

Versuche zur *in vitro*-Kultivierung von *Echinococcus multilocularis*-Keimschichtzellen

Angela Dieckmann-Schuppert, W. Frank

Einleitung

Die alveoläre Echinokokkose, eine Infektion mit der tumorartig wachsenden Larvenform des kleinen Fuchsbandwurms, *Echinococcus multilocularis* (LEUCKART 1983), ist als eine der bedeutendsten Zooanthroponosen des gemäßigten Klimas und als gefährlichste Parasitose des Menschen in Mitteleuropa anzusehen (10, 11). Die meist in der Leber gefundenen Metazestoden wachsen mit Keimschichtsprossen infiltrativ in das umgebende gesunde Gewebe hinein (21, 27), wodurch sich fortlaufend neue Zysten bilden. Eine Diagnose im Frühstadium bei verdächtigen oder aufgrund ihrer Tätigkeit in Land- oder Forstwirtschaft als besonders exponiert anzusehenden Personen kann nur indirekt mit Hilfe serologischer Methoden erfolgen (18), da die bildgebenden Diagnoseverfahren sehr kleine Zysten nicht erfassen. Eine differentialdiagnostische Abgrenzung der alveolären Echinokokkose von der Infektion mit der verwandten Art, *E. granulosus* (zystische Echinokokkose), ist im Hinblick auf die schlechtere operative und chemotherapeutische Beherrschbarkeit der erstgenannten Infektion unbedingt anzustreben. Mit den normalerweise für die Serodiagnostik verwendeten *Echinococcus*-Antigenen ist dies aber nicht möglich, da zahlreiche unspezifische und Kreuzreaktionen auftreten können. Bisher sind erst zwei Antigenpräparationen bekannt, mit denen eine Differentialdiagnose möglich erscheint (4, 12).

Mit Hilfe immunhistochemischer Techniken wurde erkannt, daß sich die Keimschicht von *E. multilocularis*-Metazestoden durch eine besonders hohe Antigenität auszeichnet (26). Die Keimschichtzellen erscheinen durch ihr zumindest *in vivo* unbegrenztes Wachstum für die *in vitro*-Kultivierung prädestiniert. In der vorliegenden Arbeit berichten wir über erste Ergebnisse solcher Primärkultivierungs-Versuche.

Eine *in vitro*-Haltung von *E. multilocularis*-Metazestodenmaterial könnte wesentlich zur Verringerung der Anzahl der bisher zur Laborhaltung des Parasiten und zum Testen neuer Medikamente benötigten Versuchstiere beitragen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ebenfalls die Sensitivität der *in vitro* gehaltenen Zellen gegenüber drei als Anthelmintika gebräuchlichen Substanzen untersucht.

Methoden

Parasit

Das verwendete *E. multilocularis*-Isolat stammt ursprünglich aus Feldmäusen (*Microtus arvaris*), die in unserem Institut mit *E. multilocularis*-Eiern aus dem Darm

eines natürlich infizierten Rotfuchses (*Vulpes vulpes*) von der Schwäbischen Alb oral infiziert worden waren (5). Das Isolat wurde zunächst in Feldmäusen, seit 1984 auch in *Meriones unguiculatus*, durch vegetatives Überimpfen von Metazestoden (16) gehalten.

Isolierung und Kultur der Zellen

Keimschichtzellen aus *E. multilocularis*-Metazestoden wurden nach der von uns bereits beschriebenen Methode isoliert (7). Nach dem Auswaschen des Percolls wurden die Keimschichtzellen in einer Dichte von $10^5/\text{cm}^2$ in 0,5 ml Medium/ cm^2 ausgesät. Die Inkubation erfolgte bei 37 ° C und 100% relativer Luftfeuchtigkeit. Alle zwei Tage wurde jeweils die Hälfte des Mediums gewechselt. Die in Tab. 1 aufgeführten Medien und Zusätze wurden dabei auf ihre Eignung zur Primärkultivierung der Keimschichtzellen getestet. Das wichtigste Kriterium für die Beurteilung eines Versuchsansatzes war — neben einer erfolgten Adhäsion der Zellen — das Fortbestehen der Infektiosität nach 14-tägiger *in vitro*-Haltung, da diese ein wesentliches Charakteristikum der frisch isolierten Keimschichtzellen darstellt (7).

TABELLE 1
Übersicht der verschiedenen getesteten Medien und Kulturzusätze bei der Primärkultivierung von *Echinococcus multilocularis*-Metazestoden-Keimschichtzellen

Zusatz	Spezifikation	Konzentration
definierte Medien	BME, DMEM, Ham's F 12, Leibovitz L 15, M 199, NCTC 135, RPMI 1640	} allein oder als 1 : 1-Mischungen
komplexe Medien	nach Lukashenko (19), nach Sakamoto (22), Rattenhepatozyten-konditioniertes Medium William's E*	
Seren (inakt.)	human (normal), human (alveoläre Echinokokkose), Pferd, Rind, fetales Kalb, <i>Meriones unguiculatus</i> , <i>Microtus arvaris</i>	0 - 25%
Substrata	Kollagen aus Ratten- und Bisam-Schwanzsehnen, Cytotex 1®	10 µg/cm ² 4 mg/ml
Feederzellen	unstimulierte Peritonealmakrophagen, Thymozyten, Hepatozyten, jeweils aus <i>Meriones</i> und <i>Microtus</i>	Cokultur, 10 ⁴ Zellen/cm ²
niedermol. Substanzen	Insulin; Dexamethason β-Mercaptoethanol; Zystein EGTA	1.0; 0.4 µg/ml 20; 10 µM 1.700 - 1.800 mM

*) dankenswerterweise von Herrn Prof. Bohley, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Tübingen, überlassen.

Immunfluoreszenztest

Im Kulturmedium suspendierte lebende Keimschichtzellen wurden als Antigen verwendet und nacheinander mit Antikörper-haltigem Serum und Fluoresceinisothiocyanat-markiertem Anti-human Gammaglobulin inkubiert (3).

Benzimidazole

Albendazol, Mebendazol und Fenbendazol wurden auf ihre Wirkung auf *E. multilocularis*-Keimschichtzellen *in vitro* hin untersucht. Mit Hilfe von Lebermikrosomen wurden Metabolite der drei Substanzen hergestellt. Die Mikrosomen wurden aus Lebern von Laborratten isoliert (22), die zuvor zur Induktion der Cytochrom-P-450-Synthese mit Phenobarbital behandelt worden waren (14). Der Verlauf der Metabolisierung wurde dünn-schichtchromatographisch verfolgt (13). Sowohl die Muttersubstanzen als auch die Metabolite wurden in Konzentrationen von 0,05 bis 2 μM den *E. multilocularis*-Keimschichtzell-Kulturen (in DMEM/10% normales Humanserum) beigegeben.

Ergebnisse

Als das geeignetste Medium zur *in vitro*-Halteung der Keimschichtzellen erwies sich DMEM (20 mM Hepes, 10 mM Natriumhydrogenkarbonat, 4 mM Glutamin) mit 10% hitzeinaktiviertem normalem Humanserum und 0,1 mg/ml Streptomycin sowie 100 U/ml Penicillin G.

Die Zellen konnten in diesem Medium über einen Zeitraum von acht Wochen (längere Abschnitte wurden nicht getestet) am Leben erhalten werden. Sie blieben adhären und zeigten in der Immunfluoreszenz *Echinococcus*-Antigen auf der Zelloberfläche. Wachstum und Zellteilungen unterblieben allerdings nach kurzer Zeit (1 - 2 Generationen). Trotz dieser geringgradigen Vermehrung konnte durch die Verwendung des beschriebenen Systems mindestens die Hälfte der zur Passage des Metazestodenmaterials benötigten Versuchstiere ersetzt werden.

Die in Tab. 1 aufgeführten Zusätze erbrachten keine weitere Verbesserung des Kulturergebnisses.

Die drei nicht metabolisierten Benzimidazole wirkten ab einer Konzentration von 0,5 μM (Albendazol und Mebendazol) bzw. 1 μM (Fenbendazol) toxisch: Die Zellen blieben im Mittel nur noch vier Tage (2 - 9) adhären und waren nach einer Woche bereits zu 50 - 60% mit Trypanblau anfärbbar und nur noch schwach infektiös, nach zwei Wochen jedoch zu 90% Trypanblau-positiv und nicht mehr infektiös. Die mit Mikrosomen hergestellten Metabolite waren in allen drei Fällen wirkungslos.

Diskussion

Die beschriebene Methode zur *in vitro*-Halteung von *E. multilocularis*-Keimschichtzellen leistet einen entscheidenden Beitrag zur Reduzierung der benötigten Versuchstierzahlen. Das System bietet die Möglichkeit zur Entwicklung eines den Tierversuch ergänzenden oder sogar ersetzenden Verfahrens.

Die Antigenität der über mehrere Wochen *in vitro* gehaltenen Keimschichtzellen unterscheidet sich nicht von der frisch isolierter Zellen. Mit dem Gesamtantigen aus den Kulturen ist eine artspezifische Diagnostik weder mittels Immunfluoreszenz noch mit Hilfe des ELISA-Tests zu realisieren. Im Immunoblot scheint hingegen nach vorläufig-

gen Ergebnissen, ähnlich wie bei der Verwendung exkretorisch-sekretorischer Antigene von *Protoscolices* (4), eine Unterscheidung beider *Echinococcus*-Arten möglich zu sein. Wie an anderer Stelle ausführlicher berichtet wird (8, 9), ist durch Fusion von *E. multilocularis*-Keimschichtzellen mit Tumorzellen ebenfalls kein unbegrenztes Wachstum zu erzielen, jedoch wurde hierbei ein in hohem Maße artspezifisches Antigen entdeckt, das sich für differentialdiagnostische Zwecke eignet. Die Verwendung solcher definierter Antigenpräparationen, bei denen der individuelle Einfluß des Spendertieres ausgeschaltet werden kann, wird in Zukunft auch die Standardisierung, d. h. die Vergleichbarkeit unabhängig voneinander erzielter Testergebnisse, gestatten.

Bei der Untersuchung der Faktoren, die das Wachstum der Keimschichtzellen in der Primärkultur beeinflussen und die dem *in vitro*-Modell heute noch fehlen, erscheint der Einfluß der Kalziumkonzentration im Medium besonders wesentlich. Bei der *in vivo*-Entwicklung von *E. multilocularis*-Metazestoden in der weißen Maus tritt relativ abrupt in der 5. - 6. Woche *post infectionem*, unmittelbar vor dem Auftreten der *Protoscolices*, die Bildung von Kalkkörperchen ein (15), was unsere eigenen Beobachtungen an *Meriones* bestätigen. Vor diesem Zeitpunkt kann man zwar bereits große Zystenmassen finden, doch sind diese stets vollständig hyalin und steril, d. h. sie enthalten weder Kalkkörperchen noch *Protoscolices*. Nach diesem Zeitpunkt hingegen ist mit dem massiven Auftreten beider zu rechnen. Die Kalziumkonzentration steht damit eindeutig in Zusammenhang mit der Differenzierung des *E. multilocularis*-Keimepithels. Da eine hohe extrazelluläre Kalziumkonzentration nach verschiedenen Autoren eine schwammige, terminale Differenzierung der Zellen induziert (6, 17, 25), haben wir versucht, durch EGTA-Zusatz einen niedrigen extrazellulären Ca-Spiegel zu simulieren, jedoch erwies sich der gebildete Komplex als zelltoxisch.

Ein weiterer Punkt, der für die Vitalität der Keimschichtzell-Primärkulturen von entscheidender Bedeutung sein dürfte, ist die mögliche Gegenwart zytotoxischer Komponenten in der Kultur. Sowohl in der Hydatidenflüssigkeit von *E. granulosus* (2) als auch auf der Oberfläche von *E. multilocularis*-Brutkapseln (1) konnten solche Stoffe nachgewiesen werden. Sie wurden verschiedentlich zur Erklärung des Absterbens des eosinophilen Infiltrats und der darauffolgenden Bildung der laminaren Schicht sowie der öfters beobachteten T-Zell-Depletion herangezogen. Solche zytotoxischen Komponenten könnten vor allem das rasche Absterben der kokultivierten Feederzellen bewirken.

Die Benzimidazol-Sensitivität der Keimschichtzellen *in vitro*, die allerdings erst bei verhältnismäßig hohen Konzentrationen beobachtet wurde, läßt den Schluß zu, daß das vorgestellte System dann als biochemisches Modell für die alveoläre Echinokokkose, speziell zum Medikamententest, herangezogen werden kann, wenn sichergestellt ist, daß die getesteten Konzentrationen nicht nur im Plasma, sondern auch in schlecht durchbluteten Geweben, in denen die Diffusion den limitierenden Faktor darstellt, erreicht werden. Vor einer weiteren chemischen Modifizierung der Benzimidazole zur Verbesserung der Chemotherapie der alveolären Echinokokkose sollten zunächst die Bindungseigenschaften dieser Substanzen an *E. multilocularis*-Metazestosen-Tubulin untersucht werden, da man bei anderen Helminthen (Nematoden) bereits Arten kennt, die aufgrund verringerter Bindung resistent geworden sind (19, 24).

Der Einfluß des Leberstoffwechsels auf die Konzentration der pharmakologisch aktiven Substanzen muß unbedingt berücksichtigt werden, da bekannt ist, daß bei einer Mebendazol-Therapie die Plasmaspiegel aufgrund der Metabolisierung in der Leber unterhalb des therapeutischen Bereichs bleiben können (28).

Das dünnschichtchromatographische Verhalten der in dieser Studie verwendeten Benzimidazol-Metabolite läßt den Schluß zu, daß es sich bei ihnen um die Endprodukte der oxidativen Metabolisierung handelt. Im Falle des Albendazols ist dieser Metabolit bereits als pharmakologisch inaktiv beschrieben worden (13). Dieses Problem muß daher durch die Verwendung synthetisch hergestellter, definierter Metabolite gelöst werden.

Die prinzipielle Möglichkeit, mit dem vorgestellten System Medikamente gegen *E. multilocularis* *in vitro* testen zu können, unterstreicht seine Eignung als Alternative zum Tierversuch.

Nicht nur für die Arten der Gattung *Echinococcus*, sondern auch für die meisten anderen parasitisch lebenden Helminthen, besteht weiterhin die Aufgabe, Wege zur *in vitro*-Kultivierung der medizinisch relevanten Entwicklungsstadien zu suchen, um die große Anzahl der heute noch erforderlichen Versuchstiere zu reduzieren, Parasiten somit auch isoliert vom Wirt betrachten zu können und damit mehr über die in den Parasiten ablaufenden biochemischen Prozesse zu lernen und schließlich Methoden zu entwickeln, diese Parasiten bzw. die von ihnen verursachten Parasitosen zu beherrschen.

Zusammenfassung

Es wurde die Möglichkeit untersucht, Keimschichtzellen von *E. multilocularis*-Metazestoden in Primärkultur *in vitro* zu halten. Isolierte Keimschichtzellen lassen sich über einen Zeitraum von mindestens acht Wochen am Leben erhalten, wobei trotz einer Stagnation der Zellteilung die Infektiosität und die Antigenität der Zellen erhalten bleiben. Die Methode gestattet ferner eine Reduzierung der Versuchstieranzahl um 50%. Das Verfahren eignet sich möglicherweise zum Testen neuentwickelter Chemotherapeutika gegen die alveoläre Echinokokkose.

Schlüsselwörter

Zestoden, *Echinococcus multilocularis*, *in vitro*, alternative Methoden zum Tierversuch, Benzimidazole.

Summary

Investigations on the *in vitro* cultivation of *Echinococcus multilocularis* germinal cells

This paper describes investigations on the *in vitro* maintenance of *E. multilocularis* metacestode germinal cells. Isolated germinal cells can be successfully maintained *in vitro* for at least 8 weeks with sustained infectivity to birds. Throughout this time the cells remained adherent and kept exhibiting *E. multilocularis* antigen in the immunofluorescence test. The use of the described system can replace 50% of the experimental animals otherwise necessary for regular passage of the parasite. The method may be suited for testing newly developed drugs against alveolar echinococcosis.

Key words

Cestodes, *E. multilocularis*, *in vitro* test, alternatives to animal experimentation, benzimidazoles.

Literatur

1. ALI-KHAN, Z., SIBOO, R., GOMERSALL, M., FAUCHER, M. (1983):
Cystolytic events and the possible role of germinal cells in metastasis formation in chronic alveolar hydatidosis.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 77, 497 - 512.
2. ANNEN, J. M., KÖHLER, P., ECKERT, J. (1981):
Cytotoxicity of Echinococcus granulosus cyst fluid in vitro.
Z. Parasitenkd. 65, 79 - 88.
3. ANONYMUS (1981):
Bekanntmachungen des Bundesgesundheitsamtes: Zur Vereinheitlichung der Laboratoriumsdiagnostik der Echinokokkose.
Bundesgesundheitsbl. 24, 310 - 311.
4. AUER, H., ASPÖCK, H. (1985):
Studies on antigenes from in vitro cultivated protoscolices of Echinococcus multilocularis and their possible use in the serodiagnosis of human echinococcosis. Proceedings of the 2nd International Symposium on Taeniasis/Cystercosis and Hydatidosis/Echinococcosis. (Hrsg. J. Prokopic), 2. - 7. Dez. 1985 in Budweis, Tschechoslowakei, S. 7 - 15.
5. BOSCH, D. (1982):
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Entwicklung von Echinococcus multilocularis. In: Probleme der Echinokokkose unter Berücksichtigung parasitologischer und klinischer Aspekte (Hrsg. R. Bähr). Huber Verlag Bern, Aktuel. Probl. Chir. Orthop. 23, 36 - 40.
6. VAN DER BOSCH, J., SCHUDT, C., PETTE, D. (1973):
Influence of temperature, cholesterol, dipalmitoyllecithin and Ca^{2+} on the rate of muscle cell fusion.
Exp. Cell Res. 82, 433 - 438.
7. DIECKMANN, A., FRANK, W. (1988 a):
Isolation of viable germinal cells from Echinococcus multilocularis metacestodes.
Par. Res. 74, 297 - 298.
8. DIECKMANN, A., FRANK, W. (1986 b):
In vitro investigations on Echinococcus multilocularis germinal cells.
Zbl. Bakt. Hyg. 303, 451.
9. DIECKMANN-SCHUPPERT, A., RUPPEL, A., BURGER, R., FRANK, W. (1988):
Echinococcus multilocularis: In vitro secretion of antigen by hybridomas from metacestode germinal cells and murine tumor cells.
Exp. Parasitol., im Druck.
10. FRANK, W. (1982):
Biologie und Epidemiologie des Echinococcus granulosus und des Echinococcus multilocularis. In: Probleme der Echinokokkose unter Berücksichtigung parasitologischer und klinischer Aspekte (Hrsg. R. Bähr). Huber Verlag Bern, Aktuel. Probl. Chir. Orthop. 23, 12 - 25.
11. FRANK, W. (1987):
Echinococcus multilocularis in Südwestdeutschland. — Persistenz einer Zoonose im mitteleuropäischen Raum.
Heidelb. Akad. Wissensch., Geomed. Forschungsst. 83, 86 - 113.
12. GOTTSTEIN, B., ECKERT, J., FEY, H. (1983):
Serological differentiation between E. granulosus and E. multilocularis infections in man.
Z. Parasitenkd. 69, 347 - 356.
13. GYURIK, R. J., CHOW, A. W., ZABER, B., BRUNNER, E. L., VILLANI, A. J., PETKA, L. A., PARISH, R. C. (1981):
Metabolism of albendazole in cattle, sheep, rats and mice.
Drug Metab. Dispos. 9, 503 - 508.
14. HARADA, N., OMURA, T. (1983):
Phenobarbital- and 3-Methylcholanthrene-induced synthesis of two different molecular species of microsomal cytochrome P 450 in rat liver.
J. Biochem. 93, 1361 - 1373.

15. HINZ, E. (1972 a):
Quantitative Untersuchungen über die Kalkkörperchenbildung bei *Echinococcus multilocularis* in der experimentell infizierten weißen Maus.
Tropenmed. Parasitol. 23, 266 - 271.
16. HINZ, E. (1972 b):
Die Aufbereitung des Infektionsmaterials für die intraperitoneale Infektion der Maus mit *Echinococcus multilocularis*.
Tropenmed. Parasitol. 23, 387 - 390.
17. KAIGHN, M. E., LECHNER, J. F. (1984):
Cell separation by biological methods. In: *Cell separation: Methods and selected applications*, Bd. 3 (Hrsg. T. G. Pretlow, T. P. Pretlow).
Acad. Press New York, S. 285 - 306.
18. KIMMIG, P., MÜHLING, A. (1985):
Erhöhte Gefährdung durch *Echinococcus multilocularis* im Endemiegebiet „Schwäbische Alb“?
Zbl. Bakt. Hyg. Abt. I Orig. B 181, 184 - 196.
19. LACEY, E., PRICHARD, R. K. (1986):
Interaction of benzimidazoles (BZ) with tubulin from BZ-sensitive and BZ-resistant isolates of *Haemonchus contortus*.
Mol. Biochem. Parasitol. 19, 171 - 181.
20. LUKASHENKO, N. P (1904):
Study on the development of *Alveococcus multilocularis* (Leuckart 1863) in vitro (russ.).
Med. Parazit. Parazit. Bolezni (Moskau) 33, 271 - 278.
21. MEHLHORN, H., ECKERT, J., THOMPSON, R. C. A. (1983):
Proliferation and metastasis formation of larval *Echinococcus multilocularis*. II. Ultrastructural investigations.
Z. Parasitenkd. 69, 749 - 763.
22. OMURA, T., SATO, R. (1964):
The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties.
J. Biol. Chem. 239, 2379 - 2385.
23. SAKAMOTO, T. (1978):
Deveelopment of echinococcal tissue cultured in vitro and in vivo.
Mem. Fac. Agr. Kagoshima University 14, 109 - 113.
24. SANGSTER, N. C., PRICHARD, R. K., LACEY, E. (1985):
Tubulin and benzimidazole-resistance in *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda).
J. Parasitol. 71, 645 - 651.
25. SHAINBERG, A., YAGIL, G., YAFFE, D. (1971):
Alterations of enzymatic activities during muscle cell differentiation in vitro.
Dev. Biol. 25, 1 - 29.
26. SVILENOV, D., HEYMER, D., HAFERKAMP, O. (1978):
Immunomorphology and pathogenesis of *Echinococcus*.
Infection 6, 12 - 15.
27. VOGEL, H. (1978):
Wie wächst der *Alveolarchinococcus*?
Tropenmed. Parasitol. 29, 1 - 11.
28. WITASSEK, F., BIRDER, J. (1983):
Chemotherapie der hepatischen Echinokokkose — mikrosomale Leberfunktion und Cholestase als bestimmende Faktoren für die Plasmakonzentration von Mebendazol.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 5, 135 - 137.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. Angela Dieckmann-Schuppert,
Abt. Strukturbioogie, Biozentrum der Universität Basel

Klingelbergstrasse 70
CH-4056 Basel
Schweiz

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1988

Band/Volume: [10](#)

Autor(en)/Author(s): Dieckmann-Schuppert Angela, Frank Werner

Artikel/Article: [Versuche zur in vitro-Kultivierung von Echinococcus multilocularis-Keimschichtzellen. 1-8](#)