©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Mit. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 7 (1985) 215 - 222

Institut für Tropenhygiene und öffentliches Gesundheitswesen, Südasien-Institut der Universität Heidelberg (Vorstand: Univ. Prof. Dr. H. J. Diesfeld) (1)
Institut Ernst Rodenwaldt, Lomé, Togo (Vorstand: Dir. Dr. Awisi) (2)
Tropenmedizinisches Institut der Universität Tübingen (Komm. Leiter: Univ. Prof. Dr. W. Höfler) (3)

Ultrastrukturelle und immunozytochemische Untersuchungen an Weibchen von Onchocerca volvulus nach Behandlung von Patienten mit Mebendazol und Levamisol [1])

Angela Prüsse[1], A. Adjamgba[2], Hartwig Schulz-Key[3]

[1]) Mit Unterstützung der Weltgesunheitsorganisation (WHO, Special Programme for Research and Training Diseases), der Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ), dem Onchocerciasis Control Programme (OCP) und der Kommission der Europäischen Gemeinschaft.

Einleitung

Das schwere Krankheitsbild der Onchozerkose wird nicht durch die adulten Filarien, sondern durch deren Larven, die Mikrofilarien, hervorgerufen. Daher zielt eine Behandlung von Patienten in erster Linie auf die Beseitigung der Mikrofilarien in der Haut ab, die in großen Mengen von den Makrofilarien freigesetzt werden. Medikamente, die die adulten Parasiten ohne Risiko für den Patienten abtöten, stehen nicht zur Verfügung. Gelänge es aber, die Ausbildung von Mikrofilarien in den Weibchen langzeitig oder gar permanent zu unterdrücken, würde ein makofilarizides Medikament entbehrlich.

Nach der Behandlung von Patienten mit Mebendazol kann in den Weibchen eine quantitative Zerstörung aller derjenigen Embryonalstadien beobachtet werden, die noch von ihrer Eihülle umschlossen sind (AWADZI et al. 1982, SCHULZ-KEY 1983). Da das Mebendazol gleichzeitig die Mikrofilarien in der Haut reduziert, konnte in Mittelamerika die Mikrofilarienichte über ein Jahr auf ein sehr niedriges Niveau gedrückt werden (RIVAS-ALCALA et al. 1981). Bei Patienten in Westafrika hielt diese embryostatische Wirkung in den Weibchen nur einige Monate an (AWADZI et al. 1982).

Nach der Behandlung mit Mebendazol läßt sich die allmähliche Degenerierung der intrauterinen Embryonen mit dem Lichtmikroskop eindrucksvoll verfolgen, man erhält dabei jedoch keine Hinweise auf den Wirkungsmechanismus. Daher sollten jetzt durch Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop weitere Aufschlüsse erhalten werden.

Material und Technik

Patienten aus Südtogo wurden 16 Tage lang mit einer täglichen oralen Dosis von 1,5 g Mebendazol und zwei wöchentlich verabreichten Dosen von 150 mg Levamisol oder mit Placebo behandelt. Palpable Knochen wurden am letzten Behandlungstag exstirpiert und die adulten Filarien mit Collagenase lebend isoliert (SCHULZ-KEY et al. 1980).

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Weibchen wie bei PRÜSSE et al. (1982) beschrieben präpariert. 0,1 µm dünne Schnitte wurden mit einem SORVALL-Rotationsmikrotom angefertigt und auf Kupfer- und Nickelnetze aufgezogen. Die Schnitte auf den Kupfernetzen wurden mit Urenylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Für die immunozytochemischen Studien wurden die Schnitte auf den Nikkelnetzen nach der Methode von RIX et al. (1981) deeponisiert und rehydriert und der Peroxydase-anti-Peroxidase-Behandlung unterworfen (STERNBERGER 1974). Die Schnitte wurden wie folgt inkubiert:

1. 5 Minuten in 10%iges (w/v) Eialbumin in PBS, pH 7,4, danach Spülen mit PBS.
2. 5 Minuten in 3%iges (v/v) hitzeinaktiviertes normales Ziegenserum (PAESEL, Frankfurt in 0,05 M Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-HCL), pH. 7.6.
3. 48 Stunden bei 4° C in Immunserum von Onchozerkosepatienten, die mit Placebo oder Mebendazol/Levamisol behandelt waren, Verdünnung 1:2.500, Spülen mit Tris-HCL.
4. 5 Minuten in Kaninchen-anti-Human IgG (MILES, Frankfurt, Verdünnung 1:2.500), Waschen in Tris-HCL.
5. 5 Minuten in 3%iges normales Ziegenserum in Tris-HCL und weitere 5 Minuten in löslichem Kaninchen-Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex (STERNBERGER-MEYER, Jarretsville Pike, USA), verdünnt in Tris-HCL 1:40, versehen mit 1%igem normalen Ziegenserum. Waschen in Tris-HCL.
6. 3 Minuten in Lösung aus 12,5 mg 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (SERVA, Heidelberg) und 8 µl 30%iges H_2O_2 in 100 ml Tris-HCL. Waschen in bidestilliertem Wasser und rehydrieren.

Die Spezifität der immunhistochemischen Reaktion wurde durch Inkubieren der Schnitte in normalem Humanserum von infizierten Patienten bei einer Verdünnung von 1:2.500 getestet, als auch durch Inkubieren der Schnitte mit Immunhumanserum, das vorher mit Filarienantigen absorbiert worden war (20 µg Protein pro ml Serum für 18 Stunden bei 0° C).

Ergebnisse

Lichtmikroskopische Beobachtungen:

Die adulten Filarien ließen sich mit Collagenase aus den exstipierten Onchozerkomen der behandelten und unbehandelten Patienten lebend isolieren und zeigten keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Vitalität. Morphologische Veränderungen, die auf eine Wirkung des Mebendazols zurückgeführt werden könnten, wurden äußerlich nicht festgestellt. Die Mikrofilarien in den Uterusschläuchen waren in beiden Gruppen stark beweglich. Der Anteil der Weibchen, die leere Uterusschläuche oder nur Einzellstadien enthielten, war ebenfalls nicht signifikant verschieden und entsprach unseren langjährigen Erfahrungen (SCHULZ-KEY et al. 1980). Die Embryonalstadien in Weibchen aus unbehandelten Patienten waren zu einem geringeren Prozentsatz pathologisch verändert, ansonsten aber gut ausgebildet. In den Weibchen aus den Mebendazolpatienten konnten dagegen bis auf die im Uterus geschlüpften Mikrofilarien keine normal entwickelten Stadien mehr nachgewiesen werden.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen:
Weibchen, die aus unbehandelten Patienten gewonnen waren, ließen eine ungestörte Entwicklung der Embryonalstadien nahe den Uteruswänden erkennen (Abb. 1a). Die reifenden Mikrofilarien („Brezelstadien") waren vollständig von einer intakten Eihülle umgeben und standen durch „nutrient channels" mit der Uteruswand in Verbindung,

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

wie sie von ELLIS et al. (1978) bei *Dipetalonema viteae* bezeichnet werden. Sie werden durch die Eihüllen dicht gelagerter Embryonen begrenzt. Die verlassenen Eihüllen der bereits geschlüpften Mikrofilarien lagen gefaltet neben ihnen (Abb. 1b).

In Weibchen aus Patienten, die mit Mebendazol/Levamisol behandelt worden waren, waren „nutrient channels" nicht oder nur unvollständig ausgebildet, denn die Eihüllen waren teilweise beschädigt. Oozyten waren desorganisiert, die embryonalen Stadien zeigten einen Zerfall der zellulären Strukturen oder enthielten Vakuolen (Abb. 2a, b). An einigen Stellen war die Kutikula der noch unreifen Mikrofilarien defekt.

Immunozytochemische Untersuchungen:
Antigen-Antikörperreaktionen konnten durch eine immunreaktive Färbung an den weiblichen Filarien festgestellt werden, unabhängig davon, ob sie aus behandelten oder unbehandelten Patienten gewonnen waren. eine deutliche immunreaktive Färbung konnte an den befruchteten Eiern, an deren Eihülle und an den Fragmenten, die die „nutrient channels" begrenzten, sowie an der Uteruswand selbst beobachtet werden (Abb. 3a). Wurde das normale Humanserum vorher an Filarienantigen absorbiert, trat keinerlei immunreaktive Färbung auf (Abb. 3b).

Legenden zu den Abbildungen

Abb. 1: *Onchocerca volvulus:* Uterusanschnitt von Weibchen aus einem unbehandelten Patienten.
a. Abschnitt mit zwei embryonalen Mikrofilarien („Brezelstadien"). Die Mikrofilarie wurde in der Eihülle mehrfach angeschnitten.
b. Uterusabschnitt mit Mikrofilarien, die die Eihüllen bereits verlassen haben. Die Eihüllen liegen gefaltet daneben.

EH Eihülle, MF Mikrofilarie, NK „Nahrungskanal", UW Uteruswand

Abb. 2: *Onchocerca volvulus:* Uterusanschnitte von Weibchen aus Patienten, die mit Mebendazol/Levamisol behandelt worden waren.

a. Abschnitt mit Eiern. Die Eihüllen sind teilweise zerstört. „Nahrungskanäle" sind nicht oder nur unvollständig ausgebildet.
b. Abschnitt mit embryonalen Mikrofilarien, die noch nicht geschlüpft sind. Die Eihüllen sind teilweise zerstört. In den Mikrofilarien bilden sich Vakuolen (Pfeile).

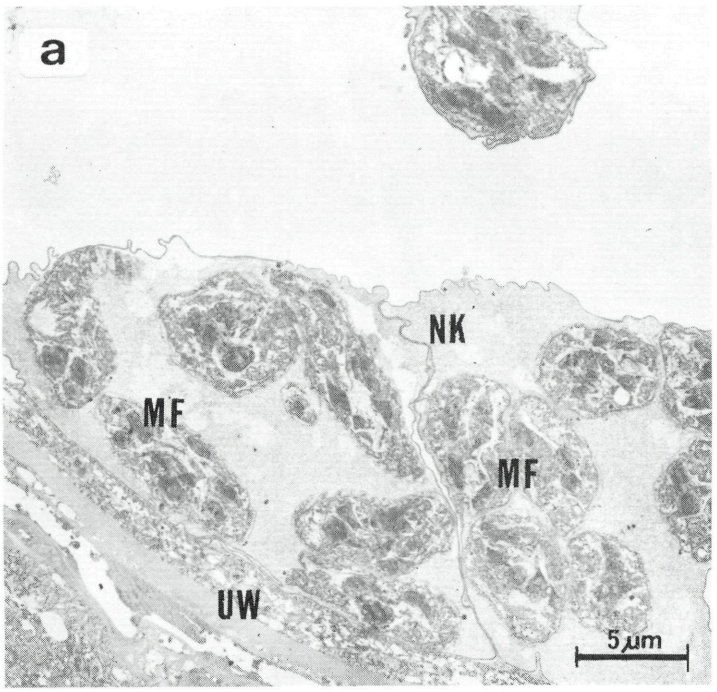
E Ei, EH Eihülle, MF Mikrofilarie, NK „Nahrungskanal", UW Uteruswand

Abb. 3: *Onchocerca volvulus:* Nachweis von antigenen Eigenschaften des Uterus und seines Inhaltes mit der PAP-Methode an Weibchen, die aus Mebendazol/Levamisolpatienten gewonnen wurden.

a. Immunreaktive Färbungen an reifenden Eiern, an deren Eihüllen, an Fragmenten der zerstörten „Nahrungskanäle".
b. Ausbleibende imunreaktive Färbung nach vorheriger Absorption des Normalserums an Filarienantigen.

E Ei, EH Eihülle, MF Mikrofilarie, NK „Nahrungskanal", UW Uteruswand

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at



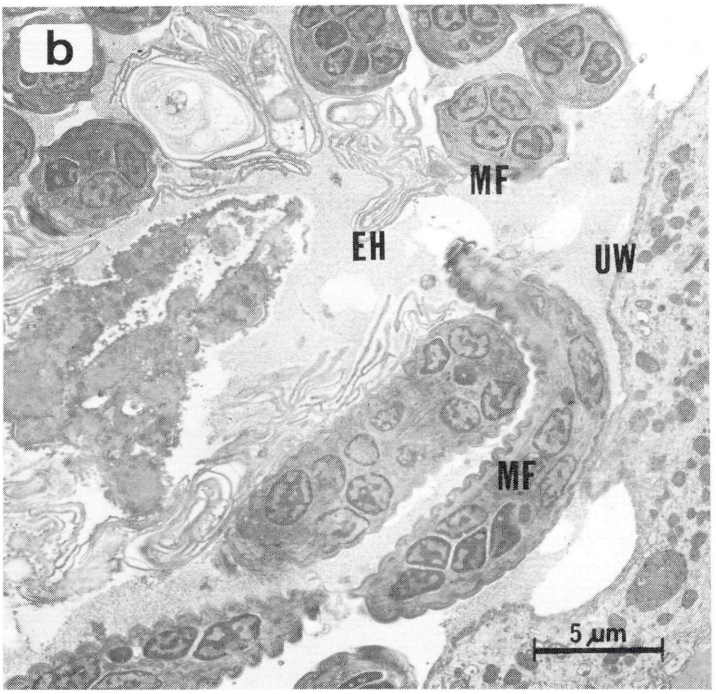
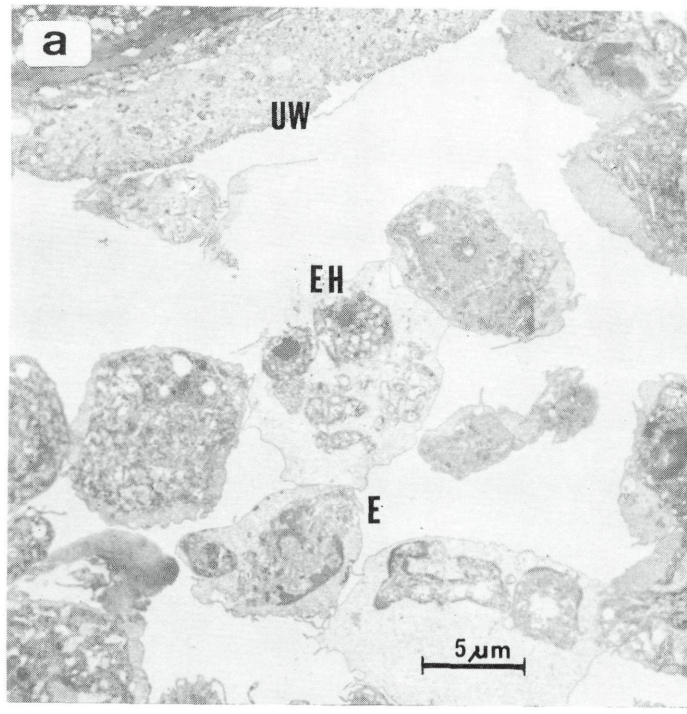


Abb. 1

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at



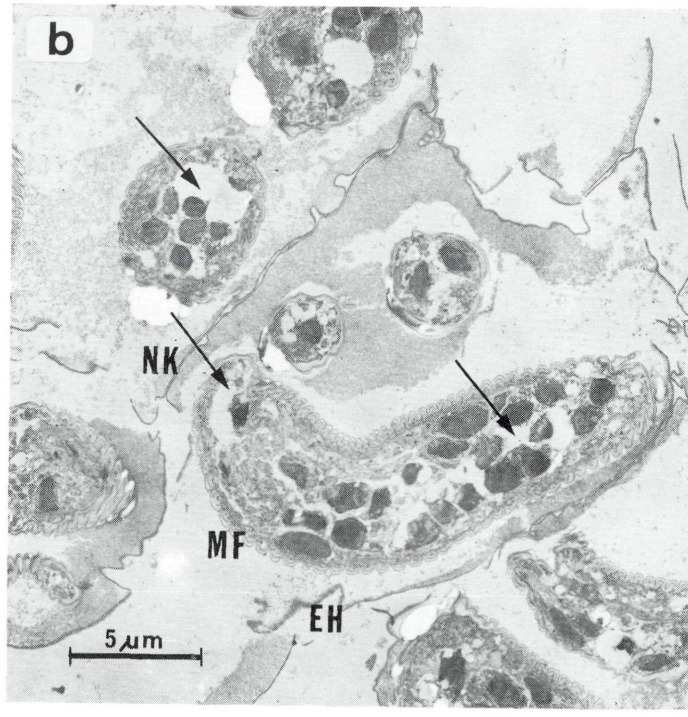
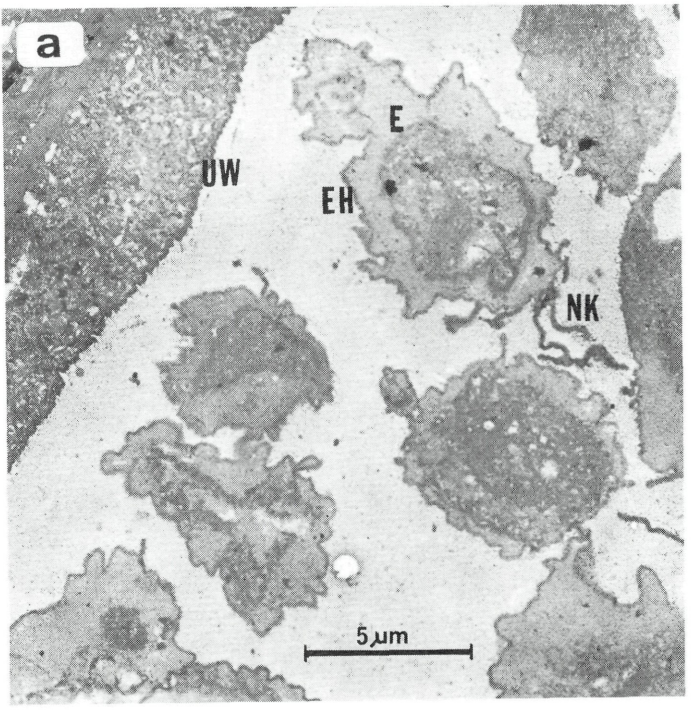


Abb. 2

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at



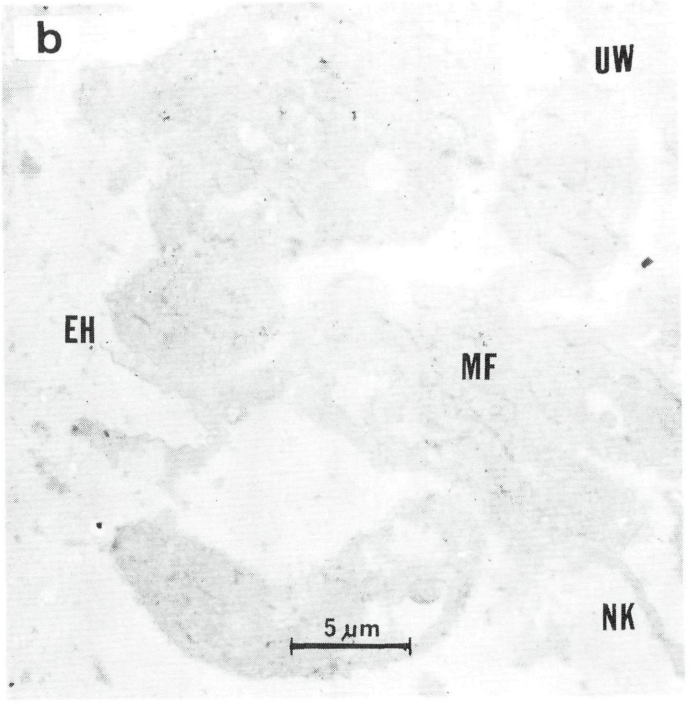


Abb. 3

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Diskussion

Auch in unbehandelten Patienten findet man einen unterschiedlich großen Anteil von degenerierten Embryonalstadien in den Weibchen von *O. volvulus*. ELLIS et al. (1978) erklären dies mit einer unzureichenden Ernährung einiger Stadien, besonders, wenn sie im Zentrum des Uteruslumen von den sie ernährenden Uteruswänden weiter entfernt sind. Sie beschreiben zwischen den dicht gepackten Embryonen Sektrektionsmaterial in „nutrient channels", das vermutlich von der Uteruswand abgegeben und an die Embryonen herangeführt wird. Werden solche „Nahrungskanäle" z. B. durch Veränderungen an der Eihülle nicht vollständig ausgebildet, wird auch der Embryo nicht mehr richtig ernährt und verkümmert. Dies ist offenbar nach einer Behandlung mit Mebendazol/Levamisol der Fall. Demnach verursacht dieses Medikament derartige Mißbildungen nicht durch eine direkte Wirkung auf die Zellteilungen der Embryonen, sondern indirekt durch eine Störung der Nährstoffversorgung. Damit erklärt sich auch die Beobachtung, daß die freien Mikrofilarien im Uterus nicht geschädigt werden und weiterhin in die Haut der Patienten einwandern können.

Beim nächsten Reproduktionsschub einige Wochen bis Monate später ist die Nährstoffzufuhr der Embryonen nicht mehr unterbunden, denn sie werden normal ausgebildet.

Antigen-Antikörperreaktionen konnten von PRÜSSE et al. (1982) im Reprodukionstrakt von *Dipetalonema viteae* nachgewiesen werden. Die antigenen Eigenschaften des Uterus und seines Inhaltes werden jetzt auch bei *O. olvulus* gefunden und könnten hier allgemein bei Filarien vorhanden sein.

Zusammenfassung

Der Uterus von *O. volvulus* und sein Inhalt werden elektronenmikroskopisch untersucht. Nach einer Behandlung mit Mebendazol/Levamisol wird die Unterbrechung der Nahrungszufuhr der Embryonen für eine indirekte embryozide Wirkung verantwortlich gemacht. — Antigene Eigenschaften des Uterus und seines Inhaltes werden nachgewiesen.

Summary

Ultrastructural and immunochemical studies in female ONCHOCERCA VOLVULUS after treatment of patients with Mebendazol and Levamisol.

The uterus of female *O. volvulus* and its contents are electronmicroscopically examined. After treatment of patients with Mebendazol/Levamisol the nutrition of the intrauterine stages is interrupted and causes an indirect embryocidal effect. — The uterus and its contents show antigenetic properties.

Literatur

AWADZI, K., H. SCHULZ-KEY, R. E. HOWELLS, D. R. W. HADDOCK, H. M. GILLES (1982): The chemotherapy of onchocerciasis VIII. Levamisol and its combination with the benzimidazoles. Annls. Trop. Med. Paras. *76*, 459—473

ELLIS, D. S., R. ROGERS, A. BIANCO, D. A. DENHAM (1978): Intrauterine development of the microfilariae of *Dipetalonema viteae*. J. HELM *52*, 7—10

PRÜSSE, A., S. VOLLMER, H. J. DIESFELD (1982): Immunocytochemical and ultrastructural studies on *Dipetalonema viteae* (Filaroidea). Tropenmed. Parasit. *33*, 33—36

RIVAS-ALCALA, A. R., B. M. GREENE, H. R. TAYLOR, A. DOMINGUEZ—VASQUEZ, C. LUGO-PFEIFFER, C. D. MACKENZIE, F. BELTRAN-HERNANDEZ (1981): chemotherapy for onchocerciasis: 12-month follow-up of mebendazole therapy for onchocerciasis. Lancet *2*, 1043

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

RIX, E., E. HACKENTHAL, U. HILGENFELDT, R. TAUGNER (1981) Neuropeptides in the pineal gland? A critical immunocytochemical study. Histochem. 72, 33—38

SCHULZ-KEY, H., B. JEAN, E. J. ALBIEZ (1980): Investigations on female *Onchocerca volvulus* for the evaluation of trug trials. Tropenmed. Parasit. *31*, 34—40

SCHULZ-KEY, H. (1983): Wirkung von Levamisol und Mebendazol auf die Embryogenese von *Onchocerca volvulus*. Mitt. Oesterr. Ges. Tropenmed. Parasitol. *5*, 139—142

STERNBERGER, L. A. (1974): Immunocytochemistry. Prentice-Hall, Inc.; Englewood Cliffs; New Jersey.

ANSCHRIFT:

Dr. Angela Prüße
Institut für Tropenhygiene und öffentliches Gesundheitswesen (Südasien-Institut)
der Universität Heidelberg, im Neuenheimer Feld 324,
D-6900, Heidelberg, BRD

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: 1985

Band/Volume: 7

Autor(en)/Author(s): Prüsse Angela, Adjamgba A., Schulz-Key Hartwig

Artikel/Article: Ultrastrukturelle und immunozytochemische Untersuchungen an Weibchen von Onchocerca volvulus nach Behandlung von Patienten mit Mebendazol und Levamisol. 215-222