

**Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie
und Hygiene der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Wagner, Ph. D. (Melbourne))

**Lichtphysiologische Untersuchungen an Cercarien von
Schistosoma mansoni, eines Erregers menschlicher
intestinaler Bilharziose**

Stefan Kopf

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. R. Disko
2. Univ. - Prof. Dr. D. Busch

Die Dissertation wurde am 3.3.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.11.2005 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
1.1.	Epidemiologie	5
1.2.	Biologie der Schistosomiasis	7
1.2.1.	Morphologie	7
1.2.2.	Entwicklungszyklus von Schistosomen	9
1.3.	Pathogenese	11
1.4.	Therapie und Prophylaxe	12
1.5.	Physikalische Grundlagen	14
1.5.1.	Elektromagnetisches Spektrum	14
1.5.2.	Eigenschaften des Lichtes	15
1.5.3.	Photophysikalische Einheiten	16
1.5.4.	Licht und Temperatur	17
1.5.5.	Periodische Erscheinungen bei Organismen	17
1.6.	Terminologie bei reizphysiologischen Untersuchungen	18
1.7.	Die Wahrnehmung von Licht	19
1.7.1.	Biochemie des Sehvorgangs	19
1.7.2.	Potentialtypen und Potentialbildung	24
1.7.3.	Typen der Sehzellen	27
1.7.4.	Die Bedeutung von Rhodopsin bei <i>Schistosoma mansoni</i>	29
1.8.	Aufgabenstellung	30
2.	Material und Methoden	31
2.1.	Versuchstiere	31
2.1.1.	Aufrechterhaltung des Wirtskreislaufes	31
2.1.2.	Gewinnung von Cercarien	32
2.1.3.	Verhalten von freien Cercarien	33
2.1.4.	Parameter für das Verhalten freier Cercarien	35
2.2.	Versuchsgeräte	36
2.2.1.	Entwicklung des computergesteuerten Beobachtungssystems	36
2.2.2.	Versuchsaufbau	37
2.2.3.	Küvette und Wasserbad 1	38
2.2.4.	Wasserbad 2 Beleuchtungsanlage	39

2.2.5. Monochromator	42
2.2.6. Echtzeit-Bildanalyse durch Schwellenwertkomparator	43
2.2.7. Nachführautomatik	48
2.2.8. Videoaufzeichnung der Cercarie	51
3. Versuchsergebnisse	52
3.1. Spontanaktivität bei Cercarien in Abhängigkeit vom Alter der Wirtsschnecke	53
3.2. Spontanaktivität bei Cercarien verschiedener Wirtsschnecken	56
3.3. Ermittlung der Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur	58
3.4. Abhängigkeit der Aktivphase von der Lichtstärke und Lichtwellenlänge	61
3.4.1. Beeinflussung der Aktivphase durch Veränderung von Lichtwellenlänge und Lichtintensität	61
3.4.2. Veränderung der Verweildauer an der Oberfläche durch Lichtstimulation	67
3.5. Abhängigkeit der Passivphase von Lichtwellenlänge und Lichtintensität	69
3.5.1. Abhängigkeit der Absinkgeschwindigkeit von Lichtwellenlänge und Lichtintensität	70
3.5.2. Abhängigkeit der Passivphase in der Länge und Anzahl von Lichtwellenlänge und Lichtintensität	72
3.5.3. Beeinflussung der Verweildauer am Boden durch veränderte Lichtstimulation	75
3.6. Stimulationsversuche	77
3.6.1. Dunkelreiz in der Passivphase	77
3.6.2. Dunkelreiz in der Aktivphase	82
3.6.3. Lichtreiz in der Passivphase	84
3.6.4. Lichtreiz in der Aktivphase	86
3.7. Gegenseitige Beeinflussung von Aktiv- und Passivphase	87
3.7.1. Beeinflussung der Aktivphase nach einer Dunkelstimulation	

in der Passivphase	87
3.7.2. Beeinflussung der Aktivphase nach einer Hellstimulation	
in der Passivphase	88
3.8. Verhalten einer größeren Cercarienpopulation	89
4.0. Diskussion	91
4.1. Diskussion der Methode in der Literaturübersicht	91
4.2. Materialien und Methode	92
4.2.1. Auswahl der Versuchstiere	92
4.2.2. Das Beobachtungssystem	92
4.2.3. Versuchsgefäß	94
4.2.4. Versuchsmedium und Versuchstemperatur	94
4.2.5. Beleuchtungsanlage und Versuchsraum	95
4.3. Gewinnung von Cercarien	96
4.4. Regelung und Messung der Lichtintensität	97
4.5. Diskussion der Messergebnisse	98
4.5.1. Ermittlung des Aktivitätsmaximums	98
4.5.2. Rhodopsin als Grundlage der lichtinduzierten Signal- übertragung bei <i>Schistosoma mansoni</i>	100
4.5.3. Funktionsmodell des Schwimmverhaltens	101
4.5.4. Cercarieneigene Rhythmik	108
4.5.5. Biologische Interpretation des Verhaltens	109
4.6. Ausblick	111
5. Zusammenfassung	113
6. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	115
7. Literaturangaben	118

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer Erregerart von Schistosomiasis, einer der bedeutendsten Tropenkrankheit.

Während die Ursache der Erkrankung bis in die Mitte des 19. Jahrhunderts unbekannt blieb, kannte man die Symptome schon in der alten ägyptischen Kultur. So wird im „Papyrus Ebers“, dessen Entstehung ca. 1500 vor Christus datiert wird, der blutige Urin als die typische Symptomatik der Schistosomiasis beschrieben.

Sir Armand Ruffer entdeckte 1910 in zwei Mumien, die aus der Zeit der 20. Pharaonendynastie stammten (1250-1000 v.Chr.), verkalkte Eier von Schistosomen (28). Erst im Jahre 1851 wurde von dem deutschen Arzt Theodor Bilharz der Erreger *Schistosoma haematobium* entdeckt (4).

Auch heute hat die Infektion nichts von ihrer Bedeutung verloren. Laut WHO sind zur Zeit ca. 200 Millionen Menschen weltweit an der Schistosomiasis infiziert, davon ca. 120 Millionen symptomatisch (38). Trotz Fortschritten in Therapie und Prävention ist die Krankheit noch lange nicht unter Kontrolle und die Zahl der betroffenen Menschen steigt weiter. Die Ursachen hierfür liegen größtenteils in den sozialen und wirtschaftlichen Bedingungen der Dritten Welt [(20), (35)].

Der enorme Bevölkerungszuwachs in der Dritten Welt, die steigende Mobilität und das Problem der Defäkation führt zu einer steigenden Belastung der Trinkwasservorräte. Immer weitreichendere Bewässerungssysteme werden nötig, um den Bedarf an Wasser und Nahrung zu decken. Die dafür geschaffenen künstlichen Bewässerungssysteme führen neben einer Verbesserung der Lebensqualität jedoch auch zu einer weiteren Verbreitung der Schistosomiasis.

Der zunehmende Reiseverkehr großer Bevölkerungsanteile der westlichen Länder in die Tropen führte dazu, daß die Behandlung und Prävention der Schistosomiasis auch in den entwickelten Länder eine zunehmende Bedeutung erlangt.

1.1. Epidemiologie

Von fünf menschenpathogenen Schistosomenarten ragen drei Arten besonders heraus:

1. *Schistosoma mansoni*

- Erreger der Darm- und Leberbilharziose
- Zwischenwirt: Schnecken der Gattung *Biomphalaria*
- Verbreitungsgebiet: Afrika (Madagaskar), Arabische-Halbinsel, Brasilien, Venezuela, Karibik

2. *Schistosoma haematobium*

- Erreger der Urogenitalbilharziose
- Zwischenwirt: Schnecken der Gattung *Bulinus*
- Verbreitungsgebiet: Afrika (Madagaskar), Arabische Halbinsel, Mesopotamien

3. *Schistosoma japonicum*

- Erreger der asiatischen Leber- und Darmbilharziose
- Zwischenwirt: verschiedene Arten der Schneckengattung *Oncomelania*
- Verbreitungsgebiet: Ostasien (hauptsächlich China, Philippinen)

An die endemische Verbreitung der Schistosomiasis sind einige Voraussetzungen geknüpft. So kann die Krankheit nur in Gebieten auftreten, in denen hohe Wassertemperaturen das Überleben der spezifischen Zwischenwirtschnecken ermöglichen und in denen Schistosomenlarven vorkommen. Aufgrund der schlechten sanitären Verhältnisse gelangen Schistosomeneier, die von infizierten Menschen ausgeschieden werden, ins Wasser und können dort ihrerseits zur Infektion von Schnecken führen.

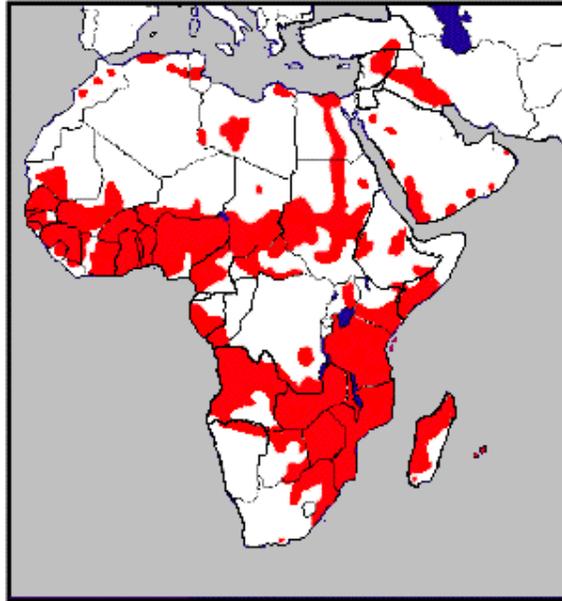


Abb. 1.1a. Geographische Verteilung von *Schistosoma haematobium* (37)

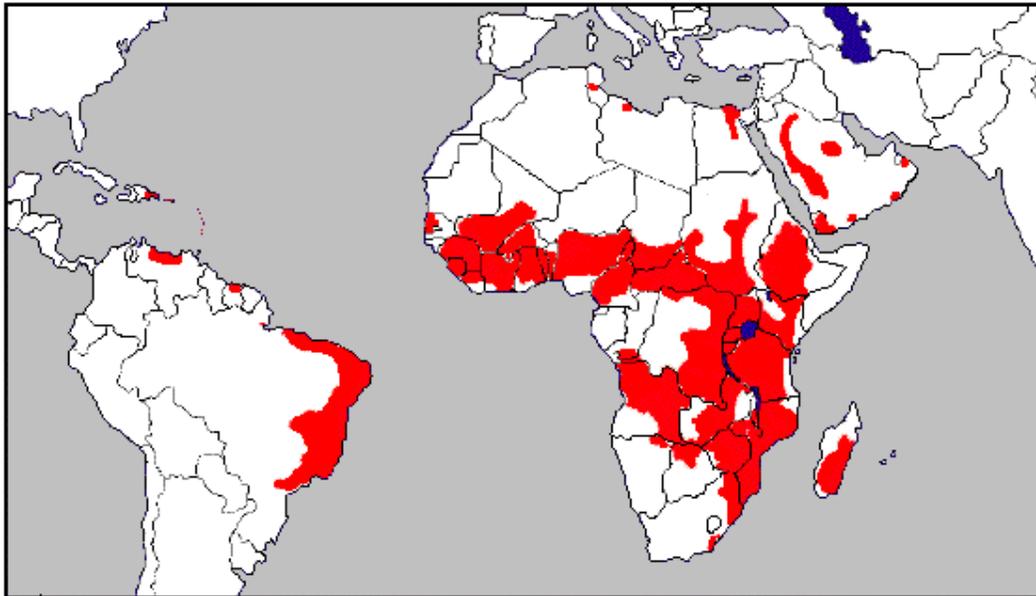


Abb.1.1b. Geographische Verteilung von *Schistosoma mansoni* (37)

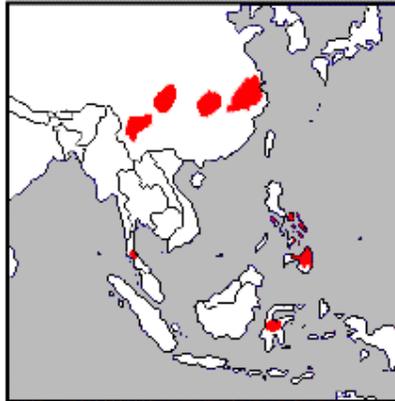


Abb. 1.1c. Geographische Verteilung von *Schistosoma japonicum* (37)

1.2. Biologie der Schistosomiasis

1.2.1. Morphologie

Die Gattung der Schistosomen wird zur Klasse der Trematoden (Saugwürmer) gerechnet. Herausragend ist die Eigenschaft, daß sie getrenntgeschlechtlich als Paar (Pärchenegel) in Venen (Aderegel) leben.

Alle Schistosomenarten zeichnen sich durch einen deutlichen Sexualdimorphismus aus. Die Männchen sind 6-10 mm lang, dorsoventral abgeplattet und an den Rändern ventral eingerollt. In dieser, Canalis gynaecophorus genannten Spalte, liegt das wesentlich schlankere, fadenförmige Weibchen (7-15 mm lang). Durch dieses morphologisches Erscheinungsbild entsteht der Eindruck eines gespaltenen Körpers (griechisch schistos: gespalten; soma: der Körper; Abb. 1.2.1.).

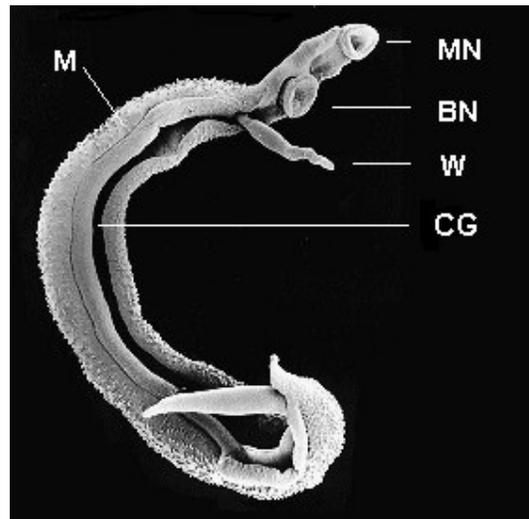


Abb. 1.2.1. Pärchen von Schistosoma mansoni (26)

- BN Bauchsaugnapf
- W Weibchen, das im Canalis gynaecophorus des Männchens liegt
- M Männchen
- MN Mundsaugnapf
- CG Canalis gynaecophorus

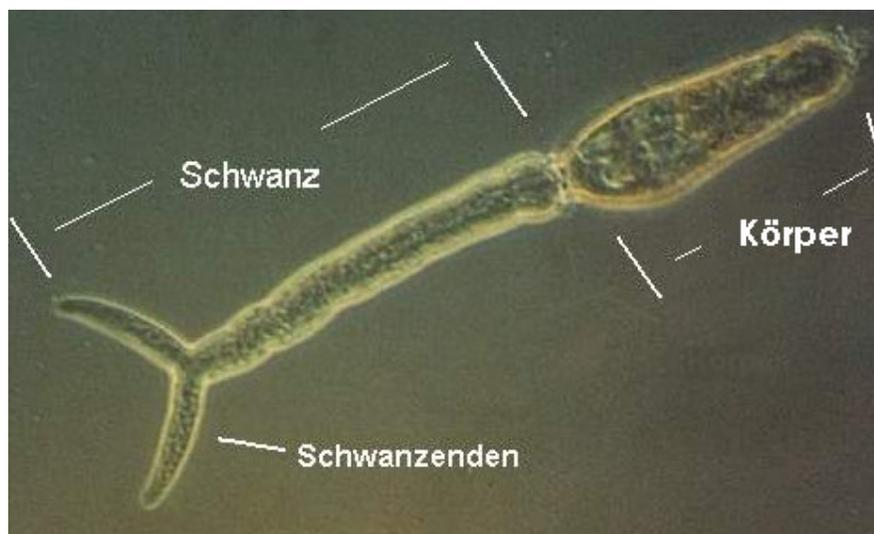


Abb. 1.2.2. Mikroskopisches Bild einer Cercarie (7)

Die Abbildung zeigt eine einzelne Cercarie, wie sie im Wasser anzutreffen ist. Der komplette Schwanz wird bei Eindringen in die menschliche Haut abgeworfen.

Die morphologischen Merkmale aller Trematoden – der Mund- und Bauchsaugnapf – sind auch bei den Schistosomen zu finden. Sie liegen nahe zusammen am vorderen Abschnitt des Körpers. Der Mundsaugnapf dient gleichzeitig der Aufnahme der Nahrung und Ausscheidung der verdauten Nahrungsreste (Blut).

1.2.2. Entwicklungszyklus von Schistosomen

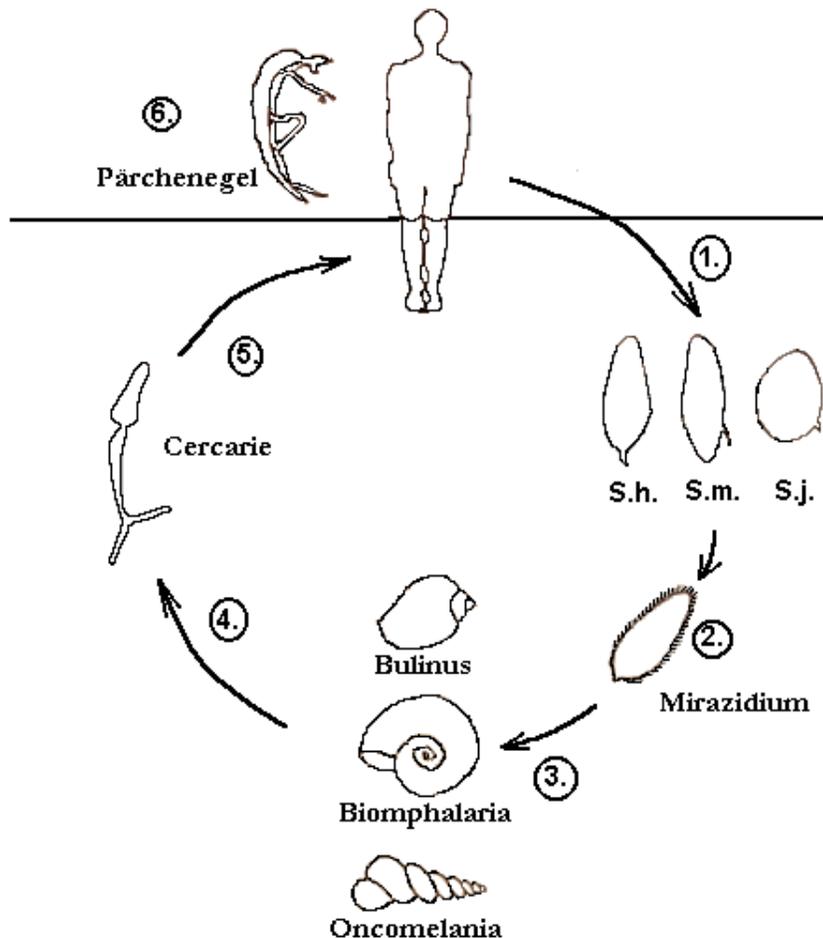


Abb.1.2.2. Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von Schistosomen zwischen Schnecke (Zwischenwirt) und Mensch (Endwirt) (8)

1. Infizierte Patienten scheiden mit dem Urin oder Fäces Schistosomen-Eier aus.
2. Kommt ein Schistosomen-Ei in Berührung mit Süßwasser, entweicht aus ihm das Mirazidium.
3. Die Miracidien infizieren die Wirtsschnecken

4. In den Wirtsschnecken entwickeln sich die Miracidien zu Sporozysten. Im Endstadium der Entwicklung in der Wirtsschnecken entweichen Cercarien aus der Schnecke in das Wasser.
5. Die Cercarien durchdringen bei Berührung die menschliche Haut. Bei der Invasion verlieren die Cercarien ihren Schwanz.
6. Der restliche Körper der Cercarie wandert über das Blut zum Pfortadersystem der Leber und zum Splanchniskussystem des Darmes (bei *S. mansoni*). Dort entwickeln sie sich zu Pärchenegel.

Der Entwicklungszyklus der drei humanmedizinisch wichtigsten Arten gestaltet sich im Prinzip ähnlich, abhängig von den jeweiligen Zwischenwirten, den süßwasserbewohnenden Schnecken.

Darstellung des Infektions- und Entwicklungszyklus von *Schistosoma mansoni*:

1. Mit Hilfe histio-cytotoxischer Einwirkungen gelangen die Eier ins Gewebe und im Falle von *S. mansoni* auch ins Darmlumen. Die gepaarten, geschlechtsreifen Würmer leben bevorzugt in den Mesenterial- und Darmvenen, sowie im Pfortadersystem der Leber. Dort erfolgt die Eiablage.
2. Das Ei wird über Fäkalien mit einem reifen Mirazidium ausgeschieden. Gelangt das Ei in Süßwasser, schlüpft das Mirazidium. Danach muß es innerhalb von 24 eine geeignete Wirtsschnecke gefunden haben.
3. Es folgt die Infektion einer Schnecke. Dort verwandelt sich das Mirazidium in ein sackartiges Gebilde, die sogenannte Muttersporozyste. Diese bildet schlauchförmige Tochtorsporozysten, die in die Mitteldarmdrüse der Schnecke wandern.
4. Die Tochtorsporozysten bringen dann die charakteristischen Gabelschwanzlarven, Cercarien, hervor.
5. Aus einer infizierten Schnecke entweichen ca. 28 Tage nach der Infektion die Cercarien ins Wasser.

6. Die Cercarien durchdringen die Haut eines Menschen. Die jungen Parasiten (Schistosomula) dringen in Lymphgefäße oder Hautvenen ein und gelangen passiv mit dem Blutstrom ins Herz. Über das Kapillarsystem der Lunge gelangen sie in das Pfortadersystem der Leber. Ihre Geschlechtsreife erreichen sie dort 4-6 Wochen nach der Infektion.

1.3. Pathogenese

Die im Gefäßsystem des Menschen lebenden Pärchenegel können bis zu 6 Jahre alt werden. Sie geben permanent Eier ab, die verantwortlich sind für die Symptome der Schistosomiasis.

Neben Gefäßverschlüssen, die durch die mechanische Wirkung der Eier hervorgerufen werden, verändern sie durch abgegebene toxische Stoffe, die sie abgeben, ihr umgebendes Gewebe. So kann es zu einer Bildung von sog. Eigranulomen („Pseudotuberkeln“) kommen, die der Ausgang einer sich entwickelnden Fibrose sind.

Bei der Schistosomiasis lassen sich drei Stadien des klinischen Erscheinungsbildes unterscheiden:

1. Cercarien-Dermatitis:

Hervorgerufen durch die Cercarieninvasion kommt es zu einer allergischen Hautreaktion mit Juckreiz und papulösen Veränderungen. Bei der in Europa beobachteten Badedermatitis, die durch intrakutane Invasion von Cercarien vogelspezifischer Schistosomenarten hervorgerufen wird, tritt oft eine stärkere Hautreaktion auf als bei der Bilharzia-Cercarieninvasion.

2. Akut-febriles Initialstadium:

4-6 Wochen im Anschluß an eine Infektion kann es zu Fieberschüben kommen. Die Symptome sind jedoch leicht mit anderen Infektionskrankheiten zu verwechseln. Ausgeprägte Beschwerden treten mit dem Beginn der Eiausscheidung der Würmer auf (sog. **Katayama-Syndrom**).

3. Chronisches Stadium:

Bei Darmbilharziose: entzündliche Dickdarmveränderungen, blutig-schleimige Durchfälle; Veränderung von Milz- und Leber bis zur Leberfibrose

Bei Urogenitalbilharziose: Haematurie, Brennen der Harnröhre und Harn-drang, bei Fortschreiten auch Blasenkrebs (hauptsächlich in Ägypten)

1.4. Therapie und Prophylaxe

Für die Behandlung der Schistosomiasis stehen folgende Medikamente zur Auswahl:

Präparat		Wirksamkeit gegen		
Internationaler Name	Handelsname	<i>Schistosoma haematobium</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma japonicum</i>
Metrifonat	Bilarcil	+	-	-
Oxamniquin	Mansil, Vansil	-	+ **	-
Praziquantel	Biltricide	+	+	+

Tab. 1.4. Wirksamkeit verschiedener Präparate auf Schistosomen-Arten
+ = wirksam, - = unwirksam, ** Wirkung auf südamerikanische Stämme besser als auf afrikanische

Bei einer frühzeitigen Behandlung der Schistosomiasis mit einem adäquaten Therapeutikum, z.B. mit Praziquantel, zeigt die Behandlung eine gute Heilungschance von bis zu 90 % bei *S. mansoni* und *S. haematobium* und 50 % bei *S. japonicum*. Eine Immunität besteht nach durchgemachter Erkrankung aber nicht, sodaß es zu einer Reinfektion kommen kann.

Eine dauerhafte prophylaktische Einnahme von Chemotherapeutika scheidet schon aus Kostengründen aus (11).

Eine andere Möglichkeit, eine Infektion zu vermeiden, bestünde darin, den Kontakt mit infiziertem Wasser zu vermeiden. Für Touristen ist dies eine gute Schutzmaßnahme, doch bei der ansässigen Bevölkerung würden sich daraus große Probleme ergeben, da dies einschneidende Änderung in den Lebensgewohnheiten zur Folge hätte. Es müßten Wassertanks errichtet werden, um das Wasser mindestens 48 Stunden bis zum Absterben der Cercarien zu lagern, oder das Wasser müßte immer abgekocht werden. Zudem müßten bei allen Kontakten mit Süßwasser Gummistiefel getragen werden.

Bisherige Bemühungen, mit einer Immunisierung die Bevölkerung zu schützen, waren bislang erfolglos (27).

Es müssen noch viele Anstrengungen unternommen werden, um eine kostengünstige, praktikable und umweltverträgliche Methode zur langfristigen Bekämpfung der Schistosomiasis zu finden.

Die größte Wirkung zur Eindämmung der Schistosomiasis erzielt immer noch die Verbesserung der hygienischen Verhältnissen in den betroffenen Ländern. Nur wenn es nachhaltig gelingt, den Infektionskreislauf zu stoppen indem infizierte Menschen ihre Fäkalien nicht unmittelbar in die Gewässer abgeben, kann eine deutliche Reduzierung der Schistosomiasis bis hin zur Ausrottung erreicht werden.

1.5. Physikalische Grundlagen

1.5.1. Elektromagnetisches Spektrum

Ein zentraler Punkt der Arbeit war, die Reaktion der Cercarien auf Licht zu untersuchen. Licht spielt im Tagesrhythmus von Pflanzen, Tieren und Menschen eine Hauptrolle.

Der Mensch kann nur den Bereich zwischen 380 und 780 nm des elektromagnetischen Spektrums als Licht wahrnehmen. Wir unterscheiden in diesem Bereich Licht verschiedener Farbe, welche von der Wellenlänge der Strahlung abhängt.

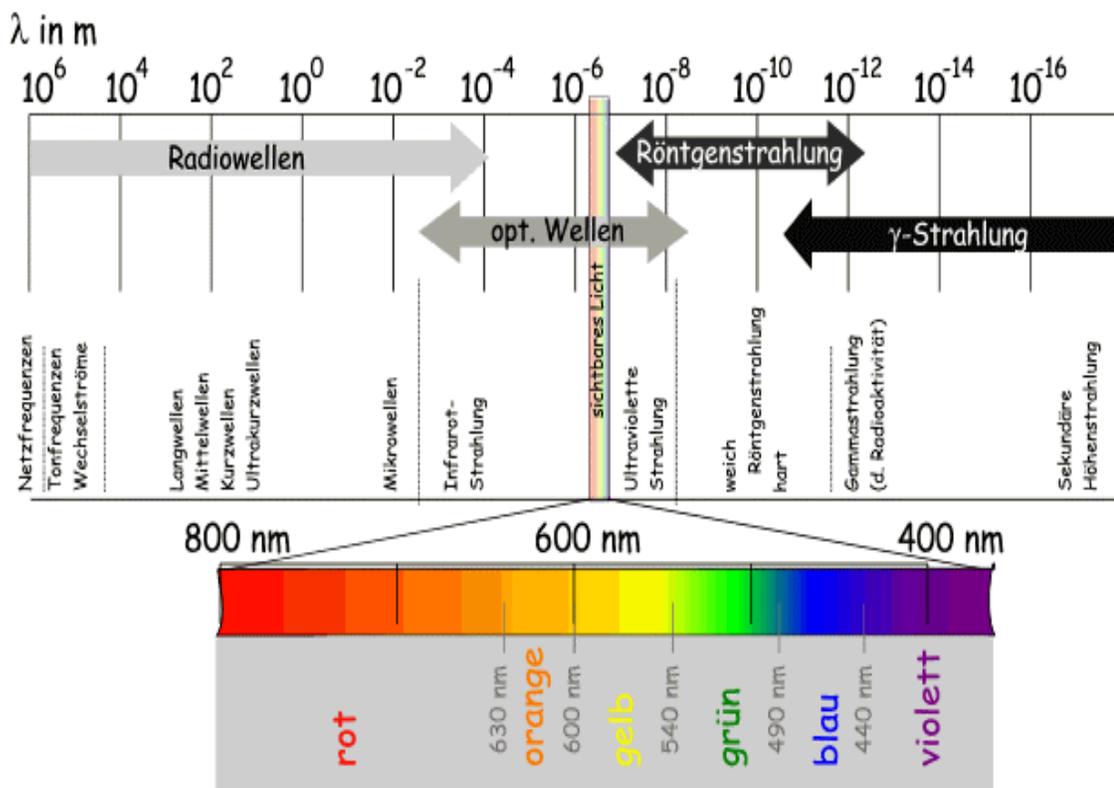


Abb. 1.5.1. Schematische Übersicht über das elektromagnetische Strahlungsspektrum

1.5.2 Eigenschaften des Lichtes

Bei Lichteinwirkung auf einen Körper können sich folgende Größen verändern:

1. Intensität des Lichts
2. Spektrale Zusammensetzung des Lichts
3. Polarisation
4. Lichtrichtung
5. Bestrahlungsdauer

Die Lichtfarbe ergibt sich aus dem Anteil der Wellenlänge des Lichts. Die Energie, die pro Photon ausgesandt wird, ist um so größer, je höher die Frequenz und je kürzer die Wellenlänge des Lichts ist.

$$c = \lambda \times \nu$$

c = Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichts

λ = Wellenlänge

ν = Frequenz

$$E = h \times \nu$$

E = Energie pro Photon

h = Planck'sche Konstante

ν = Frequenz

Aus den Gleichungen ergibt sich der Zusammenhang, daß z.B. kurzwellige Strahlung (violett mit 395 nm) fast doppelt so viel Energie pro Photon besitzt wie langwellige Strahlung (rot mit 650 nm).

Licht breitet sich in jedem Medium unterschiedlich aus. In Wasser dringt nur ein Teil der Strahlung ein, da Licht im Wasser z.T. absorbiert und z.T. an der Oberfläche reflektiert wird. Die Absorption von Licht in Wasser wird vorrangig von den im Wasser gelösten Partikeln geprägt. Je verschmutzter das Wasser ist, in desto geringerer Tiefe können Lichtstrahlen eindringen.

Licht, das auf ein Molekül trifft, bringt die Elektronen dieses Moleküls in einen angeregten Zustand, d.h. es absorbiert Energie. Ob Licht von einem Stoff absorbiert werden kann, hängt eng mit der Farbe des Stoffes zusammen. Nur die

Lichtstrahlen, die nicht von einem Gegenstand absorbiert werden, erreichen unser Auge und erscheinen dann für unser Auge in dieser Farbe.

Die für die verschiedenen Lebewesen unserer Erde sichtbaren Spektralbereiche variieren sehr stark. So sehen manche Insekten z.B. UV-Strahlung, während rotes Licht für sie nicht wahrnehmbar ist.

1.5.3. Photophysikalische Einheiten

Im nachfolgenden werden die photophysikalischen Größen dargestellt, wie sie in der Arbeit verwendet werden.

Es stehen sich dabei zwei Systeme gegenüber. Einmal die rein physikalischen Größen und zum anderen ein System photometrischer Einheiten, welches sich an der spektralen Lichtempfindlichkeit des menschlichen Auges orientiert. Somit sagen die photometrischen Größen, je mehr die Lichtempfindung des untersuchten Organismus von der des Menschen abweicht, umso weniger ist über die wirkliche Strahlungsempfindlichkeit auszusagen. Deshalb können photometrische Größen nur mit großem Aufwand und unter Einbeziehung der spektralen Empfindlichkeitskurve des Menschen in physikalische Größen umgerechnet werden.

Tabelle 1.5.3. Photophysikalische Einheiten

Photometrische Größen	Physikalische Größen
Lichtmenge (Lumensekunde = lms)	Strahlungsmenge (Joule = J)
Lichtstärke (Candela = cd)	Strahlstärke (Mol)
Leuchtdichte (Cd/m ²)	Strahldichte (Mol/m ²)
Beleuchtungsstärke (Lux = lx)	Bestrahlstärke (Watt/m ²)

1.5.4. Licht und Temperatur

Wird Strahlung von einem geeigneten Stoff absorbiert, so erhöht sich dessen Temperatur. Abhängig von der spektralen Zusammensetzung des Lichts erfolgt diese Erhöhung unterschiedlich stark. Kaltlicht (blau) erwärmt einen Körper nicht so deutlich wie Warmlicht (rot), obwohl es viel mehr Energie pro Photon besitzt. Am wirksamsten zur Erwärmung von Körpern ist Infrarotlicht.

Bei vielen wechselwarmen Tieren hängen ihre gesamten Reaktionen, besonders ihre Reaktion auf Licht, sehr stark von der Temperatur ab. Sowohl unterschiedliche Temperatur als auch unterschiedliche Lichtstärken – und Wellenlängen wirken sich auch auf das Schwimmverhalten von Cercarien aus [(1),(4),(9),(19),(23)(29),(36)].

1.5.5. Periodische Erscheinungen bei Organismen

Viele Organismen, selbst die winzigsten Einzeller, zeigen periodische Veränderungen ihrer Verhaltensweisen, die sich dem Tag-Nacht-Rhythmus, den Jahreszeiten, dem Gezeitenrhythmus oder dem Mondphasenrhythmus anpassen. Die Anpassung an solche äußeren Rhythmen führte wahrscheinlich zur Entwicklung einer „Inneren Uhr“, die auch bei Fehlen der Außenrhythmik weiterläuft. Dieser innere Rhythmus weicht jedoch von dem exogenen Rhythmus meist um kleine Zeitbeträge ab, muß also durch äußere „Zeitgeber“ immer wieder neu synchronisiert werden. Als äußere Zeitgeber fungieren hierbei meist Licht oder Temperatur. Da diese endogenen Rhythmen nur circa-Rhythmen darstellen, hat sich für die Terminologie circadian für tagesperiodisch, circatidal für gezeitenperiodisch eingebürgert.

Auch viele parasitäre Organismen zeigen ausgeprägte periodische Erscheinungen, wie bei Cercarien auch schon festgestellt werden konnte [(2),(3),(5),(24),(32)]. Da Parasiten sehr gut an ihren Wirtsorganismus angepasst

sind, liegt die Vermutung nahe, daß sie auch an die Zeitrhythmen ihrer Wirte angepaßt sind. Nur so ist eine optimale Wirtsfindung gewährleistet.

1.6. Terminologie bei reizphysiologischen Untersuchungen

Eine Reaktion auf einen externen Reiz stellt eine reizbedingte Änderung der motorischen Aktivität eines Organismus dar. Die Folge kann eine Änderung der Bewegung oder der Orientierung sein. Das Minimum an Energie, das notwendig ist, um eine Antwort hervorzurufen, wird als **Schwellenwert** bezeichnet.

Unter **Erregungspotential** versteht man die Stärke des Erregungszustandes. Wird die **Reizschwelle**, die sich variabel ändern kann, erreicht, wird die Bewegung nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip ausgelöst. D.h. wird die Reizschwelle überschritten, kommt es immer zu der Auslösung einer Bewegung.

Die Beobachtung, daß Organismen durch Gabe von Lichtreizen ihr Verhalten verändern können, prägte den Begriff **Photokinesis**. Es kann dabei sowohl zu einer Veränderung der Bewegungsgeschwindigkeit als auch der Anzahl der ausgeführten Bewegungen kommen.

Aktivität ohne äußeren Reiz wird als **Leerwert** bezeichnet. Nimmt die Aktivität durch den Reiz zu, bezeichnet man das als **positive Kinesis**. Wird die Aktivität geringer, handelt es sich um eine **negative Kinesis**.

Als **Taxis** bezeichnet man eine Bewegung, deren Orientierung von der Reizrichtung abhängig ist. Bewegt sich der Organismus auf die Reizquelle zu, dann ist die Taxis **positiv**, bewegt er sich von der Reizquelle weg, **negativ**.

Kommt es bei Organismen zu einer Ansammlung in einem Gebiet höherer Reizintensität, dann handelt es sich um eine **Akkumulation** oder **Dispersion**.

1.7. Die Wahrnehmung von Licht

1.7.1. Biochemie des Sehvorgangs

Entwicklung und Existenz des Lebens auf der Erde sind untrennbar mit dem Licht der Sonne verbunden. Die Evolution von photosynthetischen Systemen wurde initiiert, in denen eine Umsetzung von Lichtenergie in chemische Energie vorgenommen wird. Das Sonnenlicht bewirkte darüber hinaus die Entstehung von photosensitiven Systemen (Photorezeptoren), mit deren Hilfe es den Organismen möglich wurde, sich innerhalb ihres Lebensraumes orientieren zu können.

Die verschiedenen Arten wurden aufgrund der Konkurrenz innerhalb des Ökosystems gezwungen, eine ökologische Nische zu besetzen, in der sie eine Überlegenheit über andere Organismen für ihre Erhaltung ausbilden können. Das Spektrum und die Intensität des Sonnenlichts in diesen Nischen unterliegen deutlichen Variationen. So nimmt z.B. der Anteil des roten Lichts mit zunehmender Wassertiefe ab. In der Evolution haben die Organismen auf diese spektrale Verteilung mit einer erstaunlichen Variation und Anpassung photorelevanter Systeme reagiert. Pflanzen sind in der Regel an einen Ort gebunden und auf die dort vorhandenen Bedingungen angewiesen. Zur Ausrichtung ihres photosynthetischen Apparats (Chlorophyll) auf die für sie optimalen Lichtverhältnisse haben sie ein Photorezeptorsystem (Phytochrom) entwickelt. Dieses Rezeptorsystem ermöglicht Pflanzen, sowohl die Richtung als auch die Intensität des Sonnenlichts zu ermitteln und unter Umständen mit einem veränderten Wachstum zu reagieren.

Grünalgen und Bakterien sind im Gegensatz zu den standortfesten Pflanzen in der Lage, sich in Kopplung mit motorischen Systemen (Flagellen) in Richtung günstiger Lichtverhältnisse zu bewegen (Phototaxis)[19]. Diese Fähigkeit von Bakterien, auf lichtinduzierte Reize zu reagieren, ist schon seit langem bekannt. So entdeckte im Jahre 1883 Engelmann, daß Bakterien, die er aus dem Rhein isoliert hatte, nicht nur auf chemische Reize reagierten, sondern auch auf Veränderungen des Lichts (2).

Bei Tieren reduziert sich die Ausnutzung des Lichts auf den photosensorischen Bereich, der Informationsgehalt des Lichts wird für die Ortung, die Wahrnehmung der Gestalt und teilweise auch der Farbe von Objekten verwendet. Dieses ist u.a. notwendig für die Suche von Nahrung oder der Flucht vor Feinden.

Die molekulare Grundlage für die Wechselwirkung der Organismen mit dem Licht wird durch Chromoproteine gebildet. Diese setzen sich aus zwei Bestandteilen zusammen: Zum einen aus der Proteinkomponente und zum anderen aus dem Chromophor, einer niedermolekularen Einheit. Die Kombination der beiden Verbindungen ist notwendig, weil die Peptidketten des Proteins alleine für sich keine relevante Lichtabsorption aufweisen. Diese Eigenschaft besitzt hingegen das Chromophor, so daß mit der Einbindung der „farbgebenden“ Substanz in das Apoprotein ein photosensitives Molekül entsteht. Darüber hinaus kann das Chromophor über Veränderung in der Proteinstruktur seine Lichtabsorbierendeigenschaften soweit verändern, daß die Chromoproteine über den gesamten Bereich des sichtbaren Lichts mit diesem in Wechselwirkung treten und in ein Reiz umwandeln können.

Unter den Chromoproteinen findet sich eine Reihe von Strukturen, deren Gemeinsamkeit darin besteht, daß sie als Chromophor Retinal 1 oder Retinal 2 (Vitamin-A-Aldehyd) und das Protein Opsin verwenden. Dazu gehören besonders die Sehpigmente der höheren Tiere (Rhodopsin), die phototaktischen Pigmente niederer Lebewesen und das Purpurpigment Bacteriorhodopsin. Reines Retinal besitzt ein starkes Absorptionsmaximum bei 370 nm, reines Opsin bei 280 nm. Die Verbindung von Retinal und Opsin führt zu einem ausgeprägten Absorptionsmaximum bei etwa 500 nm neben einem schwächeren bei ca. 280 nm. Die Lage des Maximums im langwelligen Bereich hängt von der Struktur des Opsin ab und ist art- und klassenspezifisch. Retinal 1 als chromophore Gruppe besitzen die Sehfärbstoffe Rhodopsin, Jodopsin und Retinochrom. Retinal 2 ist dagegen Bestandteil der Porphyropsine und des Cyanopsins

Bei Landvertebraten kommen fast ausnahmslos Rhodopsine vor, deren Absorptionsmaxima in recht engen Bereichen liegen. Eine größere Variabilität in der Lage der Absorptionsmaxima weisen z.B. die Sehfärbstoffe von Fischen auf, was

in erster Linie in Zusammenhang mit den größeren Unterschieden in den Lichtabsorptionseigenschaften ihrer Lebensräume zu sehen ist. Um diesen Unterschied gerecht zu werden, haben die Fische zwei Sehfärbstoffsysteme ausgebildet, das Rhodopsin-System und das Porphyropsin-System. Diese Beobachtung konnte auch auf Rhodopsine von Nichtvertebraten übertragen werden. Bacteriorhodopsin besitzt ein sehr engen Absorptionsbereich (16).

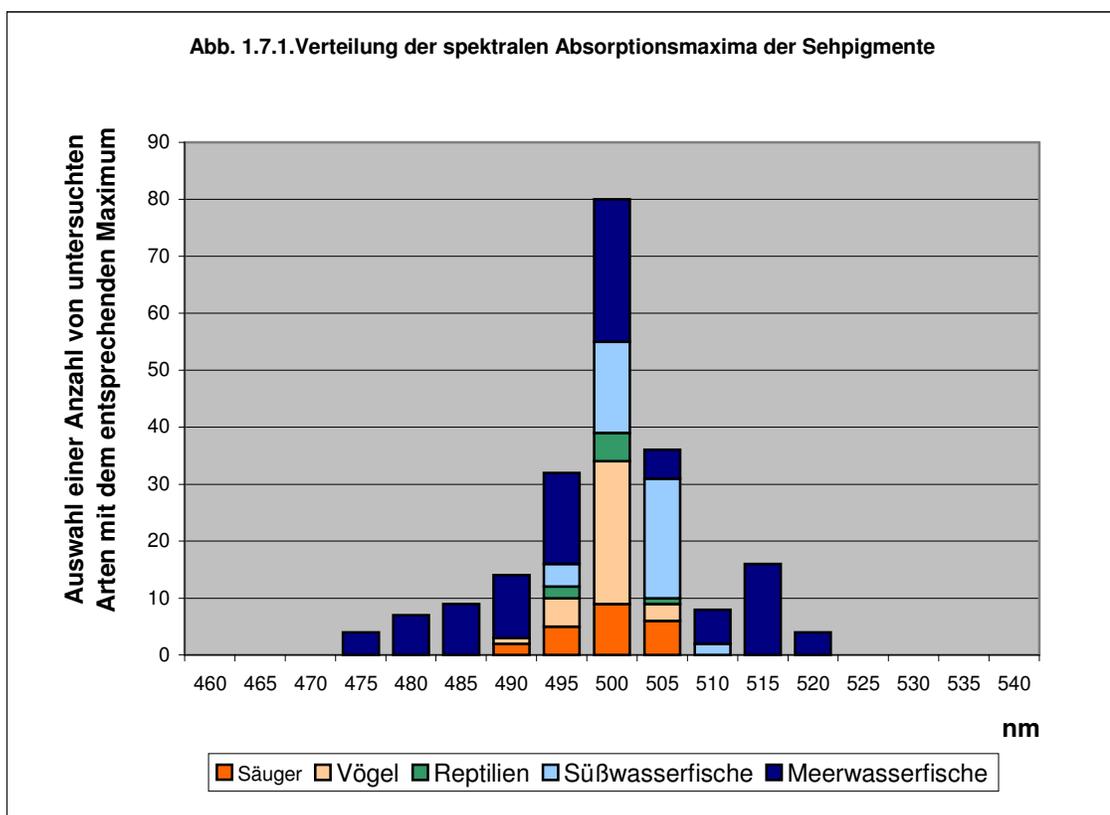


Abb. 1.7.1.1. Verteilung der spektralen Absorptionsmaxima rhodopsinbasierender Sehpigmente einer Auswahl untersuchter Arten. Es zeigt sich, daß diese Arten eine hohe Variationsbreite aufweisen, da diese sich unterschiedlichen Lichtverhältnissen anpassen müssen wie z.B. Meerwasserfische, die auch in tiefere Wasserregionen leben. Solche Arten, die diese Anpassung nicht vollziehen, besitzen ein eng eingegrenztes, spezifisches Maximumfeld (z.B. Säuger)[16]

Bei allen Sehfärbstoffen liegt das Retinal in der cis-Form vor und geht bei Belichtung in seine all-trans-Form über. Diese Konfigurationsänderung leitet eine Reihe von sehr rasch ablaufenden Reaktionen ein, die schließlich in der Bildung von

Meta-Verbindungen einen vorläufigen Abschluss findet. Einher geht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums um ca. 120 nm zum kurzwelligen Bereich hin.

Die folgenden Schritte laufen bei Vertebraten und Invertebraten unterschiedlich ab. Für die Vertebraten sei der prinzipielle Ablauf am Beispiel des Rhodopsins erläutert. Das aus dem Rhodopsin über die Zwischenstufe Metarhodopsin I hervorgegangene Metarhodopsin II zerfällt in die beiden Komponenten des Sehfärbstoffes, so das im Photorezeptor freies all-trans-Retinal I und Opsin vorliegen. Dieser Schritt, den man als Bleichung des Sehfärbstoffes bezeichnet, erfolgt einige Minuten nach der Lichtabsorption, während die Bildung von Metarhodopsin I schon rasch nach 1 ms, die von Metarhodopsin II nach 1 s abgeschlossen ist. Nach der Spaltung setzt die Regeneration des Sehfärbstoffes ein.

Beim Bacteriorhodopsin wurde ein ähnlicher Mechanismus entdeckt. Das Bacteriorhodopsin (BR) zerfällt nach der Detektion eines Lichtquants über Zwischenstufen zu Metarhodopsin I und Metarhodopsin II. Eine direkte Umwandlung in Bacteriorhodopsin ist auch hier nicht möglich, sondern gelangt nur über eine Reoisomerisierung des Chromphor in die sog. *all*-E-Form in seine Ausgangsform zurück.

Die Metarhodopsine der Invertebraten sind im Gegensatz dazu thermostabile Farbstoffe, die nicht ausbleichen. Dies lässt sich damit begründen, daß bei Invertebraten das Opsin nicht nur das cis-Retinal komplementiert, sondern auch die all-trans-Form, so daß eine beständige Verbindung besteht. Es stellt sich zwischen Rhodopsin und Metarhodopsin ein bestimmtes Mengenverhältnis ein, das im kurzwelligen Bereich zugunsten des Rhodopsins, im langwelligen Bereich dagegen zugunsten des Metarhodopsins verschoben ist. Durch Lichteinwirkung wandelt sich das Metarhodopsin wieder in Rhodopsin zurück (Photoregeneration).

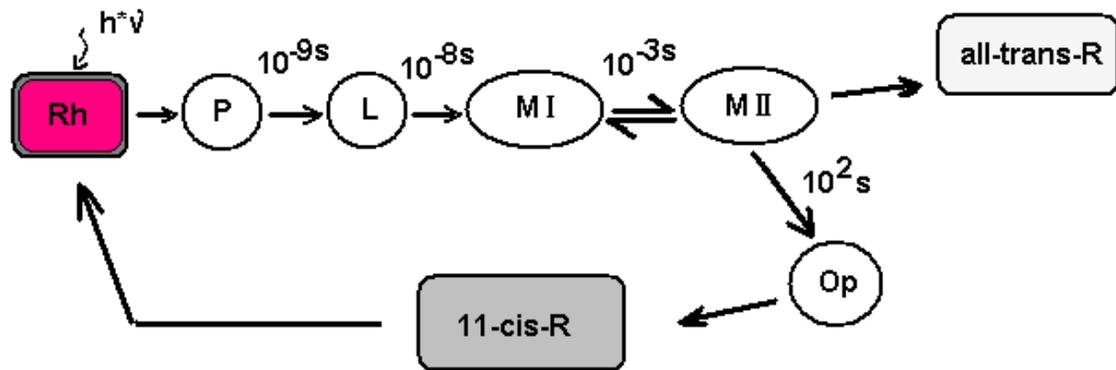


Abb. 1.7.1.2. zeigt als Beispiel die Transduktion (Umwandlung von Licht in ein Sehipuls) bei Vertebraten. Ein Lichtquant regt Rhodopsin (Rh) an. Über Zwischenstufen Praelumirhodopsin (P) und Lumirhodopsin (L) geht das Rhodopsin nach ca. 10^{-8} s in Metarhodopsin I (MI) über. Dieses zerfällt in ca. 10^{-3} s in Metarhodopsin II (MII). Das Metarhodopsin II zerfällt weiterhin in die beiden Komponenten all-trans-Retinal und Opsin. Danach setzt die Regeneration des Sehfärbstoffes wieder ein (16).

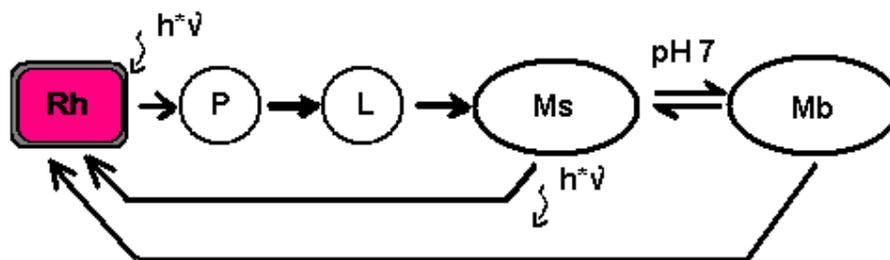


Abb. 1.7.1.3. Transduktion bei Invertebraten
Ein Lichtquant regt Rhodopsin (Rh) an. Über Zwischenstufen Praelumirhodopsin (P) und Lumirhodopsin (L) geht das Rhodopsin in die saure Metarhodopsinform über (Ms) über. Das saure Metarhodopsin ist thermostabil und kann über die Aufnahme von Licht wieder direkt in Rhodopsin umgewandelt werden (16).

1.7.2. Potentialtypen und Potentialbildung

An den Sehzellmembranen werden durch die photolytischen Reaktionen Potentialänderungen verursacht, die eng zeitlich mit dem Reaktionsschritt vom Metarhodopsin I zum Metarhodopsin II bzw. mit dem entsprechenden Schritt bei den anderen Sehfärbstoffen gekoppelt sind.

Potentialtypen: In der Regel depolarisieren die Sehzellen der Invertebraten während die Vertebraten hyperpolarisieren.

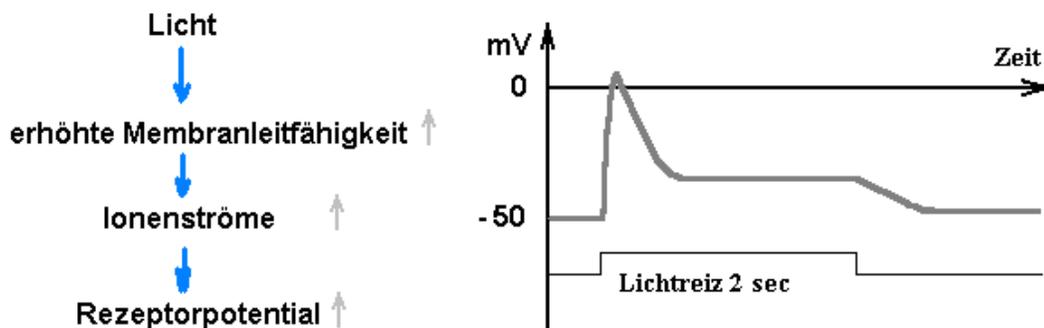


Abb. 1.7.2.1. Rezeptorpotential von Invertebraten bei Erregung. Trifft ein Lichtstrahl das Rhodopsin einer Retinalzelle kommt es über eine Kaskade zu einer Ausschüttung von Ca^{++} in die Zelle. Dies hat eine Ionenkonzentrationserhöhung in der Zelle zur Folge und führt damit zur einer Depolarisation. Nach Beendigung des Reizes kehrt das Membranpotential zu seinem Ausgangswert zurück (14).

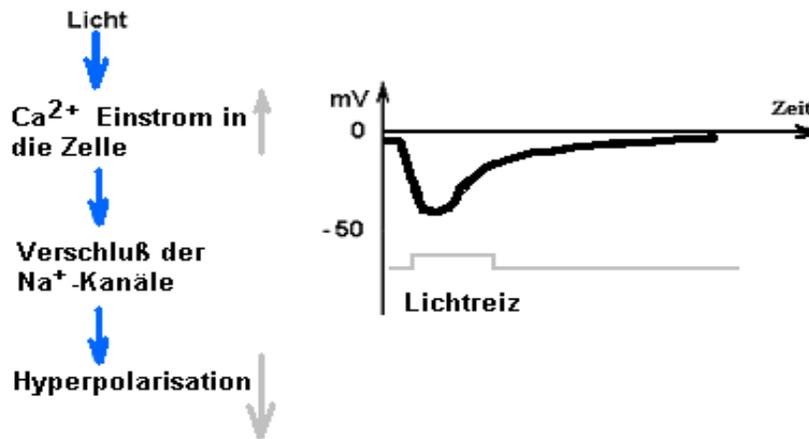


Abb. 1.7.2.2. Rezeptorpotential von Vertebraten bei Erregung. Durch den erhöhten Einstrom von Ca^{2+} während eines Lichtreizes werden die Na^+ -Kanäle verschlossen. Dies hat ein Sinken der Na^+ -Konzentration in der Zelle zur Folge, wodurch das elektrische Potential der Zellmembran abfällt. Es kommt zu einer Hyperpolarisation. Nach Beendigung des Reizes kehrt das Membranpotential zu seinem Ausgangswert zurück (16)

Mechanismen der Potentialbildung: Nicht nur die Reaktionsweise der Sehzellen von Invertebraten und Vertebraten sind verschieden, es zeigen sich auch unterschiedliche Permeabilitätseigenschaften der Zellmembran für Na^+ . Während auf der einen Seite die Sehzellen der Invertebraten bei Dunkelheit nahezu impermeabel für Na^+ sind, fließt in der Vertebraten-Sehzelle ständig ein Ionenstrom aus dem Innensegment in das Außensegment, der im wesentlichen von Na^+ getragen wird. Der Einstrom von Na^+ in das Außensegment wird dagegen fast vollständig unterdrückt, so daß es zu einer Anreicherung von Na^+ im Extrazellularraum kommt, die zu der bei Belichtung auftretenden Hyperpolarisation führt.

Der photochemische Primärprozess, also die Umwandlung von Licht in ein Sehimpuls, wird Transduktion genannt. Dabei stellt das Protein Rhodopsin (Rh) die lichtempfindliche Substanz dar.

Trifft ein Lichtstrahl Rhodopsin (Rh), verwandelt sich dieses in Metarhodopsin (M I) {Abb. 1.7.3.1}. Das Metarhodopsin (M I) ist nun in der Lage, über die Wandlung von α, β, γ -GDP zu α -GTP die Phospholipase C (PLC) zu aktivieren. Die Phospholipase (PLC) beschleunigt dann die Synthese von Inositoltriphosphat (IP_3) aus Phosphatidylinositolbiphosphonat (PIP_2). IP_3 führt dazu, daß aus den intrazellu-

lären Ca^{++} -Speichern Ca^{++} ausgeschüttet wird. Dadurch wird die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration erhöht. Gleichzeitig kommt es durch die IP_3 -Aktivierung zu einer Öffnung von membrangebundenen Na^+ -Kanälen an der Membran und es strömen Na^+ -Ionen in die Zelle ein. Dies hat eine Depolarisation zur Folge (Abb. 1.7.3.2). Die genaue Funktionsweise der Öffnung der Na^+ -Kanäle ist noch nicht geklärt (Abb. 1.7.3.3).

Der ganze Prozess von der Absorption der Lichtquanten bis zur Öffnung der Ca^{++} -Kanäle benötigt nur einige 10 ms, so daß eine sehr schnelle Reizantwort möglich wird.

Die Erregungsantwort wird ebenso wieder schnell abgeschaltet. Findet keine Aktivierung der Proteinkinase C mehr statt, wird der Ca^{++} -Einstrom sofort gestoppt, das Membranpotential kehrt zu seinem Ausgangswert zurück (Abb. 1.7.3.2.)

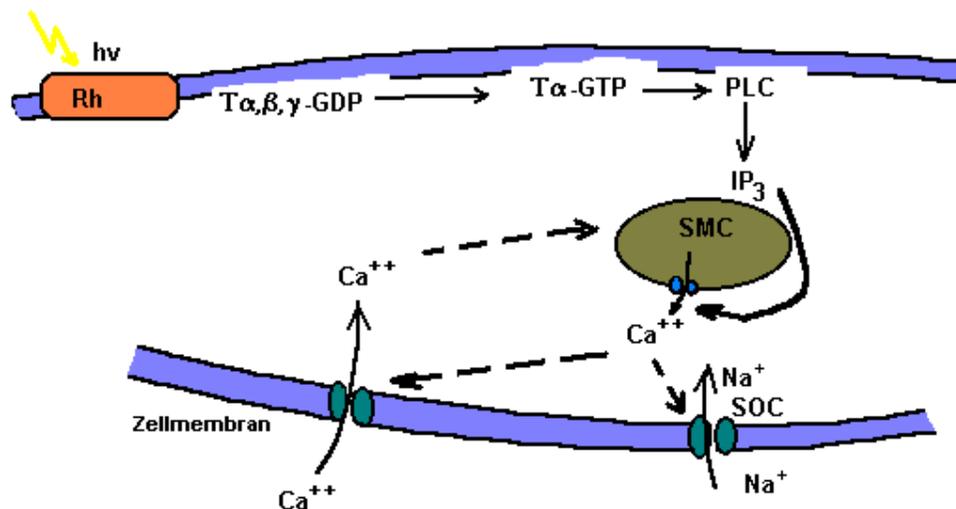


Abb. 1.7.2.3 zeigt den Transduktionsprozess. Über die Umwandlung von GDP zu GTP wird das Enzym Phospholipase C (PLC) angeregt. Diese verstärkt die Bildung von Inositoltriphosphat (IP_3). IP_3 bewirkt die Ausschüttung von Ca^{++} aus den submembranären Zisternen (SMC). Es kommt dadurch zu einer hohen Ca^{++} -Konzentration direkt an den Rhabdomeren. Die gestrichelten Linien zeigen weiterhin die vermuteten Effekte des Ca^{++} . Man geht davon aus, daß es gleichzeitig zu einem aktivierten Einstrom von Ca^{++} und Na^+ (SOC = Store operated channel) aus dem extrazellulären Raum in die Zelle kommt und dort das Erregungspotential verstärkt (17).

1.7.3. Typen der Sehzellen

Photosensible Strukturen von Sehzellen zeigen auch innerhalb enger systematischer Verwandtschaftskreise eine ungeheuere Formenvielfalt. Es lassen sich zwei Grundtypen erkennen, der Ciliar-Typ und der Rhabdomer-Typ. Bei den Sehzellen vom ciliären Typ bilden Auffaltungen der Cilienmembran die lichtempfindliche Struktur, beim Rhabdomer-Typ sind es die Mikrovillissäume, die aus der Membran der Sehzelle selbst hervorgehen. In beiden Fällen kommt es auf diese Weise zu der notwendigen Oberflächenvergrößerung, um die Sehpigmente in die Membran einlagern zu können.

Über die einfachen Rezeptoren hinaus, die sich auf den Zellmembranen befinden, entwickelten sich während der Evolution aufwendige abbildende optische Systeme. Über Grubenaugen (z.B. bei Napfschnecken) und sog. Lochkamera-Augen (Tintenfisch) bedeutet die Entstehung der Linsenaugen ein wichtiger Fortschritt in der Evolution, da diese eine höhere Auflösung und hohe Lichtempfindlichkeit ermöglichen als vergleichbare „einfache“ Rezeptoren ohne Linsensystem.

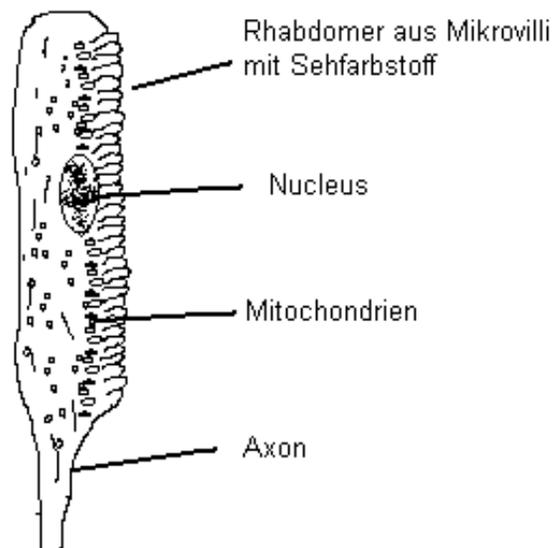


Abb. 1.7.3.1. Photorezeptor vom Rhabdomer-Typ

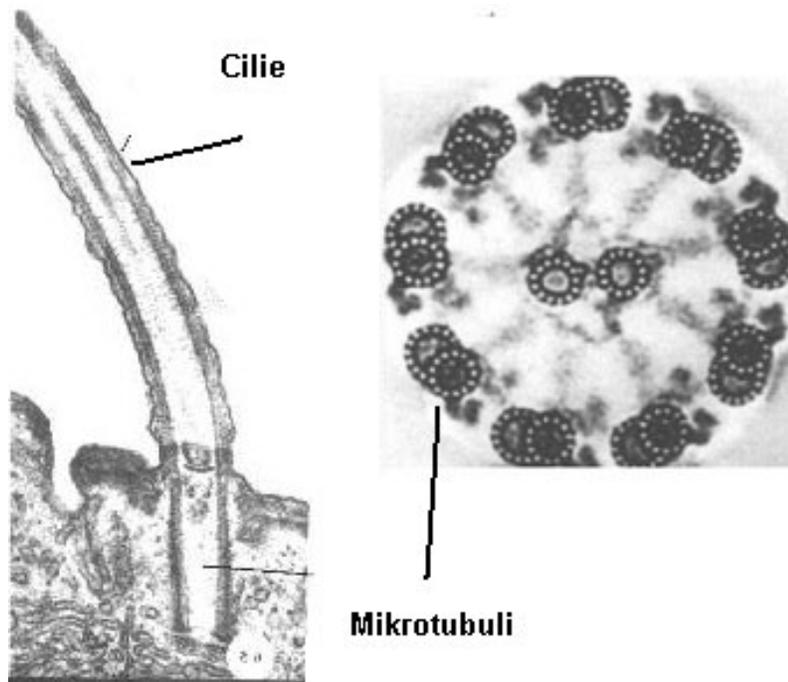


Abb. 1.7.3.2. Photorezeptor vom Ciliar-Typ

1.7.4. Die Bedeutung von Rhodopsin bei *Schistosoma mansoni*

Lange Zeit war der physiologische Mechanismus des Sehsystems der Miracidien und Cercarien von *Schistosoma mansoni* nicht bekannt, obwohl aufgrund des Verhaltensmusters vermutet wurde, daß Rhodopsin eine Rolle spielen könnte.

Durch die moderne Nukleinsäurediagnostik konnten in den letzten Jahren einige Sachverhalte geklärt werden.

So gelang es mit Hilfe einer Realtime-PCR, ein für *Schistosoma mansoni* spezifisches Rhodopsin (SmRHO) zu sequenzieren, es mit Rhodopsinen anderer Wasserinvertebraten zu vergleichen und das SmRHO diesen zuzuordnen. Weiterhin konnte mit einer Indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen werden, daß sich im oberen Körperbereich der Cercarie von *S. mansoni* an zwei sich gegenüberliegenden Stellen an der Oberfläche der Zellmembran eine hohe Konzentration von SmRHO befindet. Diese konnte man gewissermaßen als „Augenflecke“ identifizieren (Abb. 1.7.4.2) (15). Ein lichtmikroskopisch sichtbarer Augenfleck, der mit einer Linse bedeckt ist wie bei *Trichobilharzia ocellata*, konnte nicht festgestellt werden.

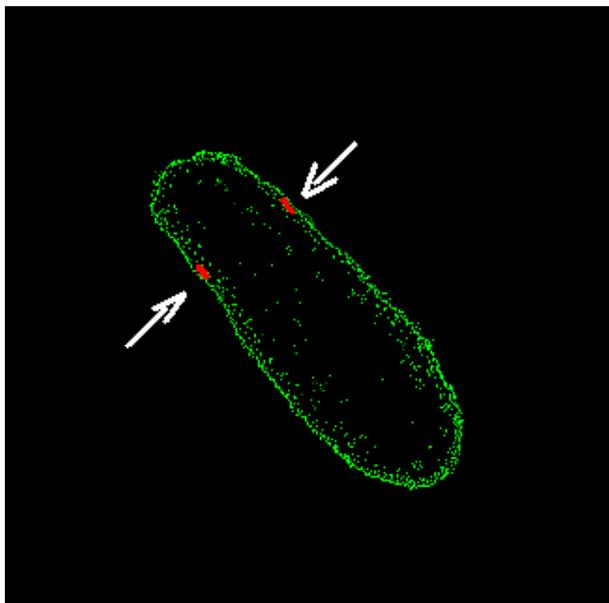


Abb. 1.7.4. Die rot markierten Stellen zeigen das SmRHO, das sich in der Zellmembran (grün markiert) des oberen Körperteils der Cercarie befindet (Ind. Immunfluoreszenz) (18).

1.8. Aufgabenstellung

Licht beeinflusst sehr stark alle Stadien des Lebens von *Schistosoma mansoni*. Zahlreiche Untersuchungen über die Lichtphysiologie der Miracidien (21), die Bedeutung des Lichts beim Schlüpfen aus dem Ei und der Zwischenwirtfindung der Miracidien liegen vor. Auch über die Cercarienausscheidung und deren lichtabhängige Rhythmik (6) und die Bedeutung des Lichts für die Endwirtfindung und das Eindringen in diesen (25) gibt es viele wissenschaftliche Arbeiten.

Das Problem der Lichtphysiologie von freien Cercarien konnte jedoch aufgrund der fehlenden technischen Voraussetzungen bisher nicht adäquat beantwortet werden. Die grundlegenden Untersuchungen auf diesem Gebiet wurden meist in sehr zeitaufwendiger „Handarbeit“ durchgeführt [(29), (31)]. Daher waren die auswertbaren Datenmengen meist nicht sehr umfangreich.

Mit Hilfe von Computern ist es nun möglich geworden, jeweils eine freie Cercarie über die ganze Dauer ihres Lebens zu beobachten und alle wichtigen Daten sofort für eine spätere Auswertung aufzuzeichnen.

Dabei standen folgenden Schwerpunkte im Mittelpunkt der Arbeit:

1. Entwicklung eines Versuchsaufbaues, mit dem es möglich ist, eine Cercarie über einen langen Zeitraum zu beobachten und ohne direkte menschliche Überwachung den Versuch automatisiert durchführen zu können.
2. Untersuchung einer größeren Anzahl einzelner Cercarien unter verschiedenen Bedingungen, um Aussagen über die gesamte Cercarienpopulation treffen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

2.1.1. Aufrechterhaltung des Wirtskreislaufes

a) Gewinnung von Miracidien

Zur Durchführung der Versuchsreihen verwendeten wir einen *Schistosoma mansoni* – Stamm der Firma Hoechst AG (Herkunft Brasilien). Dieser Stamm wird in weißen Mäusen (NMRI) gehalten. Aus infizierten und mit Äther eingeschlaferten Mäusen wird zunächst der gesamte Darm entfernt. Der Zustand der Leber gibt dabei Aufschluß darüber, ob im Darm genügend Schistosomeneier vorliegen. Ist diese grau und mit weißen Granulomen durchsetzt, ist eine gute Ausbeute an Schistosomeneiern gewährleistet. Der Darm wird in diesem Fall zerkleinert und abgedeckt eine Nacht aufbewahrt.

Am nächsten Tag wird der Mäusedarm in eine Flasche gefüllt und mit physiologischer Kochsalzlösung 2 Stunden geschüttelt. Die gewonnene Suspension wird zur Abtrennung der groben Bestandteile durch Gaze in ein Becherglas abgeschüttelt. Dieses wird wieder über Nacht in einem Kühlschrank aufbewahrt. Die Zugabe von physiologischer Kochsalzlösung und die niedrige Temperatur wirken in dieser Phase schlüpfhemmend.

Der Überstand wird am nächsten Tag abgesaugt und mit gekühltem, abgestandenem Leitungswasser aufgegossen. Der Überstand wird ca. 45 Minuten später wieder abgesaugt und zusammen mit warmem Leitungswasser in eine Petrischale ausgegossen. Unter einer Lampe lässt man dann ca. 30 Minuten lang die Miracidien schlüpfen.

b) Infektion der Schnecken

Als Zwischenwirt für *Schistosoma mansoni* werden Schnecken der Art *Biomphalaria glabrata* (Stamm Hoechst, Herkunft Brasilien) verwendet. Für die Versuche

wurden Tiere der roten Albinorasse eingesetzt, da die sich im Labor problemlos halten und vermehren lassen.

Mittelgroße Schnecken (ca. 1,5 cm im Durchmesser) werden einzeln in etwas Wasser eingesetzt, jeweils mit ca. 10 Miracidien infiziert und 6 Stunden unter einer Lampe stehen gelassen. Nach ca. 28 Tagen beginnt bei einer erfolgreichen Infektion die Ausschüttung von Cercarien.

c) Haltungsbedingungen der Schnecken

Die infizierten Schnecken befinden sich in drei Vollglasaquarien, die ca. 20 Liter Fassungsvermögen haben. Dabei werden die Becken ständig belüftet und das Wasser konstant auf 27°C gewärmt.

Um störendes Licht zu vermeiden, stehen die Becken in einem verdunkelten Raum, der von natürlichem Tageslicht völlig abgeschirmt ist. Über eine Zeitschaltuhr wird im 12-Stunden-Rhythmus ein Hell-Dunkel-Wechsel erzeugt, wobei die Hellphase von 6.00 bis 18.00 Uhr dauert.

Als Nahrung dient frischer Salat, mit dem die Schnecken regelmäßig gefüttert werden. Das Wasser wird alle 2 Wochen gewechselt.

2.1.2. Gewinnung von Cercarien

Um Cercarien einer bestimmten Schnecke zu gewinnen, wurden die Schnecken farblich markiert, bevor sie mit einzelnen Miracidien infiziert wurden. Dies geschah mit nummerierten und farblich unterschiedlichen Bienenmarkierungspunkten.

Um auch nach einem einzuplanendem Ausfall einiger Schnecken durch Absterben oder mißglückter Infektion noch eine ausreichende Anzahl infizierter Schnecken zu haben, wurden pro Infektionszyklus jeweils 25 Schnecken markiert.

Zur Gewinnung von Cercarien wurde die gewünschte positive Schnecke in ein Becherglas mit dem gleichen Medium wie im Aquarium (destilliertes Was-

ser/Leitungswasser im Verhältnis 1:1) 15 Minuten isoliert. Unter einem Mikroskop wurde nun das Schlüpfen der Cercarien beobachtet. Das Schlüpfen der Cercarien wurde auf die Zeit zwischen 9.30 und 11.00 Uhr gelegt, da in diesem Zeitraum ca. 2/3 aller Cercarien schlüpfen [(1), (23)]. Mit Hilfe einer Pipette wurde versucht, möglichst schnell eine frei schwimmende Cercarie einzufangen und sofort in die Beobachtungsküvette zu setzen.

2.1.3. Verhalten von freien Cercarien

Um das Verhalten frei schwimmender Cercarien beschreiben zu können ist es Voraussetzung, dieses Verhalten zu beobachten, aufzuzeichnen und zu analysieren.

Cercarien von *Schistosoma mansoni* schwimmen intermittierend, d.h. daß sich aktive Schwimmstöße mit passiven Phasen abwechseln.

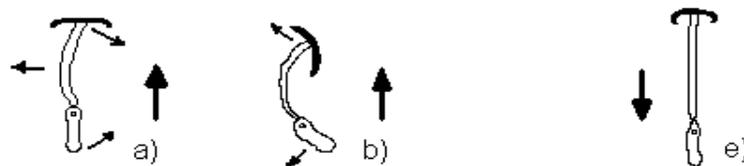
Während des passiven Absinkens (Abb. 2.1.3. e, P-Phase) sind die Enden in der Furca eingerollt und dienen der Cercarie als Treibanker. Dies führt dazu, daß die Cercarie beim Absinken abgebremst wird.

Es lassen sich zwei Formen des aktiven Schwimmens bei Cercarien von *Schistosoma mansoni* beschreiben.

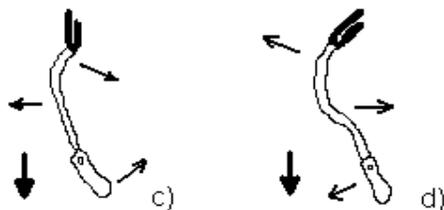
Das Rückwärtsschwimmen (A-Phase, Abb. 2.1.3. a + b) führt die Cercarie an die Wasseroberfläche. Dabei lässt sie ihren Kopf nach unten hängen und führt die vorwärtstreibenden Bewegungen mit dem Schwanzende aus. Der Schwanzstamm krümmt sich dabei in schneller Folge nach rechts und links, wobei die abgespreizten Äste der Furca als Ruder wirken. Abhängig von der Wassertemperatur kann die Cercarie Schwimgeschwindigkeiten von bis zu 2 mm/sec erreichen.

Beim selten zu beobachtenden Vorwärtsschwimmen (Abb. 2.1.3. c + d) legt die Cercarie die Furca-Äste eng aneinander. Außerdem scheint sie ihren Körper zu strecken, da sie in diesem Augenblick schmaler und länger wirkt. Mit schlangenähnlichem Hin- und Herwinden ihres Körper bewegt sich die Cercarie in Richtung

ihres Kopfes. Da dieser in der Regel in Richtung des Wasserboden zeigt, führt diese Bewegung zu einer Entfernung der Cercarie von der Wasseroberfläche. Mit Hilfe einer Videoaufzeichnung des jeweiligen Versuches wurde eine Möglichkeit geschaffen, aktives Vorwärtsschwimmen vom passiven Absinken unterscheiden zu können.



a + b Rückwärtsschwimmen (A-Phase) e Absinken (P-Phase)



c + d Vorwärtsschwimmen

Abb. 2.1.3. Schwimmphasen bei Cercarien von Schistosoma mansoni:

A-Phase (Rückwärtsschwimmen): Die Skizzen a + b zeigen die propellerartigen Bewegungen des Schwanzendes, mit dem die Cercarie in der Aktiv-Phase (A-Phase) an die Wasseroberfläche schwimmt
= Aktiphase

P-Phase (Absinken): Während der Passiv-Phase (P-Phase) breitet die Cercarie Ihre Schwanzhälften aus und reduziert somit die Absinkgeschwindigkeit.
= Passivphase

Vorwärtsschwimmen: In den Skizzen c+d werden die Bewegungen bei aktivem Vorwärtsschwimmen gezeigt. Es kommt zu einer schlangentartig Verkrümmung und Entspannung des gesamten Körpers. Das Vorwärtsschwimmen lässt sich selten beobachten und spielt im Verhalten der Cercarie kaum eine Bedeutung.

2.1.4. Parameter für das Verhalten freier Cercarien

Aufgrund der visuellen Beobachtungen kann man im Verhalten der Cercarien vier verschiedene Zustände unterscheiden:

A-Phase:	Aktives Aufwärtsschwimmen
P-Phase:	Passives Absinken
Aufenthalt am Boden:	Ruhephase am Boden liegend bis ca. 3 mm im unteren Bereich der Beobachtungsküvette
Aufenthalt an der Oberfläche:	Zeit, in der sich die Cercarie in einem Bereich von 5 mm unterhalb der Wasseroberfläche befindet

Diese Phasen wurden zur Steuerung des Versuchsablaufes in das Computerprogramm übernommen. Für jeden Zustand wurde dessen Dauer und der Aufenthaltsort der Cercarie am Anfang und am Ende des Zustandes gespeichert. Mit Hilfe eines Auswerteprogramms wurden dann die nachfolgenden Parameter für die Verhaltensbeschreibung freier Cercarien ermittelt und für eine Auswertung aufbereitet.

t_A (s)	= Dauer der Aktivphase (Schwimmstoßdauer)
t_P (s)	= Dauer der Passivphase (Absinkzeit)
s_A (mm)	= Länge der Aktivphase (Schwimmstoßlänge)
s_P (mm)	= Länge der Passivphase (Absinkstrecke)
t_O (s)	= Zeit an der Oberfläche (pro Stunde)
t_B (s)	= Zeit am Boden (pro Stunde)
V_a (mm/s)	= Aufstiegsgeschwindigkeit [berechnet]
V_p (mm/s)	= Abstiegsgeschwindigkeit [berechnet]

2.2. Versuchsgeräte

2.2.1. Entwicklung des computergesteuerten Beobachtungssystems

Die Untersuchung des Cercarienverhaltens (vom Schlüpfen bis zum Tod) wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München durchgeführt. Dazu wurde ein automatisches Beobachtungssystem entwickelt.

Mit diesem ist es möglich, einzelne Cercarien über ihren ganzen Lebenszeitraum zu beobachten, die Versuchsbedingungen Temperatur und Licht zu verändern und automatisiert Daten über das Verhalten der Cercarien aufzuzeichnen. Ein Schwerpunkt bei der Entwicklung des Systems war es, Fehlerquellen, die bei früheren Versuchsanordnungen aufgrund rein visueller Beobachtung auftraten, auszuschließen.

Diese Fehler bestanden vorwiegend darin, daß die zu ermittelnden Meßgrößen in der Regel manuell erfaßt wurden. Die Entwicklung eines Computerprogramms durch Schorp (31) beseitigte dieses Manko. Es ermöglicht die zeitnahe und zeitlich exakte Erfassung der ermittelten Daten durch einen Personal Computer. Mit Hilfe einer gleichzeitigen Aufzeichnung des Versuches durch ein mitlaufendes Videoband ist zusätzlich eine genaue Kontrolle und Auffindung von potentiellen Fehlbeurteilungen möglich.

Für eine direkte visuelle Beobachtung der Cercarien zur Interpretation ihres Verhaltens steht ein Mikroskop zur Verfügung. Mit diesem werden die Einstellungen für das Nachführsystem vorgenommen. Durch die unmittelbare Beobachtung kann man zusätzliche Informationen über das Verhalten von Cercarien gewinnen.

2.2.2. Versuchsaufbau

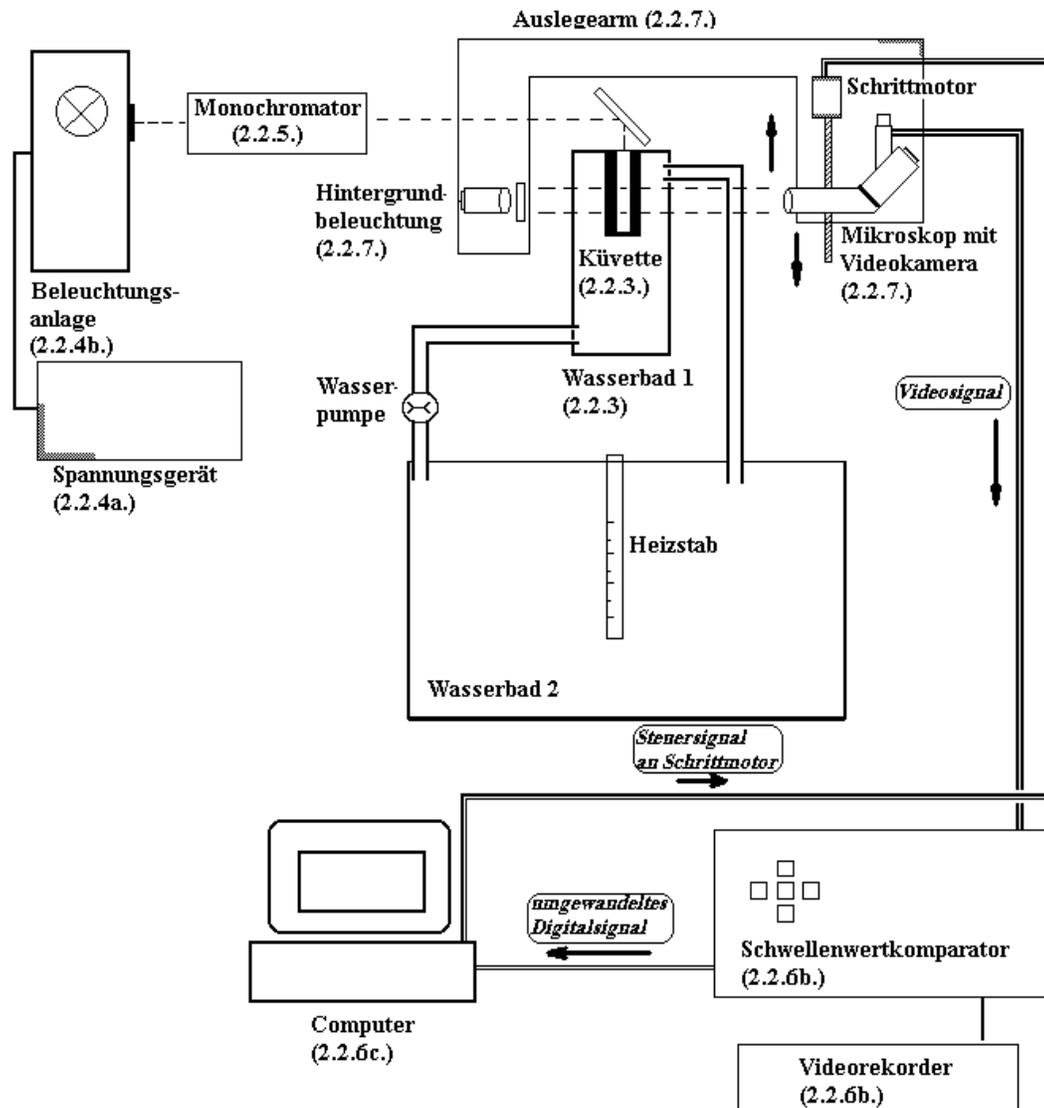


Abb. 2.2.2. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Die zu beobachtende Cercarie wird in die Küvette eingebracht. Über das Mikroskop findet die genaue Ausrichtung der Meßeinrichtung statt. Die eingebaute Videokamera liefert an den Schwellenwertkomparator ein Videosignal, das dieser in ein Digitalsignal umwandelt und an den angeschlossenen Computer weiter liefert. Über ein Computerprogramm wird das Digitalsignal verarbeitet und an den Schrittmotor in Form eines Stellbefehls zurück gesendet.

Die Beobachtungseinheit mit dem Mikroskop, der Videokamera und der Hintergrundbeleuchtung sind über einen Auslegearm mit dem Stellmotor verbunden, der vertikale Bewegungen ausführen kann und somit der Bewegung der Cercarie folgen kann.

2.2.3. Küvette und Wasserbad 1

Während der gesamten Versuchsdauer befindet sich die Cercarie innerhalb einer Küvette mit der Größe 1cm x 1cm x 4cm (Innenmaß). Der Rand der Küvette ist mit schwarzen Glas abgedeckt, damit störende Reflexe von der Seite ausgeschlossen werden. Diese Küvette ist im Wasserbad 1 integriert.

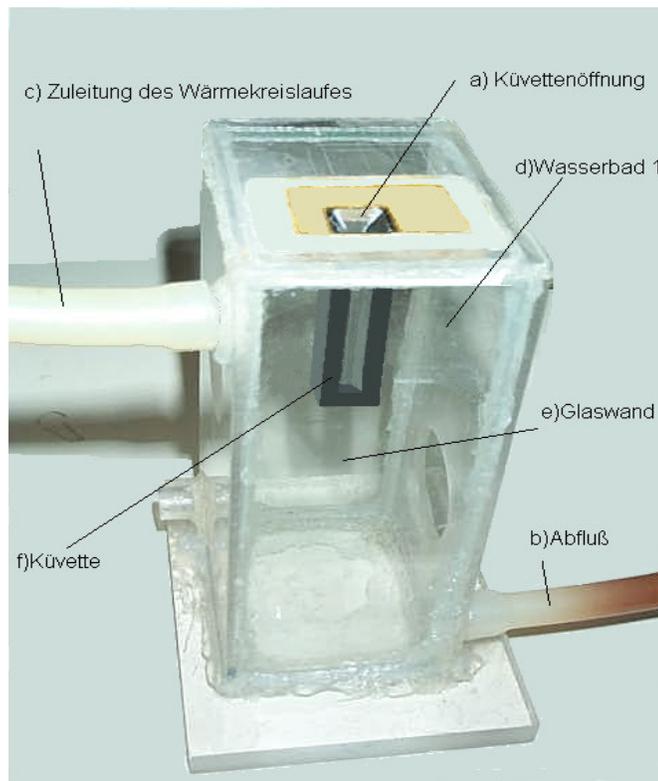


Abb. 2.2.3.

Wasserbad 1 und Beobachtungsküvette

Das Wasserbad 1 umgibt die Beobachtungsküvette. Über seitliche Öffnungen (b+c) ist das Wasserbad 1 mit dem Wasserkreislauf verbunden, der die Küvette konstant erwärmt. Die Größe des Wasserbades 1 beträgt 7cm x 7cm x 20 cm.

Die Seitenwände des Wasserbades 1, durch die der Strahlengang des Beobachtungslichtes durchtritt, bestehen aus Glas, da sich dieses gut reinigen lässt und wenig verkratzt. Dies ist notwendig, da Verunreinigungen und Kratzer sowohl auf

der Küvette wie auch an den Durchsichtswände aufgrund des empfindlichen Zeilenabtastgerätes zu Fehlern führen können.

Der Boden, die seitlichen Wände und die obere Abdeckung bestehen aus Plexiglas.

Über Schläuche ist es mit dem zweiten Wasserbad verbunden. Dort erwärmt ein Heizstab, in dem ein Temperaturregler integriert ist, das Wasser. Dieses muß vor jedem Versuch gefiltert werden, da selbst kleinste Partikel im Mikroskop sichtbar werden.

Eine Pumpe befördert das Wasser vom Wasserbad 2 in Wasserbad 1. Passiv fließt es in das Wasserbad 2 zurück.

Eine Trennung ist deshalb erforderlich, da die Beobachtungseinheit relativ klein sein muß, um für eine Beobachtung mit dem Mikroskop geringe Durchtrittsflächen zu erreichen.

2.2.4. Wasserbad 2 und Beleuchtungsanlage

Über Schläuche ist das Wasserbad 1 (Abb. 2.2.3.) mit dem Wasserbad 2 verbunden. Der Wasserkreislauf ist mit herkömmlichen Leitungswasser gefüllt, welches allerdings durch Filter gereinigt wurde. Im Wasserbad 2 befindet sich ein Heizstab, der über ein Digitalthermometer auf ca. $0,2^{\circ}$ C genau eingestellt werden kann. Das im Wasserbad 2 erwärmte Wasser wird durch eine Pumpe in das Wasserbad 1 gepumpt. Der Wasserkreislauf ist luftdicht nach außen verschlossen. Da sich das Wasser ständig in der Zirkulation befindet und die Zuläufe zum Wasserbad 1 kurz gehalten wurden, findet nahezu keine Abkühlung des Wassers statt. Zur Erzeugung von tageslichtähnlichem Licht wird eine 2000-W Xenonlampe (Osram) verwendet. Diese wird über ein externes Spannungsgerät mit Strom versorgt. Das Spannungsgerät (Abb. 2.2.4a.) übernimmt die exakte Steuerung der Spannungs- und Stromversorgung der Xenonlampe.



Abb. 2.2.4a. Spannungsgerät zur Versorgung der Xenonlampe
Über eine 380 A Starkstromleitung wird das Spannungsgerät von extern versorgt.

Die Xenonlampe ist in einem Metallgehäuse eingebaut (Abb. 2.2.4b.). Nach einer Einglühzeit von etwa 5 Minuten kommt es zur starken Erwärmung des Lampengehäuses und des Raumes. Daher wurde zur Abführung der Wärme und des Ozons eine Absauganlage installiert. Zusätzlich sind zur Vermeidung einer zu starken Aufheizung der Wasserbäder das Lampengehäuse und die Versuchseinheit in zwei Räume getrennt.

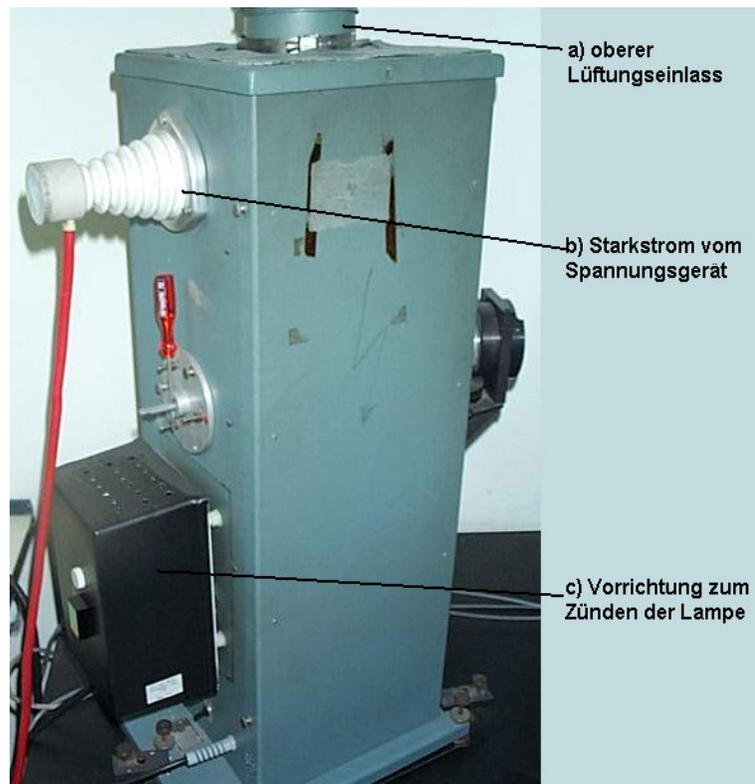


Abb. 2.2.4b. Lampengehäuse (Eigenbau)

2.2.5. Monochromator

Das Licht, das aus dem Lampengehäuse der Xenonlampe austritt, wird in Linsen gebündelt und über ein Prisma zu einem Monochromator der Firma Kratos (Kratos Surface Analysis, Eppstein) geleitet (Abb. 2.2.5.). Dieser ermöglicht die genaue Filterung des Lichtes der Xenonlampe in das Licht der gewünschten Wellenlänge.

Über ein Rohr wird das Licht in den Versuchsraum geleitet und über ein Spiegel von oben auf die Küvette gelenkt.



Abb. 2.2.5. Monochromator (Fa. Kratos) und Lampengehäuse mit Linsensystem (Eigenbau)

Über die Einstellschraube (d) wird die gewünschte Wellenlänge eingestellt. Das aus dem Lampengehäuse austretende Licht wird über ein Linsensystem gebündelt und in den Monochromator gelenkt.

2.2.6. Echtzeit-Bildanalyse durch Schwellenwertkomparator

Um die Bewegung der Cercarien aufzuzeichnen kam ein Bildauswertegerät (Abb. 2.2.6a.) zum Einsatz, das von Wimmer (39) entwickelt wurde. Es ermöglicht die Bildanalyse des von der Videokamera aufgenommenen Bildes in Echtzeit.



Abb. 2.2.6a. Schwellenwertkomparator (a) mit Videorekorder (b)

Der Videorekorder dient zur Aufzeichnung des durchgeführten Versuches. Mit Hilfe der Aufzeichnung kann man eventuelle Fehlsignale erkennen.



Abb. 2.2.6b. Frontseite des Schwellenwertkomparators

Über die an der Frontseite angebrachten Einstellknöpfe und -tasten lässt sich die Empfindlichkeit der Abtastschranken genau einstellen.

Das aufgenommene Bild wird durch den Analogkomparator auf ein einfaches S/W-Bild reduziert. Um nur einen kleinen Teil des Videosignals auswerten zu müssen, wird ein Bildfenster (Abb. 2.2.6c.) erzeugt, welches nur kurz unter und über der Cercarie die Videozeilen abtastet. Damit wird verhindert, daß helle Objekte (z.B. Staubteilchen), die sich nicht im Abtastfenster befinden, die Nachführung stören. Das S/W-Bild wird in einzelne Bildpunkte zerlegt und abhängig von der eingestellten Signalschwelle, werden Bildpunkte, die unterhalb der Signalschwelle liegen, als dunkler Punkt oder Nullsignal erfaßt, Bildpunkte oberhalb der Signalschwelle als heller Punkt oder Positivsignal.

Auf dem Monitor werden zwei waagrecht stehende Balken eingeblendet, die die Abtastschranken darstellen (Abb. 2.2.6c.). Bei Versuchsbeginn wird die Cercarie innerhalb dieser Grenzen eingestellt. Bewegt sich die Cercarie über einer der Schranken, wird dies registriert und es kommt zu einem Signal. Die Empfindlichkeit der Schranken lässt sich am Schwellenwertkomparator einstellen.

Um die Bildinformation gering zu halten und die daraus resultierende Verarbeitung mit dem Computer zu vereinfachen, wurde ein möglichst kleines Monitorbild gewählt.

Auf dem Monitorbild erscheint die Cercarie hell, und hebt sich damit vom schwarzen Hintergrund und dem übrigen Raum der Küvette ab. Überschreitet die Cercarie eine der Abtastschranken, erkennt der Schwellenwertkomparator dies als hellen Punkt und somit als positives Signal. Abhängig davon, ob die obere oder untere Schranken überschritten worden ist, wird an den Computer ein entsprechendes Signal weitergeleitet.

Schematische Darstellung der Versuchseinrichtung und Durchführung mit dem Schwellenwertkomparator:

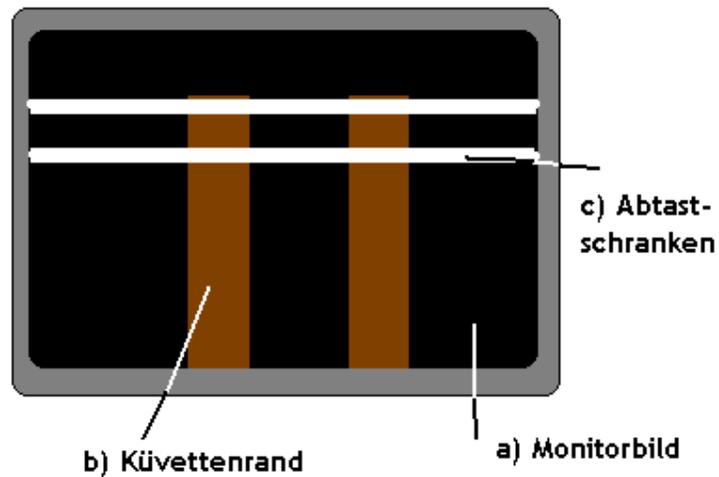


Abb. 2.2.6c.

Einstellung des oberen Küvettenrandes

Die tatsächliche Breite des Monitorbildes beträgt ca. 25 cm, die Breite der Küvette 1 cm. Das Schema gibt in etwa die Größenverhältnisse bei der Versuchsdurchführung wieder

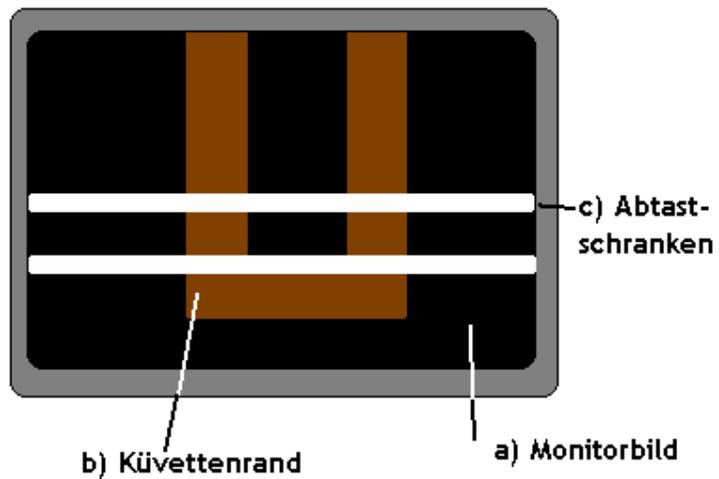


Abb. 2.2.6d.

Einstellung des Küvettenbodens

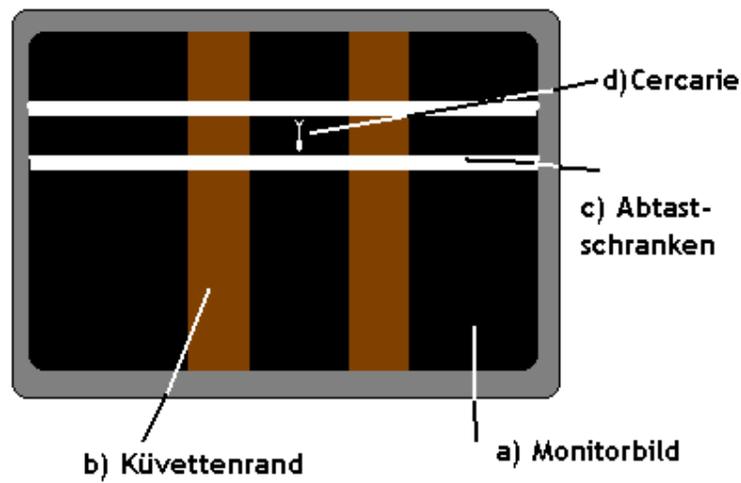


Abb. 2.2.6e. Versuchsstart

Nach der Markierung der oberen und unteren Grenzen der Beobachtungsküvette wird die Cercarie mit den beiden auf dem Monitor zu sehenden Abtastschranken eingerahmt. Berührt die Cercarie die untere Schranke, wird das Programm gestartet. Von nun an erkennt der Schwellenwertkomparator ein Überschreiten einer der beiden Abtastschranken und meldet an den Computer ein Signal. Dieser gibt ein Stellsignal an den Schrittmotor, der die Beobachtungseinheit entsprechend der Bewegung nachfährt.

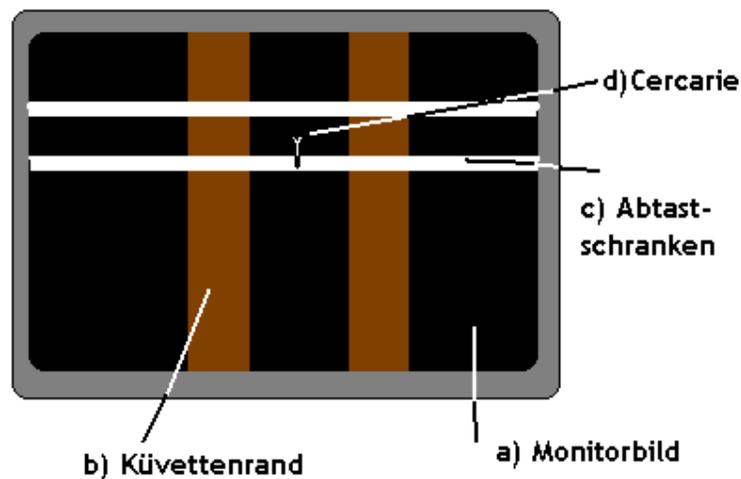


Abb. 2.2.6f. Überschreiten der unteren Abtastschranke

In diesem Beispiel lässt sich die Cercarie nach unten fallen und berührt damit die untere Abtastschranke. Der Schwellenwertkomparator erkennt dies als positives Signal und gibt es an den Computer weiter. Dieser meldet an den Schrittmotor ein Stellsignal. Darauf bewegt sich die Beobachtungseinheit in die Richtung der Cercarie, die durchgeführte Bewegung, die zurückgelegte Strecke und die benötigte Zeit wird gleichzeitig vom Computer aufgezeichnet.

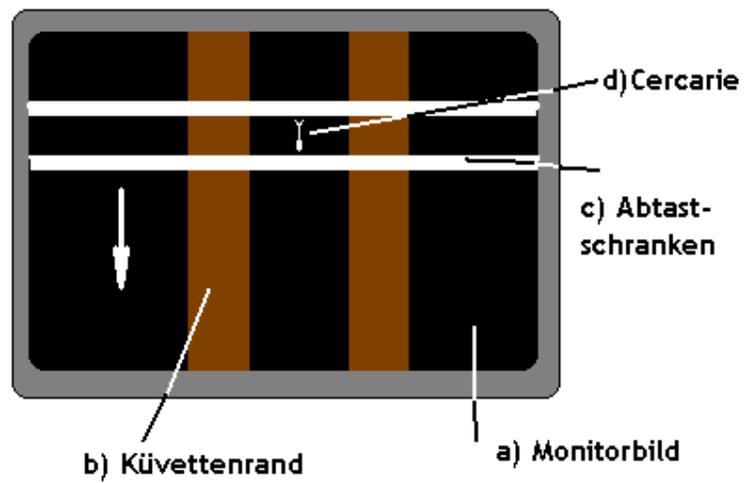


Abb. 2.2.6g. Nachführung der Beobachtungseinheit
Nach dem Berühren der Schranke durch die Cercarie wird die Beobachtungseinheit nachgeführt, die Cercarie befindet sich wieder innerhalb des Beobachtungsfensters



Abb. 2.2.6h. Computer
Über den Computer Olivetti M24 wird das Beobachtungsmikroskop und die Videokamera gesteuert.

2.2.7. Nachführautomatik

Das Mikroskop (Abb. 2.2.7.) wurde mit einem Schrittmotor verbunden, der das Mikroskop in der Vertikalen bewegen kann. Damit das Beobachtungslicht jederzeit optimal ist, wurde die Mikroskoplampe, die das IR-Dunkelfeld erzeugt, an einem Ausleger des Mikroskops befestigt. Die Lichtquelle bewegt sich also mit dem Beobachtungssystem auf und ab und liefert so während des gesamten Beobachtungszeitraums den größtmöglichen Kontrast über das IR-Dunkelfeld.

Da sich Cercarien – je nachdem ob sie aktiv schwimmen oder passiv absinken – mit sehr stark unterschiedlichen Geschwindigkeiten bewegen, wurde es nötig, den Schrittmotor, der nur in einer konstanten Geschwindigkeit dreht, extern je nach Bewegungsart der Cercarie zu steuern. Dies erfolgte über eine Erweiterungsplatine (Digital I/O-Karte PIT186), die in den PC eingebaut wurde. So konnte je nach eintreffender Impulsfrequenz von den Cercarien die Drehgeschwindigkeit des Schrittmotors geändert werden. Dies machte eine exakte Nachführung möglich.

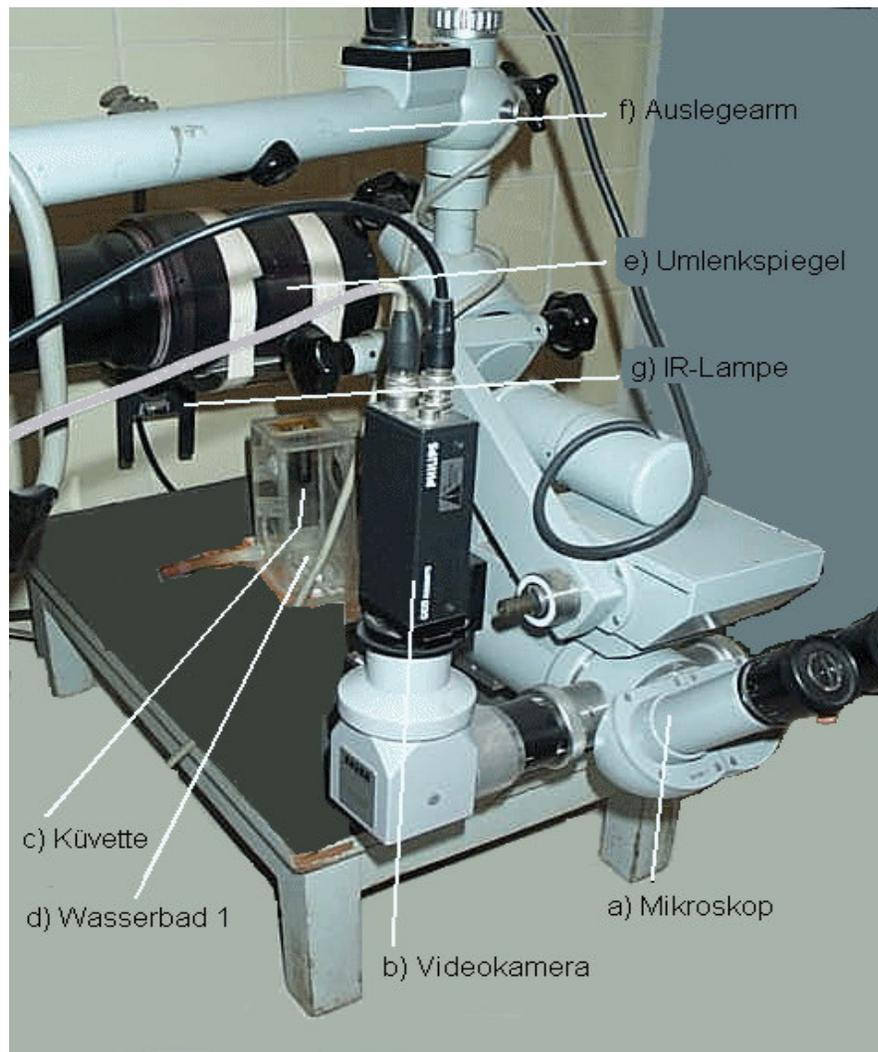


Abb. 2.2.7. Mikroskop, Videokamera, Auslegearm

- a) Mikroskop zur Beobachtung und Einstellung der Cercarie in das Nachführsystem.
- b) Videokamera zur Übermittlung des Videobildes an das Nachführsystem.
- c) Beobachtungsküvette, in der sich die Cercarie während des Versuchs befindet.
- d) Wasserbad 1, das die Beobachtungsküvette umgibt.
- e) Über ein Umlenkspiegel wird das „Tageslicht“ von oben auf die Küvette gelenkt.
- f) Am Auslegearm sind sowohl das Mikroskop als auch die IR-Lampe befestigt.

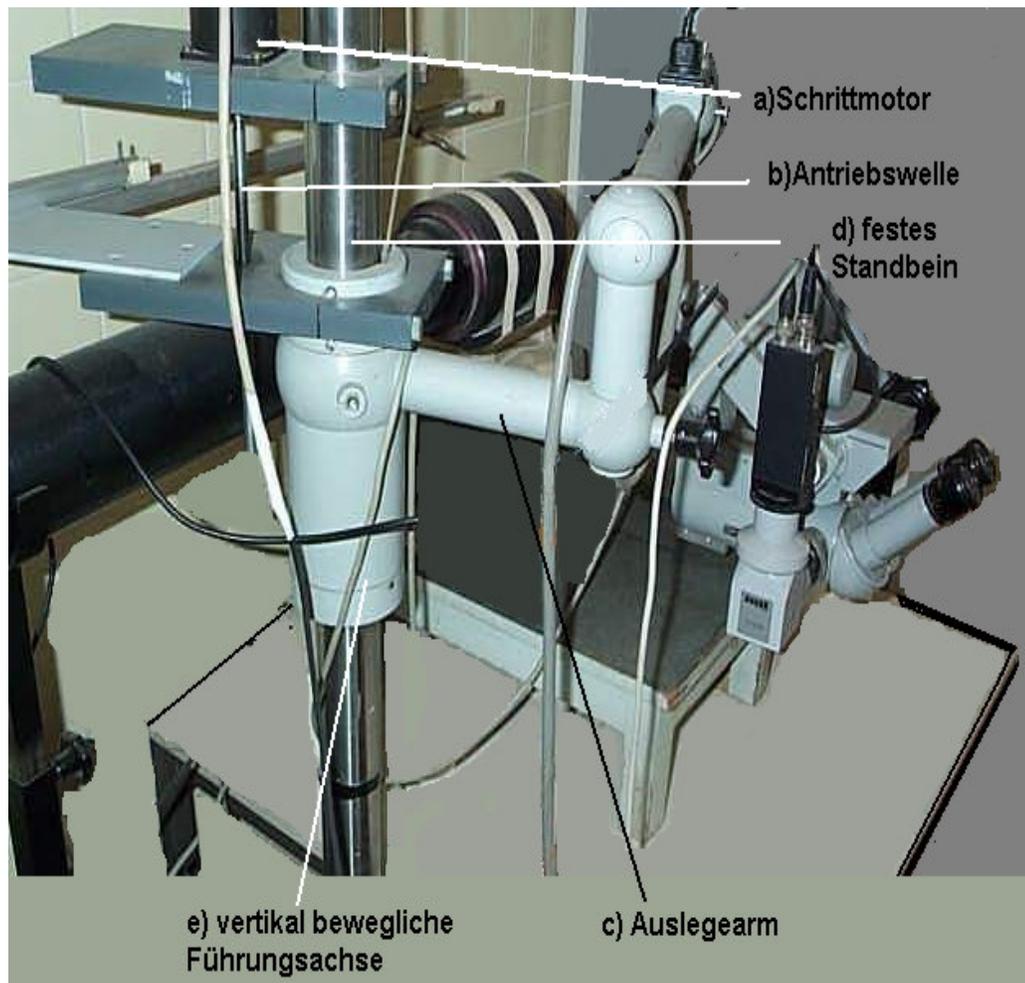


Abb. 2.2.7b. Auslegearm

Der Auslegearm (c), an dem die Beobachtungseinheit fest angebracht ist, ist vertikal beweglich. Der Antriebsmotor ist fest mit dem Standbein verbunden. Über eine Antriebswelle wird die Nachführbewegung auf den Auslegearm übertragen.

2.2.8. Videoaufzeichnung der Cercarie

Im Winkel von 90° wird die Küvette von einer Glühlampe (100 Watt), deren Hauptstrahlengang abgedeckt ist, im Abstand von ca. 10 cm beleuchtet. Vor der Glühlampe befindet sich ein Sperrfilter, der den sichtbaren Anteil des Lichts herausfiltert und nur für Licht der Wellenlänge >700nm durchlässig ist.

Das verwendete Mikroskop ist ein Operationsmikroskop, das für den Versuch umgebaut wurde (Abb. 2.2.7). Es ist an einer Antriebsstange montiert, das über den Schrittmotor exakte Bewegungen in der Vertikalen ermöglicht. Die Küvette mit dem Wasserbad 1 steht während des ganzen Versuches starr auf der Ebene, während sich das Mikroskop komplett mit der Videokamera und IR-Beleuchtung bewegt.

An dem Mikroskop ist eine Videokamera angeschlossen, die IR-empfindlich ist. Diese nimmt die Bewegungen der Cercarien auf und übermittelt die Daten dem angeschlossenen Monitor und Zeilenabtastgerät.

Auf dem Monitor wird ein Live-Bild der Versuchsküvette projiziert. Mittels des Zeilenabtastgerätes wird bei Versuchsbeginn die Ober- und Untergrenze festgelegt. Nach dem Eingeben der Cercarie wird die genaue Position ermittelt. Dazu muß die Cercarie zwischen die zwei auf dem Monitor sichtbaren Lichtbalken gebracht werden. Mittels Steuertasten ist es möglich, die Beobachtungseinheit einzustellen. Danach wird das Computerprogramm gestartet.

3. Versuchsergebnisse

Zunächst wurde die Spontanaktivität der Cercarien ohne äußere Einflüsse ermittelt.

Von Interesse war es, in welchem Maße sich die Verhaltensmuster der einzelnen Cercarien voneinander unterscheiden und ob es möglich ist, anhand der gewonnenen Daten auf das Verhalten der gesamten Cercarienpopulation schließen zu können.

Zur Ermittlung der Spontanaktivität der Cercarien ohne äußere Stimulation wurden daher Versuchsreihen mit Cercarien durchgeführt, die sowohl von einer Wirtsschnecke stammten, als auch mit Cercarien von Wirtsschnecken unterschiedlicher Infektionszyklen. Damit sollte die Beeinflussung des Verhaltens durch die Wirtsschnecke festgestellt und eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse überprüft werden können.

Die Lebenszeit von infizierten Schnecken ist verkürzt, d.h. daß infizierte Schnecken ungefähr drei Wochen nach einer Infektion leben und in diesem Zeitraum Cercarien ausscheiden. Um möglichst viele Daten über das Verhalten von Cercarien zu gewinnen, die von Schnecken aus unterschiedlichen Infektionszyklen stammten, wurden die Versuche über ca. $1\frac{3}{4}$ Jahre hinweg durchgeführt.

Die Aktivphase (A-Phase) der Cercarie lässt sich in der Anzahl der ausgeführten Schwimmstöße und der Schwimmgeschwindigkeit messen, die sich aus der Länge des Schwimmstoßes und der dafür benötigten Zeit berechnet.

Weil das Absinken ein passiver Vorgang ist, in dem die Cercarie in der Regel ohne Bewegung von der Schwerkraft nach unten gezogen wird, sind die zeitliche Länge der Passivphase und die Anzahl der Passivphasen die einzigen Parameter für die Phase der Passivität, die direkt von der Cercarie beeinflusst werden.

Da die durchschnittliche Lebensdauer einer infizierten Wirtsschnecke ca. 3 Wochen beträgt, wurden die für die gesamten Versuchsreihen verwendeten Cercarien innerhalb der ersten 21 Tagen gewonnen, weil die gegen Ende der Lebenszeit einer Schnecke gewonnenen Cercarien oft nicht lange überleben.

Bei der visuellen Beobachtung lässt sich feststellen, daß die Bewegung der Cercarie einem Alles- oder Nichts-Prinzip gleicht. Der ausgeführte Schwimmstoß scheint immer maximal stark zu sein. Dennoch lassen sich anhand der ermittelten Daten Unterschiede in der Schwimgeschwindigkeit feststellen.

Aufgrund der direkten Beobachtung durch das Mikroskop und der Videoaufnahmen zeigt sich, daß Bewegungen am Anfang der Lebenszeit einer Cercarie zielgerichteter und zeitlich länger sind als solche, die am Ende durchgeführt werden. Die Bewegungen am Lebensende sind oft ruckartig und führen selten an die Wasseroberfläche. Insgesamt ist durch die länger zurückgelegte Strecke in der aktiveren Phase auch die Geschwindigkeit höher.

Die Schwimgeschwindigkeit ist also ein direkter Hinweis auf den Aktivitätszustand der Cercarie.

3.1. Spontanaktivität bei Cercarien in Abhängigkeit vom Alter der Wirtsschnecke

Zur Untersuchung, welchen Einfluß das Alter der Wirtsschnecke auf die Aktivität der Cercarien hat, wurden Versuche mit Cercarien durchgeführt, die zwischen dem 4. – 9. Tag (1. Zeitperiode) und dem 15. – 20. Tag (2. Zeitperiode) des Infektionszyklus der Schnecke gewonnen wurden. Pro untersuchter Zeitperiode wurde jeweils 4 Cercarien verwendet. Zum Vergleich dienten Cercarien von zwei Wirtsschnecken.

In Vorversuchen wurde von Saladin (1977) und Schorp (1988-92) als optimale Temperatur für die Aktivität von Cercarien von *Schistosoma mansoni* der Bereich zwischen 27°C - 29°C festgestellt und als optimale Lichtwellenlänge der Bereich von 500 nm.

Für die Ermittlung der Spontanaktivität wurde daher die Temperatur 28° C, 500 nm Lichtwellenlänge und als Lichtintensität 10×10^3 Cd verwendet. Die Cercarien wurden 24 Stunden durchgehend mit Licht bestrahlt. Um Cercarien der selben Wirtsschnecke für die Versuchsreihen zu verwenden, wurde zur Wiedererkennung die Schnecke farblich markiert.

Aus der Abb. 3.1.1. lässt sich erkennen, daß sich innerhalb der ersten drei Stunden (Tageszeit von 10.00 – 13.00 Uhr) die durchschnittlichen Schwimgeschwindigkeiten pro Stunde nur minimal unterscheiden. In dieser Phase sind Cercarien, die in der ersten Infektionsphase gewonnen wurden, genauso schnell wie solche aus der zweiten Phase.

Ab ca. 14.00 Uhr Tageszeit reduziert sich bei allen Cercarien die durchschnittliche Geschwindigkeit, wobei die Cercarien in ihrer Aktivität deutlicher abfallen, die in der Spätphase des Infektionszyklus gewonnen wurden (Abb. 3.1.1. rote und orange Linien).

Cercarien sind in der Lage bis zu 48 Stunden alt zu werden, wobei der überwiegende Teil schon nach ca. 12 Stunden verstorben ist. Die Ergebnisse zeigen, daß bei fünf von acht Cercarien aus der ersten Phase (Abb. 3.1.1. hell- und dunkelblaue Linien) nach ca. 18 Stunden noch eine Aktivität gemessen werden konnte. Aus der Gruppe der spät gewonnenen Cercarien (rote und orange Linien) überlebten dagegen nur zwei von acht die ersten 18 Stunden.

Insgesamt lässt sich daher folgern, daß die Cercarien, die am Anfang des Infektionszyklus gewonnen wurden, in der Gesamtheit ihrer Lebenszeit aktiver sind (Abb. 3.1.1. hell- und dunkelblaue Linien) als die älteren (Abb. 3.1.1. rote und orange Linien) und eine deutlich längere Lebenszeit aufweisen.

In der ersten Phase der Lebenszeit einer Cercarie, also kurz nach dem Schlüpfen bis ca. 3 Stunden danach, spielt dagegen die Rolle des Alters der Cercarie nur eine untergeordnete Rolle. Innerhalb der ersten drei Lebensstunden sind die Cercarien fast immer gleich aktiv.

Der Vergleich der Cercarien beider Schnecken zeigt, daß sich keine signifikanten Unterschiede im Verhalten zwischen den Cercarien der zwei Wirtsschnecken feststellen lassen. Beide Gruppen der früh gewonnenen Cercarien sind aktiver und leben länger als die zwei Gruppen der Cercarien. Die aus der Spätphase stammen unabhängig, von welcher Schnecke die Cercarien stammen.

Wie die Tabelle 3.1.2. exemplarisch anhand der Datenreihe der Cercarie (S2 spät Cercarie 17) zeigt, verringert sich nicht nur die Schwimgeschwindigkeit, sondern auch die Anzahl der ausgeführten Schwimmstöße und die Länge der

Schwimmstöße. Die Passivphasen nehmen dabei überdurchschnittlich zu. Kurz vor dem Tod der Cercarie finden nur noch wenige kurze Zuckungen statt. Sie verharrt für lange Zeit am Boden und kommt nicht mehr an die Oberfläche.

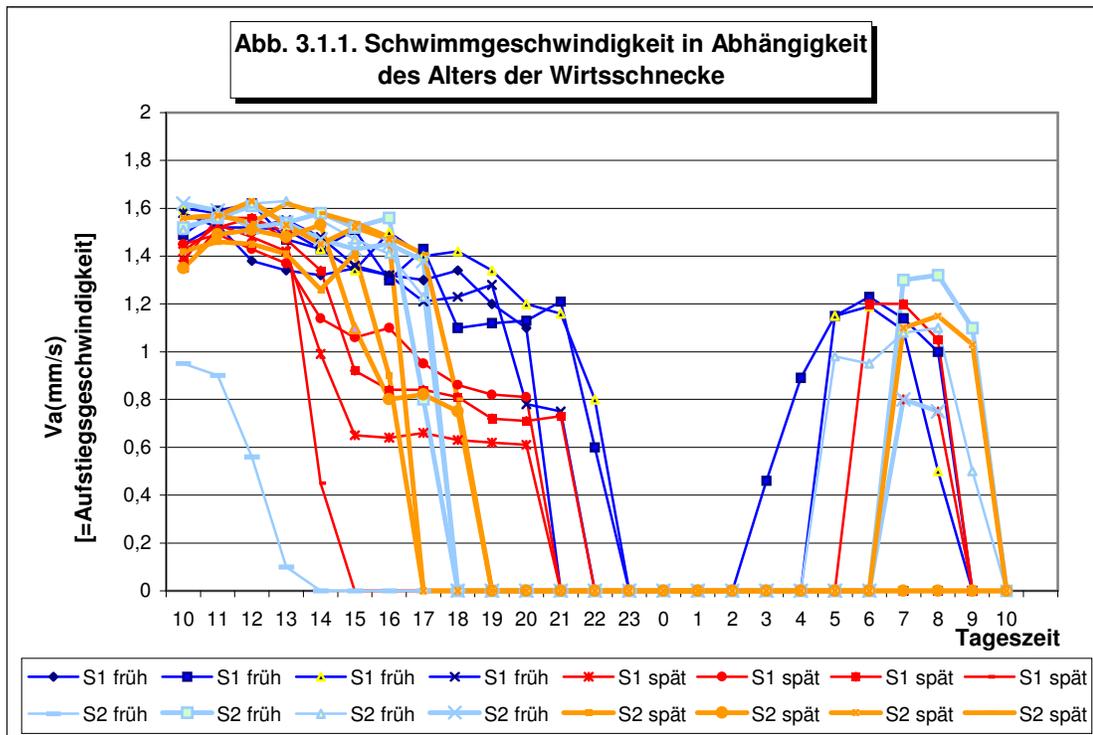


Abb. 3.1.1

S1 früh = 4 Cercarien der Schnecke 1 gewonnen in der Frühphase des Infektionszyklus (4. - 9.Tag)

S1 spät = 4 Cercarien der Schnecke 1 gewonnen in der Spätphase des Infektionszyklus (15. - 20. Tag)

S2 früh = 4 Cercarien der Schnecke 2 gewonnen in der Frühphase des Infektionszyklus (4. - 9. Tag)

S1 spät = 4 Cercarien der Schnecke 2 gewonnen in der Spätphase des Infektionszyklus (15. - 20. Tag)

Untersucht wurden insgesamt jeweils vier Cercarien pro Zeiteinheit von zwei verschiedenen Wirtsschnecken. Die Cercarien wurden durchgehend 24 Stunden mit Licht bestrahlt.

Es ist zu sehen, daß die im 4. - 9. Tag des Infektionszyklus gewonnenen Cercarien im Vergleich zu dem am 15. - 20. Tag gewonnenen nach ca. 5 Stunden eine z.T. höhere Geschwindigkeit und insgesamt ein deutlich verlängerte Lebensspanne haben. Ein dauerhafter Abfall der Geschwindigkeitskurve bedeutet das Absterben der Cercarie. Weiterhin zeigt sich, daß trotz dauerhafter Lichtbestrahlung die Cercarien in der Zeit von 22.00 – 5.00 Uhr eine deutlich geringere Aktivität zeigen als zu den anderen Tageszeiten.

Tabelle 3.1.2. Datenreihe der Cercarie 16 (Schnecke S2 spät)

Cercarie 16 Tagesuhrzeit	Anzahl S der ausgeführten Schwimmstöße	Durchschnittliche Länge der Schwimmstöße in sec	Anzahl P der aus- geführten Passiv- phase	Durchschnittlich Länge der Passiv- phasen in sec
10:00	65	3,2	223	15
11:00	45	2,6	96	36
12:00	25	2,1	73	48
13:00	15	2,15	67	53
14:00	13	2,05	66	54
15:00	10	2	64	56
16:00	6	1,8	31	114
17:00	9	1,5	21	168
18:00	4	1,7	15	228
19:00	3	1,3	10	350
20:00	1	1,4	8	411
21:00	0	0	0	0
22:00	0	0	0	0
23:00	0	0	0	0

Tab. 3.1.2. zeigt als Beispiel die Aufzeichnung der gewonnenen Daten der Cercarie 16 (Schnecke S2 in der Spätphase des Infektionszyklus)

3.2. Spontanaktivität bei Cercarien verschiedener Wirtsschnecken

Um das Aktivitätsmuster von Cercarien unterschiedlicher Wirtsschnecken zu untersuchen, wurde mit dem selben Versuchsansatz bei einer Wassertemperatur von 28 °C, einer Lichtwellenlänge von 500 nm und mit einer Lichtintensität von 10×10^3 Cd die Aktivität jeweils einer Cercarie gemessen. Die Cercarien wurden 24 Stunden lang mit Licht bestrahlt.

Für die Durchführung des Versuchs wurden 8 Cercarien verschiedener Schnecken in der Mitte eines Infektionszyklus verwendet, also etwa 10 Tage nachdem die Wirtsschnecke Cercarien ausschied.

Die Schwimmgeschwindigkeit als ein aussagekräftiger Parameter der Aktivitätsphase ist bei den Cercarien einer Wirtsschnecke wie bei den Cercarien verschiedener Wirtsschnecken innerhalb der ersten drei Stunden ähnlich stark ausgeprägt und auch ähnlich konstant. Mit zunehmenden Lebensalter, das maximal bis zu 48 Stunden dauern kann, im Schnitt aber nicht länger als 12 Stunden anhält,

fällt die Aktivität bei fast allen Cercarien stark ab, bis sie in der Regel am Boden zum Liegen kommen und sich nicht mehr bewegen.

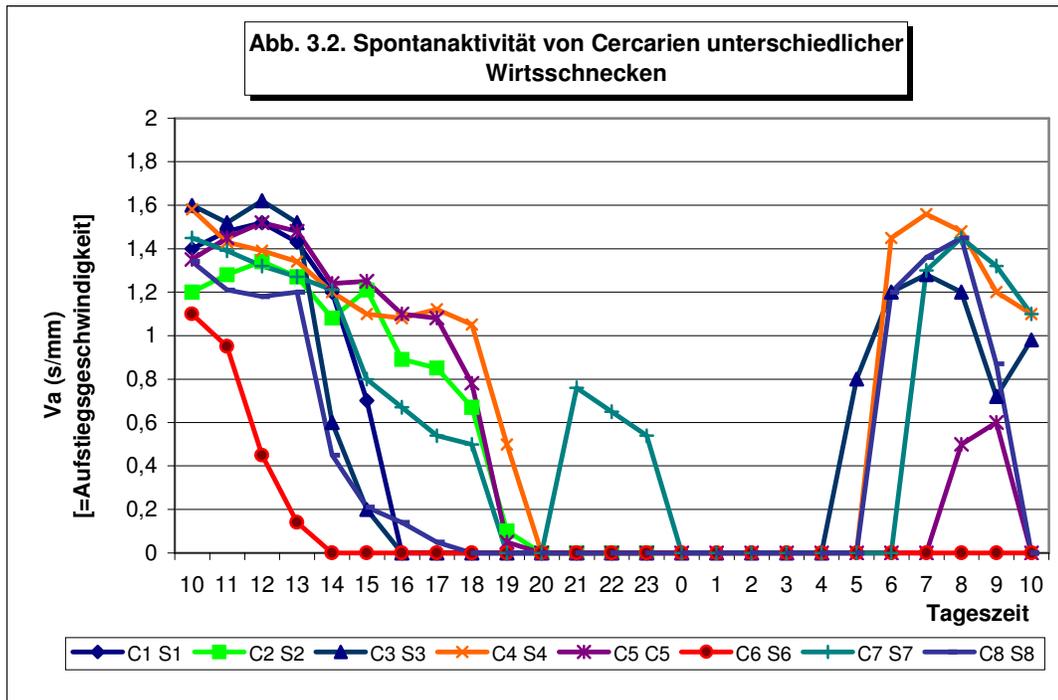


Abb. 3.2. zeigt die Versuchsreihen von 8 Cercarien, die von 8 verschiedener Schnecken gewonnen wurden. Die Cercarien wurden 24 Stunden lang mit Licht bestrahlt. Man erkennt, daß nach ca. drei Stunden sich die gemessene durchschnittliche Geschwindigkeit bei allen Cercarien reduziert, was auf eine Ruhephase der Cercarie zurückzuführen ist. In den Morgenstunden (0-4 Uhr) nimmt die Aktivität dann wieder zu.
(C1S1 = Cercarie Nr.1 von der Schnecke Nr.1; fortführend durchnummeriert)

Testdaten Abb. 3.2.:	
Anzahl der getesteten Cercarien:	8 Cercarien von 8 verschiedenen Schnecken
Testtemperatur:	28 °C
Lichtstärke	10000 Cd
Testdauer	24 Stunden

Der Vergleich der Aktivitäten von Cercarien unterschiedlicher Wirtsschnecken zeigt keinen signifikanten Unterschied. Innerhalb der ersten drei Lebensstunden

sind die Cercarien in der Lage, im Durchschnitt zwischen 1,1 – 1,7 (mm/s) zu schwimmen. Danach beginnt ein Rückgang der Aktivität.

Fünf von acht Cercarien überleben die ersten 18 Stunden und zeigen danach noch messbare Aktivität. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von den Versuchen mit Cercarien, die von einer Schnecke zu verschiedenen Abnahmezeitpunkte innerhalb einer Infektionsphase einer Schnecke gewonnen wurde. Dagegen hat dieser Faktor offensichtlich keinen Einfluß auf die Schwimgeschwindigkeit in den ersten drei Stunden der Messungen. Der Vergleich von Cercarien mehrerer Schnecken zeigt, daß die Cercarie an ihrem Lebensanfang maximal aktiv ist.

3.3. Ermittlung der Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur

a) Veränderung der Schwimgeschwindigkeit

Zur Ermittlung der Abhängigkeit von der Temperatur wurden je fünf Cercarien einer Wirtsschnecke drei Stunden unter Beibehaltung einer konstanten Lichtintensität untersucht. Dieser Versuche wurde im Temperaturbereich von 20 – 32 °C in 2° C Schritten durchgeführt, wobei Cercarien verwendet wurden, die am 5. - 10. Tag des Infektionszyklus gewonnen wurden.

Als Lichtwellenlänge wurde 500 nm und als Lichtintensität 10000 Cd verwendet. Abb. 3.3. zeigt, daß bei einer Zunahme der Temperatur bis 28°C die Schwimgeschwindigkeit durchschnittlich auf ca. 1,6 mm/s ansteigt. Eine Erhöhung der Wassertemperatur darüber hinaus auf bis zu 32°C lässt dagegen die Schwimgeschwindigkeit wieder absinken. Als optimale Temperatur für die deutlichste Ausprägung der Aktivität wurde daher 28°C Wassertemperatur gewählt.

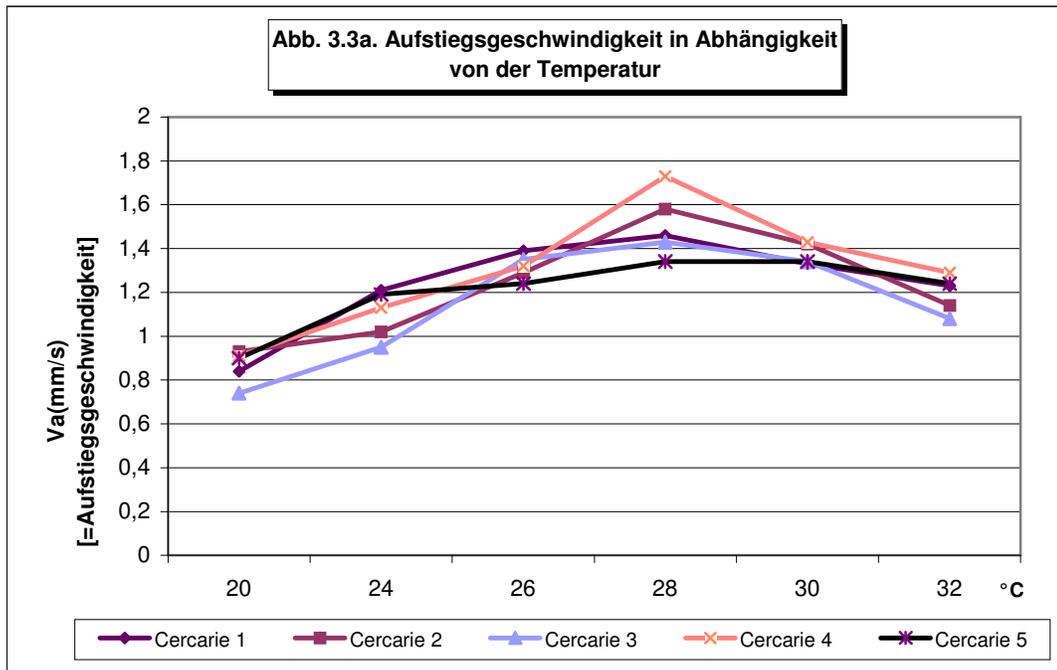


Abb. 3.3a. zeigt beim durchgeführten Vergleich von 5 Cercarien einer Schnecken, daß die Cercarien bei einer Zunahme der Temperaturen bis 28 °C mit einer Aktivitätszunahme reagieren. Eine Erhöhung der Temperatur darüber hinaus führt wieder zu einer Abnahme der Bewegungsgeschwindigkeit.

Testdaten Abb. 3.3a.	
Testtemperaturen	20 °C, 24 °C, 26 °C, 28 °C, 30 °C, 32 °C
Lichtstärke	10000 Cd
Testdauer	Jeweils 3 Stunden, beginnend 10.00 Uhr
Testdurchführung	Jede Cercarie wurde ca. 30. Min mit jedem Temperaturschritt untersucht. Die Cercarien stammen von der selben Schnecke

b) Veränderung der Länge und Anzahl der Aktivphase

Wie Tabelle 3.3b. und Abb. 3.3b. zeigen, verlängert sich mit steigender Temperatur die Dauer der Aktivphase bis 28 °C bis ca. drei Sekunden pro aktiver Schwimmbewegung im Durchschnitt. Wird die Temperatur weiter erhöht, verringert sich die durchschnittliche Länge der Aktivphase wieder.

Tabelle 3.3b. Länge der Aktivphase bei veränderter Temperatur

Temperatur °C	sA(s) der einzelnen Cercarien					Durchschnitt
	1	2	3	4	5	
20	1,45	0,82	0,91	0,75	1,45	1,076
24	1,78	1,1	1,35	0,95	1,67	1,37
26	2,67	2,43	2,3	1,85	1,91	2,232
28	2,91	3,41	3,21	3,06	2,67	3,052
30	3,21	2,65	2,87	2,34	2,21	2,656
32	2,64	2,41	2,61	2,11	1,65	2,284

Tab. 3.3b. zeigt, daß mit steigender Temperatur sich die Länge der Aktivphase sA(s) bis 28°C erhöht. Darüber hinaus schwächt sich die Länge der A-Phase wieder ab.

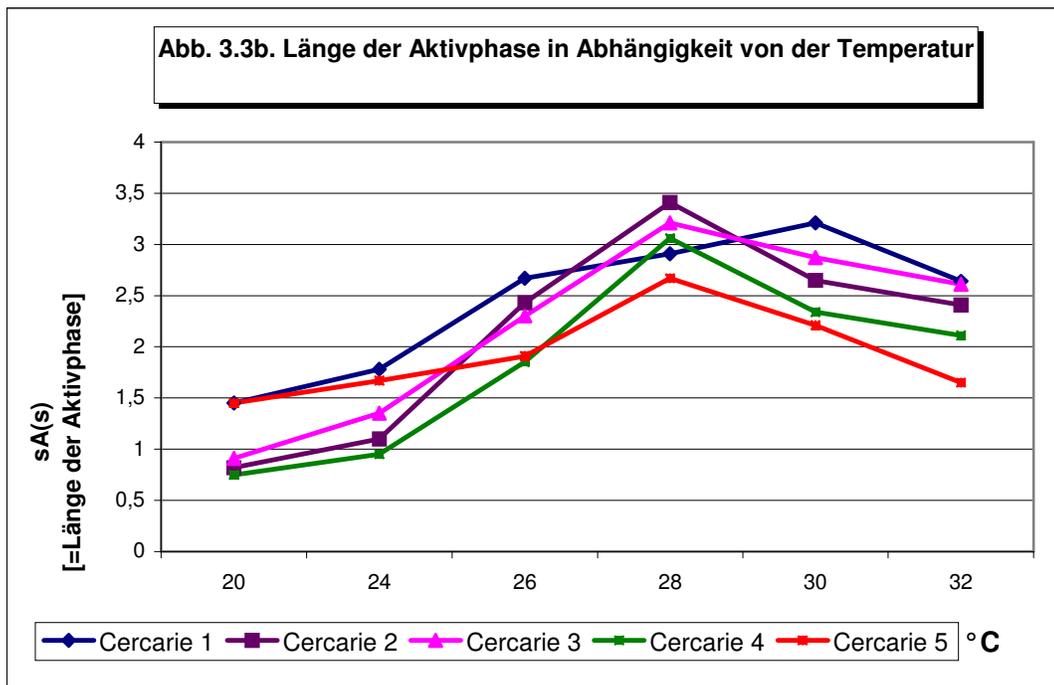


Abb. 3.3b. zeigt die Veränderung der Länge der Aktivphase bei steigenden Temperaturen (siehe Tabelle 3.3b.)

3.4. Abhängigkeit der Aktivphase von der Lichtstärke und Lichtwellenlänge

Um festzustellen, welcher Einfluß sowohl die Lichtwellenlänge als auch die Lichtintensität auf die verschiedenen Bewegungsphasen der Cercarien hat, wurden mehrere Versuchsreihen mit Veränderung einer der beiden Parameter Lichtwellenlänge und Lichtintensität durchgeführt.

Dabei war es unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die Cercarien in den ersten drei Lebensstunden ihre maximale Aktivität erreichen und diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede zwischen Cercarien verschiedener Wirtsschnecken feststellbar waren, möglich, Cercarien von verschiedenen Wirtsschnecken zu verwenden.

Dies war aufgrund der Fülle der Versuche zur Messung der Abhängigkeit der Aktivität von Lichtwellenlänge und Lichtintensität notwendig, da die Wirtsschnecken ca. drei Wochen leben und pro Tag nur eine Cercarie untersucht werden kann.

Als Wassertemperatur wurde bei allen Versuchsreihen 28° C verwendet.

3.4.1. Beeinflussung der Aktivphase durch Veränderung von Lichtwellenlänge und Lichtintensität

a) Veränderung der Aufstiegsgeschwindigkeit

Bei den Versuchsreihen wurden jeweils zwei Cercarien einer Wirtsschnecke mit einer Kombination aus Lichtwellenlänge und Lichtintensität untersucht. Um herauszufinden, bei welcher Kombination die Cercarien die größte Schwimgeschwindigkeit zeigen, wurde die Lichtwellenlänge, ausgehend von 400 nm, in 50 nm – Schritten bis 700 nm, die Lichtintensität von 0 Cd (kein Licht) auf 5000 Cd, 10000 Cd, 20000 Cd und auf 30000 Cd erhöht.

Die Abb. 3.4.1. zeigt, daß Cercarien ohne Lichtstimulation durchschnittlich ca. 0,6 mm/s schnell schwimmen (blaue Balken). Werden die Cercarien mit Licht von

5000 Cd stimuliert, reagieren sie mit einer deutlichen Zunahme der Geschwindigkeit. Am stärksten ist dieser Effekt bei der Wellenlänge von 500 nm. Eine Stimulation mit 500 nm bei 5000 Cd bringt eine Zunahme der Schwimgeschwindigkeit von 0,6 mm/s auf ca. 1,6 mm/s. Wird die Lichtintensität auf 10000 Cd erhöht, steigt die Geschwindigkeit bei allen Wellenlängen nochmals um ca. 0,2 mm/s.

Eine weitere Erhöhung der Lichtintensität auf 30000 Cd ergibt dann aber keinen weiteren meßbaren Effekt auf die Schwimgeschwindigkeit.

Die Variation der Lichtwellenlänge ergibt ein charakteristisches Profil. Das Anheben der Lichtwellenlänge von 400 auf 500 nm erwirkt einen deutlich meßbaren Anstieg der Aktivität der Cercarien. Während bei 400 nm der Durchschnitt der Geschwindigkeit bei ca. 0,8 mm/s liegt, erhöht sich diese bei 500 nm Lichtwellenlänge auf ca. 1,6 mm/s. Steigert man in Folge die Lichtwellenlänge auf 700 nm, reduziert sich die Aktivität der Cercarien wieder. Die erreichte Geschwindigkeit wird dann mit ca. 0,8 mm/s gemessen.

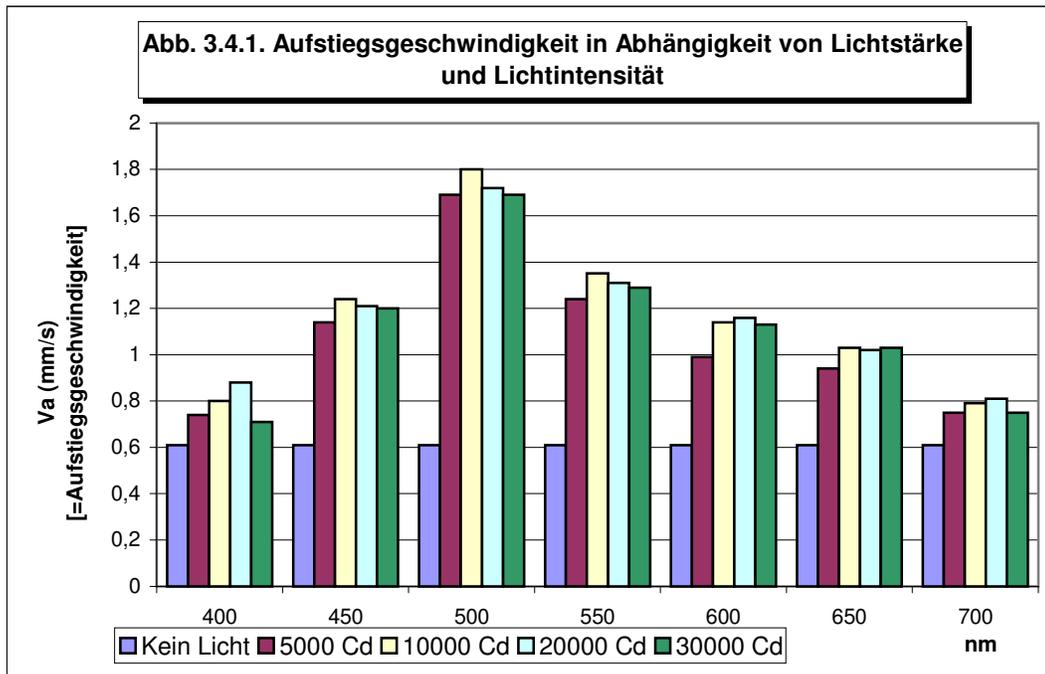


Abb. 3.4.1. zeigt, daß ohne Lichtstimulation die Schwimgeschwindigkeit am geringsten ist (hellblaue Balken). Eine Zunahme der Lichtstärke auf 5000 Cd steigert die Aktivität deutlich. Bei 500 nm Lichtwellenlänge die ist Geschwindigkeit am höchsten.

Testdaten Abb. 3.4.1.	
Testtemperatur	28 °C
Lichtstärke	Dunkelheit, 5000 Cd, 10000 Cd, 20000 Cd, 30000 Cd
Lichtwellenlänge	400 nm, 450 nm, 500 nm, 550 nm, 600 nm, 650 nm, 700 nm
Testdurchführung	Bei jeder Kombination von Lichtwellenlänge und Lichtstärke wurde 3 Cercarien untersucht, insgesamt 105 Cercarien; Cercarien von 7 verschiedenen Schnecken
Testdauer	Beginnend 10.00 Uhr bis ca. 8.00 Uhr des nächsten Tages

b) Veränderung der aktiv ausgeführten Schwimmstöße in Anzahl und Länge

Ein aktiver Schwimmstoß führt die Cercarie in Richtung der Wasseroberfläche. Wenn sie sich passiv verhält, wird sie dagegen von der Schwerkraft zum Boden gezogen. Die Anzahl und Länge der Schwimmstöße haben also unmittelbaren Einfluß auf die Lage der Cercarie im Wasser. Will die Cercarie einen Wirt finden, muß sie sich in der Nähe des Wirtes aufhalten und somit möglichst oft an der Oberfläche oder in der Mitte des Wasser schwimmen.

Zur Auswertung kamen die Ergebnisse bei den Messungen mit den Lichtwellenlänge 400 nm, 500 nm und 600 nm. Jede dieser Wellenlänge wurde mit den Lichtstärken 5000 Cd, 10000 Cd und 20000 Cd kombiniert. Untersucht wurden jeweils drei Cercarien.

Werden Cercarien nicht mit Licht stimuliert, führen sie in den ersten Stunden ca. 5 Schwimmstöße pro Minute aus (hellblaue Balken in Abb. 3.4.1.2). Wie Tabelle 3.4.1.1. + Abb. 3.4.1.2. zeigen, erhöht sich die Anzahl der ausgeführten Schwimmstöße nach Stimulation mit Licht von 5000 Cd auf ca. 12 pro Minute. Bei einer Stimulation der Cercarien mit der Lichtstärke von 10000 Cd führen die Cercarien im Durchschnitt dann ca. 15 Schwimmstöße aus. Wird die Lichtstärke weiter auf 20000 Cd gesteigert, bleibt die Anzahl der Schwimmstöße konstant.

Der Effekt ist am stärksten bei der Lichtwellenlänge 500 nm ausgeprägt. Hier führen die Cercarie die meisten Schwimmstöße aus. Wie in der Abb. 3.4.1.2. zu sehen ist, ist die Anzahl der ausgeführten Schwimmstöße bei den Wellenlänge 400 nm und 600 nm bei allen Lichtintensitäten geringer als bei 500 nm.

Tabelle 3.4.1.1. Abhängigkeit der aktiv ausgeführten Schwimmstöße von Lichtintensität und Lichtwellenlänge

Tageszeit	Anzahl aktiver Schwimmstöße ohne Licht			Anzahl aktiver Schwimmstöße bei 5000 Cd		
	400 nm	500 nm	600 nm	400 nm	500 nm	600 nm
10:00	5,3	5,2	5,3	11,2	12,1	11,6
11:00	5,4	5,5	5,3	12,1	12,5	11,2
12:00	5,1	5	5,2	11,3	11,5	10,4
13:00	4,5	4,7	4,7	8,6	9,2	8,4
14:00	4,1	4,2	4,2	7,4	7,6	6,7
15:00	3,5	3,4	3,2	4,9	4,3	4,1
16:00	4	4	4	4,3	6,7	4,6
17:00	4	4	4	4,2	6,3	4,7
18:00	3	2	2	3,9	4,1	3,5
19:00	3	3	2	3,4	3,6	3,1
20:00	2	2	2	2,2	2	2,6
21:00	1	1	1	1,7	1,4	1,9
22:00	0	0	0	0	0	0
23:00	0	0	0	0	0	0

Tageszeit	Anzahl aktiver Schwimmstöße bei 10000 Cd			Anzahl aktiver Schwimmstöße bei 20000 Cd		
	400 nm	500 nm	600 nm	400 nm	500 nm	600 nm
10:00	14,5	15,3	14,1	14,7	14,8	14,2
11:00	14,1	15,4	14,5	14,8	14,6	14,5
12:00	14,4	15,8	14,6	14,6	14,8	14,4
13:00	12,3	14,2	13,2	11,5	13,2	12,6
14:00	8,3	9,2	8,5	8,3	7,8	8,4
15:00	5	6,5	6,5	4,5	4,9	5,6
16:00	4	5,5	3,8	4,4	4	4,1
17:00	3,4	3,9	2,6	3,6	4,2	3,7
18:00	3,2	4,1	3,9	3,2	4,3	2,6
19:00	3,8	3,8	2,8	3,6	4	3,1
20:00	4,2	3,1	2,1	2,5	5,1	3,7
21:00	0	2,4	4	1,5	1,6	3,9
22:00	0	0	4	0,2	0,2	2,6
23:00	0	2,8	0	0,5	0	0

Tab. 3.4.1.1. Die Tabelle zeigt, daß in den ersten Lebensstunden die meisten Schwimmstöße auftreten. Ohne Beleuchtung zeigen sich die Cercarien am wenigsten aktiv. Sowohl bei einer Steigerung der Lichtintensität als auch der Lichtwellenlänge reagieren die Cercarien mit einer Zunahme der Schwimmstöße bis 10000 Cd. Testdaten wie in Abb. 3.4.1

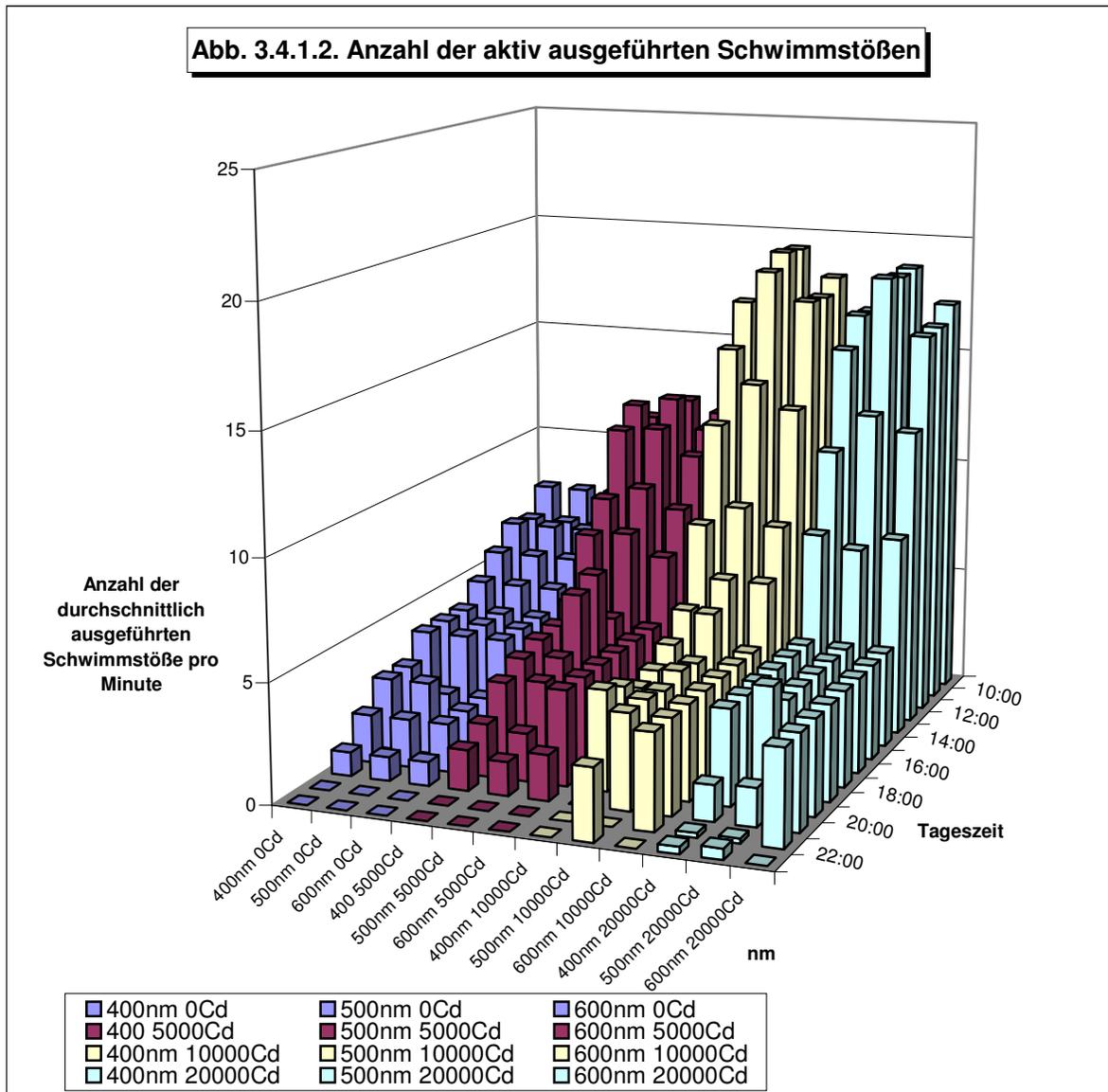


Abb. 3.4.1.2 zeigt, daß die Cercarien durch Zunahme der Lichtwellenlänge und der Lichtstärke mit einer vermehrten Ausführung von Schwimmstößen reagieren. Diese Reizantwort ist in den ersten Lebensstunden der Cercarie am stärksten ausgeprägt. Sind die Cercarien einige Stunden alt, gleicht sich die Bereitschaft, einen Schwimmstoß auszuführen, bei einer stärkeren Reizung der schwächeren an. Bei einer Lichtstimulation im Bereich von 500 nm mit der Lichtstärke 10000 Cd führen die Cercarien deutlich mehr Schwimmstöße aus als solche, die kein Licht erhalten.

3.4.2. Veränderung der Verweildauer an der Oberfläche durch Lichtstimulation

Die Geschwindigkeit einer Cercarie ist nur ein Merkmal der A-Phase. Ziel einer Cercarie ist es, in ihrer Lebensspanne einen Endwirten zu finden. Daher muß die Cercarie in dieser Zeit möglichst oft versuchen, sich in einem Bereich aufzuhalten, in dem sich auch die Zwischenwirte befinden.

Abb. 3.4.2a. zeigt die Auswertung der gewonnenen Daten, welchen Einfluß die Veränderung von Lichtintensität und Lichtwellenlänge auf das Bestreben der Cercarie hat, sich an der Oberfläche aufzuhalten. Um dies zu überprüfen, wurde dabei als Oberfläche ein Bereich von ca. 5 mm unterhalb des Wasserspiegels angesehen (Abb. 3.4.2b.)

Es lässt sich erkennen, daß durch Lichtstimulation die Länge des Aufenthalts an der Oberfläche der Küvette deutlich zunimmt. Ohne Licht hält sich die Cercarie durchschnittlich nur ca. zwei Minuten pro Stunde an der Oberfläche auf. Durch Gabe von Licht erhöht sich diese Phase bis auf über acht Minuten bei 10000 Cd und 500 nm.

Wie schon in Abschnitt 3.4.1. gezeigt, erhöht sich bei Stimulation mit Licht die Schwimmggeschwindigkeit. Dies bedeutet, daß die Cercarie häufiger einen aktiven Schwimmstoß durchführt, der sie zwangsläufig näher an die Wasseroberfläche bringt. Durch die Zunahme der Schwimmstöße und der Schwimmggeschwindigkeit erhöht sich daher auch die Länge des Aufenthaltes an der Wasseroberfläche.

Diese Beobachtung hebt sich auf, wenn die Lichtintensität auf 30000 Cd gesteigert wird. Der Aufenthalt an der Wasseroberfläche geht dann durchschnittlich auf ca. sechs Minuten pro Stunde zurück.

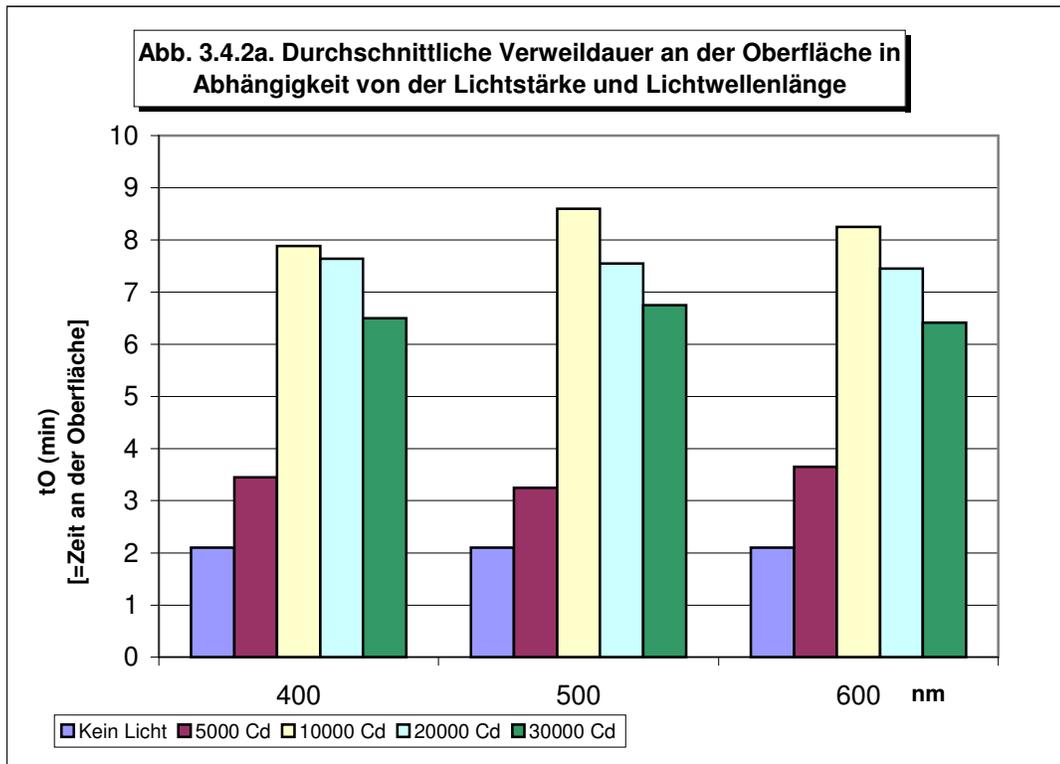


Abb.3.4.2a. zeigt, daß sich die durchschnittliche Dauer der Phase t_0 (min), in der sich die Cercarie an der Oberfläche befindet, sich mit Zunahme der Lichtwellenlänge bis 500 nm und der Lichtstärke bis ca. 10000 Cd erhöht.

Testdaten Abb. 3.4.2a.	
Testtemperatur	28 °C
Lichtstärke	Dunkelheit, 5000 Cd, 10000 Cd, 20000 Cd, 30000 Cd
Lichtwellenlänge	400 nm, 500 nm, 600 nm
Testdurchführung	Bei jeder Kombination von Lichtwellenlänge und Lichtstärke wurden 3 Cercarien untersucht, insgesamt 105 Cercarien; Cercarien von 7 verschiedenen Schnecken.
Testdauer	Beginnend 10.00 Uhr bis ca. 8.00 Uhr des nächsten Tages

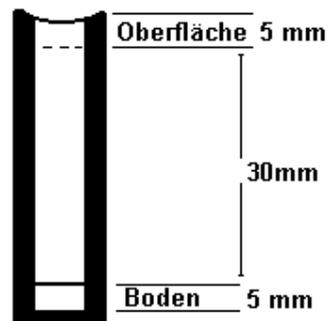


Abb. 3.4.2b. Schema Küvette

Als Bereich der Oberfläche wurde eine Strecke 5 mm unterhalb des Wasserspiegels definiert.

3.5. Abhängigkeit der Passivphase von Lichtwellenlänge und Lichtintensität

Die Passivphase ist charakterisiert durch das passive Absinken der Cercarie in Richtung Boden. Im normalen, natürlichen Gewässer eines Flusses oder Sees ist die Länge dieser Phase unter anderem abhängig von der Fließgeschwindigkeit des Wassers und dessen Verwirbelungen. Die Geschwindigkeit des Absinkens kann die Cercarie nur indirekt variieren, indem sie aktiv Schwimmstöße ausführt, die sie kurzzeitig sie in der Schwebelage halten und der Schwerkraft entgegen wirken.

Während der Versuchsreihe befindet sich die Cercarie in der Beobachtungsküvette. Beim Starten des Versuchs wurde darauf geachtet, daß sich in der Küvette keine störenden Verwirbelungen bilden und das Wasser ruhig bleibt.

3.5.1. Abhängigkeit der Absinkgeschwindigkeit von Lichtwellenlänge und Lichtintensität

Bei den Versuchsreihen wurden jeweils zwei Cercarien einer Wirtsschnecke mit einer Kombination aus Lichtwellenlänge und Lichtintensität untersucht.

Die Lichtwellenlänge wurde von 400 nm in 50 nm – Schritten auf 700 nm erhöht, die Lichtstärke von 0 Cd (kein Licht), auf 5000Cd, 10000 Cd, 20000 Cd und 30000 Cd gesteigert.

Die Messergebnisse der Versuchsreihen bestätigen, daß die Absinkgeschwindigkeit relativ konstant ist. Das passive Absinken ist von der Schwerkraft abhängig.

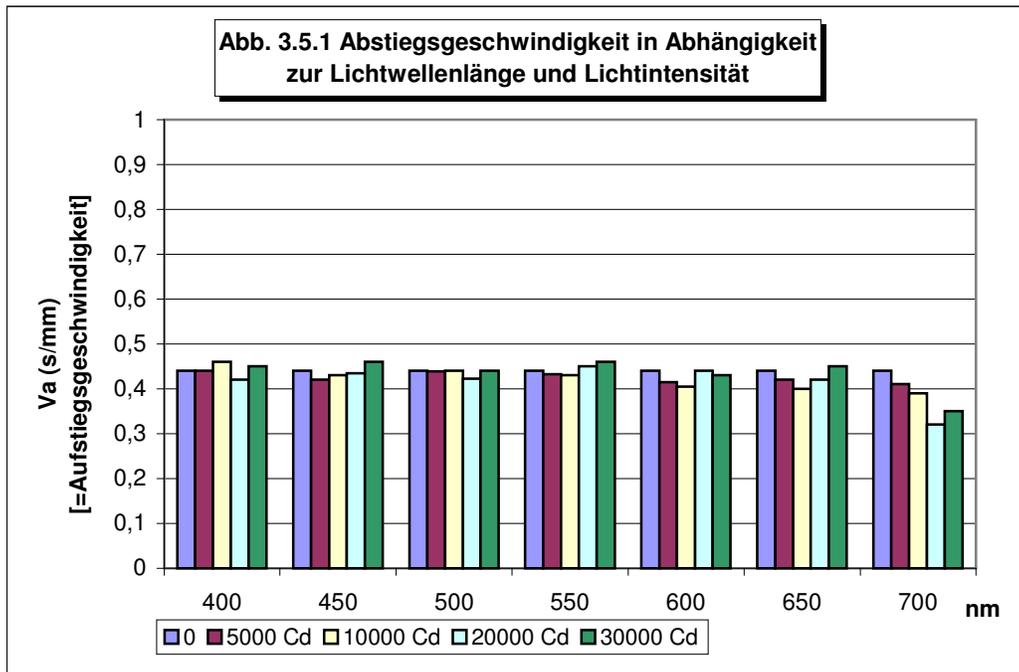


Abb. 3.5.1. zeigt, daß die Abstiegs- und Aufstiegs-
geschwindigkeit über alle Lichtintensitäten und Lichtwellen-
längen relativ konstant bleibt.

Testdaten Abb. 3.5.1.	
Testtemperatur	28 °C
Lichtstärke	Dunkelheit, 5000 Cd, 10000 Cd, 20000 Cd, 30000 Cd
Lichtwellenlänge	400 nm, 450 nm, 500 nm, 550 nm, 600 nm, 650 nm, 700 nm
Testdurchführung	Bei jeder Kombination von Lichtwellenlänge und Lichtstärke wurden 3 Cercarien untersucht, insgesamt 105 Cercarien; Cercarien von 7 verschiedenen Schnecken.
Testdauer	Beginnend 10.00 Uhr bis ca. 8.00 Uhr des nächsten Tages

3.5.2. Abhängigkeit der Passivphase in der Länge und Anzahl von Lichtwellenlänge und Lichtintensität

Aktiv- und Passivphase befinden sich ständig im gegenseitigen Wechsel. Die Bereitschaft, einen Schwimmstoß auszuführen, erhöht sich mit dem Erregungszustand der Cercarie. Je länger die Passivphase andauert, um so größer wird die Wahrscheinlichkeit, daß die Cercarie einen Schwimmstoß ausführt. Die Länge der Passivphase hat daher unmittelbaren Einfluß auf die Auslösung der aktiven Bewegungen.

Die Passivphase ist geprägt vom Absinken der Cercarie in Richtung Boden der Küvette. Die Geschwindigkeit ist dabei konstant, da keine Schwimmbewegung ausgeführt wird.

Wie Tabelle 3.5.2.1. und Abb. 3.5.2.2. zeigen, ist die Anzahl der Passivphasen in den ersten Lebensstunden relativ hoch. Sie liegen bei ca. 100 pro Stunde.

Aus Abb. 3.5.1. lässt sich aber entnehmen, daß die Beeinflussung der Passivphase durch die jeweilige Lichtstärke und Lichtwellenlänge nur minimal ist. Diese scheint auf die Passivphase und somit auf die Zeit, die vergeht, bis die Cercarie wieder eine aktive Bewegung ausführt, nur einen geringen Einfluß zu haben.

Tabelle 3.5.2.1. Passivphase in Abhängigkeit von Lichtwellenlänge und Lichtintensität

0 Cd	Anzahl Passivphase			Durchschnittliche Länge von tP(s) pro Stunde			5000 Cd	Anzahl Passivphase			Durchschnittliche Länge von tP(s)		
	400 nm	500 nm	600 nm	400 nm	500 nm	600 nm		400 nm	500 nm	600 nm	400 nm	500 nm	600 nm
10:00	141	141	141	15,2	15,2	15,2	10:00	124	116	117	15,2	14,2	16,4
11:00	87	87	87	35,1	35,1	35,1	11:00	96	87	78	33,2	31,3	29,6
12:00	73	73	73	46,2	46,2	46,2	12:00	73	75	79	46,7	45,1	49,2
13:00	67	67	67	50,1	50,1	50,1	13:00	67	72	76	49,4	53,1	51,8
14:00	66	66	66	54	54	54	14:00	66	61	65	54	52,3	53,9
15:00	56	56	56	57,8	57,8	57,8	15:00	64	56	58	56,3	87,4	72,5
16:00	31	31	31	107,2	107,2	107,2	16:00	31	34	37	98,2	114,7	93,5
17:00	26	26	26	167,4	167,4	167,4	17:00	21	26	29	151,3	164,2	145,6
18:00	14	14	14	215,5	215,5	215,5	18:00	15	14	17	194,3	207,2	217,9
19:00	8,1	8,1	8,1	351,3	351,3	351,3	19:00	10	8	12	351,3	312,5	315,4
20:00	8,2	8,2	8,2	415,7	415,7	415,7	20:00	8	4	8	415,7	382,6	387,3
21:00	6,4	6,4	6,4	421,2	421,2	421,2	21:00	7	5	6	358,6	431,1	412,3
22:00	6,1	6,1	6,1	434,5	434,5	434,5	22:00	6	7	4	434,5	401,3	467,3
23:00	5,4	5,4	5,4	444,3	444,3	444,3	23:00	3	5	8	423,1	465,1	454,2
Tageszeit	400 nm	500 nm	600 nm	400 nm	500 nm	600 nm		400 nm	500 nm	600 nm	400 nm	500 nm	600 nm
10000 Cd	Anzahl Passivphase			Durchschnittliche Länge von tP(s) pro Stunde			20000 Cd	Anzahl Passivphase			Durchschnittliche Länge von tP(s)		
10:00	121	118	119	16,5	16,2	12,3	10:00	119	118	121	10,2	11,3	11,1
11:00	96	87	78	36,5	31,2	27,3	11:00	92	83	75	33,2	32,4	23,2
12:00	73	75	79	48,1	43,5	47,2	12:00	72	67	69	45,7	48,2	38,3
13:00	67	72	76	53,7	51,2	50,6	13:00	65	66	65	52,1	53,7	45,6
14:00	66	61	65	54,5	53,4	52,1	14:00	63	62	62	53,4	54	51,2
15:00	64	56	58	56,2	55,2	54,2	15:00	60	52	55	54,2	56	53,7
16:00	31	34	37	114,3	85,6	114,8	16:00	29	29	32	109,8	114,2	88,7
17:00	21	26	29	152,6	141,2	168,2	17:00	21	26	28	158,2	168,3	142,6
18:00	15	14	17	204,5	202,3	228,4	18:00	14	13	18	208,3	227,2	205
19:00	10	8	12	314,8	304,2	340,1	19:00	10	8	12	337,6	341,2	271,3
20:00	8	5	9	323,6	402,1	411,2	20:00	8	4	8	405,6	352	320,5
21:00	7	6	11	345,2	490,6	421,3	21:00	7	5	8	351,2	365,5	345,4
22:00	7	7	4	387,8	502	467,9	22:00	6	6	4	378,5	375,3	367,3
23:00	6	6	9	402,3	491	457,2	23:00	4	6	7	398,2	378,2	385,7
Tageszeit	400 nm	500 nm	600 nm	400 nm	500 nm	600 nm		400 nm	500 nm	600 nm	400 nm	500 nm	600 nm

Tab. 3.5.2.1. zeigt, daß sich die Anzahl der Passivphasen mit zunehmender Tageszeit verringert. Gleichzeitig nimmt aber deren Länge deutlich zu.

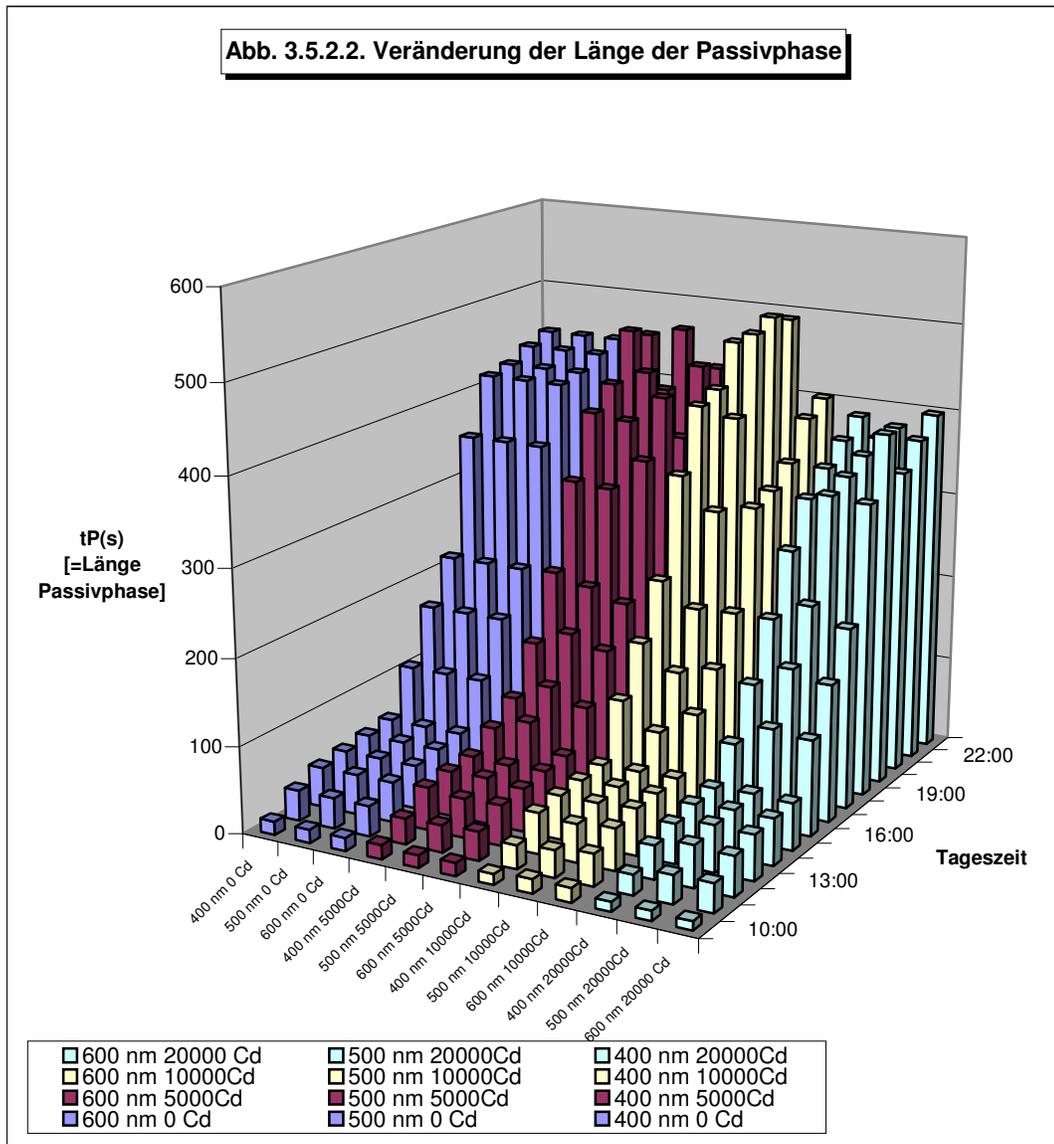


Abb. 3.5.2.2. zeigt, daß sich $t_P(s)$ [Dauer der Passivphase] in Abhängigkeit von der Tageszeit deutlich verlängert. **Testdaten wie in Abb. 3.5.1.**

3.5.3. Beeinflussung der Verweildauer am Boden durch veränderte Lichtstimulation

Die Länge der Phase $t_B(s)$ [Verweildauer der Cercarie am Boden], korreliert sehr deutlich mit dem Erregungszustand der Cercarie. An ihrem Lebensanfang ist die Cercarie sehr aktiv und führt viele Schwimmbewegungen aus, um sich im oberen Drittel des Wassers aufzuhalten. Ein Absinken und längeres Verharren im unteren Bereich der Küvette wird dagegen erst in den späteren Lebensstunden beobachtet. Die Stimulation mit Licht moduliert nicht nur die Aktivphase, sondern wirkt auch verkürzend auf die Passivphase.

Aus der Abb. 3.5.3.1. wird deutlich, daß sich mit einer Erhöhung der Lichtstärke und Lichtwellenlänge die Länge der Phase verringert, in der sich die Cercarie am Boden befindet. Die Cercarie meidet die untere Region der Küvette, da dort die Wahrscheinlichkeit, einen Endwirt zu finden, geringer ist als an der Wasseroberfläche.

Wird die Cercarie mit Licht stimuliert, verringert sich die Länge von $t_B(s)$ von ca. 23 min ohne Licht auf ca. 17 min pro Stunde bei einer Stimulation mit der Lichtstärke von 5000 Cd.

Bis 10000 Cd reduziert sich $t_B(s)$ weiter auf ca. 10 min, um bei der Gabe von Licht mit 20000 Cd und 30000 Cd auf die Länge von ca. 12 min wieder leicht anzuwachsen.

Untersucht wurden dabei die Lichtwellenlänge 400, 500 und 600 nm. Abb. 3.5.3.1. zeigt, daß bei 500 nm die Phase am Boden am kürzesten ist. Werden Cercarien in diesem Spektrum stimuliert, halten sie sich ca. 10 min. pro Stunde am Boden auf.

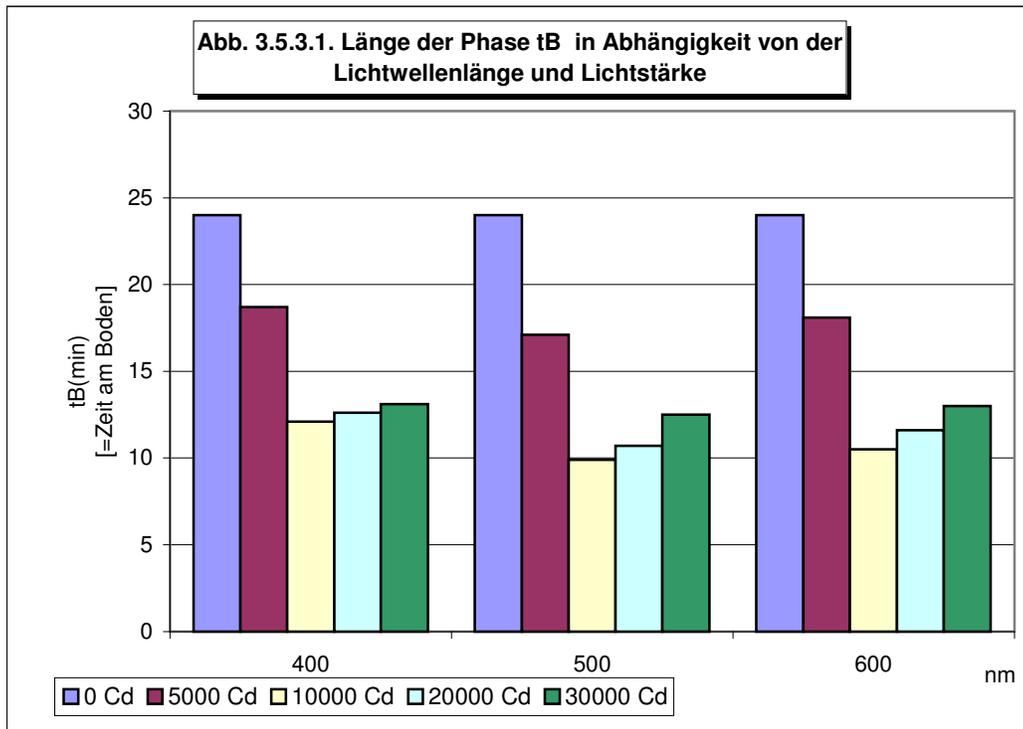


Abb. 3.5.3.1. zeigt, daß die Länge der Phase am Boden ohne Lichtstimulation am längsten ist. tB(s) reduziert sich bei Lichtstimulation. Bei der Lichtwellenlänge von 500 nm ist der Aufenthalt am Boden am kürzesten. Die dargestellten Werte beziehen sich auf die Testauswertung in der Tageszeit von 10.00 – 11.00 Uhr

Testdaten Abb. 3.5.3.1.	
Testtemperatur	28 °C
Lichtstärke	Dunkelheit, 5000 Cd, 10000 Cd, 20000 Cd, 30000 Cd
Lichtwellenlänge	400 nm, 500 nm, 600 nm
Testdurchführung	Bei jeder Kombination von Lichtwellenlänge und Lichtstärke wurden 3 Cercarien untersucht, insgesamt 105 Cercarien; Cercarien von 7 verschiedenen Schnecken
Testdauer	Beginnend 10.00 Uhr bis ca. 8.00 Uhr des nächsten Tages. Testauswertung in der Zeit von 10.00 – Uhr 11.00 Uhr

3.6. Stimulationsversuche

3.6.1. Dunkelreiz in der Passivphase

a) Beeinflussung der aktiv ausgeführten Schwimmstöße

In weiteren Versuchen wurde der Frage nachgegangen, ob die Aktiv- und Passivphase in ihrer Anzahl und Ausprägung durch äußere Lichtreize direkt beeinflusst werden kann. Bekannt war, daß bei verschiedenen Cercarienarten durch Dunkelreize Schwimmstöße ausgelöst werden können (30). Ob die Cercarie einen Schwimmstoß ausführt, ist von der Höhe des Erregungspotentials abhängig, das die Passivphase steuert. Äußere Reize können dieses Potential sowohl erhöhen als auch hemmen. In den Versuchen zeigte sich, daß diese äußere Beeinflussung bei den Cercarien unterschiedlich stark ausgeprägt ist.

Von Interesse dabei war es auch, ob die Cercarie nur mit einem Schwimmstoß antwortet oder auch meßbar ihren Aufenthaltsort ändert. Dies hätte Auswirkung auf die Frage, ob die Cercarie unmittelbar auf potentielle Endwirte in Form eines Schattens reagiert und sich in dessen Richtung bewegt.

Über der Küvette wurde in den Strahlengang des Lichtes ein Blendenverschluß der Firma Zeiss eingebracht. Mit Hilfe eines externen Steuergerätes kann der Verschluß mit vorgegebenen Zeiten geöffnet oder verschlossen werden.

Als Lichtwellenlänge wurde 500 nm bei 10000 Cd Lichtstärke verwendet. Untersucht wurden Passivphasen, die insgesamt zwei, vier, sechs und dreißig Sekunden dauerten.

Der Dunkelreiz wurde nach Ablauf der zu untersuchenden Passivphase appliziert, also exakt nach zwei, vier, sechs und dreißig Sekunden. Die Auslösung des Dunkelreizes wurde von dem Computerprogramm übernommen, das auch die Steuerung der Nachführautomatik übernimmt. Die Länge des Dunkelreizes betrug eine Sekunde. Die Versuche wurden in der Tageszeit von 10.00 Uhr bis 13.00 Uhr durchgeführt.

Wie aus Tab. 3.6.1 zu sehen ist, nimmt die Bereitschaft der Cercarie, einen Schwimmstoß spontan auszuführen mit der Länge der Passivphase zu. Nach einer Passivphase von 30 Sekunden führen ca. 52 % der Cercarien einen aktiven Schwimmstoß aus, während nur 24 % der Cercarien nach 2 Sekunden Passivphase diese unterbrechen.

Werden die Cercarien in der Passivphase mit einem Dunkelreiz stimuliert, erhöht sich die Anzahl der ausgeführten Schwimmstöße unmittelbar nach Reizgabe auf bis zu 18% (z.B. bei Passivphasen die 30 Sekunden dauern).

Tabelle 3.6.1. Dunkelreiz in der Passivphase

Ohne Dunkelreiz				
Länge von tP(s)	2	4	6	30
Prozentualer Anteil der bis zu dem Zeitpunkt ausgelösten Schwimmstöße	24	26,5	31,4	51,8
Dunkelreiz 1 sec				
Länge von tP(s)	2	4	6	30
Prozentualer Anteil der bis zu dem Zeitpunkt ausgelösten Schwimmstöße	27,7	31,3	41,5	69,8
Anzahl der Reizungen	100	100	100	100

Tab. 3.6.1. zeigt den Anteil in % der durch einen Dunkelreiz von 1 s (10000 Cd auf 0 Cd) ausgelösten Schwimmstöße nach Passivphasen von 2, 4, 6, 30 Sekunden.

Testdaten Tab. 3.6.1.	
Testtemperatur	28 °C
Lichtstärke	10000 Cd
Lichtwellenlänge	500 nm
Testdurchführung	Die Stimulationsversuche wurden mit sechs Cercarien verschiedener Wirtsschnecken durchgeführt, die zum Vergleich herangezogenen Daten ohne Dunkelreiz ebenso von sechs Cercarien unterschiedlicher Wirtsschnecken. Insgesamt wurde je Passivphase die gleiche Gesamtanzahl untersucht.
Testdauer	Beginnend 10.00 Uhr bis ca. 13.00 Uhr

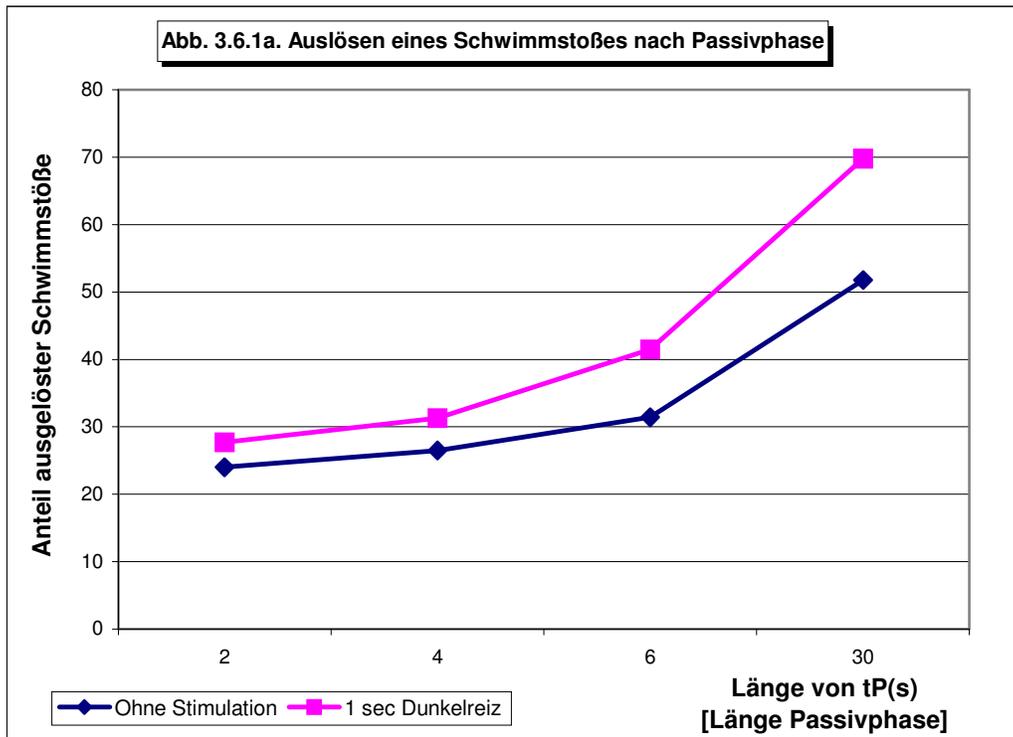


Abb. 3.6.1a. zeigt den Anteil in % der nach einer Sekunde Dunkelreiz ausgelösten Schwimmstöße. Cercarien, die mit einem Dunkelreiz (1 sec) stimuliert werden, lösen in der Passivphase häufiger einen Schwimmstoß aus als solche, die nicht stimuliert werden.

b) Auswirkung auf das Verhalten der Cercarien, die keinen Schwimmstoß ausführen

In der Tabelle 3.6.1b. werden die prozentualen Anteile der Schwimmstöße dargestellt, welche direkt nach den untersuchten Passivphasen gestartet wurden.

Zusätzlich war es für uns von Interesse, welche Auswirkung die Gabe des Dunkelreizes auf die Bereitschaft der Cercarie hat, in der weiteren Phase einen Schwimmstoß möglicherweise früher auszulösen als dies ursprünglich der Fall gewesen wäre.

Abb. 3.6.1b. zeigt die durchschnittliche Länge der Passivphasen nach einer Stimulation und deren relativer Anteil an den Passivphasen insgesamt. Es wird deutlich, daß die Stimulation sowohl nach 2, 4 und 6 Sekunden in der Passivphase keine signifikant meßbare Auswirkung auf die Auslösebereitschaft eines Schwimmstoßes hat. Die Häufigkeit des Startzeitpunktes des Schwimmstoßes ist

bei den Passivphasen der gereizten Cercarien ähnlich verteilt wie bei denen, die nicht gereizt wurden.

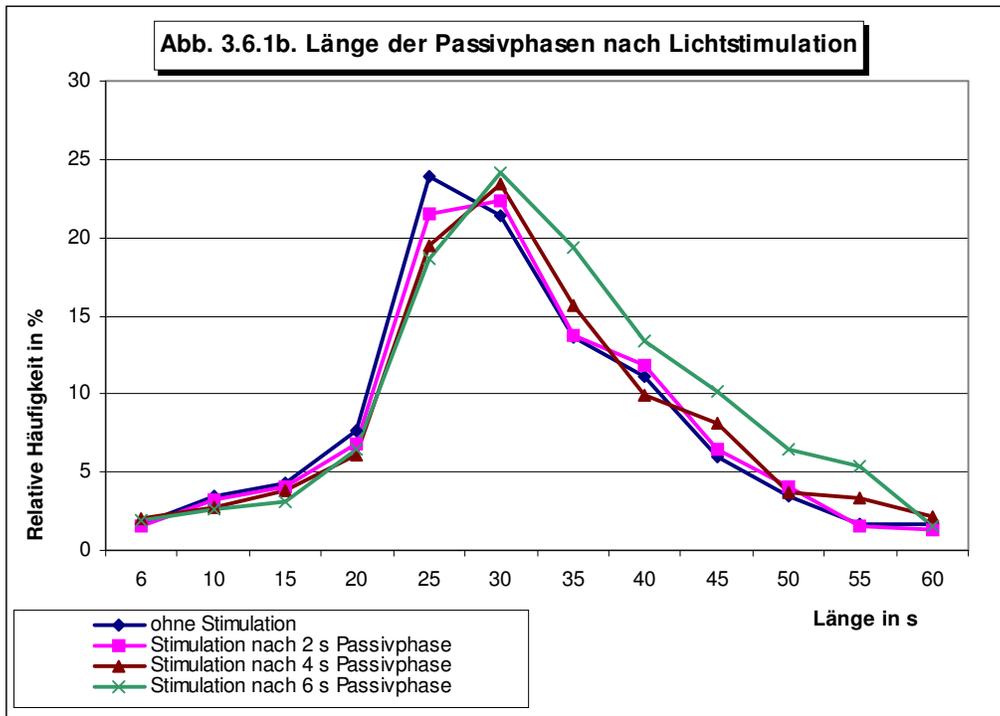


Abb. 3.6.1b. Es wurden Cercarien ohne Lichtstimulation mit solchen verglichen, die nach einer Passivphase von jeweils 2, 4, 6 Sekunden Passivphase mit einem Lichtreiz stimuliert wurden. Die Verteilung zeigt die Häufigkeit der auf die Zeitachse aufgetragenen ausgelösten Schwimmstöße. Die Anzahl der ausgelösten Schwimmstöße scheint sich nicht signifikant verändert zu haben.

Die Bereitschaft der Cercarien, einen Schwimmstoß nach einer Passivphase auszuführen, die 30 Sekunden andauert, erhöht sich dagegen nach einem Dunkelreiz von einer Sekunde. Wie die Abb. 3.6.1c. zeigt, reagieren die Cercarien mit der vermehrten Auslösung von Schwimmbewegungen unmittelbar nach Reizgabe. Die Stimulation durch einen äußeren Reiz scheint bei einer längeren Passivphase also Einfluß auf die Auslösebereitschaft einer Schwimmbewegung zu haben.

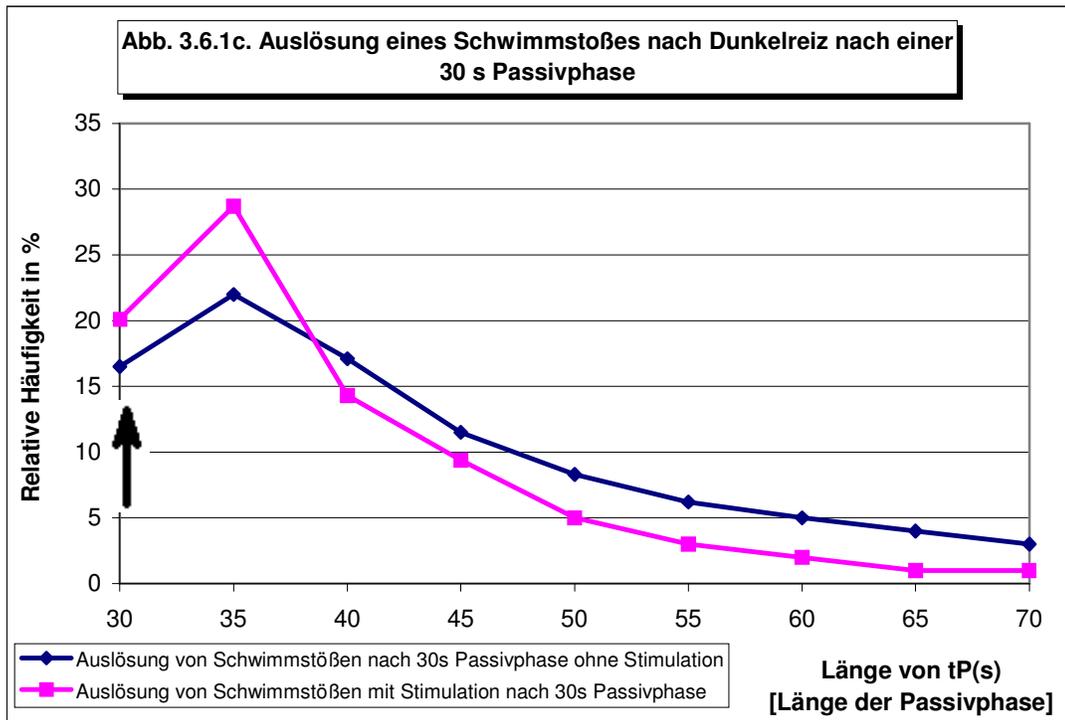


Abb.3.6.1c. zeigt die Ergebnisse der Stimulation durch einen Dunkelreiz. Zum Vergleich der nach 30 Sekunden Passivphase stimulierten Cercarien wurden Daten von Cercarien herangezogen, die mindestens 30 s lang passiv waren. Die stimulierten Cercarien lösen dabei häufiger einen Schwimmstoß aus als die nicht gereizten.

3.6.2. Dunkelreiz in der Aktivphase

Durch die Stimulation mit einem Dunkelreiz von einer Sekunde wurde die Auswirkung auf die Bereitschaft untersucht, einen aktiven Schwimmstoß zu unterbrechen. Es wurden dabei die Aktivphasen mit der Länge von einer, zwei und vier Sekunden ausgewählt. Aktivphasen, die länger dauern, sind relativ selten, so daß die Aussagefähigkeit eingeschränkt wäre. Der Dunkelreiz wurde unmittelbar im Anschluß an die zu untersuchende Länge der Aktivphase gegeben.

Tabelle 3.6.2. zeigt, daß die Bereitschaft, die Aktivphase zu unterbrechen, nach Gabe eines Dunkelreizes von einer Sekunde bei den Schwimmstößen deutlich zunimmt, die kurz andauerten. Fast doppelt so viele Cercarien, die nach einer Sekunde Aktivphase mit einem Dunkelreiz stimuliert werden, reagieren mit einem Abbruch des Schwimmstoßes.

Dieser Effekt scheint dagegen bei länger andauernden Aktivphasen ab der Länge von vier Sekunden deutlich geringer zu sein. Cercarien, die ca. vier Sekunden aktiv waren, brechen nach Gabe eines Dunkelreizes nur unwesentlich häufiger den Schwimmstoß ab als solche, die nur in ihrem spontanen Verhalten untersucht wurden. Ein Grund könnte dafür sein, daß die Aktivphasen durchschnittlich nicht länger als fünf Sekunden anhalten und ein signifikanter Effekt nicht beobachtet werden kann.

Tabelle 3.6.2. Dunkelreiz in der Aktivphase

ohne Dunkelreiz			
Länge der Aktivphase in Sekunden	1	2	4
Prozentualer Anteil der danach abgebrochenen Schwimmstöße	33,4	52,1	82,3
Dunkelreiz 1 sec			
Länge der Aktivphase in Sekunden	1	2	4
Prozentualer Anteil der danach abgebrochenen Schwimmstöße	61,7	69,8	86,7

Tab. 3.6.2. zeigt die Anzahl der nach einer Gabe eines Dunkelreizes in der Aktivphase abgebrochenen Schwimmstöße. Werden Cercarien in einer kurz andauernden Aktivphase mit einem Dunkelreiz stimuliert, brechen sie prozentual die Schwimmbewegung häufiger ab, als wenn der Aktivstoß länger dauert.

Testdaten Tab. 3.6.1.	
Testtemperatur	28 °C
Lichtstärke	10000 Cd
Lichtwellenlänge	500 nm
Testdurchführung	Die Stimulationsversuche wurden mit sechs Cercarien verschiedener Wirtsschnecken durchgeführt, die zum Vergleich herangezogenen Daten ohne Dunkelreiz ebenso von sechs Cercarien unterschiedlicher Wirtsschnecken. Insgesamt wurde je Passivphase die gleiche Gesamtanzahl untersucht.
Testdauer	Beginnend 10.00 Uhr bis ca. 13.00 Uhr

3.6.3. Lichtreiz in der Passivphase

Um zu überprüfen, welchen Einfluß die Gabe von Lichtreizen auf das Verhalten der Cercarien hat, wurden Cercarien in den Passivphasen mit Licht stimuliert. Der über der Küvette angebrachte Photoverschluß wurde zunächst geschlossen. Die Xenonlampe brannte dabei mit der Lichtstärke von 10000 Cd, eingestellt waren 500 nm Lichtwellenlänge. Zur Stimulation wurde der Verschluß mittels des Computerprogramms geöffnet. Die Öffnungszeiten wurden durch ein externes Steuergerät des Fotoverschlusses vorgegeben. Gegeben wurde ein Lichtreiz mit der Länge von einer Sekunde. Danach wurde die Beleuchtung durch das Testlicht wieder abgeschaltet. Der Lichtreiz wurde nach genau 10 Sekunden Passivphase gegeben.

Als Vergleich dienten die Daten der Cercarien, die ohne Licht beobachtet worden waren.

Es zeigt sich, daß die Gabe eines Lichtreizes in der Passivphase auf die Auslösung eines Schwimmstoßes verzögernd wirkt. Wie in Abb. 3.6.3. zu sehen ist, wird die Ausführung der folgenden Schwimmstöße gehemmt und die Dauer der Passivphase nimmt in der Folge auf die Reizgabe deutlich zu.

Die Gabe eines Lichtreizes in der Passivphase scheint also hemmende Wirkung auf die unmittelbare Auslösung der folgenden Schwimmstöße zu haben.

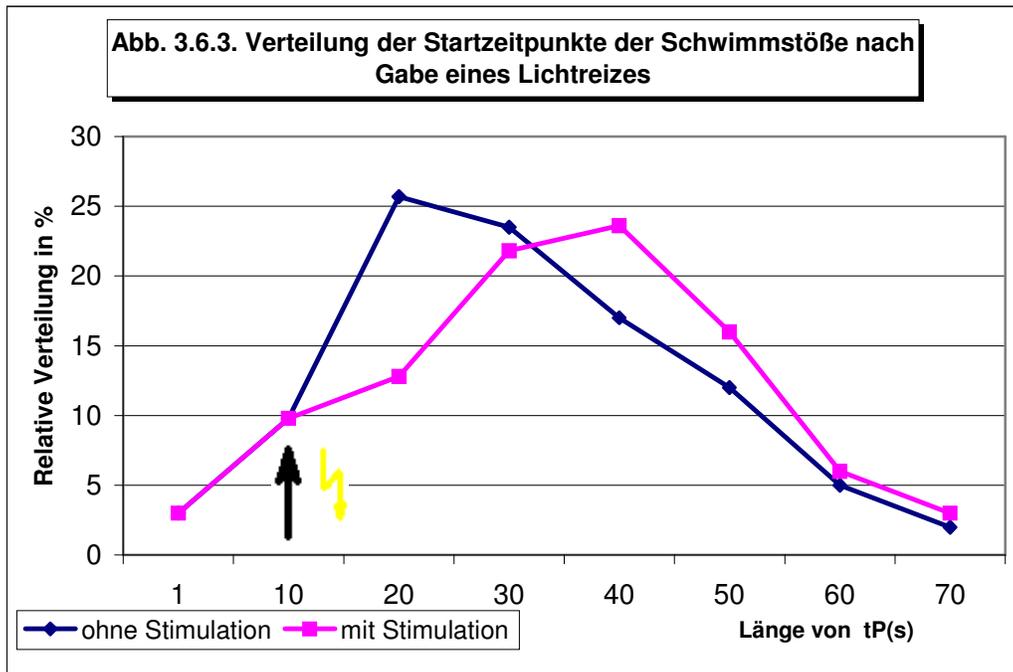


Abb. 3.6.3. zeigt das Verhalten der Cercarie nach Gabe eines Lichtreizes nach 10 Sekunden Passivphase. Die Länge des Lichtreizes beträgt eine Sekunde. Man sieht, daß sich dadurch die Passivphase verlängert und das Auslösen eines Schwimmstoßes deutlich verzögert wird.

Testdaten Tab. 3.6.3.	
Testtemperatur	28 °C
Lichtstärke des Reizes	10000 Cd
Lichtwellenlänge	500 nm
Testdurchführung	Die Stimulationsversuche wurden mit sechs Cercarien verschiedener Wirtsschnecken durchgeführt, die zum Vergleich herangezogenen Daten ohne Dunkelreiz ebenso von sechs Cercarien unterschiedlicher Wirtsschnecken. Insgesamt wurde je Passivphase die gleiche Gesamtanzahl untersucht.
Testdauer	Beginnend 10.00 Uhr bis ca. 13.00 Uhr

3.6.4. Lichtreiz in der Aktivphase

Zur Überprüfung der Abhängigkeit der Aktivphase von Lichtreizen, wurden Cercarien in der Aktivphase mit einem Lichtreiz mit der Länge von einer Sekunde stimuliert. Dabei wurde ein Lichtreiz nach Ablauf einer Aktivphase mit der Länge von ein, zwei und vier Sekunden appliziert. Die dabei ermittelten Ergebnisse verglichen wir mit Cercarien, die nicht stimuliert wurden.

Aus Tabelle 3.6.4. kann man entnehmen, daß in unseren Versuchen die Cercarie auf Lichtreizung in der Aktivphase nur minimal reagieren. Die Aktivphase verlängert sich nur um wenige Zehntelsekunden, es werden nur minimal weniger Aktivphasen abgebrochen.

Eine Aktivierung der A-Phase ließ sich ebenso nicht signifikant feststellen. Die nicht unterbrochenen A-Phasen wurden im Vergleich zu nicht stimulierten A-Phasen nicht wesentlich verlängert. Es fand also keine meßbare Aktivierung statt.

Tabelle 3.6.4. Lichtreiz in der Aktivphase

Lichtreiz in der Aktivphase

ohne Lichtreiz			
Länge der Aktivphase	1	2	4
Prozentualer Anteil der abgebrochenen Schwimmstöße	28,1	56,1	85,6
Lichtreiz 1 sec			
Länge der Aktivphase	1	2	4
Prozentualer Anteil der abgebrochenen Schwimmstöße	27,4	54,4	83,2
Länge der Aktivphase nach Stimulation in s	0,2	0,4	0,1
Anzahl der Reizungen	200	200	200

Tab. 3.6.4. zeigt die Reaktion der Cercarien, die nach einer Phase von einer, zwei und vier Sekunden einem Lichtreiz von einer Sekunde ausgesetzt wurden. Es zeigt sich, daß nur wenig Cercarien ihren Schwimmstoß durch Reizung unterbrechen. Die nicht abgebrochenen Schwimmstöße werden auf den Lichtreiz nur unwesentlich verlängert. Gemessen wurde an 20 Cercarien.

Testdaten Tab. 3.6.3.	
Testtemperatur	28 °C
Lichtstärke des Reizes	10000 Cd durch Aufblenden des Fotoverschlusses über der Küvette
Lichtwellenlänge	500 nm
Testdurchführung	Die Stimulationsversuche wurden mit sechs Cercarien verschiedener Wirtsschnecken durchgeführt, die zum Vergleich herangezogenen Daten ohne Dunkelreiz ebenso von sechs Cercarien unterschiedlicher Wirtsschnecken. Insgesamt wurde je Passivphase die gleiche Gesamtanzahl untersucht.
Testdauer	Beginnend 10.00 Uhr bis ca. 13.00 Uhr

3.7. Gegenseitige Beeinflussung von Aktiv- und Passivphase

3.7.1. Beeinflussung der Aktivphase nach einer Dunkelstimulation in der Passivphase

Wie sich aus Tabelle 3.7.1. zeigt, hat die Gabe einer Dunkelstimulation in der Passivphase auch Auswirkungen auf die darauffolgende Aktivphase. Auch wenn der aktive Schwimmstoß verzögert ausgelöst wird, verringert sich die Länge von $sA(s)$. Diese Wirkung scheint sich über den ganzen folgenden Bereich der Passivphase fortzusetzen, d.h. daß die Wirkung der Stimulation speicherbar zu sein scheint.

Tabelle 3.7.1. Abhängigkeit von Aktivphase und Passivphase nach Dunkelstimulation

Sekunden nach der Dunkelstimulation	30	35	40	45	50	55	60
tP(s) ohne Stimulation	3,1	2,87	2,56	2,43	1,95	1,76	1,3
tP(s) mit Stimulation	2,5	2,21	2,11	1,98	1,57	1,09	0,9

In **Tab. 3.7.1.** wurden die Beeinflussung der Aktivphasen überprüft, die auf einen Dunkelreiz in der Passivphase folgten. Diese sind im Durchschnitt kürzer als bei spontan ausgelösten Schwimmbewegungen. Diese Wirkung ist auch über einen längeren Zeitraum nach der Reizgabe meßbar.

3.7.2. Beeinflussung der Aktivphase nach einer Hellstimulation in der Passivphase

Wie gezeigt, verzögert sich die Auslösung eines Schwimmstoßes nach Gabe eines Lichtreizes in der Passivphase. Es kommt zu einer späteren Schwimmbewegung der Cercarie.

Die folgenden aktiven Schwimmstöße werden aber deutlich länger ausgeführt als solche, die ohne Stimulation spontan auftreten. Es scheint so, daß der Lichtreiz auf die Aktivphase aktivierenden Einfluß hat und auf diesen verlängernd wirkt.

Wie in Tabelle 3.7.2. zu sehen ist, erhöht sich die Dauer der ausgeführten Schwimmstöße fast auf das doppelte. Schwimmstöße, die ca. 20 Sekunden nach dem Lichtreiz ausgelöst werden, dauern durchschnittlich ca. fünf Sekunden, spontan ausgelöste dagegen ca. drei Sekunden.

Tabelle 3.7.2. Abhängigkeit von den Aktivphasen, die auf eine hellstimulierte Passivphase folgen.

Spontan		mit Lichtreiz			
tP (s)	S (mm)	N	tP (s)	s (mm)	n
1—10	3,2	43	-	-	-
11—20	3,4	38	11--20	4,5	25
21—30	3,1	41	21--30	5,2	21
31—40	2,9	35	31--40	5,1	24
41—50	2,8	31	41--50	4,7	19
51—60	2,6	35	51--60	3,9	23
61—70	2,1	25	61--70	3,1	20

Tab. 3.7.2. zeigt links die Länge von spontanen Passivphasen und die ihnen folgenden Aktivphasen. Auf der rechten Seite der Tabelle wurden die Cercarien in der Passivphase mit einem Lichtreiz stimuliert. Die folgenden Aktivphasen dauerten deutlich länger als die Aktivphasen ohne Stimulation in der Passivphase.

3.8. Verhalten einer größeren Cercarienpopulation

Bei der reizphysiologischen Untersuchung von Cercarien bisher unbeachtet blieb die Tatsache, daß in der Natur keine einzelne Cercarie einen Endwirt finden „möchte“, sondern viele. Da sich gleichzeitig viele Cercarien im Wasser befinden, ist die Rolle der einzelnen Cercarie abgestimmt auf das Verhalten der gesamten Gruppe. Daß es zu einer Infektion kommt ist abhängig von der Dichte an Cercarien an dem Ort, an dem sich der potentielle Endwirt, der Mensch, aufhält.

Technisch ist es schwierig, das Verhalten mehrerer Cercarien gleichzeitig zu untersuchen. Aufgrund der Größe der Cercarie ist eine direkte Beobachtung nur mit Hilfe eines Mikroskops möglich. Will man mehrere gleichzeitig beobachten, muß die Vergrößerung reduziert werden, so daß die einzelne Cercarie kaum mehr erkennbar ist.

Aus den bisherigen Ergebnissen lässt sich erkennen, daß sich die Cercarie nicht immer an der Oberfläche befindet. Da eine einzelne Cercarie beschränkte Energiereserven hat und durchschnittlich ca. 24 Stunden lebt, kann sie sich nicht immer an der Wasseroberfläche aufhalten.

In Abb. 3.8.1. wurde als Beispiel grafisch das Bewegungsmuster einer Cercarie aufgezeichnet. Anhand der Meßergebnisse lässt sich rechnerisch ermitteln, zu welchem Zeitpunkt die Cercarie an welchem Ort ist. Verbindet man diese Punkte in einer grafischen Darstellung, entsteht das so dargestellte Bewegungsmuster. Legt man mehrere solcher Bewegungsmuster übereinander wie in Abb. 3.8.2. erkennt man, daß sich besonders in der Mitte der Küvette relative viele Bewegungslinien der Cercarien treffen. Wenn man die Zeitachse zum Vergleich heran zieht, stellt man fest, daß in der ersten Stunde der beobachteten Tageszeit die Dichte an Cercarien in der Mitte, am Boden wie auch an der Oberfläche relativ konstant ist.

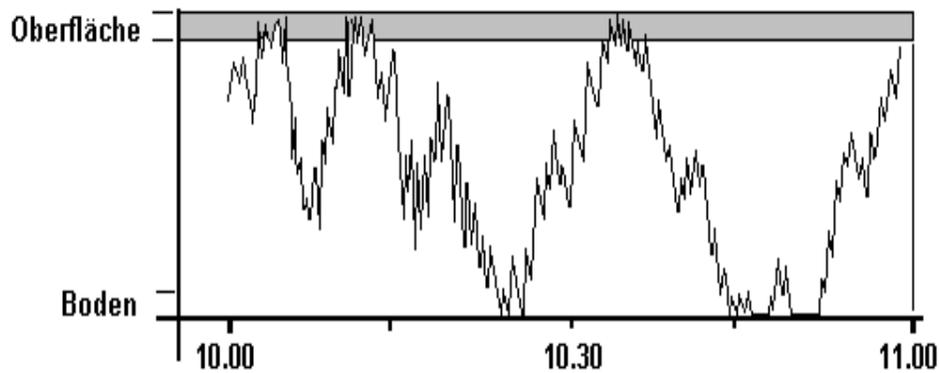


Abb. 3.8.1. zeigt die grafische Aufzeichnung des Bewegungsmusters einer Cercarie. Es entwickelt sich ein Ort-Zeit-Diagramm.

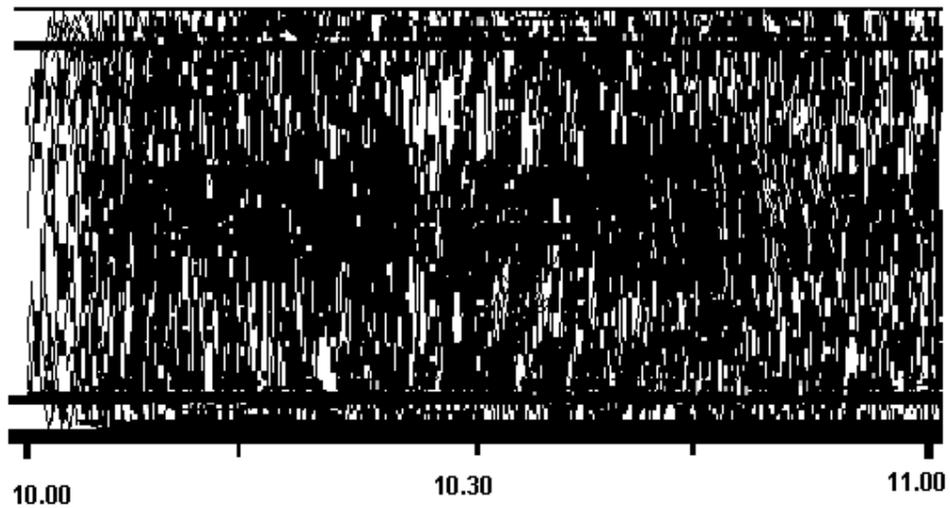


Abb. 3.8.2. Bewegungsmuster mehrerer Cercarien

Die Abbildung zeigt die grafische Überlagerung der von 35 verschiedenen Cercarien gewonnenen Daten. Die Daten wurden in der Tageszeit von 10.00 – 11.00 Uhr gewonnen. Es fällt auf, daß die Dichte an Cercarien besonders in der Mitte der Küvette relativ hoch ist. Über die gesamte Zeit verteilt befinden sich jedoch an allen Orten Cercarien.

4.0. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte durch reizphysiologische Untersuchung an Cercarien von *Schistosoma mansoni* die Beeinflussbarkeit des Verhaltens von Cercarien durch äußere Faktoren untersucht werden.

4.1. Diskussion der Methode in der Literaturübersicht

Von Haas [(12),(13)] wurde an Cercarien von *Diplostomum spathaceum*, eine in Augen von Süßwasserfischen parasitierende Trematodenart, reizphysiologische Untersuchungen vorgenommen. Er untersuchte die Cercarien unter verschiedenen Umgebungsbedingungen und fand heraus, daß die Aktivität von Cercarien sowohl von der Wassertemperatur, der Lichtwellenlänge als auch der Lichtstärke abhängig ist. Haas entwarf ein Funktionsmodell, das die Zusammenhänge zwischen äußeren Reizen und den inneren Auslösemechanismen darstellte. In diesem Modell forderte Haas, daß die Steuerung der Passivphase und die Stimulation der Aktivphase von zwei verschiedenen unabhängigen Mechanismen gesteuert werden. Beide Mechanismen lassen sich zwar durch äußere Reize beeinflussen, die Steuerung der verschiedenen Aktivitätszustände werde aber von endogenen Faktoren übernommen. In den folgenden Jahren verfeinerte Haas in weiteren Versuchen dieses Modell. Dieses Funktionsmodell konnten wir mit unseren Versuchen z.T. bestätigen.

Saladin [(29),(30)] untersuchte Cercarien von *Schistosoma mansoni*. Dabei stellte er fest, daß Cercarien bei 500 nm Licht ihre größte Aktivität zeigen. Mit Hilfe von Dunkel- und Hellstimulationen untersuchte Saladin die Aktiv- und Passivphase und deren Abhängigkeit voneinander. Er erkannte, daß Cercarien auf Reizstimulation in diesen Phasen mit einer Verhaltensänderung in den folgenden Bewegungs- und Passivphasen reagieren können. In den vergangenen Jahren wurden die Diskussionen über die physiologischen Grundlagen der Cercarien verstärkt auf die molekularbiologische Ebene verlagert. Damit versucht man, die

molekularen Strukturen der Reiz- und Bewegungsbiologie von Cercarien zu entschlüsseln.

4.2. Materialien und Methode

4.2.1. Auswahl der Versuchstiere

Zur Durchführung der Versuchsreihen wurden Cercarien von *Schistosoma mansoni* verwendet. Mit der selben Cercarienart arbeitete auch Saladin (1979), und Schorp (1988). Diese Cercarien lassen sich problemlos gewinnen und spielen aus medizinischer Sicht im Infektionszyklus der Schistosomiasis eine bedeutende Rolle.

Haas (12) benutzte für die Arbeit, deren Ergebnis ich zum Vergleich heranziehe, Cercarien von *Diplostomum spathaceum*. Wie Haas (12) belegte, ist das Verhalten von *Schistosoma mansoni* und *Diplostomum spathaceum* in einzelnen Details verschieden. Er zeigte, daß Cercarien der unterschiedlichen Arten z.T. verschieden auf gleiche mechanische, optische und umweltbedingte Reize reagieren. Der Grund könnte darin liegen, daß *Schistosoma mansoni* und *Diplostomum spathaceum* unterschiedliche Endwirte haben. *Schistosoma mansoni* penetriert die Haut von Menschen oder Tieren, während *Diplostomum spathaceum* als Endwirt die Augenlinsen von Fischen hat.

Aufgrund ihrer Verwandtschaft, des ähnlichen biologischen Aufbaues, und des Interesses der reizphysiologischen Verhaltensänderungen eignen sich dennoch beide Cercarienarten zum Vergleich.

4.2.2. Das Beobachtungssystem

Die Beobachtung des Verhaltens von Cercarien stellt aufgrund der Größe von nur 15 µm Länge ein Problem dar.

Nur mit Hilfe von Mikroskopen ist es möglich, Cercarien direkt zu beobachten um ihr Verhalten interpretieren zu können. Mit der reinen optischen Beobachtung, ist

es aber nicht möglich, genaue Daten über das Verhalten von Cercarien und deren Reaktionen auf sich ändernde Umgebungsbedingungen zu erheben, da diese zu Ungenauigkeiten beim Messen der zu ermittelnden Daten führt. Daher mußte ein System entwickelt werden, bei dem man die Bewegungen über einen längeren Zeitraum aufzeichnen kann, um objektive Meßergebnisse zum Verhalten der Cercarien zu gewinnen.

Mit der Einführung des Personal Computers wurde es möglich, die Untersuchungsmethode zu präzisieren, indem für die Zeitmessung sowie die Verarbeitung der anfallenden großen Datenmengen ein Computer verwendet wurde.

Schorp entwarf 1988-1991 einen Versuchsaufbau, mit der es gestattete, die Beobachtung und Aufzeichnung mit Hilfe eines Computers zu automatisieren und unabhängig von Handmeßmethoden zu machen. Dadurch gelang es, Cercarien über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Dies ist besonders wichtig, da die Reaktionen der Cercarien auch von ihrem Alter abhängig sind.

In dem von Schorp entworfenen Versuchsaufbau wurde ein Operationsmikroskop integriert, mit dem die Cercarie direkt beobachtet werden kann. Die gleichzeitig gewonnenen Daten konnten sofort von einem Computer gespeichert und zur späteren Weiterarbeit aufbewahrt werden.

In einigen Fällen kommt es vor, daß die Meßeinrichtung eine Cercarie verliert oder durch Staubpartikel im Wasserkreislauf irritiert wird. Um diesen Fehler bei der späteren Datenverarbeitung zu erkennen, wurde zusätzlich eine mitlaufende Videoaufzeichnung eingerichtet. So lassen sich nachträglich Fehlaufzeichnungen erkennen und aus der Bewertung ausschließen.

Mit dem entwickelten Beobachtungssystem ist es möglich, äußerst exakt über einen langen Zeitraum automatisiert Cercarien unter den unterschiedlichsten Bedingungen zu beobachten und Erkenntnisse über Verhaltensänderung zu gewinnen.

4.2.3. Versuchsgefäß

Während des Versuches befindet sich die Cercarie in einer seitlich abgedunkelten Küvette, deren Innenmaß die Größe von 1 cm x 1 cm x 4 cm hat.

Die Küvette ist von einem Gefäß umgeben, das zur Erwärmung und konstanten Erhaltung der Wassertemperatur dient. Um Kratzer bei der Reinigung zu vermeiden, die die Meßreinrichtung stören könnte, bestehen die Wände des Gefäßes in der Ebene der Beobachtung aus Glas. Zum Reinigen der Küvette wird destilliertes Wasser verwendet, damit Ablagerungen vermieden werden und es zu keiner Beeinträchtigung der Cercarie durch Spurenelemente kommt.

Um Ablagerungen oder Schmutzauflagerungen, die in Ausnahmefällen auftreten, zu beseitigen, wurde in geringen Mengen ein Reinigungsmittel verwendet. Nach solchen Reinigungsvorgängen wurde mindestens 5 mal mit destilliertem Wasser gespült. Dies ist erforderlich, damit es zu keinen toxischen Einwirkungen auf die Cercarie kommt. Somit hat die Cercarie nach dem Schlüpfen nur Kontakt mit dem Versuchsmedium.

Bei Haas (12) kam als Versuchsgefäß eine Küvette aus Plexiglas mit den Innenmaßen 2 cm x 2 cm x 35 cm zum Einsatz. Die Höhe von 35 cm entspricht etwa dem Uferbereich von Flüssen und Seen, der hauptsächlich bevorzugten Infektionsregion der Schistosomen.

Wegen der eingeschränkten Bewegungsfreiheit der Beobachtungseinheit mußten wir jedoch eine kleine Küvette mit der Höhe von 4 cm verwenden. Bei der Beurteilung unserer gewonnenen Daten könnte diese geringe Innenraumhöhe als Nachteil angesehen werden. Dieser Nachteil wurde allerdings in Kauf genommen, um den Vorteil der exakten Messung der Daten verwirklichen zu können.

4.2.4. Versuchsmedium und Versuchstemperatur

Cercarien sind nur beschränkt in der Lage, während ihrer gesamten Lebensdauer Nahrung aufzunehmen. Die Untersuchungen von Lawson (1977) zeigten, daß

Cercarien zwischen 5-14 ng Glycogen für ihre Bewegungsaktivität zur Verfügung steht. Die variable Ausstattung mit Glycogen könnte mit ein Grund für die unterschiedlichen Überlebenszeiten sein.

Als Versuchsmedium wurde eine Mischung von einem Teil Leitungswasser und einem Teil destillierten Wassers verwendet, das in Vorversuchen auch von Schorp verwendet wurde.

Da in diesem Medium auch die Schnecken gehalten werden, entsteht kein zusätzlicher Störfaktor durch ein Wechsel des Versuchsmediums. Nachteil dieses Mediums ist, daß die Überlebensrate und die Überlebenszeit geringer ausfällt als mit dem Alternativmedium BSS.

Wie die Ergebnisse zeigen, ist es notwendig, die Versuchstemperatur konstant zu halten. Die Cercarien reagieren sonst mit einer Verhaltensänderung und es kann z.T. zu höheren Absterberaten kommen.

Die Beobachtungsküvette wird von einem Wasserbad umgeben, das über Verbindungsschläuche an einem großen Gefäß angeschlossen ist. Dort wird das Wasser erwärmt und mit einem Thermostat auf einer konstanten Temperatur gehalten. Eine Pumpe lässt das Wasser zirkulieren, so daß in dem Kreislauf eine konstante Temperatur herrscht.

Mit dem Einrichten eines Wärmekreislaufes und der exakten Temperierung der Beobachtungsküvette wurde dem Rechnung getragen, daß Cercarien äußerst sensibel auf die Umgebungstemperatur reagieren.

4.2.5. Beleuchtungsanlage und Versuchsraum

Zur Lichtsimulation kam eine 2000-W-Xenonlampe (Osram) zum Einsatz, die Licht emittiert, das in seinem Spektrum dem Tageslicht ähnlich ist. Damit sollte erreicht werden, daß die Cercarien möglichst natürlichen Bedingungen unterworfen werden. Nach einer Einbrenndauer von etwa 15 min. liefert die Lampe eine konstante Lichtintensität.

Der Versuchsaufbau war von 1994 bis 2002 in zwei Räumen im Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München im Klinikum Rechts der

Isar untergebracht. Die räumliche Trennung der Xenonlampe von der Beobachtungseinheit machte es möglich, die Beeinflussung durch die abgestrahlte Wärme der Lampe zu minimieren. Mit Hilfe eines Ableitungsrohres nach außen und eines in dem Lampengehäuse integrierten Lüfters war es möglich, die Wärme zu reduzieren. Dennoch konnte es in dem Raum, in dem sich die Xenonlampe befand, bis zu 30° warm werden. Die Temperaturen im Raum, in dem sich die Küvette befand, waren dagegen relativ konstant, da es darin kein Fenster gab. Die Außentemperaturen spielen somit keine Rolle und es war möglich, den Beobachtungsraum komplett von außen zu schließen. So wurde auch vermieden, daß Streulicht auf die Küvette fällt.

Durch diese Anordnung wurde eine deutliche Verbesserung des Versuchsaufbaues im Vergleich zu Schorp (1988) erreicht.

4.3. Gewinnung von Cercarien

Zur Gewinnung von Cercarien wurden die Schnecken mit ca. 10 Miracidien infiziert. Dies hat den Nachteil, daß es sich nach der Infektion der Schnecke nicht um isogenetische Cercarien handelt. Der Vorteil dagegen ist, daß die Infektionswahrscheinlichkeit der Schnecken deutlich größer ist, so daß pro Infektionszyklus mehr Schnecken für die Cercariengewinnung zur Verfügung stehen.

Die in einem abgeschlossenen Raum in Aquarien gehaltenen Schnecken werden einem Nachtrhythmus von ca. 12 Stunden unterworfen, d.h. daß um 18.00 Uhr die Beleuchtung abgeschaltet und um 6.00 Uhr angeschaltet wird. Der optimale Zeitpunkt, an dem am meisten Cercarien aus den Schnecken schlüpfen, ist zwischen 10.00 – 11.00 Uhr. Die für die Versuchsreihe ausgewählte Schnecke wurde markiert, um immer wieder Cercarien der gleichen Schnecke zu verwenden.

Die Versuche wurden um 10.00 Uhr Tageszeit begonnen. Ca. 30 Minuten vorher wurde die markierte Schnecke mit einer Pinzette aus dem Aquarium in eine Petrischale gesetzt. In der Petrischale befand sich das Medium aus ein Teil auf ca. 25° C vorgewärmtes Leitungswasser und ein Teil destilliertes Wasser.

Nach kurzer Zeit schlüpfen aus der infizierten Schnecke die Cercarien. Unter Beobachtung durch ein Mikroskop wurde mit Hilfe einer Pipette versucht, eine einzelne Cercarie zu gewinnen. Durch die am Anfang des Schlüpfens starke Eigenbewegung nahm dies oft einige Minuten in Anspruch. Die gefangenen Cercarie wurde daraufhin in die Beobachtungsküvette übertragen.

4.4. Regelung und Messung der Lichtintensität

Die Lichtintensität wurde durch einen Einschub von ND-Filtern von der Firma Balzers (jetzt Unaxis Optics, Geisenheim) in eine Filterschublade direkt über der Küvette geregelt. Diese vermindern die Lichtintensität gleichmäßig über einen Wellenlängenbereich von 350 -1500 nm.

Die verwendeten Filter sind Reflexionsfilter. Auf das Trägermaterial (Normalglas bei einer Wellenlänge von 380-800nm, Quarzglas im UV-Bereich) sind Metallschichten aufgedampft, die das auftretenden Licht teilweise reflektieren.

Zur Lichtintensitätsmessung wurde das Luxmeter Mavolux 5032C der Firma Gossen (Nürnberg) benutzt, das mit einem Lichtdichtevorsatz ausgestattet war, um die Lichtstärke in Candela zu messen.

Die Messung der Lichtstärke wurde direkt unter dem Austritt des Lichtes gemessen, an der Stelle, an der auch das Licht auf die Küvette trifft.

4.5. Diskussion der Messergebnisse

4.5.1. Ermittlung des Aktivitätsmaximums

Saladin [(12),(13)] bewies, daß Cercarien von *Schistosoma mansoni* bei 500 nm Lichtwellenlänge ein ausgeprägtes Aktivitätsmaximum besitzen.

Um Vergleichsdaten für die Durchführung der Stimulationsversuche zu erhalten, wurde von uns das Aktivitätsspektrum von Cercarien von *Schistosoma mansoni* mit unserer Versuchsanordnung nochmals bestimmt.

In der Aktivphase führt die Cercarie einen Schwimmstoß aus, der sie in der Regel an die Wasseroberfläche bringt. Die Länge der Aktivphase und die Anzahl der ausgeführten Schwimmstöße ist ein direktes Maß zur Feststellung des Erregungszustandes in der Aktivphase.

Diese beiden Parameter wurden in 20 Schneckeninfektionsphasen (ca. 1 ½ Jahre) mit insgesamt ca. 350 Cercarien unter den verschiedensten Bedingungen gemessen. Dabei wurde das Verhalten der Cercarien bei veränderter Lichtwellenlänge und Lichtstärke, untersucht und eine optimale Kombination von beiden ermittelt.

Es zeigte sich, daß die Cercarien bei 500 nm Lichtwellenlänge und 10000 Cd Lichtstärke am häufigsten eine Aktivphase ausbildeten und die Aktivphase dort am längsten waren. Gleichzeitig war bei der Lichtwellenlänge - Lichtstärkekombination die absolute Anzahl an Passivphasen am geringsten.

Insgesamt bestätigten sich die Ergebnisse Saladins anhand einer großen Population von Cercarien.

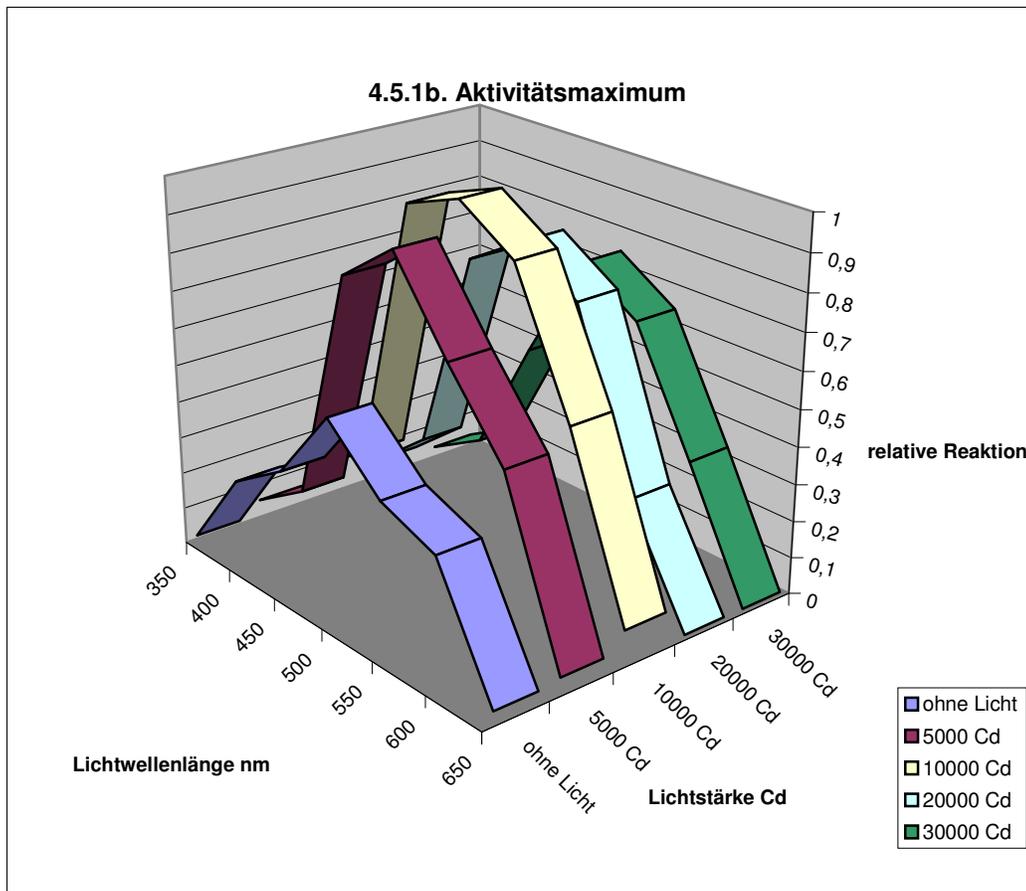


Abb. 4.5.1b. Aktivitätsmaximum

Kombiniert man die zwei veränderten äußeren Umweltfaktoren Lichtwellenlänge und Lichtstärke mit der relativ gemessenen Reaktion der ausgeführten Bewegung, so ergibt sich bei 500 nm und 10000 Cd die stärkste relative Reaktion der Cercarie

4.5.2. Rhodopsin als Grundlage der lichtinduzierten Signalübertragung bei *Schistosoma mansoni*

Rhodopsine besitzen Absorptionsmaxima von 450 – 550 nm, während ihre Zerfallsprodukte ein Absorptionsmaxima von ca. 380 nm für Retinal und ca. 290 nm für Opsin haben (14).

In Wasser verändert sich der Wellenanteil des einstrahlenden Sonnenlichtes in Abhängigkeit von der Tiefe des Gewässers. Bis ca. 10 Meter Wassertiefe lässt sich bei 500 nm die höchste Lichtintensität messen. Mit zunehmender Tiefe engt sich der Wellenbereich auf 475 nm ein, da Wasser als Blaufilter wirkt. Zudem verringert sich die Lichtintensität deutlich.

Bei Fischen, die ihren Lebensraum nur in geringer Tiefe (bis ca. 50 m) haben, konnten ebenso Absorptionsmaxima um 500 nm nachgewiesen werden (14). Diese Eigenschaft ist zusätzlich sehr variabel. Durch geringe Veränderungen der Aminosäuresequenz des Rhodopsins sind z.B. Flussaale, die zum Laichen bis zu 400 m ins Meer hinabsteigen, in der Lage, ihre Sehempfindlichkeit der Tiefe anzupassen. Dadurch verändert sich ihr Absorptionsmaximum von 502 nm im Fluß auf 480 nm im Meer. Dies zeigt, daß auch die Absorptionsmaxima eine exakte Zuordnung zur molekularen Grundstruktur der lichtverarbeitenden molekularen Grundstrukturen zulässt. Bei bisher untersuchten Arten konnte man Rhodopsin als das weit verbreitetste Strukturprotein identifizieren.

Mit unseren lichtreizphysiologischen Untersuchungen konnten wir als optimales Absorptionsmaximum von Cercarien von *S. mansoni* die Lichtwellenlänge von 500 nm ermitteln. Arten, die im gleichen Lebensraum unter gleichen Bedingungen leben, haben Rhodopsin als lichtverarbeitendes Protein. Aufgrund der Verteilung des Aktivitätsspektrums lässt dies den Schluß zu, daß bei Cercarien von *Schistosoma mansoni* Rhodopsin als grundlegendes Strukturprotein der Lichtreizverarbeitung dient.

Mittels molekular-biologischer Methodik konnte Hofmann diese Aussage belegen (15).

4.5.3. Funktionsmodell des Schwimmverhaltens

a) Funktionsmodell des spontanen Schwimmverhaltens

Die Cercarie besitzt zwei Aktivitätszustände. In der Passivphase lässt sie sich von der Schwerkraft auf den Boden ziehen, in der Aktivphase schwimmt sie aktiv an die Wasseroberfläche. Dies bedeutet, daß die Cercarie mit der Auslösung einer Passivphase sich gezielt weg von der Wasseroberfläche bewegt, während ein Schwimmstoß die Cercarie gezielt an die Wasseroberfläche bringt.

Bei unseren Untersuchungen interessierte uns besonders, welche Steuermechanismen die Länge der beiden Aktivitätszustände regeln und somit das Verhalten der Cercarie in bezug auf ihren Aufenthaltsort im Wasser, wie diese Verhaltensmuster von außen veränderbar sind und wie sich gegenseitig beeinflussen.

Zunächst muß geklärt werden, ob die zwei Aktivitätszustände von einem oder zwei Steuermechanismen geregelt werden.

Die von Haas an *Diplostomum spathaceum* aufgezeigten Steuermechanismen der Aktivitätszustände konnten bei Cercarien von *S.mansoni* z.T. bestätigt werden.

Aus den Meßergebnisse zeigt sich, daß zwei getrennte Mechanismen die Aktivitätszustände steuern. Dies ergibt sich aus der Beobachtung, daß die Länge eines spontanen Schwimmstoßes, der auf eine P-Phase folgt, zunächst unabhängig von der Länge der P-Phase ist. Ebenso ist die Länge der P-Phase unabhängig von der Länge der A-Phase. Weiter konnten wir ermitteln, daß eine Reizgabe in der einem Aktivitätszustand zu unterschiedlichen Folgen im anderen Zustand führt. Die Gabe eines Lichtreizes in der P-Phase führt z.B. nicht nur zu einer Verlängerung der P-Phase, sondern auch zu einer Verlängerung der A-Phase. Wird die Cercarie mit einem Dunkelreiz in der P-Phase stimuliert, konnten wir dagegen keinen signifikanten Effekt in der A-Phase feststellen. Die unterschiedlichen Reaktionsmuster belegen, daß beide Aktivitätszustände jeweils eigene Steuermechanismen besitzen.

Um die Beeinflussung der Bewegungsphasen aufeinander feststellen zu können, überprüften wir zunächst das Verhalten der Cercarie ohne äußere Reizgabe. Aktiv- und Passivphase sind im ständigen Wechsel miteinander. Wird ein Schwimmstoß beendet, folgt sofort im Anschluß eine P-Phase und umgekehrt. Wir überprüften in unseren Versuchen, wie sich die Längen und die Anzahl der Bewegungsphasen aufeinander auswirken, um zu sehen, welche Abhängigkeiten zwischen den beiden Steuermechanismen bestehen. Es zeigte sich, daß die Länge und Anzahl der A-Phase nur bedingt von der Länge und Anzahl der P-Phase abhängig ist. So konnten wir feststellen, daß sich die P-Phasen bei der optimalen Lichtwellenlängen-Lichtstärkenkombination im Vergleich zu einer schlechteren Kombination deutlich verringern, so daß absolut gesehen die Anzahl der A-Phasen zunahm. In der optimalen Lichtwellenlänge-Lichtstärkenkombination nahm dagegen die Länge der A-Phase nur geringfügig zu.

Wie lang die einzelnen Aktivitätszustände im spontanen, ungereizten Zustand ausfallen, ist abhängig vom Erregungspotential der Cercarie, das unmittelbar auf die äußere Umgebungsbedingungen reagiert. Mit dem Fortgang der P-Phase erhöht sich das Erregungspotential. Ist die Reizschwelle erreicht und wird sie überschritten, wird ein Schwimmstoß ausgelöst. Im konkreten Fall heißt das, daß der Steuermechanismus der P-Phase die P-Phase abbricht und den Steuermechanismus der A-Phase veranlaßt, einen Schwimmstoß auszuführen. Das Auslösen eines Schwimmstoßes wird also direkt vom Steuermechanismus der P-Phase übernommen.

Wie lang die folgende A-Phase anhält, wird von vom Steuermechanismus der A-Phase geregelt. Dieser wird ebenso über den Erregungszustand der Cercarie gesteuert. Wird eine bestimmte Schwelle erreicht, wird die A-Phase abgebrochen und automatisch wieder mit der P-Phase begonnen, die Cercarie beginnt abzusinken. Die Reizschwelle des Steuermechanismus der A-Phase scheint insgesamt weniger von äußeren Umweltbedingungen beeinflussbar zu sein, sondern ist vielmehr vom Alter der Cercarie abhängig. Je älter eine Cercarie wird, desto kürzer fallen die A-Phasen aus, unabhängig von äußeren Bedingungen.

Die Beeinflussung durch die äußere Umgebungsbedingungen adaptiert beide Steuermechanismen. Wird die Lichtwellenlänge erhöht, reduziert sich die Reizschwelle der P-Phase, so daß das Erregungspotential, das zum Abbruch der P-Phase erreicht werden muß, geringer ausfällt und der Schwimmstoß früher ausgelöst werden kann.

Weiterhin zeigt sich, daß die auf eine A-Phase folgende P-Phase in ihrer Länge unabhängig von der Länge der A-Phase ist. Dies bestätigt die Annahme, daß sowohl die A-Phase wie auch die P-Phase über eigene Steuermechanismen verfügen.

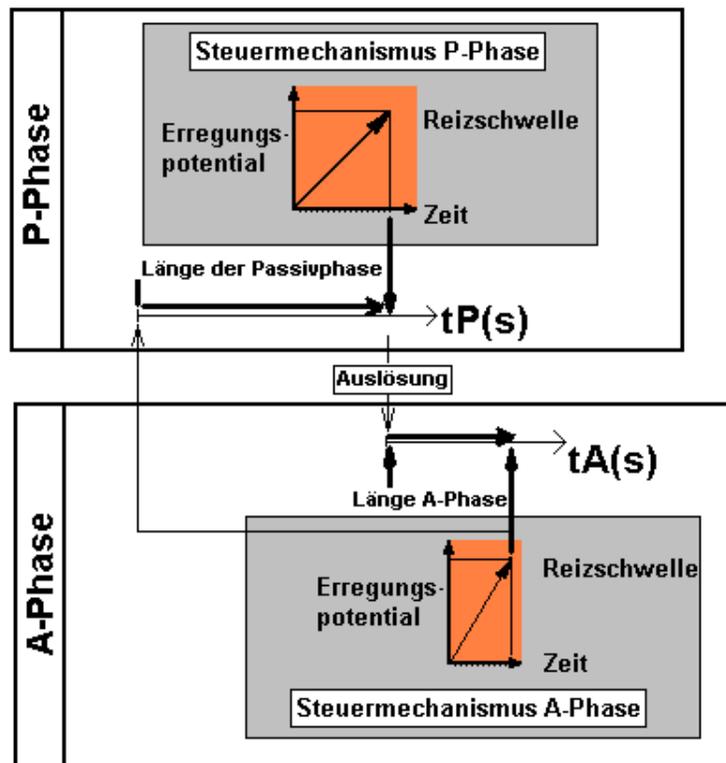


Abb. 4.5.2a. Zusammenhang zwischen $t_P(s)$ [Länge Passivphase], der Auslösung von der A-Phase und $t_A(s)$ [Länge Aktivphase] ohne äußere Reizgabe.

Die Länge von der P-Phase ist abhängig vom Erregungspotential. Wird die Auslöseschwelle überschritten, wird die P-Phase unterbrochen und es kommt zur Auslösung eines Schwimmstoßes. Der Aktivitätszustand geht somit in die A-Phase über. Die Länge der A-Phase ist aber unabhängig von der Länge der P-Phase. Der eigenständige Steuermechanismus der A-Phase reguliert die Länge der A-Phase. Wird diese unterbrochen, folgt wieder die P-Phase.

b) Funktionsmodell des Schwimmverhaltens bei äußerer Reizgabe

Um die weiteren Zusammenhänge zwischen den beiden Steuerungsmechanismen aufzuzeigen, wurden in den verschiedenen Zustandsphasen Stimulationen durchgeführt. Die Reaktion der Cercarie auf die Gabe von äußeren Reizen war zum Teil abhängig vom Fortgang der untersuchten Zustandsphase. So wurden z.B. Stimulationen in der Frühphase einer Passivphase gar nicht, in der Spätphase mit einem Abbruch beantwortet.

Diese Beobachtungen stützen die These, daß die einzelnen Steuerungsmechanismen vom endogenen Erregungszustand der Cercarie abhängig sind. Die exogene Stimulation können diesen nur partiell beeinflussen.

Um diesen Zusammenhang genauer zu untersuchen, wurden Cercarien in der P-Phase mit einem Dunkelreiz stimuliert. Es zeigte sich, daß die Cercarie fast nie mit einem Abbruch reagierte, wenn der Stimulus zu einem Zeitpunkt in der P-Phase gegeben wurde, in der die P-Phase noch relativ kurz voran geschritten ist. Dauern die P-Phasen dagegen länger an, erhöht sich das Erregungspotential und gleichzeitig auch die Wahrscheinlichkeit, daß die Cercarie mit einem Abbruch der P-Phase reagiert und einen aktiven Schwimmstoß auslöst (Abb. 4.5.2b.). In Kapitel 3.7.1. wurde gezeigt, daß der folgende, ausgelöste Schwimmstoß dann allerdings kürzer ausfällt als spontan ausgelöste Schwimmstöße. Es findet also eine Hemmung von (S) A-Phase statt.

Je höher also das Erregungspotential der Cercarie ist, umso früher reagiert sie in der P-Phase mit einem Abbruch und löst einen Schwimmstoß aus.

Gibt man in der P-Phase einen Lichtreiz, wird die P-Phase verlängert, d.h. daß der folgende Schwimmstoß verzögert ausgelöst wird. Ein Lichtreiz, der in der P-Phase gegeben wurde, hemmt somit den Steuermechanismus der P-Phase.

In der Folge fördert er die Ausprägung der A-Phase, indem die Länge dieser deutlich zunimmt. Wie in Kapitel 3.7.2. nachgewiesen wurde, wird somit der Steuermechanismus der A-Phase von einem Lichtreiz aktiviert, der in der Passivphase appliziert wurde.

Werden Cercarien in der Aktivphase mit einem Dunkelreiz stimuliert, zeigen sich auch hier je nach Erregungszustand unterschiedliche Reaktionen.

Gibt man in kurz andauernde A-Phasen Dunkelreize, so bricht die Cercarie den Bewegungsstoß überproportional häufig ab. Bei A-Phasen, die länger anhalten, reagieren Cercarien dagegen fast gar nicht mit einer Verhaltensänderung. Auch zeigt sich, daß die Reaktion auf den Dunkelreiz in der A-Phase abhängig vom Erregungszustand der Cercarie ist (Abb. 4.5.3c.).

Bei Gabe von Lichtreizen in der Aktivphase ermittelten wir nur eine geringe Reaktion der Cercarien (Kapitel 3.6.4.). Im Vergleich zu spontan durchgeführten Schwimmstößen, die nicht stimuliert wurden, brachen nur wenige stimulierte Cercarien ihren Schwimmstoß ab.

Eine Aktivierung vom Steuermechanismus der A-Phase konnte auch nicht eindeutig festgestellt werden. Die nicht unterbrochenen Schwimmstöße wurden nach der Reizgabe nur unwesentlich verlängert.

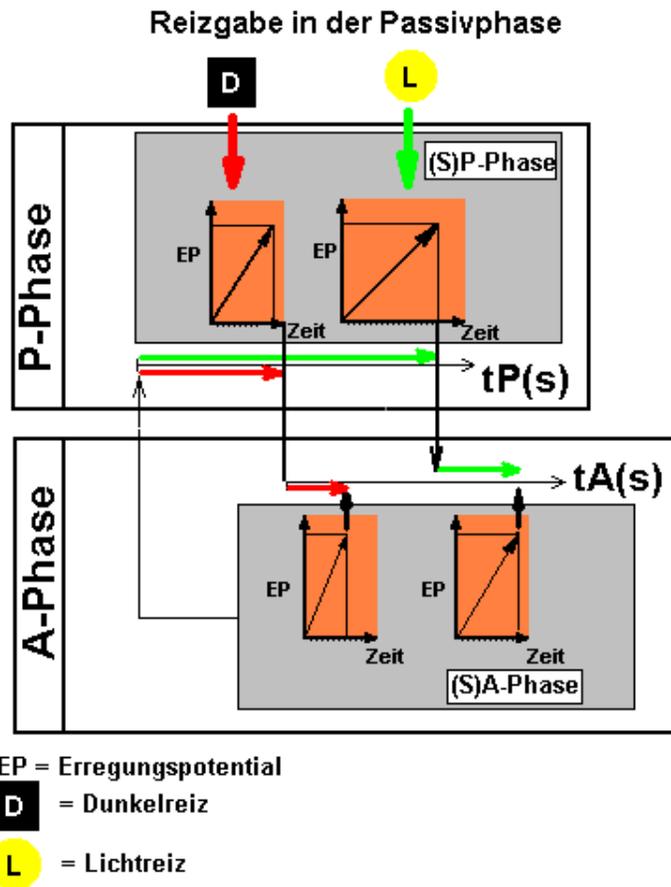


Abb. 4.5.2b. Funktionsmodell der gegenseitigen Beeinflussung bei Reizgabe in der Passivphase.

Die Versuche haben gezeigt, daß ein Dunkelreiz in der Passivphase diese verkürzt. D.h., der folgende Schwimmstoß wird früher ausgelöst, als ohne Dunkelreiz. Die folgende A-Phase wird ebenso kürzer ausgelöst, allerdings ist dieser Effekt geringer ausgeprägt, als bei der P-Phase. Wird in der P-Phase ein Lichtreiz appliziert, so wirkt dieser verlängernd. Die folgende A-Phase wird dabei auch verlängert.

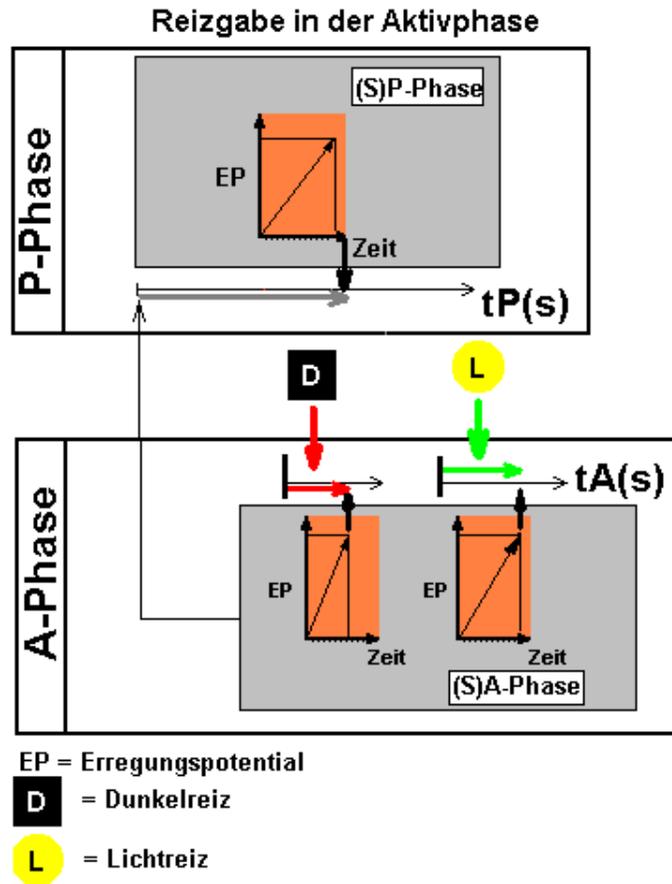


Abb. 4.5.2c. Funktionsmodell der gegenseitigen Beeinflussung bei Reizgabe in der Aktivphase

Gibt man in der A-Phase einen Dunkelreiz, so verkürzt sich diese. Wird ein Lichtreiz gegeben, so wird die A-Phase verlängert. Insgesamt ist die Reaktion der Cercarie auf Reizgabe in der A-Phase deutlich geringer als die in der P-Phase. In der folgenden P-Phase konnten wir keinen meßbaren Effekt auf die Länge der dann ausgeführten P-Phase feststellen.

4.5.4. Cercarieneigene Rhythmik

Wie in Kapitel 3.1. und 3.2. bei der Ermittlung der Spontanaktivität von Cercarien bei dauerhafter Bestrahlung zu sehen ist, zeigen Cercarien von *S.mansoni* in einer Tageszeit von ca. 23.00 – 4.00 Uhr keine Aktivität. Dies lässt sich sowohl an Cercarien derselben als auch von verschiedenen Schnecken eindeutig beobachten.

Vor dem Schlüpfen der Cercarien wurden die Schnecken in Anpassung an einen möglichst identischen Tag-Nachtrhythmus mit einer Hell-Dunkelrhythmik (von 6.00- 18.00 Uhr hell, 18.00 – 6.00 dunkel) mit Licht bestrahlt.

Offensichtlich sind die Cercarien also in der Lage, diesen Tag-Nachtrhythmus zu speichern und sich auch nach dem Schlüpfen an dieses Schemata zu orientieren.

Dieses Verhalten ist durchaus sinnvoll, weil damit zu rechnen ist, daß sich der Tag-Nachtrhythmus in freier Umgebung nach dem Schlüpfen fortsetzt und in der Nacht deutlich weniger Endwirte im Wasser anzutreffen sind als tagsüber. Ebenso dient die Nachtphase als Ruhephase und Vorbereitung zu einem erneuten Ausschwärmen am folgenden Tag.

4.5.5. Biologische Interpretation des Verhaltens

Bei der Überlegung, welche Reaktionen Cercarien durch äußere Reizgabe zeigen, sollte auch berücksichtigt werden, an welchem Ort sich die Cercarie bei der Reizung aufhält und wohin sie sich mit welcher Bewegungsstärke bewegt.

Aus Kapitel 3.4.2 und 3.5.2 ergibt sich, daß sich die Cercarien mit zunehmender Lichtintensität vermehrt an der Wasseroberfläche und vermindert am Wasserboden aufhalten.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Saladin (1979), der Cercarien von *Schistosoma mansoni* unter direktem Sonnenlicht beobachtete und feststellte, daß diese sich bei vermehrtem Sonnenlicht am Boden seines Beobachtungsgefäßes ansammeln. Dies wurde als Schutzmechanismus vor zu hoher UV-Strahlung gedeutet.

Möglicherweise spielt bei unseren Ergebnissen der monochrome Charakter des Lichts eine Rolle, das von der verwendeten Xenonlampe abgestrahlt wird. Reines Sonnenlicht sendet dagegen ein größeres Spektrum ab, welches vermehrt UV-Anteil enthält. Eine Erklärung, daß sich die Cercarien bei zunehmender Lichtstärke vermehrt an der Oberfläche aufhalten wäre die, daß sich dann die Wahrscheinlichkeit erhöht, einen Endwirt zu finden, der sich häufiger bei Tage im Wasser befindet.

Ziel der Cercarie ist es, möglichst schnell einen Endwirt zu finden. Um dieses Ziel zu erreichen, muß sie ökonomisch ihren begrenzten Energievorrat einteilen und ihr Verhalten optimieren. Da sich die Extremitäten des Menschen, die bevorzugt penetriert werden, in der Regel an der Wasseroberfläche befinden, muß sich die Cercarie möglichst häufig dort aufhalten. Daß Cercarien dies auch tun, beweisen die Stimulationen durch Licht mit der optimalen Wellenlänge.

In unseren Versuchen zeigte sich, daß Cercarien, die lange passiv waren, durch einen Dunkelreiz zu einem Schwimmstoß gereizt werden konnte. Übertragen auf die Situation in einem natürlichen Gewässer bedeutet dies, daß ein Schatten die lange passiven Cercarien wieder vermehrt an die Wasseroberfläche bringt.

Dagegen wird die Reizung mit einem Lichtreiz mit einer Hemmung des aktiven Schwimmstoßes beantwortet und die Passivphase verlängert sich.

Übertragen auf die natürliche Situation bedeutet dies, daß die Cercarie mit einem Absinken, also Entfernen vom potentiellen Ort des Endwirtes, reagiert. Dies ließe sich als Schutzmaßnahme vor zu starken Sonnenstrahlen interpretieren.

Wie in Kapitel 3.8. gezeigt wurde, befinden sich immer mehrere Cercarien im oberen Drittel und der Mitte der Beobachtungsküvette. Abhängig von der Lebensdauer der Cercarien und der Tageszeit bleibt der Anteil der sich an der Oberfläche befindlichen Cercarien relativ konstant. Da gleichzeitig mehrere Cercarien im Wasser sind, ist es sinnvoll, daß nicht alle zur gleichen Zeit ihre Energien verbrauchen.

Dies würde erklären, daß eine Reizung nur indirekt das Verhalten der Cercarie steuert, in dem die Auslösung eines Schwimmstoßes, abhängig vom Erregungszustand, beschleunigt wird.

Insgesamt lassen die Beobachtungen den Schluß zu, daß insgesamt das Verhalten der Cercarien dahin gehend beeinflußt wird, die Dichte von Cercarien an der Wasseroberfläche konstant hoch zu halten. Die Reaktion der einzelnen Cercarie spielt dabei nur indirekt eine Rolle. Ein Teil dieses Verhaltens ist durch äußere Reizung beeinflussbar. Die Untersuchungen konnten jedoch nicht vollständig klären, welcher Anteil am Verhalten einer reinen endogenen Eigenrhythmik unterliegt. Die Eigenrhythmik läßt sich zwar von außen zum Teil modulieren, ein Rest des Verhaltens unterliegt einem inneren willkürlichen Auslösemuster.

Um mehr Information darüber zu erlangen, wäre es notwendig, weitere Langzeitbeobachtungen durchzuführen, eventuell auch über mehrere Tage hinweg mit mehr als einer Cercarie. Dadurch könnte eine größere Anzahl an Cercarien gleichzeitig untersucht werden, um mehr über das dynamische Verhalten einer Gruppe von Cercarien zu erfahren.

4.6. Ausblick

Der Versuchsaufbau wurde so konzipiert, daß nur genau eine Cercarie untersucht werden kann. Durch den optimalen Einsatz der bisher vorhandenen technischen Mitteln war es möglich, exakte Daten über das Verhalten einer einzelnen Cercarie zu gewinnen.

Bei der Interpretation der gewonnenen Daten stand bisher die Frage im Mittelpunkt, welchen Nutzen das beobachtete Verhalten der Cercarie in Bezug auf die Wirtsfindung hat. In der natürlichen Umgebung der Cercarie ist die Bedeutung der einzelnen Cercarie allerdings nur nebensächlich. Entscheidend ist die Frage, wie hoch die Dichte an Cercarien im oberen Drittel des Wassers ist. Von Interesse wäre daher die Frage, welche Konsequenzen die bei einzelnen Cercarien beobachteten Verhaltensmuster für die Gesamtheit einer Cercarienpopulation hat.

Durch eine vollständige digitale Aufzeichnung und Steuerung des Beobachtungssystems könnte eine Untersuchung mehrerer Cercarien gelingen. Mit dem Fortschritt in der digitalen Bildverarbeitung wäre auch eine Echtzeitverarbeitung der anfallenden Daten denkbar. Ebenso könnte eine weitreichendere Langzeitbeobachtung realisiert werden, eventuell auch von mehreren Cercarien gleichzeitig.

Im optimalen Fall könnte ein Bild der gesamten Küvette gewonnen werden, wodurch ein aktives Mitführen des Mikroskops überflüssig werden würde. Die Bewegungen der Cercarie lägen dann direkt als digitales Signal in Form eines Bildpunktes vor. Mit Hilfe einer geeigneten Software könnte somit eine lückenlose Aufzeichnung erfolgen. Es wäre dadurch möglich, auf ein mechanisches Nachführsystem der Beobachtungseinrichtung zu verzichten. Diese digitale Bildinformation könnte auch zur Steuerung von Hell- oder Dunkelreizen verwendet werden. Es hätte den großen Vorteil, daß keine Apparatur bewegt werden muß, um die Cercarie in ihren Bewegungen zu verfolgen.

Eine große Rolle bei der Interpretation des reizphysiologischen Verhaltens der einzelnen Cercarie stellt der Aufenthaltsort der Cercarie dar. Aktiv ausgeführte Bewegungen führen immer an die Wasseroberfläche, eine Passivphase zum Ab-

sinken. Um dies genau aufzeichnen zu können, müßte der Versuchsaufbau in einigen Details verändert werden. Das Computerprogramm zur Steuerung des Beobachtungssystems ist in seinem zeitlichem Ablauf der einzelnen Steuerungskomponenten genau der Taktfrequenz des Computers angepaßt. Weitere, ausgefeiltere Stimmulationsversuche mit dem Fotoverschluß würden daher das Programm überfordern. Eine leistungsfähigere Beobachtungseinrichtung (neuere Computersysteme mit digitaler Bildverarbeitung) wäre in der Lage, die anfallenden Bilddaten schnell zu verarbeiten und gleichzeitig die vorgegebenen Stimmulationsimpulse zu setzen.

5. Zusammenfassung

Cercarien von *Schistosoma mansoni* sind weltweit die bedeutendsten humanpathogenen Infektionslarven von Trematoden. Über 200 Millionen Menschen sind weltweit von der Schistosomiasis betroffen. Und auch für die nächsten Jahre ist keine Abnahme der Infektionsraten zu erwarten. Daher ist es immer noch bedeutend, weitere Kenntnisse über die Schistosomiasis zu erlangen.

Einen Teil des Infektionszyklus, der vom Verhalten der Cercarien abhängig ist und der Wirtsfindung dient, haben wir in unseren Versuchen untersucht.

So ermittelten wir die Kombination von Lichtwellenlänge und Lichtstärke, in der die Cercarie am aktivsten ist. In den Versuchen veränderten wir die Lichtwellenlänge von 400 – 700 nm und gleichzeitig die Lichtintensität von 5000 – 30000 Cd.

Die Meßergebnisse ergaben dabei eine optimale Kombination aus Lichtwellenlänge von 500 nm und Lichtstärke von 10000 Cd, bei der die Cercarien ihre größte Aktivität zeigten. Bei dieser Kombination von Lichtwellenlänge und Lichtstärke führten die Cercarien die meisten und längsten Schwimmstöße aus und befanden sich am häufigsten an der Wasseroberfläche.

Unsere Untersuchungen zeigten, daß Rhodopsin mit großer Wahrscheinlichkeit als grundlegendes lichtreizverarbeitendes Strukturprotein bei Cercarien von *Schistosoma mansoni* dient. Damit konnten wir die molekular-biologischen Ergebnisse bestätigen.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war es, Erkenntnisse über den Aufenthaltsort der Cercarie im Wasser in Abhängigkeit von Lichtwellenlänge und Lichtstärke zu bekommen. Es zeigte sich, daß sich die Cercarien bei Zunahme der Lichtintensität verstärkt an der Wasseroberfläche aufhalten. Verringert sich dagegen die Lichtintensität, hält sich die Cercarie häufiger am Boden auf.

Weiter untersuchten wir, in welchem Maße die Cercarie auf Gabe von äußeren Reizen reagiert. Nach einer längeren Passivphase am Boden begünstigt die Gabe eines Dunkelreizes die Auslösung eines aktiv ausgeführten Schwimmstoßes. Dies führt dazu, daß die Cercarie sich häufiger an der Wasseroberfläche aufhält. Befindet sich die Cercarie dagegen an der Wasseroberfläche, konnte keine Zunahme der ausgelösten Schwimmstöße registriert werden.

Ebenso konnten wir feststellen, daß der Mechanismus, der die Passivphase steuert, vom Erregungszustand der Cercarie abhängig ist. Dieser Mechanismus kann durch Gabe von exogenen Reizen z.T. moduliert werden, d.h., es konnte sowohl eine Veränderung der Passivphase wie der sich anschließenden Aktivitätsphase festgestellt werden. Bei Stimulationen in der Aktivphase konnten wir Veränderungen des Verhaltens in dem selben Bewegungsablauf feststellen. Auf die folgende Passivphase konnten wir dagegen keine signifikante Beeinflussung feststellen. Beobachtet man die Gesamtheit einer Cercarienpopulation, stellt man fest, daß sich zur selben Zeit konstant viele Cercarien an der Wasseroberfläche aufhalten. Gleichzeitig „ruhen“ sich die restlichen Cercarien am Boden der Beobachtungsküvette aus. Dieses Gesamtverhalten ermöglicht, daß sich die Wahrscheinlichkeit, einen Endwirten zu finden, erhöht und dennoch die einzelne Cercarie mit ihrem beschränkten Energievorrat rationell umgehen kann. Diese Beobachtung erklärt möglicherweise die Tatsache, daß sich das Verhalten der Cercarien nur bedingt durch äußere Reizgabe beeinflussen lässt. Ein Teil des Verhaltens kann von außen gesteuert werden, ein Teil unterliegt einer endogenen Eigendynamik.

So konnten wir zeigen, daß die Cercarien den vor dem Schlüpfen applizierten Tag-Nacht-Rhythmus nach dem Schlüpfen beibehalten und ihrerseits eine ausgeprägte Ruhephase in der Nacht einhalten. Dies ermöglicht eine Einsparung der Energiereserven und dient als Vorbereitung für ein erneutes Ausschwärmen am nächsten Tag. Diese endogene Eigendynamik der einzelnen Cercarie ermöglicht es der Gesamtheit der Cercarien, die Konzentration an Cercarien zu den Zeiten, in denen viele Endwirte erwarten werden, an der Wasseroberfläche konstant hoch zu halten.

6. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis:	Seite:
Abb. 1.1a. Geographische Verteilung von <i>Schistosoma haematobium</i>	6
Abb. 1.1b. Geographische Verteilung von <i>Schistosoma mansoni</i>	6
Abb. 1.1c. Geographische Verteilung von <i>Schistosoma japonicum</i>	7
Abb. 1.2.1. Pärchen von <i>Schistosoma mansoni</i>	8
Abb. 1.2.2. Mikroskopisches Bild einer Cercarie	8
Abb. 1.2.2. Schematische Darstellung des Entwicklungskreislaufes von <i>Schistosoma mansoni</i> zwischen Schnecke (Zwischenwirt) und Mensch (Endwirt)	9
Tab. 1.4. Wirksamkeit verschiedener Präparate auf Schistosomen Arten	12
Abb. 1.5.1. Schematische Übersicht über das elektromagnetische Strahlungsspektrum	14
Tab. 1.5.3. Photophysikalische Einheiten	16
Abb. 1.7.1.1. Verteilung der spektralen Absorptionsmaxima	21
Abb. 1.7.1.2. Transduktion bei Vertebraten	23
Abb. 1.7.1.3. Transduktion bei Invertebraten	23
Abb. 1.7.2.1. Rezeptorpotential von Invertebraten bei Erregung	24
Abb. 1.7.2.2. Rezeptorpotential von Vertebraten bei Erregung	25
Abb. 1.7.2.3. Transduktionsprozess	26
Abb. 1.7.3.1. Photorezeptor vom Rhabdomer-Typ	27
Abb. 1.7.3.2. Photorezeptor vom Ciliar-Typ	28
Abb. 1.7.4. Rot markiertes SmRHO (Rhodopsin von <i>Schistosoma mansoni</i>)	29
Abb. 2.1.3. Schwimmphasen bei Cercarien von <i>Schistosoma mansoni</i>	34
Abb. 2.2.2. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	37
Abb. 2.2.3. Wasserbad 1 und Beobachtungsküvette	38

Abb. 2.2.4a. Spannungsgerät zur Versorgung der Xenonlampe	40
Abb. 2.2.4b. Lampengehäuse	41
Abb. 2.2.5. Monochromator und Linsensystem	42
Abb. 2.2.6a. Schwellenwertkomparator mit Videorekorder	43
Abb. 2.2.6b. Frontseite des Schwellenwertkomparators	43
Abb. 2.2.6c. Einstellung des oberen Küvettenrandes	45
Abb. 2.2.6d. Einstellung des Küvettenbodens	45
Abb. 2.2.6e. Versuchsstart	46
Abb. 2.2.6f. Überschreiten der unteren Abtastschranke	46
Abb. 2.2.6g. Nachführung der Beobachtungseinheit	47
Abb. 2.2.6h. Computer	47
Abb. 2.2.7. Mikroskop, Videokamera, Auslegearm	49
Abb. 2.2.7b. Auslegearm	50
Abb. 3.1.1. Schwimmgeschwindigkeit in Abhängigkeit des Alters der Wirtsschnecke	55
Tab. 3.1.2. Datenreihe Cercarie 16 (S2 spät)	56
Abb. 3.2. Spontanaktivität von Cercarien unterschiedlicher Wirtsschnecken	57
Abb. 3.3a. Aufstiegsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur	59
Tab. 3.3b. Länge der Aktivphase bei veränderter Temperatur	60
Abb. 3.3b. Länge der Aktivphase in Abhängigkeit von der Temperatur	63
Abb. 3.4.1. Aufstiegsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von Lichtstärke und Lichtintensität	65
Tab. 3.4.1.1. Abhängigkeit der aktiv ausgeführten Schwimmstöße von Lichtintensität und Lichtwellenlänge	66
Abb. 3.4.1.2. Anzahl der aktiv ausgeführten Schwimmstöße	66
Abb. 3.4.2a. Durchschnittliche Verweildauer an der Oberfläche in Abhängigkeit von der Lichtstärke und Lichtwellenlänge	68
Abb. 3.4.2b. Schema Küvette	69
Abb. 3.5.1. Abstiegsgeschwindigkeit in Abhängigkeit zur Lichtwellenlänge und Lichtintensität	71

Tab. 3.5.2.1. Passivphase in Abhängigkeit von Lichtwellenlänge und Lichtintensität	73
Abb. 3.5.2.2. Veränderung der Länge der Passivphase	74
Abb. 3.5.3.1. Länge der Phase t_B in Abhängigkeit von der Lichtwellenlänge und Lichtstärke	76
Tab. 3.6.1. Dunkelreiz in der Passivphase	78
Abb. 3.6.1a. Auslösen eines Schwimmstoßes nach Passivphase	79
Abb. 3.6.1b. Länge der Passivphasen nach Lichtstimulation	80
Abb. 3.6.1c. Auslösung eines Schwimmstoßes nach Stimulation nach einer 30 s P-Phase	81
Tab. 3.6.2. Dunkelreiz in der Aktivphase	83
Abb. 3.6.3. Verteilung der Startzeitpunkte der Schwimmstöße nach Gabe eines Lichtreizes	85
Tab. 3.6.4. Lichtreiz in der Aktivphase	86
Tab. 3.7.1. Abhängigkeit von Aktivphase und Passivphase I.	87
Tab. 3.7.2. Abhängigkeit von Aktivphase und Passivphase II.	88
Abb. 3.8.1. Grafische Aufzeichnung des Bewegungsmusters einer Cercarie	90
Abb. 3.8.2. Bewegungsmuster mehrerer Cercarien	90
Abb. 4.5.1. Aktivitätsmaximum	99
Abb. 4.5.2a. Funktionsmodell des Zusammenhangs zwischen Steuerung der Passivphase und der Aktivphase	103
Abb. 4.5.2b. Funktionsmodell der gegenseitigen Beeinflussung bei Reizgabe in der Passivphase	106
Abb. 4.5.2c. Funktionsmodell der gegenseitigen Beeinflussung bei Reizgabe in der Aktivphase	107

7. Literaturangaben:

- (1) **Abrous, M.:** Influence of low temperatures on the cercarial shedding of *Paramphistomum daubneyi* from the snail *Lymnaea truncatula*. *Parasite* (France), **6** : 85-8 (1999)
- (2) **Armitage J, Hellingwerf K, Abrous, M.:** Light-induced behavioral responses (phototaxis) in prokaryotes: *Photosynthesis research* **76**: 145-155 (2003)
- (3) **Asch, H.L.:** Rhythmic emergence of *Schistosoma mansoni* cercariae from *Biomphalaria glabrata*: Control by illumination. *Experimental Parasitology* **31**: 350-355 (1972)
- (4) **Bilharz, T.:** „Ein Beitrag zur Helminthographia humana“, aus brieflichen Mitteilungen des Dr. Bilharz in Cairo nebst Bemerkungen von Prof. C. Th. V. Siebold in Breslau. *Zeitschrift für wissenschaftlichen Zoologie* **4**: 53-71 (1853)
- (5) **Bogea, T.:** Circadian pattern of cercarial emergence in *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes:Digenea) from isolated *Biomphalaria glabrata*. *Chronobiology International*: 93-101 (1996)
- (6) **Disko, R.:** Gesetzmäßigkeit des Cercarienschwärmens von *Schistosoma mansoni*: Untersuchungen zu einem Basisvorgang der Bilharziose. *Habilitations-schrift der TU München* (1974)
- (7) **Disko, R.:** Mikroskopisches Bild einer Cercarie. (2003)
- (8) **Disko, R.:** Schematische Darstellung des Entwicklungskreislaufes von Schistosomen zwischen Schnecke (Zwischenwirt) und Mensch (Endwirt). (2003)

- (9) **Dönges, J.:** Reizphysiologische Untersuchungen an der Cercarie von *Posthodiplostomum cuticola*, dem Erreger des Diplostomatiden-Melanoms der Fische. *Verhandlungen der Deutschen Zoologische Gesellschaft München*: 216-223 (1963)
- (10) **Gordeliy VI, Labahn J, Moukhametzianov R, Efremov R, Granzin J, Schlesinger R, Buldt G, Savopol T, Scheidig AJ, Klare JP, Engelhard M.:** Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II-transducer complex. *Nature* 419: 484-7 (2002)
- (11) **Guyatt, H.:** The cost of delivering and sustaining a control programme for schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. *Acta Tropica* 86:267-74 (2003)
- (12) **Haas, W.:** Reizphysiologische Untersuchungen an Cercarien von *Diplostomum spathaceum*. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 64: 254-287 (1969)
- (13) **Haas, W.:** Physiological Analysis of Cercarial behavior. *Journal of Parasitology* 78: 243-255 (1992)
- (14) **Heldmaier G, Neuweiler G :** *Vergleichende Tierphysiologie*, Springer Verlag Band 1: 333 – 378 (2003)
- (15) **Hoffmann KF, Davis EM, Fischer ER, Wynn TA:** The guanine protein coupled receptor rhodopsin is developmentally regulated in the free-living stages of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 112: 113 – 123 (2001)

(16) Horn E.: Vergleichende Sinnesphysiologie, Gustav Fischer Verlag: 258 - 271 (1981)

(17) Kopf, Stefan: Eigene Zeichnung nach (14) [2004]

(18) Kopf, Stefan: Eigene Zeichnung nach (15) [2004]

(19) Loy, C.: Photo- and geo-orientation by Echiostome cercariae results in habitat selection. *Journal of Parasitology* **87**: 505-509

(20) Magnussen, P.: Prevalence and morbidity of urinary schistosomiasis among schoolchildren in the Mwera division of Pangani district, Tanzania, 30 months after the last round of annual, selective treatments. *Annual of tropical and medical Parasitology* **96**:843-8 (2002)

(21) Manson, P.R.: Analysis of the movements of *Schistosoma mansoni* miracidia using dark-ground photography. *Journal of Parasitology* **62**: 721 – 727 (1976)

(22) Marwan W, Bibikov SI, Montrone M, Oesterhelt D wan, P.R.: Mechanism of photosensory adaptation in *Halobacterium salinarium*. *Journal of Molecular Biology* **246**: 493-499 (1995)

(23) McCarthy, HO :The influence of temperature on the survival and infectivity of the cercariae of *Echinoparyphium recurvatum* (Digenea: Echinostomatidae). *Parasitology* **118**: 383-8 (1999)

(24) McCarthy HO, Fitzpatrick S, Irwin SW: Life history and life cycles: production and behavior of trematode cercariae in relation to host exploitation and next-host characteristics. *Journal of Parasitology* **88**: 910-8 (2002)

(25) McKerrow JH, Salter J.: Invasion of skin by *Schistosoma cercariae*. *Trends of Parasitology* **18**:193-5. (2002)

(26) Morris, G.P.: The fine structure of the tegument and associated structures of the cercaria of *Schistosoma mansoni*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **36**: 15-31 (1971)

(27) Pearce, E.J.: Progress towards a vaccine for schistosomiasis. *Acta Tropica* **86**:309 -13 (2003)

(28) Ruffer, M.A.: Note on the Presence of “*Bilharzia haematobia*” in Egyptian Mummies of the Twentieth Dynasty (1250-1000 B.C.). *British Medical Journal* **1**: 16 (1910)

(29) Saladin, S.: *Schistosoma mansoni*: Cercarial responses to irradiance changes. *Journal of Parasitology*: 120-124 (1982)

(30) Saladin, S.: Behavioral Parasitology and Perspectives on Miracidial Host-finding. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **60**: 197-210 (1979)

(31) Schorp, W.: Persönliche Mitteilung; 1996

(32) Silva, HS.: Longitudinal study of circadian rhythms in the cercarial emergence of *Schistosoma mansoni* from *Biomphalaria glabrata*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (Brazil): 459-61 (1995)

(33) Sineshchekov OA, Jung KH, Spudich JL. Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **99**: 8689-94 (2002)

(34) Sopott-Ehlers B, Haas W, Ehlers U: Ultrastructure of pigmented and unpigmented photoreceptors in cercariae of *Trichobilharzia ocellata* (Plathelminthes, Trematoda, Schistosomatidae): evidence for the evolution of parasitism in Neodermata. *Parasitology Research*. **91**(2): 109-16 (2003)

(35) Southgate, V.: Studies on the biology of schistosomiasis with emphasis on the Senegal river basin. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (Brazil), **96**: 75-8 (2001)

(36) Theron, A.: *Schistosoma mansoni*: cercarial shedding patterns from a mixed infection of *Biomphalaria glabrata* with two (early and late) chronobiological variants. *Parasitology Research*: 356-8 (1997)

(37) University of Cambridge, Geographical Distribution of Schistosomiasis (www.path.cam.ac.uk) (1998)

(38) Weltgesundheitsorganisation WHO, *World Health Report*, 2001

(39) Wimmer, J: *Diplomarbeit Fachhochschule München* (1986)

(40) Wright, D.G.S.: Response of the cercariae of *Trichobilharzia ocellata* to white light, monochromatic light, and irradiance reduction. *Canadian Journal of Zoology* **52**: 575 – 579 (1974)

Danksagung:

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. R. Disko für die Überlassung des Themas, für die unermüdliche Beratung und Unterstützung während der Versuchsdurchführung und Verfassung der Arbeit und die vielen unzähligen, über das Thema hinausgehenden philosophischen Diskussionen.

Vielen herzlichen Dank möchte ich an meine Eltern richten, die mir dieses Studium ermöglicht und mich immer tatkräftig unterstützt haben.

Ebenso möchte ich mich bei meiner Lebensgefährtin Cornelia bedanken, die mich gerade in vielen schwierigen Phasen der Arbeit unterstützt und motiviert hat.