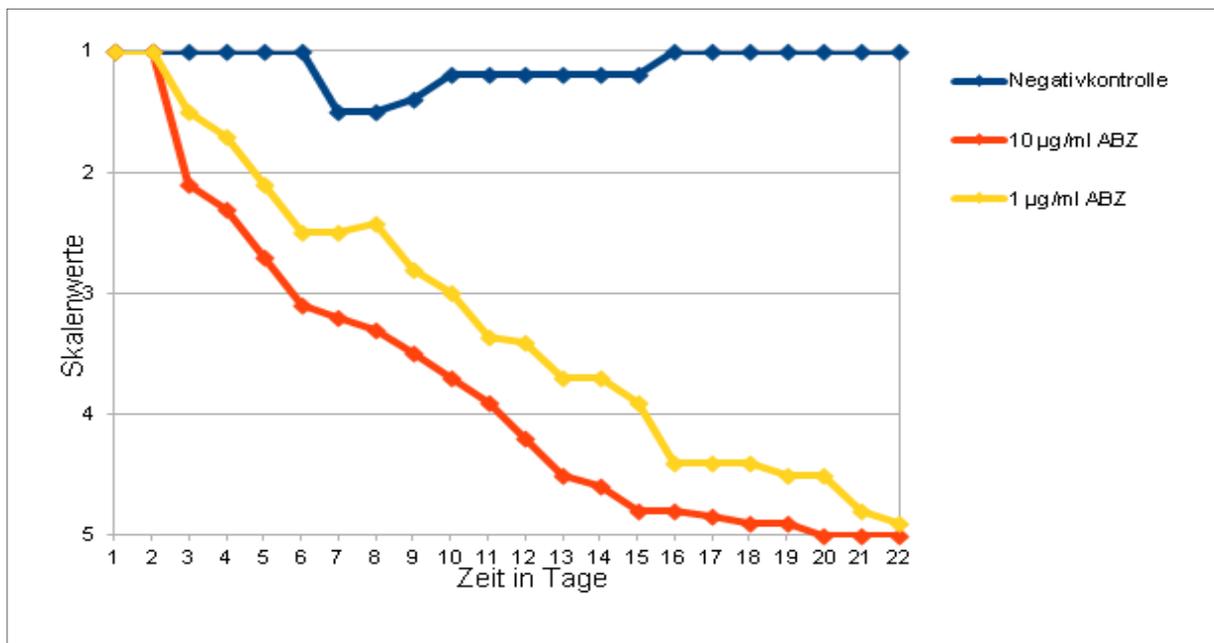


Abbildung 8: Wirkung der unterschiedlichen Konzentrationen von Albendazol (ABZ) auf Vesikel von *Echinococcus multilocularis* im Kultursystem mit Feeder-Zellen.

Innerhalb von 21 Tagen führten beide Konzentrationen zu einer starken Schädigung der Vesikel, die Konzentration von 1 µg/ml wirkte jedoch zeitlich um 3 Tage versetzt.

In einem weiteren Versuch wurde die Wirkung bei geringeren Konzentrationen von ABZ (0,01 µg/ml und 0,1 µg/ml) geprüft. Die Konzentrationen von 1 µg/ml und 10 µg/ml wurden als Referenz mitgeprüft. In den Konzentrationen von 1 µg/ml und

10 µg/ml zeigte sich eine nahezu gleiche Wirkung wie in dem vorausgehenden durchgeführten Versuch (Abb. 9).

Bei 0,01 µg/ml ABZ zeigte sich, wie bei der Negativkontrolle, keine Wirkung. Bei 0,1 µg/ml ABZ konnte nach 12 Tagen die 50%-ige Schädigung erreicht werden. Bei 0,1 µg/ml entfaltete sich die Wirkung jedoch noch protrahierter als bei 1 µg/ml ABZ.

Reuter et al. 2006 untersuchten die Konzentrationen 10 und 1 µg/ml ABZ. Für ABZ wurden bisher keine Daten für niedrige Konzentrationen (0.1 und 0.01 µg/ml) publiziert. Während Jura et al. 1998 folgende niedrige Konzentrationen 0,01 µM (0,003 µg/ml), 0,1 µM (0,03 µg/ml), 1 µM (0,3 µg/ml), 10 µM (3 µg/ml) MBZ getestet haben, wurde ABZ von Jura nicht geprüft.

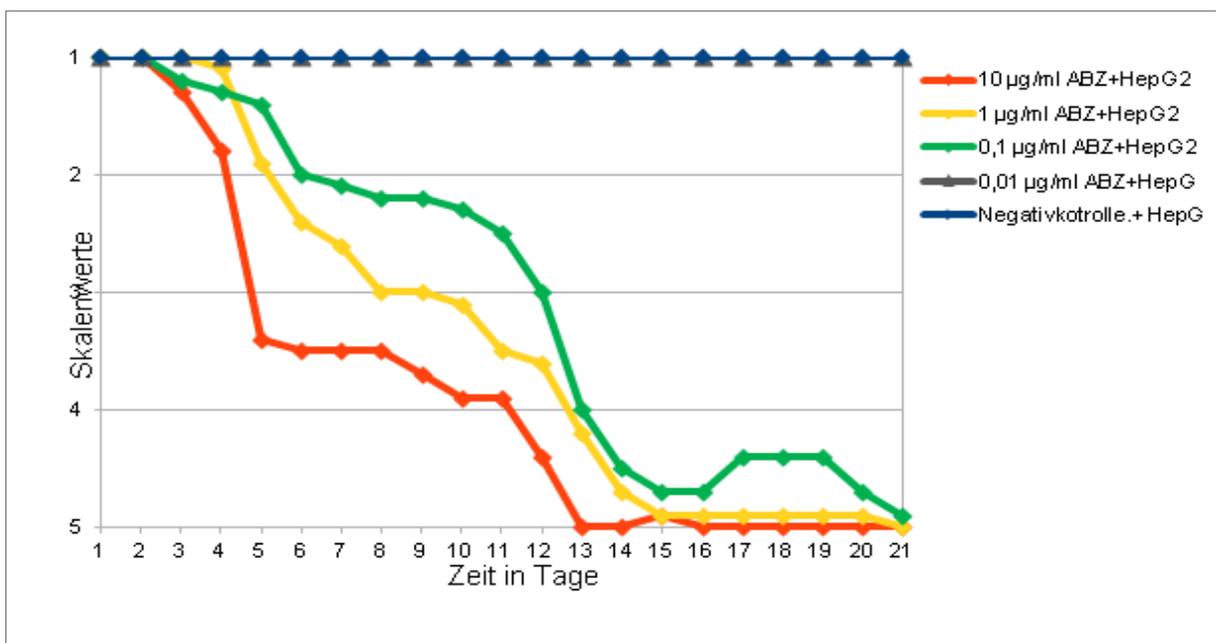


Abbildung 9: Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen Albendazol (ABZ) auf Vesikel von *Echinococcus multilocularis*.

3.3. Beeinflussung des Metabolismus von ABZ:

RTV wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml getestet. Zudem wurde die Kombination von 0,01 µg/ml ABZ mit 1 µg/ml RTV, sowie 0,1 µg/ml ABZ mit 1 µg/ml RTV geprüft.

Wie zu erwarten, zeigt RTV als spezifisches HIV-Medikament keine schädigende Wirkung auf die Vesikel (Abb. 10).

Wie in vorherigen Versuchen gezeigt wurde, wurde bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml ABZ nach etwa 12 Tagen eine 50%-ige schädigende Wirkung erreicht. Während die Kombination von 0,01 µg/ml ABZ mit 1 µg/ml RTV keine schädigende Wirkung bis zum Versuchsende nach 21 Tage erreichte, führte die Kombination von 0,1 µg/ml ABZ mit 1 µg/ml RTV schon nach 3 Tagen zu einer 50%-igen Schädigung und erreichte die etwa 80%-ige Schädigung (Skalenwert 4-5, siehe Tabelle 2) nach 3 Tagen.

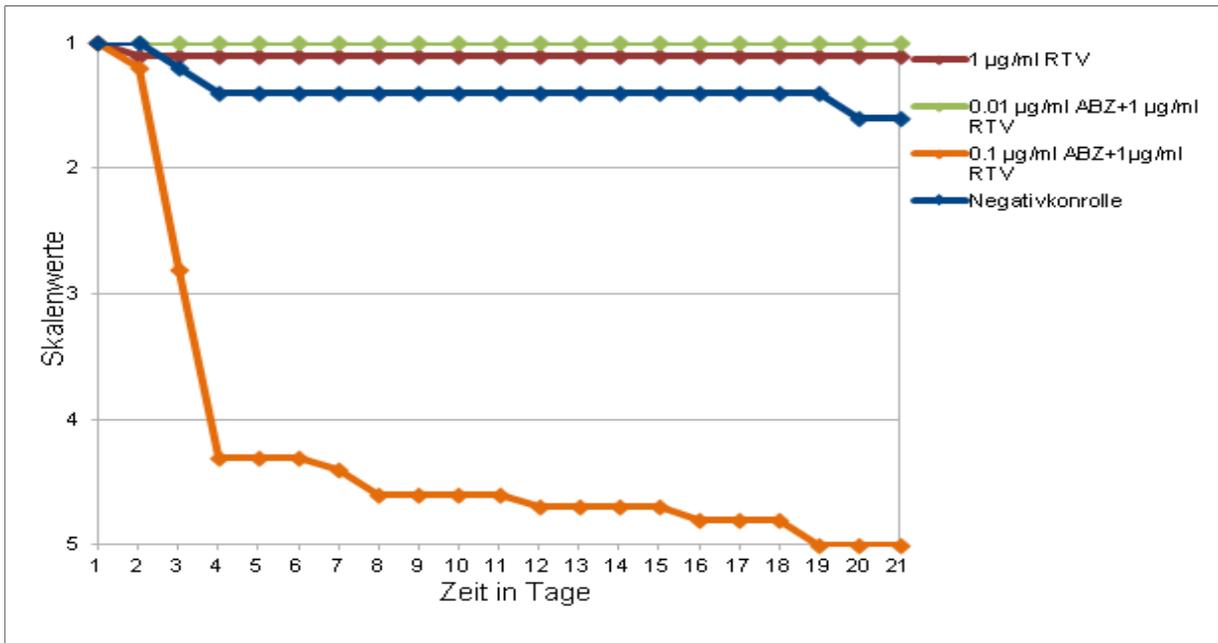


Abbildung 10: Einfluss von Ritonavir (RTV) auf den Metabolismus von Albendazol (ABZ) in der Vesikel von *Echinococcus multilocularis*.

Die Kombination von 0,1 µg/ml ABZ mit 1 µg/ml RTV verursachte die stärkste Schädigung der Vesikel. Innerhalb von drei Tagen betrug die Schädigung etwa 80%, was einer praktisch 100% Schädigung der Vesikel entspricht. Diese Wirkung war mit den Einzelsubstanzen nicht zu erreichen.

In einem weiteren Versuch wurde nun RTV in einer Konzentration von 10 µg/ml getestet.

Auch bei einer Konzentration von 10 µg/ml zeigte RTV keine Schädigung der Metazestoden. In Kombination mit ABZ zeigte sich ein ähnliches Ergebnis, wie oben beschrieben, und somit einen stärkeren schädigenden Effekt.

Wie zu erwarten, hat RTV keinen schädigenden Effekt auf Vesikel von *E. multilocularis* *in vitro*. Die Kombination mit ABZ zeigt den stärksten schädigenden Effekt mit einer 100%-igen Schädigung nach 3 Tagen. Somit wird bestätigt, dass RTV den Metabolismus von ABZ durch die HepG2-Zellen

verändert und damit den suffizienten Spiegel von ABZ verursacht, wodurch eine maximale Schädigung der Vesikel erreicht wird. Leider konnte die ABZSO Spiegel aus dem Kultursystem nicht verlässlich bestimmt werden, um diese Hypothese weiter abzusichern.

3.4. Einfluss von Praziquantel im Kultursystem:

Es wurden zwei Konzentrationen von 0,1 µg/ml und 1 µg/ml PZQ untersucht.

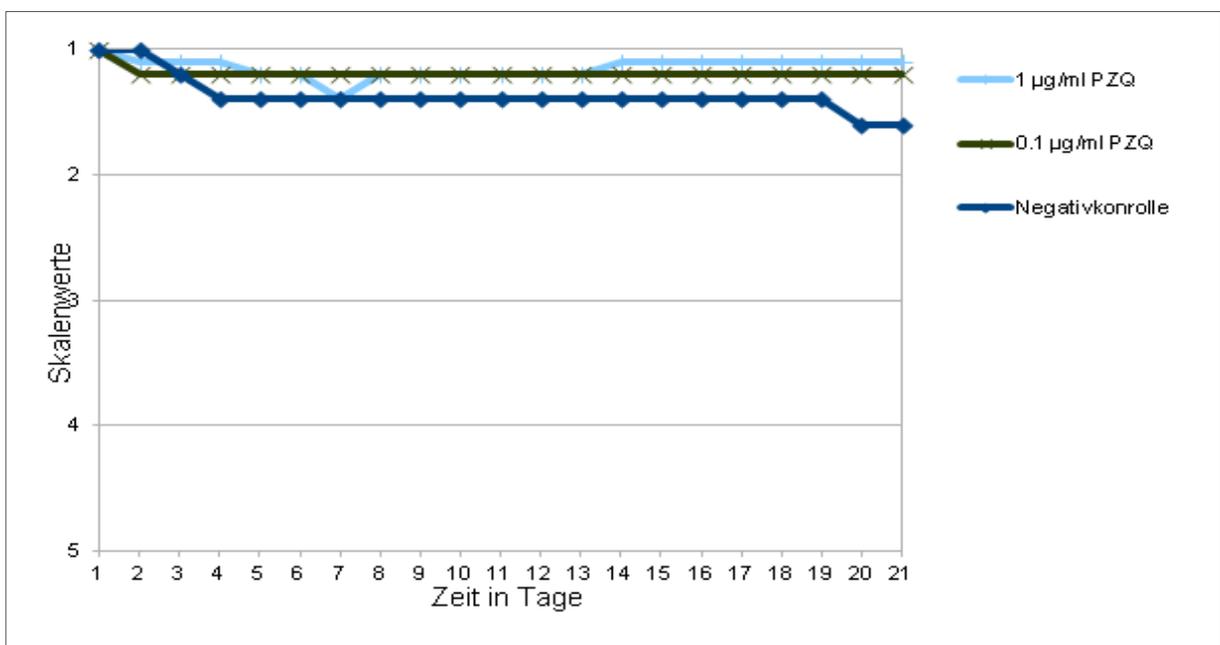


Abbildung 11: Wirkung von Praziquantel (PZQ) auf Vesikel von *Echinococcus multilocularis*.

PZQ zeigte in den oben genannten Konzentrationen keine Wirkung auf Vesikel von *E. multilocularis*.

In einem weiteren Versuch wurde auch PZQ in der Konzentration von 10 µg/ml untersucht. Es gab auch bei dieser hohen Konzentration keine Wirkung auf Vesikel von *E. multilocularis*.

PZQ zeigt daher keine Wirkung auf Vesikel *E. multilocularis in vitro*.

3.5. Kombination von ABZ und PZQ in unterschiedlichen Konzentrationen:

PZQ wird zum größten Teil über CYP3A4 metabolisiert. ABZ wird über dieses Enzym zum aktiven ABZSO metabolisiert, was mögliche Auswirkungen im Kultursystem hat.

Im ersten Experiment wurden ABZ und PZQ in den Konzentrationen 0,01 µg/ml ABZ mit 0,1 µg/ml PZQ und 0,1 µg/ml ABZ mit 0,1 µg/ml PZQ untersucht.

Bei der Kombination von 0,1 µg/ml ABZ mit 0,1 µg/ml PZQ konnte eine sehr starke und schnelle Wirkung beobachtet werden. Nach 3 Tagen wurde eine 50%-ige Schädigung erreicht. Nach 4 Tagen waren die Vesikel zu 100% (Skalenwert 5) geschädigt. Die Kombination von 0.01 µg/ml ABZ mit 1 µg/ml PZQ zeigte hingegen keine Wirkung und verhielt sich damit wie die Negativkontrolle.

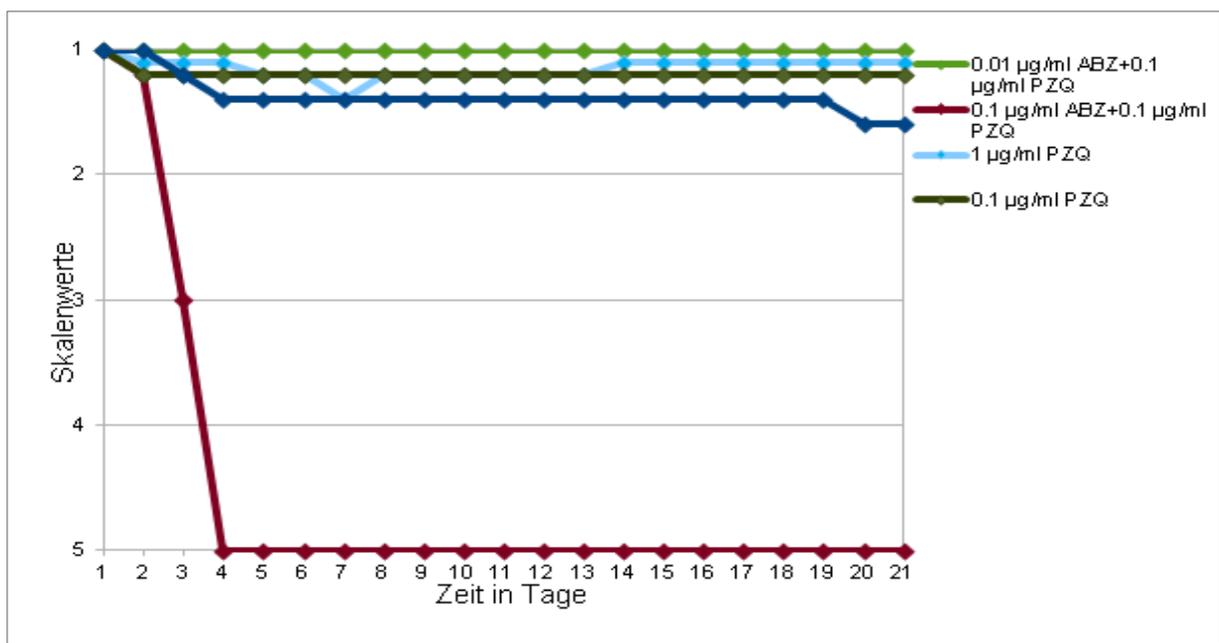


Abbildung 12: Wirkung von Albendazol (ABZ) und Praziquantel (PZQ) im *in vitro* Kultursystem der Vesikel von *Echinococcus multilocularis*.

Des Weiteren zeigte die Kombination von 0,1 µg/ml ABZ mit 10 µg/ml PZQ eine schädigende Wirkung. Auch diese Wirkung konnte mit den Einzelsubstanzen nicht erreicht werden. Somit beeinflusst sich der Metabolismus von ABZ durch PZQ gegenseitig, dass im Kultursystem verfügbare ABZ-Metaboliten eine starke schädigende Wirkung der Vesikel erzielen können.

Nun wurde wiederum untersucht, ob eine pharmakologische Beeinflussung der CYP-Enzyme durch RTV zu einer veränderten Wirkung von PZQ auf die Bläschen führen könnte.

Es wurden die Kombinationen von 1 µg/ml RTV mit 0,1 µg/ml PZQ und 1 µg/ml RTV mit 1 µg/ml PZQ getestet. Die Kombination von 0,1 µg/ml bzw. 1 µg/ml PZQ mit 1 µg/ml RTV zeigte keine Schädigung der Vesikel (Abb. 13).

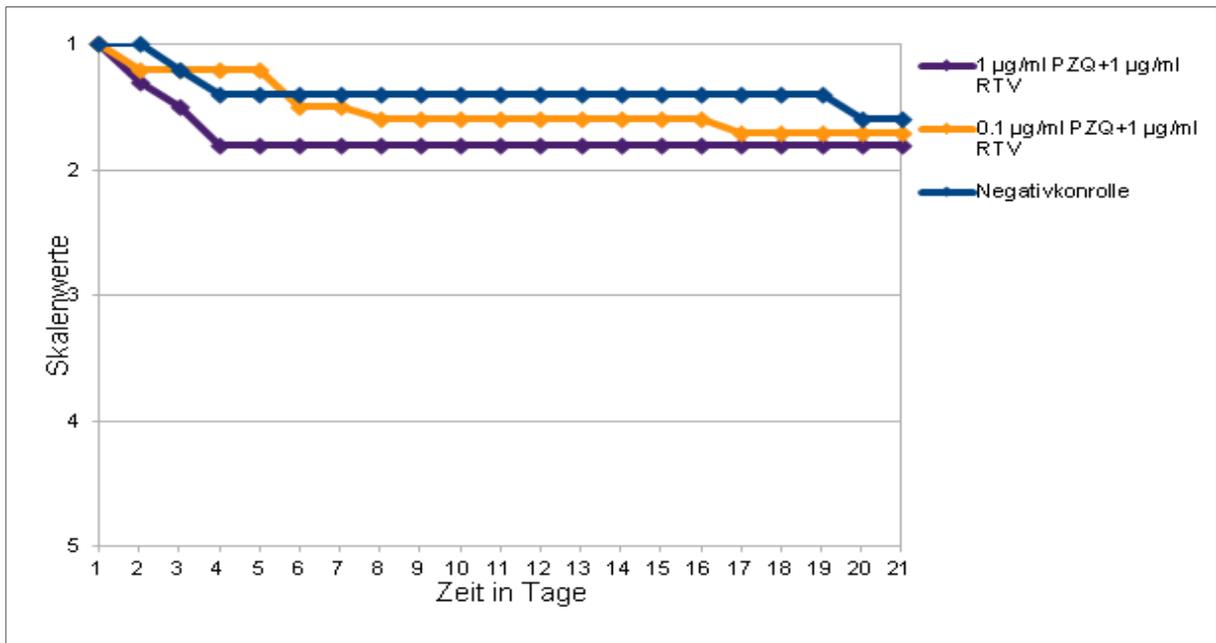


Abbildung 13: Prüfung von Praziquantel (PZQ) in Anwesenheit eines Proteaseinhibitors Ritonavir (RTV) auf Vesikel von *Echinococcus multilocularis*.

In einem weiteren Versuch wurde eine 10-mal höhere Konzentration von RTV eingesetzt. Es wurden folgende Kombinationen geprüft: 10 µg/ml RTV mit 0,1 µg/ml bzw. 1 µg/ml PZQ. Bei der Kombination von 10 µg/ml RTV mit 0.1 µg/ml bzw. 1 µg/ml PZQ konnte keine schädigende Wirkung auf Vesikel von *E. multilocularis* gezeigt werden.

Genau wie die Einzelsubstanzen zeigt die Kombination von RTV mit PZQ keine schädigende Wirkung auf Vesikel von *E. multilocularis*. Das würde bedeuten, dass die stärkste Wirkung der obengenannten Kombinationen von ABZ mit RTV bzw. ABZ mit PZQ durch ABZ entsteht. Die zwei Substanzen RTV und PZQ haben über die Wirkung an der Isoform 3A4 des CYP-Enzyms den Metabolismus von ABZ dahingehend verändert, dass ABZ-Metabolite eventuell höher und länger im Medium vorhanden waren. Somit konnten kleinste Konzentrationen von ABZ bei Kombination mit RTV bzw. PZQ eine sehr starke schädigende Wirkung zeigen.

3.6. Einfluss von Ivermectin im Kultursystem:

In diesem Versuch wurden die Konzentrationen 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml IVM geprüft. ABZ wurde in der Konzentration 1 µg/ml mitgetestet. IVM zeigte in den Konzentrationen von 0,1 µg/ml und 1 µg/ml keine Wirkung. Wie in der Negativkontrolle blieben die Vesikel vollkommen unbeschädigt. In der Konzentration von 10 µg/ml zeigte sich hingegen eine nach 2 Tagen beginnende Wirkung. Allerdings gingen bei dieser Konzentration auch zunehmend HepG2-Zellen zugrunde, so dass eine Aussage für diese Konzentration nicht getroffen werden kann.

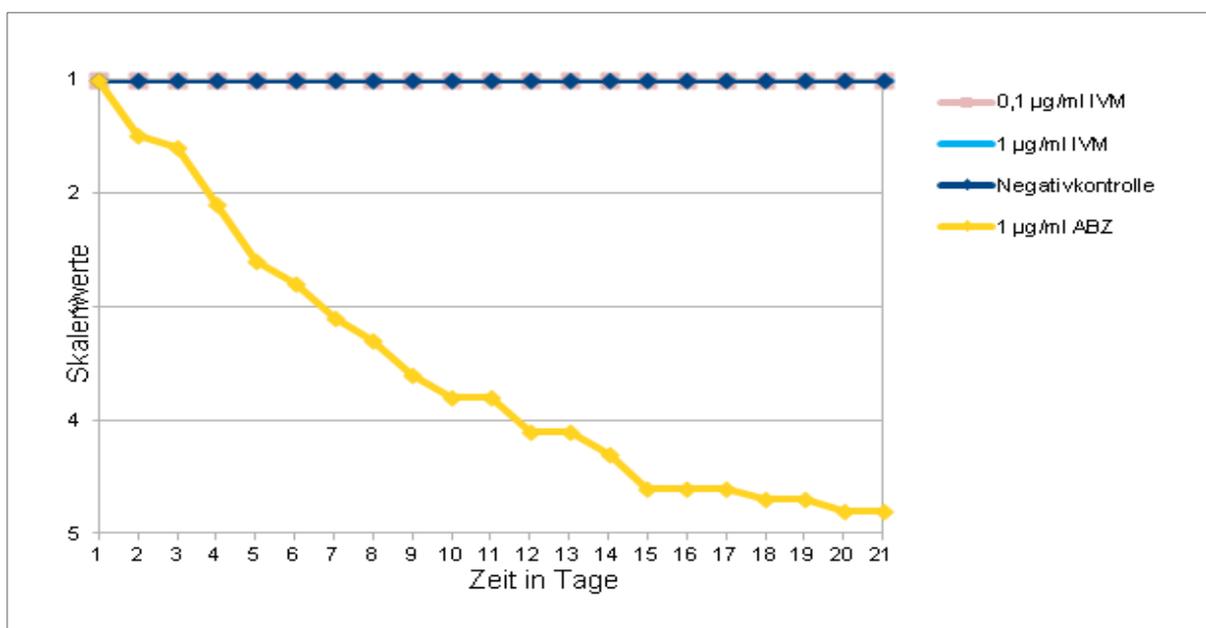


Abbildung 14: Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von Ivermectin (IVM) und Albendazol (ABZ) auf *Echinococcus multilocularis*.

Die Bewertung von IVM in einer Konzentration von 10 µg/ml gegen die Metazestoden *in vitro* ist durch das Absterben der HepG2-Zellen nicht möglich. Somit zeigt IVM keine Wirkung auf die Vesikel im Kultursystem.

3.7. Kombination von 0,1 µg/ml ABZ mit unterschiedlichen Konzentrationen von IVM:

Nun wurden verschiedene Kombinationsmöglichkeiten von ABZ mit IVM im Vergleich zu IVM allein geprüft. Dabei wurden die Konzentrationen 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml IVM jeweils mit 0,1 µg/ml ABZ kombiniert.

Wie im vorausgehenden Experiment zeigte IVM in den Konzentrationen 1 µg/ml und 2 µg/ml keine Wirkung, die Vesikel blieben vollständig intakt. Bei 5 µg/ml zeigte sich nach ca. 14 Tagen eine etwa 50%-ige Schädigung der Vesikel. Bei 10 µg/ml sind zunehmend HepG2-Zellen abgestorben, sodass die Prüfung mit 5 µg/ml und 10 µg/ml nicht verwertbar sind.

Sowohl die Kombination von 1 µg/ml als auch 2 µg/ml IVM mit 0,1 µg/ml ABZ zeigten nach 2-3 Tagen eine erste Schädigung. Die 50%-ige Schädigung zeigte sich bei 1 µg/ml IVM mit 0,1 µg/ml ABZ nach ca. 5-6 Tagen. Bei 2 µg/ml IVM mit 0,1 µg/ml ABZ trat diese Wirkung nach 4-5 Tagen ebenfalls ein.

Die Kombination von 5 µg/ml und 10 µg/ml IVM mit 0,1 µg/ml ABZ war aus oben genanntem Grund ebenfalls nicht verwertbar.

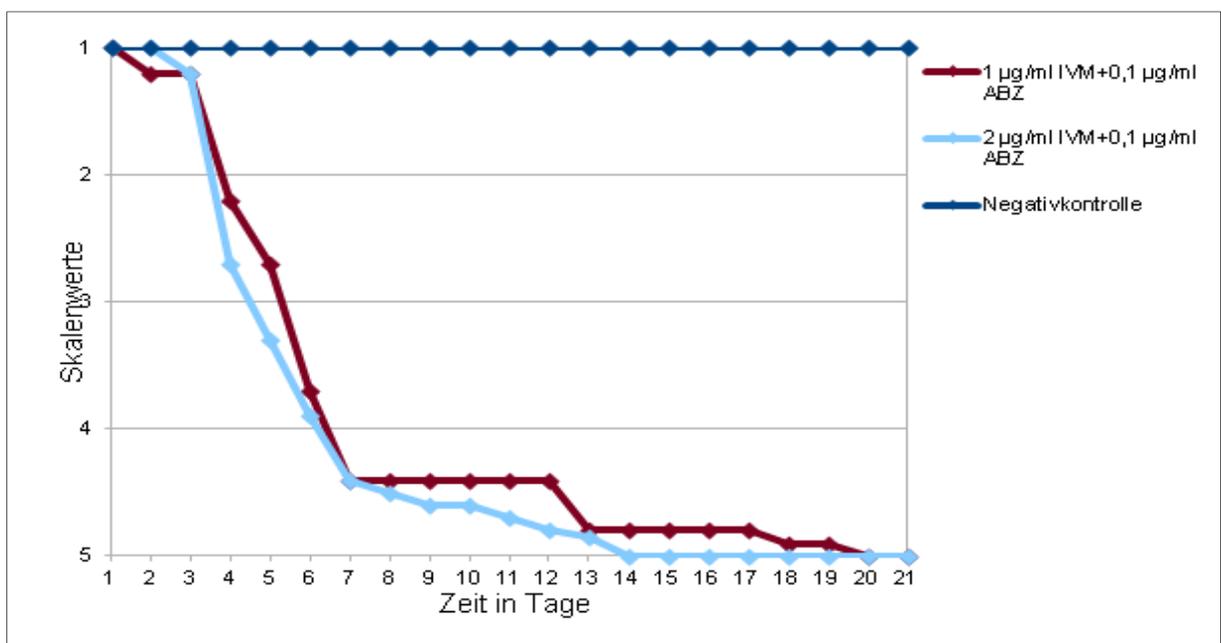


Abbildung 14: Wirkung verschiedener Konzentrationen von Ivermectin (IVM) in Kombination mit 0,1 µg/ml Albendazol (ABZ) im Vergleich zu Ivermectin auf Vesikel von *Echinococcus multilocularis*.

Die Kombination von IVM in den Konzentrationen 1 µg/ml und 2 µg/ml mit 0,1 µg/ml ABZ zeigte einen markanten schädigenden Effekt als IVM einzeln. Während

1 µg/ml und 2 µg/ml IVM alleine keine Wirkung zeigten, zeigten 5 µg/ml und 10 µg/ml eine Wirkung, die auf die gleichzeitig abgestorbenen HepG2-Zellen zurückzuführen ist, wodurch der Versuch nicht weiter in Betracht gezogen werden kann.

Somit wird der Metabolismus von ABZ durch IVM so verändert, dass eine Konzentration an ABZ von 0,1 µg/ml eine sehr effektive Wirkung auf Vesikel von *E. multilocularis* in kurzer Zeit erzielt.

In einem weiteren Experiment wurde wiederum die Blockade des CYP-Enzyms mit RTV induziert. In diesem Versuch wurde RTV in der Konzentration von 1 µg/ml in Kombination mit 1 µg/ml IVM untersucht. RTV in der Konzentration von 1 µg/ml verändert die Vesikelmorphologie nicht (Abb. 16).

Allerdings zeigte bei den Kombinationen der oben genannten Konzentrationen keine Wirkung.

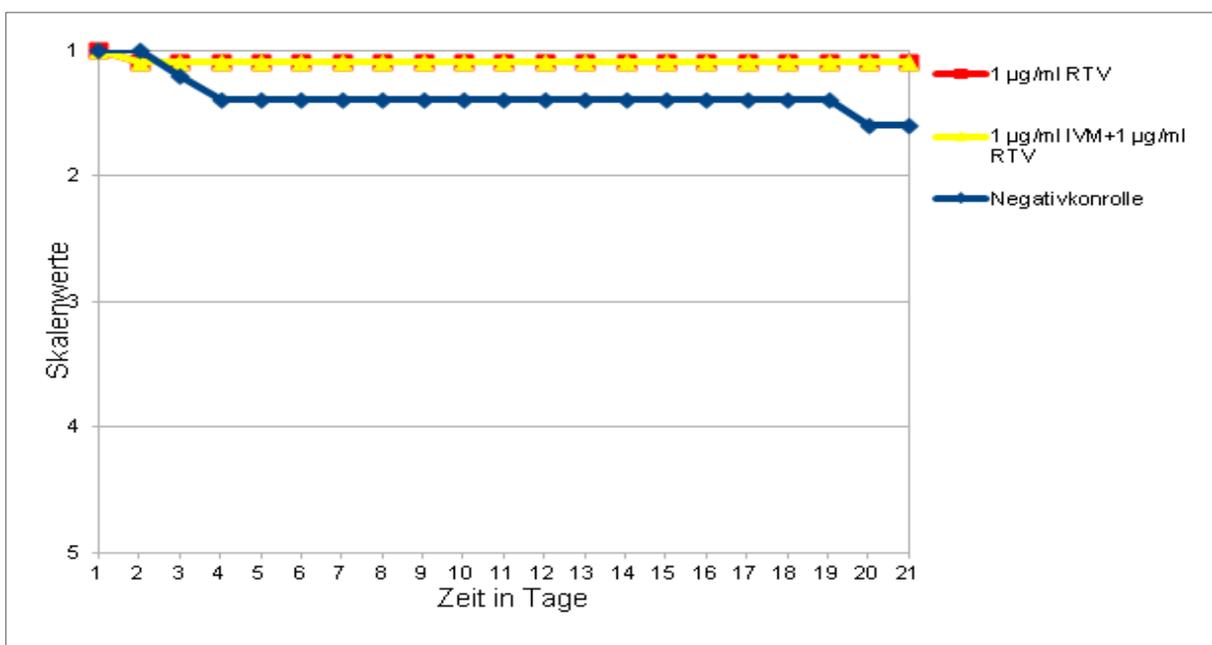


Abbildung 15: Effekt der Kombinationsbehandlung von Ritonavir (RTV) in einer niedrigen Konzentration mit Ivermectin (IVM).

In einem weiteren Versuch wurde RTV in einer höheren Konzentration von 10 µg/ml mit 1 µg/ml IVM kombiniert. Es zeigte sich, wie bei der RTV-Monosubstanz, keine Wirkung.

Genau wie die Einzelsubstanzen zeigt IVM mit RTV keine schädigende Wirkung auf Vesikel von *E. multilocularis*. Das würde bedeuten, dass die starke Wirkung

der oben genannten Kombinationen von ABZ mit IVM von ABZ selbst hervorgerufen wird. IVM und RTV verändern über die Wirkung auf CYP-Enzym den Metabolismus von ABZ , sodass die kleinste Konzentration an ABZ eine starke schädigende Wirkung zeigt.

Nachdem sich herausstellte, dass eine Konzentration von 0,01 µg/ml ABZ in Anwesenheit von HepG2-Zellen keine Wirkung zeigte, wurde es nun in diese Konzentration mit 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml IVM kombiniert. Als Referenz wurde wiederum ABZ in der Konzentration von 0,01 µg/ml getestet.

Bei der Kombination von 1 µg/ml und 2 µg/ml µg/ml IVM mit 0,01 µg/ml ABZ zeigte sich keine Wirkung. Wie bei der Negativkontrolle waren die Vesikel vollständig unbeschädigt. Es zeigt sich also, dass die Kombination mit einer solchen geringen Konzentration von ABZ keine schädigende Wirkung ergibt.

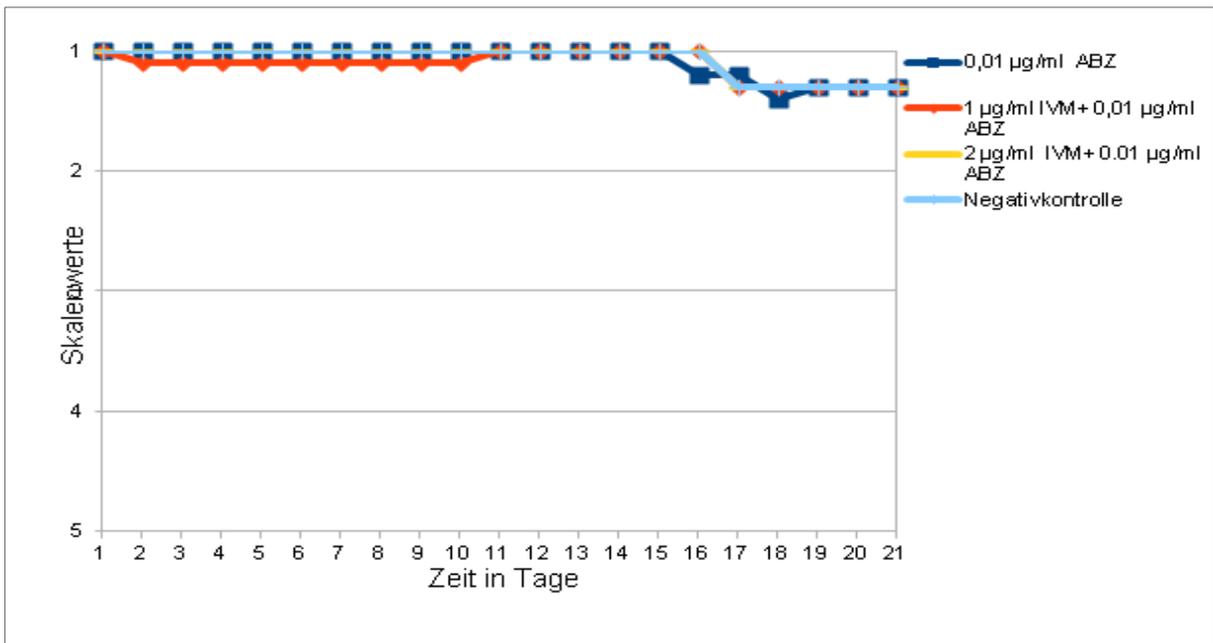


Abbildung 16: Wirkung verschiedener Konzentrationen von Ivermectin (IVM) in Kombination mit 0,01 µg/ml Albendazol (ABZ) auf Vesikel von *Echinococcus multilocularis*.

3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse der untersuchten Substanzen und deren Kombinationen:

Tabelle 3: Zusammenfassung der geprüften Substanzen und ihrer Wirkungen.

Substanzen	Wirkung
Albendazol ohne HepG2 Zellen	Zunehmende Schädigung der Vesikel bei allen Konzentrationen und sogar ohne Pharmakon.
Albendazol mit HepG2-Zellen	50%-ige Schädigung: Bei 10 µg/ml ist am 5-6 Tag, 1 µg/ml am 8-10 Tag, 0,1 µg/ml am 12 Tag erreicht. 0,01 µg/ml zeigt keinen Effekt.
Ritonavir als Proteaseinhibitor	Keine schädigende Wirkung auf Vesikel von <i>Echinococcus multilocularis</i> .
Ritonavir + Albendazol	Sehr starke schädigende Wirkung auf Vesikel von <i>Echinococcus multilocularis</i> . 50%-ige Schädigung ist am 3 Tag erreicht.
Praziquantel und Ivermectin, jeweils getrennt	Keine schädigende Wirkung auf Vesikel von <i>Echinococcus multilocularis</i> .
Albendazol + Praziquantel	Sehr starke schädigende Wirkung auf Vesikel von <i>Echinococcus multilocularis</i> . 50%-ige Schädigung ist am 3 Tag erreicht.
Ritonavir + Praziquantel	Keine schädigende Wirkung auf Vesikel von <i>Echinococcus multilocularis</i> .
Albendazol + Ivermectin	Sehr starke schädigende Wirkung auf Vesikel von <i>Echinococcus multilocularis</i> 50%-ige Schädigung ist je nach Konzentration am 4-6 Tag erreicht.
Ritonavir + Ivermectin	Keine schädigende Wirkung auf Vesikel von <i>Echinococcus multilocularis</i> .

1. HepG2-Zellen sind erforderlich für das Wachstum der Vesikel von *Echinococcus multilocularis in vitro*.
2. Der Metabolismus von Albendazol wird durch die Kombination mit dem Proteaseinhibitor Ritonavir als „Baby dose“-Dosierung verändert. In der

Kombinationstherapie wirken selbst kleine Konzentrationen ABZ wesentlich stärker schädigend als hohe Konzentrationen ABZ-Monosubstanz.

3. Die Kombination von ABZ mit Anthelminthika wie PZQ und IVM in niedriger Konzentration „Baby dose“ schädigt die Vesikel von *E. multilocularis in vitro* stärker als ABZ Monosubstanz. Die Kombination der Anthelminthika PZQ und IVM mit dem Proteaseinhibitor RTV wirkt nicht schädigend auf Vesikel von *E. multilocularis*. Bei der Kombination ABZ mit PZQ und ABZ mit IVM wird die Hauptwirkung somit durch ABZ erzielt.

4. Diskussion:

4.1. Wirkung von ABZ verschiedener Konzentration bei An-/Abwesenheit von Feeder-Zellen:

Bei Fehlen jeglicher Prüfsubstanzen kommt es zu einer raschen Vesikelschädigung, wenn keine Feeder-Zellen (HepG2-Zellen) vorhanden sind (Abb. 7). Auch bei der Negativkontrolle wurde stets eine Schädigung der Vesikel beobachtet. Diese Beobachtung deckt sich mit der von Jura et al. (Jura et al., 1996).

Dies lässt vermuten, dass, wie jeder Organismus, auch die Metazestode von *E. multilocularis* Wachstumsfaktoren von Zellen eines möglichen Zwischenwirtes benötigt (Hemphill and Gottstein, 1995), (Jura et al., 1996), (Spiliotis et al., 2004). Wie schon oben beschrieben, befällt der *E. multilocularis* hauptsächlich die Leber, da er hier die besten Wachstumsfaktoren vorfindet, die sein Überleben garantieren. Die HepG2-Zellen stellen die Quelle dieser Wachstumsfaktoren dar. Sie garantieren den Metazestoden bzw. Vesikeln im *vitro*-System ihre Intaktheit.

Wie in Abb. 8,9 gezeigt wurde, entfaltet eine niedrige Konzentration von 0,1 µg/ml ABZ bei Vorhandensein der Feeder-Zellen eine schwache Wirkung auf Vesikel von *E. multilocularis*. Die Wirkung einer solch niedrigen Konzentration wurde von Reuter et al. 2006 nicht untersucht. Jura et al., 1996 testeten nur niedrige Konzentrationen MBZ, wohingegen niedrige Konzentrationen ABZ nicht untersucht wurden.

Dabei benutzten Jura et al. humane und murine Leberzellen als Feeder-Zellen, die in Kollagen eingebettet waren. Der Einfluss von MBZ wurde per Lichtmikroskop beobachtet. In der Arbeitsgruppe der Universität Ulm (Prof. Kern und Prof. Reuter) wurden nur humane Leberzellen benutzt. In den verschiedenen Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden die Vesikel makroskopisch und mikroskopisch bewertet. Dieses geschah täglich anhand einer Skala (1-5). Reuter et al. 2006

bewerteten die Vesikel anhand ihrer Anzahl. Vesikel, die an Turgor verloren haben, und solche, die zerfallen sind, wurden als geschädigt verwertet und damit nicht mehr dokumentiert. Es wurde die Proliferation der Vesikel anhand ihrer Anzahl bzw. ihrer Größe beurteilt.

Damit erfolgte in den verschiedenen Versuchen der Universitäten Ulm und Würzburg keine biochemische Messung (Bestimmung vom *EmAP*). *EmAP* wurde von einer Berner Arbeitsgruppe in Vesikelflüßigkeit, Metazestodenextraktionen und Mediumüberstände zur Beurteilung der Kultivierung von Vesikel *in vitro* verwendet (Hemphill et al., 1995).

4.2. Beeinflussung des Metabolismus von ABZ durch den Protease-Hemmer RTV:

Die Kombination von ABZ mit RTV zeigte einen deutlichen Effekt im Vergleich zu den ABZ allein. RTV ist einer der wichtigsten CYP-Inhibitoren. Die hauptsächliche Hemmung wird auf CYP3A4 und CYP2D6 ausgeübt (Kumar et al., 1996), (Eagling et al., 1997). ABZ wird durch CYP3A4 und Flavinmonooxygenase zu ABZSO und durch CYP1A2 zu ABZSN metabolisiert (Rawden et al., 2000), (Galtier et al., 1991). Damit würde eine Hemmung des CYP3A4-Enzyms durch RTV eine Verlangsamung des Abbaus von ABZ bedeuten und vermutlich über längere Zeit eine Erhöhung dessen Spiegels. In verschiedenen Tiermodellen wurde durch Gabe von ABZ mit einem CYP3A4-Enzym Hemmer wie z.B. Cyclosporin oder Ketoconazol eine Erhöhung der Plasmakonzentration an ABZ gefunden (Merino et al., 2003).

RTV ist, wie ABZSO, ein Substrat von P-gp. Jedoch verursacht RTV zusätzlich eine Hemmung von P-gp und MRP2. Dies konnte in einem Versuch zur Untersuchung der Interaktion zwischen RTV und Cyclosporin A, welches auch ein Substrat von P-gp ist, und Methotrexat, welches ein MRP2-Substrat ist, festgestellt werden (Gutmann et al., 1999). Wie es schon oben beschrieben wurde, ist ABZSO Hauptsubstrat der MRP2 und P-gp-Transporter. Da diese Transporter für die Clearance von Substraten eine große Rolle spielen, wird vermutlich durch die Hemmung der P-gp und MRP2-Transporter durch RTV, die Clearance und Abbau

von ABZ und ABZSO verlangsamt und damit auch die Konzentration von ABZSO länger erhöht.

Durch diese verschiedenen Mechanismen bleibt eventuell die Konzentration an ABZSO für längere Zeit erhöht und wird langsamer verstoffwechselt. Gleichzeitig wird die Clearance von ABZSO über P-gp und MRP2 ins Medium über die Pseudokanalikuli vermindert ausgeschieden. *In vitro* verursachte ABZSO eine Erhöhung der *EMAP* in Mediumüberständen, und somit im Verlauf eine schädigende Wirkung auf Metazestoden von *E. multilocularis* (Stettler et al., 2003).

Der Metabolismus von ABZ wird durch kleine Gaben von RTV so verändert, dass bereits niedrige Konzentrationen an ABZ einen starken Effekt auf *E. multilocularis*-Vesikel zeigen (siehe Abb. 9,10). Auf der anderen Seite erfahren nicht alle CYP-Enzyme durch RTV eine Hemmung (Yeh et al., 2006) (Vourvahis and Kashuba, 2007). Es besteht u.a. eine Induktion des Enzyms CYP1A2 durch RTV. Dies würde eine Beschleunigung des Abbaus von ABZSO bedeuten, was über das gleiche CYP-Isoenzym zu ABZSN metabolisiert wird (Souhaili-El Amri et al., 1988), (Galtier et al., 1991). Dies würde zu einem schnelleren Abfall von ABZSO und einer verminderten Wirkung der Kombination von ABZ mit RTV bedeuten. Der dadurch entstehende schwächende Effekt wurde scheinbar durch die Hemmung von CYP-3A4 und P-gp bzw. MRP2-Transporter unterdrückt .

Durch diese Kombination wurde die Wirkung von ABZ so verstärkt, dass sie den schädigenden Effekt einer 100-fach höher konzentrierten ABZ-Gabe übertraf (Abb. 9, 10).

In einem klinischen Fallbericht wurde eine verlangsamte Progression von *E. multilocularis* beobachtet. Dabei wurde ein HIV Patient, der mit *E. multilocularis* coinfiziert war, mit MBZ und RTV gleichzeitig behandelt (Zingg et al., 2004). Die weitere Progression von *E. multilocularis* konnte damals bei der Spiegelmessung mit einem zwanzigstel der Standardkonzentration an MBZ verhindert werden.

Damit lässt sich beweisen, dass eine Kombination von ABZ mit RTV einen deutlich besseren schädigenden Effekt auf Vesikel von *E. multilocularis in vitro* hat. Das würde mit der Beobachtung von Zingg et al. übereinstimmen, die eine verlangsamte Progression von *E. multilocularis* unter Benutzen der gleichen

Kombination (ABZ mit RTV) feststellten. Es bleibt weiterhin unklar, wie sich der Spiegelverlauf von ABZ und ABZSO verhält. Eine Bestimmung der Spiegel beider Substanzen wurde leider aus dem Kultursystem nicht verlässlich erfolgt.

4.3. Einfluss von PZQ in der Kombination mit ABZ:

In den oben beschriebenen Versuchen wurde PZQ verschiedener Konzentration auf Vesikel von *E. multilocularis* untersucht. Bemerkenswerterweise entfaltet PZQ keinen schädigenden Effekt. Patzschke et al. beschrieben 1979, dass PZQ fast komplett im Intestinaltrakt resorbiert wird. Andrew et al. 1983 stellten fest, dass PZQ einen sehr starken und schnellen Metabolismus bzw. first pass Effekt in der Leber durchläuft, was zum inaktiven Metaboliten führt. Dieser schnelle Metabolismus erfolgt *in vitro* bei Anwesenheit von Rattenleberzellen innerhalb 4 Stunden (Meier and Blaschke, 2001). Das könnte der Grund dafür sein, dass PZQ in den getesteten Konzentrationen unwirksam war.

Hingegen verursacht die Kombination von ABZ mit PZQ eine verstärkte Schädigung auf Vesikel von *E. multilocularis*. ABZ als Einzelsubstanz gleicher Konzentration wirkte deutlich langsamer und schwächer als die Kombination (Abb. 9,12). PZQ wird hauptsächlich durch CYP-Enzym rasch metabolisiert. R. Bertz und R. Granneman konnten 1997 zeigen, dass PZQ durch CYP metabolisiert wird, eine genaue Eingrenzung auf ein Isoenzym fand leider nicht statt. Eine Studie zur Untersuchung der Interaktion von Grapefruitsaft, der hauptsächlich CYP 3A4 hemmt, legt die Vermutung nahe, dass PZQ über dieses Isoenzym metabolisiert wird (Castro et al., 2002), (Godawska-Matysik and Kieć-Kononowicz, 2006). Da ABZ zum größten Teil durch CYP3A4 metabolisiert wird, ist eine Konkurrenz zwischen PZQ und ABZ um dieses Enzym anzunehmen. Vermutlich wird PZQ stärker vom CYP3A4-Enzym metabolisiert und ABZ langsamer. Dadurch wurden sehr geringe Konzentrationen von ABZ so verändert, dass diese zu einer längeren Wirkung von ABZ und ABZSO führten. Die Kombination ABZ mit PZQ wirkt stärker schädigend als ABZ allein.

ABC-Transporter spielten wahrscheinlich dabei keine Rolle, da PZQ keine Wirkung auf P-gp bei der Untersuchung auf LLC-PK1 (renale Epithel Zelllinie) hat (Dupuy et al., 2010).

Eagling konnte bereits zeigen, dass RTV CYP-Enzyme hemmt. Hauptsächlich werden CYP3A4 und CYP2D9 gehemmt. PZQ wird, wie schon oben beschrieben, von CYP3A4 metabolisiert. Somit würden diese unterschiedlichen Abbauege von RTV und PZQ über CYP-Enzyme zu einem verlangsamten Metabolismus von PZQ und vermutlich zu einem verbleibenden erhöhten Spiegel von PZQ führen, was trotzdem keine schädigende Wirkung auf die Vesikel der *E. multilocularis* entfaltet. Während RTV zusammen mit ABZ eine rasche Wirkung verursachte, entfaltet RTV mit PZQ keine Wirkung. Dies lässt den Umkehrschluss zu, dass die starke Wirkung der Kombination ABZ mit PZQ hauptsächlich durch ABZ bedingt wird. Daraus lässt sich folgern, dass das Anthelminthikum PZQ und der Proteasehemmer RTV vor allem für die Verlangsamung des Metabolismus von ABZ verantwortlich sind. Die Wirkung dieser Kombinationen PZQ mit ABZ und RTV mit ABZ kommt allein durch ABZ und seinen Metabolit ABZSO zustande. In einer Arbeit wurde die Kombination von ABZ mit PZQ an gesunden Freiwilligen untersucht (Lima et al., 2011). Es zeigte sich eine sehr starke Erhöhung der Konzentration von ABZSO. (+) ABZSO-Enantiomer wurde um 264 % und der (-) ABZSO-Enantiomer um 358% erhöht. Es zeigte sich aber dabei nur eine geringe Erhöhung vom (-) PZQ-Enantiomer um 64,77 % und eine unveränderte Kinetik vom (+) PZQ-Enantiomer (Lima et al., 2011). Das verstärkt die Vermutung, dass die bei der vorliegenden Arbeit erzielte verstärkte schädigende Wirkung durch ABZ verursacht wurde.

4.4. Einfluss von IVM in der Kombination mit ABZ:

IVM zeigte in den Konzentrationen von 1 und 2 µg/ml keine Wirkung. Die Konzentrationen von 5 und 10 µg/ml schädigten alle Vesikel sowie die Feeder-Zellen. Aus diesem Grund ist die Verwendung einer hohen Konzentration IVM nicht aussagefähig, da die Feeder-Zellen zugrunde gehen (Abb. 14). Bray et al. 1999 beschrieben keine Aufnahme von Glucose in Zellen unter Behandlung mit IVM. Dies könnte der Grund dafür sein, dass HepG2-Zellen mit diesen Konzentrationen zugrunde gegangen sind. Vermutlich stieg die Osmolarität im Medium unter der Gabe von IVM an, sodass die HepG2-Zellen an Turgor verloren haben, was die Ursache für Schädigung der Vesikel darstellen könnte.

Im Vergleich zur Behandlung mit IVM konnte durch die kombinierte Gabe von ABZ mit IVM eine deutliche Potenzierung des schädigenden Effektes auf Vesikel von *E. multilocularis* erreicht werden. Während 1 oder 2 µg/ml IVM keine Wirkung zeigten, konnte durch die Kombination mit 0,1 µg/ml ABZ eine schädigende Wirkung erreicht werden. Es entstand durch die Kombination eine bessere und schnellere schädigende Wirkung auf Vesikel der *E. multilocularis* als durch ABZ allein (Abb. 9,15). Die Zeit bis zu einer 50% Schädigung der Vesikel konnte bei einer Kombination von 1 µg/ml IVM mit 0,1 µg/ml ABZ um etwa 5-6 Tage im Vergleich zur Behandlung mit 0,1 µg/ml ABZ verkürzt werden. Trotz der sehr niedrigen Konzentration an ABZ erzielte man im Versuch mit dieser Kombination eine fast gleiche Wirksamkeit wie die 100-fache Konzentration (10 µg/ml) von ABZ.

Zur Erklärung der stärkeren schädigenden Wirkung bei der Kombination von IVM und ABZ gibt es mehrere Hypothesen: Zum einen der Metabolismus durch CYP-Enzyme zum anderen die Interaktion mit P-gp und MRP-Transportern sowie der osmotische Druck durch Glukose und Elektrolyte.

Erstens wird IVM wiederum hauptsächlich durch das Enzym CYP3A4 bei Menschen metabolisiert (Zeng et al., 1998). Man kann annehmen, dass durch die Konkurrenz von ABZ und IVM um CYP3A4 auch eine verlangsamte Metabolisierung und Abbau von ABZ verursacht.

Zweitens ist IVM ein Substrat von MRP1, MRP2 und P-gp (Didier and Loor, 1996), (Pouliot et al., 1997), (Lespine et al., 2006). Auf der anderen Seite ist ABZSO ein Substrat der P-gp und MRP 2 (Merino et al., 2003). Dies führt vermutlich wiederum zu einem verlangsamten Abbau und Abtransport von ABZSO. Molento et al. testete 2003 die Wirkung der Kombination von IVM mit Verapamil. Verapamil ist ein P-gp und CYP3A4-Hemmer. Es wurde gezeigt, dass die maximale IVM Konzentration bei der Kombination höher als die der Monotherapie war. Die vermutete Wirkung wurde damals hauptsächlich auf die Hemmung von P-gp im *in vivo* System zurückgeführt. Dies weist auf die Wichtigkeit von p-gp beim Abbau vom IVM hin. Auch *in vitro* konnte bei einer Kombination von IVM mit Azithromycin nachwiesen werden, dass P-gp eine große Rolle beim Metabolismus von IVM *in vitro* spielen (El-Tahtawy et al., 2008). Damit könnte vermutlich eine Konkurrenz

von IVM und ABZSO um die MRP-Transporter und die P-gp stattfinden, was die Konzentration von ABZSO vermutlich länger erhöht bzw. den Abbau von ABZSO verlangsamt.

Drittens stellten Bray et al. 1999 fest, dass unter Behandlung mit IVM keine Aufnahme von Glucose in Zellen stattfindet. Tote et al. beschrieben 1990, dass der Transport von Glucose durch die Hemmung der Polymerisation von Tubuli durch ABZ erschwert ist. Somit könnte eventuell die Konzentration von Glucose außerhalb der HepG2 Zellen erhöht werden, was einen verstärkten osmotischen Druck im Kulturmedium der Vesikel aufbaut. Damit könnte ein verstärkter Verlust von Vesikelflüssigkeit durch den erhöhten osmotischen Druck entstehen. Dadurch erfolgt eine verstärkte Schrumpfung, was eine verstärkte Schädigung der Vesikel begünstigt. Arise et al. konnten 2009 bereits *in vivo* eine erhöhte Glucosekonzentration im Blut bei der Kombinationstherapie von ABZ und IVM nachweisen.

Die Konkurrenz um CYP-Enzyme, MRP-2 und P-gp-Transporter bzw. der Aufbau eines erhöhten osmotischen Druckes im Medium sind in ihrer Summe vermutlich für den verstärkten schädigenden Effekt der Kombination von ABZ mit IVM ursächlich. Somit wird der Metabolismus von ABZ durch IVM so verändert, dass selbst eine niedrige Konzentration an ABZ eine sehr starke schädigende Wirkung auf Vesikel von *E. multilocularis* in kurzer Zeit erzielt.

In vivo ist die verstärkte schädigende Wirkung von IVM in Kombination mit ABZ bereits bei anderen Erkrankungen wie z. B. Zystische Echinokokkose und Gastrointestinale Nematoden untersucht (Casado et al., 2002), (Alvarez et al., 2008). Eine Kombination von IVM mit ABZ auf *E. multilocularis*-Larven *in vivo* ist noch nicht getestet worden.

IVM kann in sehr hohen Konzentrationen ZNS Nebenwirkungen verursachen. Die Bioverfügbarkeit von IVM liegt bei etwa 50% (Ottesen and Campbell, 1994). Eine orale Dosis von IVM bis 120 mg wöchentlich wurde am Menschen getestet ohne relevante Unverträglichkeiten (Guzzo et al., 2002). Auch in einer Studie von 400 Patienten, die mit bis 400 µg/kg täglich mit IVM behandelt wurden, waren die Nebenwirkungen sehr gering (Martin-Prevel et al., 1993).

Bei der Kombination von RTV mit IVM verschiedener Konzentrationen konnte kein schädigender Effekt auf Vesikel von *E. multilocularis* nachgewiesen werden. Abb. 16 und 12 zeigen einen gleichen Kurvenverlauf der Kombination wie die Einzelsubstanzen. Da IVM mit ABZ bzw. RTV mit ABZ einen sehr starken schädigenden Effekt auf Vesikel von *E. multilocularis* entfalten und RTV mit IVM keinen schädigenden Effekt auf Vesikel hat, lässt dies wiederum den Umkehrschluss zu, dass die Hauptwirkung der Kombinationen durch ABZ geleistet wird. Die kleinen Dosen an IVM verändern nur den Metabolismus und die Clearance von ABZ und seiner Metaboliten, sodass es zur verstärkten schädigenden Wirkung auf Vesikel von *E. multilocularis* kommt.

Im Grunde entspricht der verstärkte schädigende Effekt der Kombination ABZ mit IVM sowie ABZ mit PZQ dem gleichen Effekt wie bei der Kombination von ABZ mit NTX (Stettler et al., 2004). Es war nicht ganz klar, wie dieser verstärkte Effekt bei der Kombination ABZ mit NTX zustande kommt. Am ehesten war das durch den Metabolismus von ABZ und NTX über das gleiche Enzym oder Enzymkomplex verursacht (Stettler et al., 2004). NTX wird dadurch stärker zu den Metaboliten Tizoxanid und Tizaxonid-Glucose verstoffwechselt und damit bleibt gleichzeitig die Konzentration der anderen Substanz (ABZ) bzw. ihrer Metaboliten (ABZSO) länger erhöht (Stettler et al., 2004). In Studien hat sich gezeigt, dass weder NTX noch sein Metabolit Tizoxanid eine Interaktion mit CYP-Enzymen hat (Rossingol, 2009). Während vermutlich CYP-Enzyme bei der Kombination von ABZ mit NTX keine Rolle spielten, sind sie ein wichtiger Baustein bei der vorliegenden Arbeit. Leider konnten die ABZSO Spiegel aus dem Kultursystem nicht verlässlich bestimmt werden, um diese Hypothese weiter abzusichern.

4.5. Einsatzpunkte untersuchter Kombinationen:

Eine Substanzkombination wurde zum ersten Mal gegen Lepra, Tuberkulose und später auch HIV eingesetzt. Das Ziel der kombinierten Therapie ist einen summierenden Effekt mit einer niedrigeren Konzentration zu erzielen und damit gleichzeitig das Nebenwirkungspotenzial zu verringern. Auch der Resistenzenbildung durch eine Monotherapie soll vorgebeugt werden.

Wie aus den Versuchen zu entnehmen ist, konnte die *in vitro* applizierte Dosis von ABZ in der Kombination mit anderen Substanzen stark reduziert werden. Dies ist besonders wichtig bei Patienten, die Lebererkrankungen und Toxizität durch hohe Spiegel bei einer ABZ Therapie haben. Ein Todesfall im Zusammenhang mit der ABZ Therapie eines Patienten mit *E. granulosus*, der gleichzeitig eine Leberzirrhose Child B hatte, wurde beschrieben (Opatrny et al., 2005). Es wurde während der dritten Woche der Therapie mit ABZ eine Panzotyponie beobachtet, die anschließend zum Tode führte. Durch die Dosisreduktion an ABZ können solche lebensbedrohliche Nebenwirkungen vermieden werden.

Die Kombinationstherapie von ABZ mit dem Protease-Inhibitor RTV könnte eine vielversprechende Maßnahme bei Patienten mit HIV Infektion und gleichzeitiger Infektion mit *E. multilocularis* darstellen. Sailer et al. berichteten 1997 von einem 6-jährigen Mädchen mit einer HIV Infektion. Es wurde bei ihr eine schnell fortschreitende Infektion mit alveolärer Echinokokkose beobachtet. Obwohl Erfahrungen mit Koinzidenz von HIV und alveolärer Echinokokkose eine extreme Rarität ist, könnte die medikamentöse Kombination ABZ mit RTV bei nicht mit HIV infizierten Patienten eingesetzt werden. Vor allem in niedrigen Konzentrationen ist RTV gut verträglich.

Attraktiver ist jedoch die Kombinationstherapie von Anthelminthika wie ABZ mit IVM oder mit PZQ. Dies könnte besonders in den Tropen bei Koinzidenz mehrerer Wurmspezies, u. a. den Echinokokken, bedeutend sein.

Unter der Kombination von Anthelminthika IVM und PZQ mit ABZ sowie des Protease-inhibitors RTV mit ABZ könnte bei ausreichender Wirkung eine Dosisreduktion und damit eine Minimierung des Nebenwirkungspotenzials erzielt werden. Dies scheint auch ein vielversprechender Therapieansatz des *E. multilocularis* zu sein.

Um diese Resultate abzusichern, sind weitere präklinische Untersuchungen der getesteten Substanzen im Mausmodell notwendig.

5. Zusammenfassung:

Die alveoläre Echinokokkose ist eine der gefährlichsten parasitären Erkrankungen. Süddeutschland ist ein Endemiegebiet für diese Erkrankung. Benzimidazole wie zum Beispiel Albendazol und Mebendazol sind Standardtherapeutika. Für die Therapie sind jedoch hohe Konzentrationen erforderlich, was mit einem vermehrten Auftreten von Nebenwirkungen verbunden ist. Da die Infektion eine lange Latenzzeit hat und die Erkrankung daher erst spät entdeckt wird, beginnt die medikamentöse Therapie der tumorartig invasiv wachsenden Herde spät. Bei einigen Patienten schlägt die Therapie in diesem Stadium nicht mehr an, sodass die Prognose verschlechtert und die Überlebenszeit verkürzt ist.

Das Ziel unserer Versuche war es, verschiedene Medikamente sowohl alleine als auch in Kombination mit anderen Medikamenten zu testen, um alternative Therapien mit möglichst geringen Konzentrationen und damit eventuell geringen Nebenwirkungen zu finden.

Methodik:

In einem *in vitro* Modell wurde Metazestodengewebe angezüchtet und weiter kultiviert. Die Substanzen wurden in verschiedenen Konzentrationen und in Kombination mit anderen Wirkstoffen getestet. Es galt herauszufinden, ob die Konzentration der einzelnen Substanz in Kombination reduziert werden konnte, ohne dabei die Wirkung *in vitro* zu vermindern. Bei der Auswahl der getesteten Substanzen wurde ihren Metabolismus über Cytochrom-P450 Enzyme berücksichtigt.

Ergebnisse:

Albendazol war die einzige Substanz, die in sehr niedriger Konzentration noch eine Wirkung auf Vesikel von *Echinococcus multilocularis* zeigte. In Kombination mit Praziquantel war die Wirkung mit vollständiger Schädigung innerhalb von vier Tagen ablesbar. Auch die Kombination von dem Proteaseinhibitor Ritonavir mit Albendazol in niedrigster Konzentration war fast gleich effektiv wie die Kombination von Praziquantel mit Albendazol oder von Ivermectin mit Albendazol.

Die Wirkung, die so erreicht werden konnte, war stärker als die von Albendazol in 100-facher höherer Konzentration.

Metazestodengewebe und die entstehenden Vesikel von *Echinococcus multilocularis* bleiben *in vitro* nur in Anwesenheit von Humanen Leberzellen intakt.

Schlussfolgerung:

Die Kombination der Anthelminthika Albendazol, einem Benzimidazolderivat, mit Ivermectin und Praziquantel könnte eine mögliche Alternative zur Standardtherapie sein. Es ist anzunehmen, dass Ivermectin und Praziquantel den Metabolismus von Albendazol verändern und damit die suffizienten Spiegel von Albendazol erzielen. Eine maximale Schädigung der Vesikel ist erreicht. Auch die Kombination von Albendazol mit dem Protease-inhibitor Ritonavir, ein Cytochrom P450-Inhibitor, zeigte effektive Wirkung *in vitro*. Diese ausgeprägte schädigende Wirkung verschiedener Kombinationen auf Vesikel von *Echinococcus multilocularis* beruht auf der Veränderung des Metabolismus von Albendazol durch Wirkung auf Cytochrom-P450 Enzyme sowie Efflextansporter P-Glykoproteine und Multidrugresistanceproteine.

Diese Resultate regen die Durchführung präklinischer Versuche *in vivo* (Maus) an, um die zeitliche Abfolge der Kombinationen festlegen zu können und damit eine Empfehlung zur Anwendung beim Menschen erwogen werden kann.

6. Literatur:

1. Alvarez, L., Lifschitz, A., Entrocasso, C., Manazza, J., Mottier, L., Borda, B., Virkel, G., Lanusse, C. (2008). Evaluation of the interaction between ivermectin and albendazole following their combined use in lambs. *J Vet Pharmacol Ther* 31, 230–239.
2. Ammann, RW., Hirsbrunner, R., Cotting, J., Steiger, U., Jacquier, P., Eckert, J. (1990). Recurrence rate after discontinuation of long-term mebendazole therapy in alveolar echinococcosis (preliminary results). *Am J Trop Med Hyg* 43, 506-515.
3. Ammann, RW., Eckert, J. (1996). Cestodes. Echinococcus. *Gastroenterol Clin North Am* 25, 655-689.
4. Andrews, P., Thomas, H., Pohlke, R., Seubert, J. (1983). Praziquantel. *Med Res Rev* 3, 147-200.
5. Anonymous. (1996). Guidelines for treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. WHO Informal Working Group on Echinococcosis. *Bull World Health Organ* 74, 231-242.
6. Arena, JP., Liu, KK., Paress, PS., Frazier, EG., Cully, DF., Mrozik, H., Schaeffer, JM. (1995). The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity. *J Parasitol* 81, 286-294.
7. Asteinza, J., Camacho-Carranza, R., Reyes-Reyes, RE., Dorado-González, V., acute accent]ctor, and Espinosa-Aguirre, JJ. (2000). Induction of cytochrome P450 enzymes by albendazole treatment in the rat. *Environ Toxicol Pharmacol* 9, 31-37.
8. Axelson, M., Mörk, B., Everson, GT. (1991). Bile acid synthesis in cultured human hepatoblastoma cells. *J Biol Chem* 266, 17770-17777.

9. Benet, LZ., Cummins, CL. (2001). The drug efflux-metabolism alliance: biochemical aspects. *Adv Drug Deliv Rev* 50 *Suppl 1*, S3-11.
10. Becker, B., Mehlhorn, H., Andrews, P., Thomas, H. (1980a). Scanning and transmission electron microscope studies on the efficacy of praziquantel on *Hymenolepis nana* (Cestoda) in vitro. *Z Parasitenkd* 61, 121-133.
11. Becker, B., Mehlhorn, H., Andrews, P., Thomas, H., Eckert, J. (1980b). Light and electron microscopic studies on the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium dendriticum*, and *Fasciola hepatica* (Trematoda) in vitro. *Z Parasitenkd* 63, 113-128.
12. Borst, P., Elferink, R. O. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71, 537-592.
13. Bouma, ME., Rogier, E., Verthier, N., Labarre, C., Feldmann, G. (1989). Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line HepG2: morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. *In Vitro Cell Dev Biol* 25, 267-275.
14. Bray, JJ., Mills, RG., Sayer, RJ., Sheard, PW. (1999). Blood: In *Lecture Notes on Human Physiology*. 4th ed. pp. 283-313.
15. Brunetti, E., Kern, P., Vuitton, DA. (2010). Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop* 114, 1-16.
16. Buttenschoen, K., Kern, P., Reuter, S., Barth, TFE. (2009). Hepatic infestation of *Echinococcus multilocularis* with extension to regional lymph nodes. *Langenbecks Arch Surg* 394, 699-704.
17. Campbell, WC. (1985). Ivermectin: an update. *Parasitol Today (Regul. Ed.)* 1, 10-16.
18. Cantz, T., Nies, A. T., Brom, M., Hofmann, AF., Keppler, D. (2000). MRP2, a human conjugate export pump, is present and transports fluo 3 into apical vacuoles of Hep G2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278, G522-531.

19. Casado, N., Moreno, M.J., Urrea-París, M.A., Rodríguez-Caabeiro, F. (2002). Could ivermectin have a synergic effect with albendazole in hydatidosis therapy?. *Parasitol Res* 88, 153-159.
20. Castro, N., Jung, H., Medina, R., González-Esquivel, D., Lopez, M., Sotelo, J. (2002). Interaction between grapefruit juice and praziquantel in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 1614-1616.
21. Cheeseman, C.L., Delany, N.S., Woods, D.J., Wolstenholme, A.J. (2001). High-affinity ivermectin binding to recombinant subunits of the *Haemonchus contortus* glutamate-gated chloride channel. *Mol Biochem Parasitol* 114, 161-168.
22. Chiu, J.H., Hu, C.P., Lui, W.Y., Lo, S.C., Chang, C.M. (1990). The formation of bile canaliculi in human hepatoma cell lines. *Hepatology* 11, 834-842.
23. Cooper, A.D., Craig, W.Y., Taniguchi, T., Everson, G.T. (1994). Characteristics and regulation of bile salt synthesis and secretion by human hepatoma HepG2 cells. *Hepatology* 20, 1522-1531.
24. Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R., Bertino, J.R. (1989). Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 695-698.
25. Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Boccia, J., Casals, D., Bertino, J.R., Melamed, M.R. (1990). Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 38, 1277-1287.
26. Cully, D.F., Vassilatis, D.K., Liu, K.K., Paress, P.S., Van der Ploeg, L.H., Schaeffer, J.M., Arena, J.P. (1994). Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 371, 707-711.
27. Delatour, P., Garnier, F., Benoit, E., Caude, I. (1991). Chiral behaviour of the metabolite albendazole sulphoxide in sheep, goats and cattle. *Res Vet Sci* 50, 134-138.

28. Didier, A., Loor, F. (1996). The abamectin derivative ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor. *Anticancer Drugs* 7, 745-751.
29. Duce, IR., Scott, RH. (1985). Actions of dihydroavermectin B1a on insect muscle. *Br J Pharmacol* 85, 395-401.
30. Dupuy, J., Alvinerie, M., Ménez, C., Lespine, A. (2010). Interaction of anthelmintic drugs with P-glycoprotein in recombinant LLC-PK1-mdr1a cells. *Chem Biol Interact* 186, 280-286.
31. Eagling, VA., Back, DJ., Barry, MG. (1997). Differential inhibition of cytochrome P450 isoforms by the protease inhibitors, ritonavir, saquinavir and indinavir. *Br J Clin Pharmacol* 44, 190-194.
32. Eckert, J., Pohlenz, J. (1976). On the effect of mebendazole on metacestodes of *Mesocestoides corti* and *Echinococcus multilocularis*. *Tropenmed Parasitol* 27, 247-262.
33. Eckert, J., Deplazes, P. (1999). Alveolar echinococcosis in humans: the current situation in Central Europe and the need for countermeasures. *Parasitol Today* 15, 315-319.
34. El-Tahtawy, A., Glue, P., Andrews, EN., Mardekian, J., Amsden, GW., Knirsch, C. A. (2008). The effect of azithromycin on ivermectin pharmacokinetics--a population pharmacokinetic model analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e236.
35. Galtier, P., Alvinerie, M., Steimer, JL., Francheteau, P., Plusquellec, Y., Houin, G. (1991). Simultaneous pharmacokinetic modeling of a drug and two metabolites: application to albendazole in sheep. *J Pharm Sci* 80, 3-10.
36. Germann, UA. (1996). P-glycoprotein--a mediator of multidrug resistance in tumour cells. *Eur J Cancer* 32A, 927-944.
37. Gibbons, GF., Khurana, R., Odwell, A., Seelaender, MC. (1994). Lipid balance in HepG2 cells: active synthesis and impaired mobilization. *J Lipid Res* 35, 1801-1808.
38. Godawska-Matysik, A., Kieć-Kononowicz, K. (2006). Biotransformation of praziquantel by human cytochrome p450 3A4 (CYP 3A4). *Acta Pol Pharm* 63, 381-385.

39. Gottstein, B., Jacquier, P., Bresson-Hadni, S., Eckert, J. (1993). Improved primary immunodiagnosis of alveolar echinococcosis in humans by an enzyme-linked immunosorbent assay using the Em2plus antigen. *J Clin Microbiol* 31, 373-376.
40. Goudie, AC., Evans, NA., Gration, KA., Bishop, BF., Gibson, SP., Holdom, KS., Kaye, B., Wicks, SR., Lewis, D., Weatherley, AJ. (1993). Doramectin--a potent novel endectocide. *Vet Parasitol* 49, 5-15.
41. Grüner, B. (2009 persönliche Mitteilung)
42. Gutmann, H., Fricker, G., Drewe, J., Toeroek, M., Miller, DS. (1999). Interactions of HIV protease inhibitors with ATP-dependent drug export proteins. *Mol Pharmacol* 56, 383-389.
43. Guzzo, CA., Furtek, CI., Porras, AG., Chen, C., Tipping, R., Clineschmidt, C. M., Sciberras, DG., Hsieh, JY., Lasseter, KC. (2002). Safety, tolerability, and pharmacokinetics of escalating high doses of ivermectin in healthy adult subjects. *J Clin Pharmacol* 42, 1122-1133.
44. Hemphill, A., Gottstein, B. (1995). Immunology and morphology studies on the proliferation of in vitro cultivated *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Parasitol Res* 81, 605-614.
45. Hemphill, A., Stettler, M., Walker, M., Siles-Lucas, M., Fink, R., Gottstein, B. (2002). Culture of *Echinococcus multilocularis* metacestodes: an alternative to animal use *Trends. Parasitol* 18, 445-451.
46. Hokelek, M., Deger, B. A., Deger, E., Tutar, E., Sunbul, M. (2002). Ivermectin used in percutaneous drug injection method for the treatment of liver hydatid disease in sheep. *Gastroenterology* 122, 957-962.
47. Hübner, C., Wiehr, S., Kocherscheidt, L., Wehrl, H., Pichler, BJ., Schmid, A., Kern, P., Soboslay, PT. (2010). Effects of in vitro exposure of *Echinococcus multilocularis* metacestodes to cytostatic drugs on in vivo growth and proliferation of the parasite. *Parasitol Res* 107, 459-463.

48. Hunter, J., Hirst, BH. (1997). Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* 25, 129-157
49. Ingold, K., Bigler, P., Thormann, W., Cavaliero, T., Gottstein, B., Hemphill, A. (1999). Efficacies of Albendazole Sulfoxide and Albendazole Sulfone against In Vitro-Cultivated *Echinococcus multilocularis* Metacestodes. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1052–1061.
50. Javitt, NB. (1990). Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *Faseb J* 4, 161–168.
51. Juliano, RL., Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455, 152-162.
52. Jura, H., Bader, A., Hartmann, M., Maschek, H., Frosch, M. (1996). Hepatic tissue culture model for study of host-parasite interactions in alveolar echinococcosis. *Infect Immun* 64, 3484-3490.
53. Jura, H., Bader, A., Frosch, M. (1998). In vitro activities of benzimidazoles against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 1052-1056.
54. Kern, P. (1983). Human echinococcosis: follow-up of 23 patients treated with mebendazole. *Infection* 11, 17-24.
55. Kern, P., Wechsler, J., Lauchart, W., Kunz, R. (1994). Der kleine Fuchsbandwurm- Klinik und Therapie der alveolären Echinokokkose. *Deutsches Ärzteblatt* 91, 2494-2501.
56. Kern, P., Frosch, P., Helbig, M., Wechsler, JG., Usadel, S., Beckh, K., Kunz, R., Lucius, R., Frosch, M. (1995). Diagnosis of *Echinococcus multilocularis* infection by reverse-transcription polymerase chain reaction. *Gastroenterology* 109, 596-600.
57. Kern, P., Kratzer, W., Reuter, S. (2000a). [Alveolar echinococcosis: diagnosis]. *Dtsch Med Wochenschr* 125, 59-62.

58. Kern, P., Kratzer, W., Reuter, S. (2000b). [Alveolar echinococcosis: therapy] *Dtsch Med Wochenschr* 125, 87-89.
59. Kern, P., Bardonnnet, K., Renner, E., Auer, H., Pawlowski, Z., Ammann, RW., Vuitton, DA., Kern, P. (2003). European echinococcosis registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982-2000 *Emerging Infect. Dis* 9, 343-349.
60. Kern, P., Ammon, A., Kron, M., Sinn, G., Sander, S., Petersen, LR., Gaus, W., Kern, P. (2004). Risk factors for alveolar echinococcosis in humans. *Emerging Infect Dis* 10, 2088-2093.
61. Kern, P., Wen, H., Sato, N., Vuitton, DA., Gruener, B., Shao, Y., Delabrousse, E., Kratzer, W., Bresson-Hadni, S. (2006). WHO classification of alveolar echinococcosis: principles and application. *Parasitol Int* 55 *Suppl*, S283-287.
62. Kern, P. (2010). Clinical features and treatment of alveolar echinococcosis. *Curr Opin Infect Dis* 23, 505-512.
63. Knowles, BB., Howe, CC., Aden, DP. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209, 497-499.
64. König, J., Nies, AT., Cui, Y., Leier, I., Keppler, D. (1999). Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461, 377-394.
65. Kumar, G. N., Rodrigues, AD., Buko, AM., Denissen, JF. (1996). Cytochrome P450-mediated metabolism of the HIV-1 protease inhibitor ritonavir (ABT-538) in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 277, 423-431.
66. Lacey, E. (1990). Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today (Regul. Ed.)* 6, 112-115.
67. Laffont, CM., Toutain, PL., Alvinerie, M., Bousquet-Mélou, A. (2002). Intestinal secretion is a major route for parent ivermectin elimination in the rat. *Drug Metab Dispos* 30, 626-630.

68. Lankas, GR., Cartwright, ME., Umbenhauer, D. (1997). P-glycoprotein deficiency in a subpopulation of CF-1 mice enhances avermectin-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 143, 357-365.
69. Lee, G., Piquette-Miller, M. (2001). Influence of IL-6 on MDR and MRP-mediated multidrug resistance in human hepatoma cells. *Can J Physiol. Pharmacol* 79, 876-884.
70. Lespine, A., Dupuy, J., Orłowski, S., Nagy, T., Glavinas, H., Krajcsi, P., Alvinerie, M. (2006). Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3). *Chem Biol Interact* 159, 169-179
71. Li, T., Chen, X., Zhen, R., Qiu, J., Qiu, D., Xiao, N., Ito, A., Wang, H., Giraudoux, P., Sako, Y., Nakao, M., Craiq, PS. (2010). Widespread co-endemicity of human cystic and alveolar echinococcosis on the eastern Tibetan Plateau, northwest Sichuan/southeast Qinghai, China. *Acta Trop* 113, 248-256.
72. Lima, RM., Ferreira, MA., de Jesus Ponte Carvalho, TM., Dumêt Fernandes, BJ., Takayanagui, OM., Garcia, HH., Coelho, EB., Lanchote, VL. (2011). Albendazole-praziquantel interaction in healthy volunteers: kinetic disposition, metabolism and enantioselectivity. *Br J Clin Pharmacol* 71, 528-535.
73. Litman, T., Druley, TE., Stein, WD., Bates, SE. (2001). From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci* 58, 931-959.
74. Martin-Prevel, Y., Cosnefroy, JY., Tshipamba, P., Ngari, P., Chodakewitz, JA., Pinder, M. (1993). Tolerance and efficacy of single high-dose ivermectin for the treatment of loiasis. *Am J Trop Med Hyg* 48, 186-192.
75. Matheny, CJ., Lamb, MW., Brouwer, KR., Pollack, GM. (2001). Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy* 21, 778-796.
76. Meier, H., Blaschke, G. (2001). Investigation of praziquantel metabolism in isolated rat hepatocytes. *J Pharm Biomed Anal* 26, 409-415.

77. Merino, G., Molina, A.J., García, J.L., Pulido, M.M., Prieto, J.G., Alvarez, A.I. (2003). Intestinal elimination of albendazole sulfoxide: pharmacokinetic effects of inhibitors. *Int J Pharm* 263, 123-132.
78. Opatrny, L., Prichard, R., Snell, L., Maclean, J.D. (2005). Death Related to Albendazole-Induced Pancytopenia: Case Report and Review. *Am J Trop Med and Hyg* 72, 291 -294.
79. Ottesen, E.A., Campbell, W.C. (1994). Ivermectin in human medicine. *J Antimicrob Chemother* 34, 195-203.
80. Pouliot, J.F., L'Heureux, F., Liu, Z., Prichard, R.K., Georges, E. (1997). Reversal of P-glycoprotein-associated multidrug resistance by ivermectin. *Biochem Pharmacol* 53, 17-25
81. Rausch, R., and Jentoft, V.L. (1957). Studies on the helminth fauna of Alaska. XXXI. Observations on the propagation of the larval *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863, in vitro. *J Parasitol* 43, 1-8.
82. Rawden, H.C., Kokwaro, G.O., Ward, S.A., Edwards, G. (2000). Relative contribution of cytochromes P-450 and flavin-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* 49, 313-322.
83. Reuter, S., Kratzer, W., Kurz, S., Wellinghausen, N., Kern, P. (1998). [Chemotherapy of alveolar echinococcosis with benzimidazoles. A prospective long-term study]. *Med Klin (Munich)* 93, 463-467.
84. Reuter, S., Jensen, B., Buttenschoen, K., Kratzer, W., Kern, P. (2000). Benzimidazoles in the treatment of alveolar echinococcosis: a comparative study and review of the literature. *J Antimicrob Chemother* 46, 451-456.
85. Reuter, S., Buck, A., Grebe, O., Nüssle-Kügele, K., Kern, P., Manfras, B. J. (2003). Salvage treatment with amphotericin B in progressive human alveolar echinococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 3586-3591.
86. Reuter, S., Merkle, M., Brehm, K., Kern, P., Manfras, B. (2003). Effect of amphotericin B on larval growth of *Echinococcus multilocularis*. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 620-625.

87. Reuter, S., Buck, A., Manfras, B., Kratzer, W., Seitz, H. M., Darge, K., Reske, S. N., and Kern, P. (2004). Structured treatment interruption in patients with alveolar echinococcosis. *Hepatology* 39, 509-517.
88. Reuter, S., Manfras, B., Merkle, M., Härter, G., Kern, P. (2006). In vitro activities of itraconazole, methiazole, and nitazoxanide versus *Echinococcus multilocularis* larvae. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2966-2970.
89. Reuter, S., Beisler, T., Kern, P. (2010). Combined albendazole and amphotericin B against *Echinococcus multilocularis* in vitro. *Acta Trop* 115, 270-274.
90. Rossignol, JF. (2009). Thiazolidines: a new class of antiviral drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5, 667-674.
91. Schantz, PM., Van den Bossche, H., Eckert, J. (1982). Chemotherapy for larval echinococcosis in animals and humans: report of a workshop. *Z Parasitenkd* 67, 5-26.
92. Schellens, JH., Malingré, MM., Kruijtzter, CM., Bardelmeijer, HA., van Tellingen, O., Schinkel, AH., Beijnen, JH. (2000). Modulation of oral bioavailability of anticancer drugs: from mouse to man. *Eur J Pharm Sci* 12, 103-110.
93. Schinkel, AH., Wagenaar, E., Mol, CA., van Deemter, L. (1996). P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 97, 2517-2524.
94. Schinkel, AH., Mayer, U., Wagenaar, E., Mol, CA., van Deemter, L., Smit, JJ., van der Valk, M.A., Voordouw, AC., Spits, H., van Tellingen, O., Zijlmans, JM., Fibbe, WE., Borst, P. (1997). Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 4028-4033.
95. Shapiro, AB., Ling, V. (1998). The mechanism of ATP-dependent multidrug transport by P-glycoprotein. *Acta Physiol Scand Suppl* 643, 227-234.
96. Smit, JW., Schinkel, AH., Weert, B., Meijer, DK. (1998). Hepatobiliary and intestinal clearance of amphiphilic cationic drugs in mice in which both mdr1a and mdr1b genes have been disrupted. *Br J Pharmacol* 124, 416-424.

97. Sormunen, R., Eskelinen, S., Lehto, VP. (1993). Bile canaliculus formation in cultured HEPG2 cells. *Lab Invest* 68, 652-662.
98. Souhaili-El Amri, H., Mothe, O., Totis, M., Masson, C., Batt, AM., Delatour, P., Siest, G. (1988). Albendazole sulfonation by rat liver cytochrome P-450c. *J Pharmacol Exp Ther* 246, 758-764.
99. Spiliotis, M., Tappe, D., Sesterhenn, L., Brehm, K. (2004). Long-term in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes under axenic conditions. *Parasitol Res* 92, 430-432.
100. Stettler, M., Fink, R., Walker, M., Gottstein, B., Geary, TG., Rossignol, JF., Hemphill, A. (2003). In vitro parasitocidal effect of Nitazoxanide against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 467-474.
101. Stettler, M., Rossignol, JF., Fink, R., Walker, M., Gottstein, B., Merli, M., Theurillat, R., Thormann, W., Dricot, E., Segers, R., Hemphil, A. (2004). Secondary and primary murine alveolar echinococcosis: combined albendazole/nitazoxanide chemotherapy exhibits profound anti-parasitic activity. *Int J Parasitol* 34, 615-624.
102. Sugawara, I., Kataoka, I., Morishita, Y., Hamada, H., Tsuruo, T., Itoyama, S., Mori, S. (1988). Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16. *Cancer Res* 48, 1926-1929.
103. Taylor, DH., Morris, DL., Richards, KS., Reffin, D. (1988). *Echinococcus multilocularis*: in vivo results of therapy with albendazole and praziquantel. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82, 611-615.
104. Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, MM., Pastan, I., Willingham, MC. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 7735-7738.

105. Van Asperen, J., Van Tellingen, O., Beijnen, JH. (1998). The pharmacological role of P-glycoprotein in the intestinal epithelium. *Pharmacol Res* 37, 429-435.
106. Van den Bossche, H., Rochette, F., Hörig, C. (1982). Mebendazole and related anthelmintics. *Adv Pharmacol Chemother* 19, 67-128.
107. Veit, P., Bilger, B., Schad, V., Schäfer, J., Frank, W., Lucius, R. (1995). Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology* 110 (Pt 1), 79-86.
108. Vourvahis, M., Kashuba, AD. (2007). Mechanisms of pharmacokinetic and pharmacodynamic drug interactions associated with ritonavir-enhanced tipranavir. *Pharmacotherapy* 27, 888-909.
109. Wacher, VJ., Wu, CY., Benet, LZ. (1995). Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol Carcinog* 13, 129-134.
110. Westerink, WM., Schoonen, WG. (2007). Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* 21, 1581-1591.
111. Westermann, P., Knoblich, M., Maier, O., Lindschau, C., Haller, H. (1996). Protein kinase C bound to the Golgi apparatus supports the formation of constitutive transport vesicles. *Biochem J* 320 (Pt 2), 651-658.
112. Wilson, JF., Rausch, RL., McMahon, BJ., Schantz, PM. (1992). Parasitocidal Effect of Chemotherapy in Alveolar Hydatid Disease: Review of Experience with Mebendazole and Albendazole in Alaskan Eskimos. *Clin Infect Dis* 15, 234-249.
113. Yeh, RF., Gaver, VE., Patterson, KB., Rezk, NL., Baxter-Meheux, F., Blake, MJ., Eron, JJ., Jr, Klein, CE., Rublein, JC., Kashuba, AD. (2006). Lopinavir/ritonavir induces the hepatic activity of cytochrome P450 enzymes CYP2C9, CYP2C19, and CYP1A2 but inhibits the hepatic and intestinal

activity of CYP3A as measured by a phenotyping drug cocktail in healthy volunteers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 42, 52-60.

114. Yu, DK. (1999). The contribution of P-glycoprotein to pharmacokinetic drug-drug interactions. *J Clin Pharmacol* 39, 1203-1211.
115. Zeng, Z., Andrew, NW., Woda, JM., Halley, BA., Crouch, LS., Wang, RW. (1996). Role of cytochrome P450 isoforms in the metabolism of abamectin and ivermectin in rats. *J Agric Food Chem* 44, 3374-3378
116. Zeng, Z., Andrew, NW., Arison, BH., Luffer-Atlas, D., Wang, RW. (1998). Identification of cytochrome P4503A4 as the major enzyme responsible for the metabolism of ivermectin by human liver microsomes. *Xenobiotica* 28, 313-321.
117. Zingg, W., Renner-Schneiter, EC., Pauli-Magnus, C., Renner, EL., van Overbeck, J., Schläpfer, E., Weber, M., Weber, R., Opravil, M., Gottstein, B., Speck, RF., Swiss, HIV. (2004). Alveolar echinococcosis of the liver in an adult with human immunodeficiency virus type-1 infection. *Infection* 32, 299-302.

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Kern für die Möglichkeit, diese interessante Doktorarbeit im Forschungslabor des CIDC der Universitätsklinik Ulm anfertigen zu dürfen und für die sehr gute Betreuung.

Ebenso danken möchte ich Herrn D. Richter für die gute Einarbeitung im Infektionslabor.

Besonderer Dank gilt Frau H. Hartnagel für die Mithilfe bei der Korrektur der Rechtschreibfehler meiner Doktorarbeit.

Außerdem danke ich Herrn S. Wacker für die Einführung und für die Hilfestellungen bei allen Problemen bezüglich mikroskopischer Photographie.

Vielen Dank an Frau J. Franz für die besondere Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Versuche.

Auch Frau S. Schirmer gilt mein Dank für die Hilfe bei der Vorbereitung der Leberzellen für die letzten zwei Versuche meiner Doktorarbeit.

R. Neufeld, M. Specht, R. Breuer und M. Wolf möchte ich für die besondere Unterstützung bei der sprachlichen Korrektur meiner Doktorarbeit danken.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern und besonders meinem Bruder für die Motivation bei schwierigen, langwierigen Laborversuchen und während der Prüfungszeiten.

Lebenslauf:

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten"

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten"