

Aus der Tropenmedizinischen Abteilung der Missionsärztlichen Klinik Würzburg
Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Würzburg
Chefarzt: Professor Dr. August Stich

„Plasmodium falciparum – changes under treatment“
Eine lichtmikroskopische Studie morphologischer Änderungen
von *Plasmodium falciparum* unter Therapie

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Daniel Johannes Zimmerer
aus Altlautern

Würzburg, März 2012

Referent: Prof. Dr. August Stich

Korreferent: Prof. Dr. Klaus Brehm

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Januar 2013

Der Promovend ist Arzt

Für Deng Bol, Nyathema und Habibo

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis und Symbole.....	VI
1. Einleitung.....	1
1.1 Malaria tropica.....	1
1.1.1 Entwicklungszyklus von <i>P. falciparum</i>	1
1.1.2 Diagnostik.....	3
1.1.3 Morphologie von <i>P. falciparum</i> im Lichtmikroskop	4
1.1.4 Therapie.....	5
1.1.5 Chinin-Wirkmechanismus und Hämoglobin-Stoffwechsel im Plasmodium	5
1.1.6 Resistenzentwicklung.....	7
1.2 Zielsetzung.....	8
1.3 Hypothese.....	8
2. Methodik.....	9
2.1 Studienkonzept und Studienverlauf.....	9
2.2 Vorstellung des Patienten	10
2.2.1 Herkunft der Malaria-Infektion.....	12
2.3 Material und Vorgehen.....	13
2.3.1 Probenentnahmen und Färbung.....	13
2.3.2 Randomisierung der Proben	14
2.3.3 Untersuchungen am Lichtmikroskop.....	14
2.3.3.1 Bestimmung der Parasitämie.....	14
2.3.3.2 Morphologische Untersuchungen der Plasmodien.....	14
2.3.4 Auswertung am Computer.....	14
2.3.4.1 Vermessung der Strukturen.....	15
2.3.5 In vitro Plasmodien-Kulturen	16
2.4 In vivo-Studie am Lichtmikroskop.....	17
2.4.1 Festlegung morphologischer Kriterien.....	17
2.4.1.1 Allgemeine Strukturen der Ringformen.....	17
2.4.1.2 Parameter zur Beurteilung der Ringformen am Lichtmikroskop.....	19
2.4.1.2.1 Lage des Plasmodiums im Erythrozyten.....	20
2.4.1.2.2 Form und Größe der Plasmodien.....	21

2.4.1.2.3 Zytoplasmastruktur der Plasmodien.....	21
2.4.1.2.4 Kern-Plasma-Relation.....	22
2.4.2 Bildung von Gruppen.....	22
2.4.2.1 Einteilungsschritte.....	22
2.4.2.1.1 Einteilung der Plasmodien nach Lage im Erythrozyten.....	22
2.4.2.1.2 Unterteilung der Ringformen.....	23
2.4.2.1.3 Beurteilung des Zytoplasmas.....	23
2.4.2.2 Plasmodiengruppen.....	25
2.4.2.2.1 Gruppe I - Ringformen.....	25
2.4.2.2.2 Gruppe II - Ringformen.....	25
2.4.2.2.3 Gruppe III - Ringformen.....	25
2.4.2.2.4 Gruppe IV - ‚Accolé‘-Formen.....	26
2.4.2.2.5 Gruppe V - ‚Accentué‘-Formen.....	26
2.4.2.2.6 Gruppe VI - ‚Restgruppe‘.....	26
2.4.2.3 Problemfälle der Einteilung und Nebenkriterien.....	29
2.4.2.4 Beispiel zur Einteilung in eine Gruppe.....	31
2.4.3 Vorgehen bei der Beurteilung am Lichtmikroskop	31
2.4.4 Methoden zur Auswertung der Gruppen	32
2.4.4.1 Prozentuale Verteilung der Plasmodiengruppen.....	32
2.4.4.1.1 Punktdiagramme mit Trendlinie.....	32
2.4.4.1.2 Balkendiagramme.....	32
2.4.4.2 Berechnung der Absolutzahlen der Plasmodiengruppen.....	33
2.4.4.2.1 Approximation der Erythrozytenwerte im Intervall.....	34
2.5 Digitale Auswertung der Plasmodien.....	35
2.5.1 Parameter zur Vermessung am Computer	35
2.5.1.1 Größe der Erythrozyten	35
2.5.1.2 Größe der Plasmodien	35
2.5.1.3 Plasmodien-Erythrozyten-Relation.....	36
2.5.1.4 Zytoplasmaband-Durchmesser.....	36
2.5.1.5 Kerndurchmesser.....	36
2.5.1.6 Kern-Plasma-Relation	36
2.5.2 Erstellung der Digitalfotos und Auswertung der Parameter.....	37

2.5.3 Auswertung der Parameter.....	37
2.5.4 Auswertung der Plasmodien-Größe.....	37
2.5.5 Auswertung der Zytoplasmabandbreite.....	38
2.6 Untersuchung der Plasmodien in vitro.....	39
2.6.1 Bewertung der Ausstriche und Plasmodien.....	39
2.6.1.1 Plasmodien-Formen.....	39
2.6.1.2 Plasmodien-Strukturen.....	40
2.6.1.3 Synchronisationsproblem.....	40
2.6.2 Vergleich der in vitro-Ausstriche: Chinin- & Kontroll-Serie.....	41
2.6.2.1 Graphische Darstellung der Verteilung der in vitro-Serien.....	41
2.6.3 Vergleich der in vitro-Serien mit den in vivo-Plasmodien.....	41
3. Ergebnisse.....	43
3.1 Rückgang der Parasitämie unter Therapie.....	43
3.2 Lichtmikroskopische Untersuchung der Plasmodien.....	44
3.2.1 Vorkommen der Gruppen I-VI über den Verlauf der Therapie.....	44
3.2.1.1 Gruppe I (Ringformen).....	44
3.2.1.2 Gruppe II (Ringformen).....	46
3.2.1.3 Gruppe III (Ringformen).....	48
3.2.1.4 Gruppe IV (Accolés).....	50
3.2.1.5 Gruppe V (Accentués).....	52
3.2.1.6 Gruppe VI (Restgruppe).....	54
3.2.2 Vergleich der Gruppen.....	56
3.2.2.1 Ringformen vs. Accentué-Formen und Restgruppe.....	56
3.2.2.2 Vergleich der Ringformen.....	59
3.2.2.3 Kombination der Gruppen.....	60
3.2.3 Absolutzahlen der Plasmodiengruppen.....	63
3.2.3.1 Gesamtanzahl der Plasmodien.....	63
3.2.3.2 Absolutanteil der Plasmodien-Gruppen.....	65
3.2.4 Zusammenfassung des ersten Studienteils.....	70
3.3 Analyse der Blutausstriche am Computer.....	72
3.3.1 Breite des Zytoplasmabandes.....	72
3.3.1.1 Absolute Breite des Zytoplasmas.....	72

3.3.1.2 Kern-Plasma-Relation.....	75
3.3.1.3 Vergleich der Zytoplasmabandbreite zu fixer Zahl 0,68.....	79
3.3.2 Größe der Plasmodien.....	81
3.3.2.1 Absolute Größe.....	81
3.3.2.2 Einteilung in Gruppen.....	84
3.3.2.3 Plasmodien-Durchmesser in Relation zum Erythrozyten	86
3.4 Sichtbare Veränderungen als direkte Folge der Medikamente?.....	90
3.4.1 In vitro-Ausstriche: Plasmodien-Formen im zeitlichen Verlauf.....	90
3.4.2 Vergleich der Plasmodien-Struktur der in vitro-Serien	92
3.4.3 Vergleich der in vitro-Serien mit der in vivo-Studie	93
4. Diskussion.....	99
4.1 Studienabschnitt – „in vivo“: Analyse der Plasmodien am Mikroskop.....	100
4.2 Studienabschnitt – „in vivo“: digitale Vermessung der Plasmodien.....	104
4.3 Studienabschnitt – „in vivo“: gesamt	105
4.4 Studienabschnitt – „in vitro“: Ätiologie der Strukturänderungen.....	107
4.5 Anwendung in der Praxis.....	110
4.6 Fazit.....	111
5. Zusammenfassung.....	112
6. Literaturverzeichnis.....	113
Danksagung.....	
Curriculum Vitae.....	

Abkürzungsverzeichnis und Symbole

∅	Durchschnitt
%	Prozent
‰	Promille
Abb.	Abbildung
AZ	Allgemeinzustand
CQ	Chloroquin
CRP	C-reaktives Protein
Cyt.	Zytoplasma
Diagr.	Diagramm
d	Tag(e)
dl	Deziliter
FPP	Ferriprotoporphyrin
g	Gramm
h	Stunde(n)
Hkt.	Hämatokrit
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
l	Liter
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
Max	Maximum
mg	Milligramm
Min	Minimum
min.	Minute
Mio.	Millionen

Abkürzungsverzeichnis und Symbole (Fortsetzung)

mmol	Millimol
MQ	Mefloquin
Nr.	Nummer
n	Anzahl Plasmodien
P.	Plasmodium
QN	Quinine/Chinin
RR	Blutdruck
s.	siehe
SD	Standardabweichung
sec.	Sekunden
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
tgl.	Täglich
Tsd.	Tausend
vs.	versus
vgl.	vergleiche

1. Einleitung

1.1 Malaria tropica

Malaria ist eine von Protozoen der Gattung Plasmodium verursachte parasitäre Infektionskrankheit, die durch Mücken der Gattung Anopheles von Mensch zu Mensch übertragen wird. Es sind fünf menschenpathogene Plasmodienarten bekannt^[1] (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum* und *P. knowlesi*^{[2][3][4][5]}), von denen *Plasmodium falciparum*, als Verursacher der *Malaria tropica* die größte klinische Relevanz hat.

Trotz großen Bemühungen, die Erkrankung in den letzten Jahrzehnten mittels Chemotherapeutika und großangelegten Mückenvernichtungsprogrammen zurückzudrängen,^{[6][7][8][9]} lebt weiterhin annähernd die Hälfte der Weltbevölkerung mit dem Risiko sich mit *P. falciparum* zu infizieren – meist in den ärmsten Ländern der Welt.^[10] So verursacht *P. falciparum* ca. 250 Millionen Erkrankungen pro Jahr und führt hierbei zu jährlich nahezu 1 Million Todesfällen,^[11] die große Mehrzahl davon (ca. 90%) im subsaharischen Afrika.^[10] Am stärksten betroffen sind Kinder unter fünf Jahren^[12] und Schwangere.^[13] Weltweit ist *P. falciparum* für 7% der Todesfälle im Kindesalter verantwortlich, in Afrika stirbt ungefähr jedes 6. Kind (16%) an *Malaria tropica*.^{[14][15]}

1.1.1 Entwicklungszyklus von *P. falciparum*

Der Lebenszyklus von *P. falciparum* umfasst einen sexuellen Entwicklungszyklus in der weiblichen Anopheles-Mücke und einen asexuellen Vermehrungszyklus im Menschen. Beim Stich einer Anopheles -Mücke werden aus deren Speicheldrüse Sporozoit in die Blutbahn des Menschen freigesetzt, gelangen in die Leber und befallen dort Hepatozyten, in welchen durch asexuelle Vermehrung mehrere tausend Merozoiten entstehen (exoerythrozytische Schizogonie). Durch Zerstörung der Hepatozyten gelangen die Merozoiten in die Blutbahn und befallen Erythrozyten. In diesen beginnen sie zunächst zu Ringformen und im weiteren innerhalb von ca. 48 Stunden über ein Trophozystenstadium zu Schizonten zu reifen. Diese platzen und es werden erneut Merozoiten freigesetzt, welche weitere Erythrozyten befallen (intraerythrozytäre

Schizogonie). Durch diese Phase der parasitären Entwicklung wird das klinische Bild der Malaria mit plötzlich auftretendem hohem Fieber, Schüttelfrost und Anämie charakterisiert. Die zusätzliche Adhäsion infizierter Erythrozyten in den Kapillaren (Sequestration) verursacht lebensbedrohlichen Komplikationen wie die einer zerebralen Malaria.^{[16][17]}

Während des intraerythrozytären Zyklus der Plasmodien, mit der Entwicklung vom Merozoiten zum Schizonten, können lichtmikroskopisch verschieden Reifestadien der Plasmodien unterschieden werden. In den ersten 26 Stunden reifen die Merozoiten zu Ringformen, die sich in den folgenden 12 Stunden zu reifen Trophozoiten mit mehreren Kernen entwickeln (Schizonten). Nach weiteren 10 Stunden differenzieren sich diese zu sog. Segmenten. Diese bestehen aus neuen Merozoiten, welche durch Platzen in die Blutbahn freigesetzt werden und erneut Erythrozyten befallen.^[16]

Einige der freigesetzten Merozoiten entwickeln sich zu Gametozyten, welche bei einer erneuten Blutmahlzeit durch weibliche Anophelesmücken aufgenommen werden und sich in dieser durch sexuelle Vermehrung zu infektiösen Sporozoiten entwickeln. Diese wiederum werden bei einer erneuten Blutmahlzeit von der Mücke auf den Menschen übertragen, somit schließt sich der Kreislauf (*Abb. 1.1*).^[16]

1.1.3 Morphologie von *P. falciparum* im Lichtmikroskop

Bei einer schweren Infektion durch *P. falciparum* wird das Bild im Lichtmikroskop von sogenannten Ringformen dominiert. Diese liegen intraerythrozytär und ein Erythrozyt kann auch von mehreren Parasiten befallen sein. Der Erreger selbst zeigt im lichtmikroskopischen Bild ein oder mehrere Kerne, ein Zytoplasmaband und eine zentrale Vakuole (Abb. 1.2), das Zytoplasmaband kann in unterschiedlicher Breite vorliegen.^{[21][22]} Ältere Trophozoiten-Stadien, Schizonten und Gametozyten (Abb. 1.3) sind nur selten im dünnen Blutaussstrich zu finden.

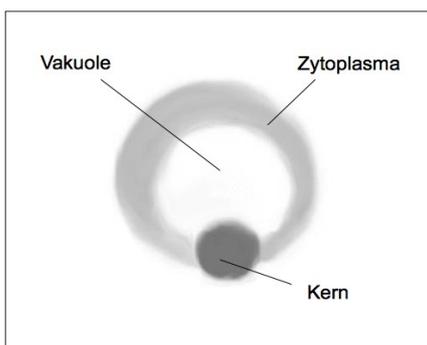


Abb.1.2: *P. falciparum* – Ringform^[23]
Skizze mit Kern, Cytoplasma und zentraler Vakuole

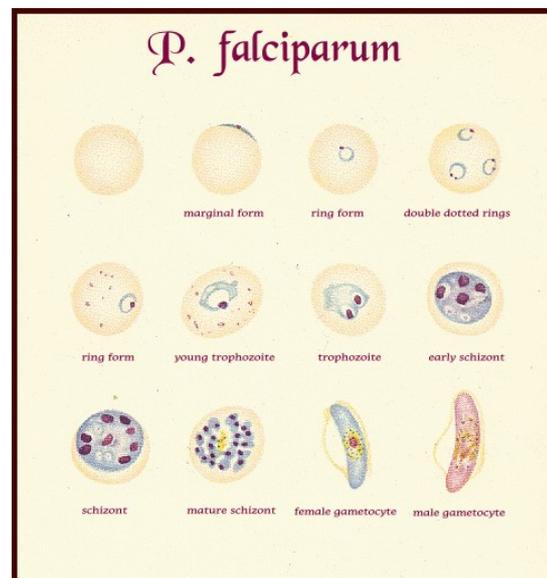


Abb.1.3: Formen von *P. falciparum*^[24]

1.1.4 Therapie

Die Infektion mit *P. falciparum* ist ein infektiologischer Notfall, eine antiparasitäre Therapie muss sofort eingeleitet werden. Zur Therapie der schweren *Malaria tropica* ist in Deutschland nach wie vor nur die intravenöse Gabe von Chinin zugelassen und wird in der Regel in Kombination mit Doxycyclin oder Clindamycin angewandt. Eine intravenöse Therapie mit Artemisinin-Derivaten, welche international als mindestens gleichwertig angesehen wird, steht für die intravenöse Gabe in Deutschland bisher nicht zur Verfügung.^[25]

Die Gabe von Chinin soll mindestens über 7 Tage bzw. bis keine Parasiten mehr im Blut nachweisbar sind erfolgen. Bei der intravenösen Gabe wird innerhalb weniger Minuten ein wirksamer therapeutischer Spiegel erreicht, das Plasmamaximum des Medikamentenspiegels wird nach 1-4 Stunden bei einer Plasma-Halbwertszeit von 10-20 Stunden erreicht.^[26]

Doxycyclin hemmt die Proteinbiosynthese der Plasmodien und erreicht nach 2 Stunden das Plasmamaximum bei einer Halbwertszeit von 12-24 Stunden.^[27]

1.1.5 Chinin-Wirkmechanismus und Hämoglobin-Stoffwechsel im Plasmodium

Der genaue Wirkmechanismus von Chinin im Plasmodium ist bislang ungeklärt.^{[28][29][30]}

Als gesichert gilt, dass Chinoline den Hämoglobin-Stoffwechsel des Parasiten in dessen erythrozytären Entwicklungszyklus behindern.^{[31][32][33]} Der Parasit verbraucht während seiner Entwicklung im Erythrozyten ungefähr 75% des Hämoglobins der Wirtszelle.^[34]

^{[35][36]} Die Hämoglobin-Aufnahme in den Parasiten erfolgt per Endozytose aus dem Zytosol des Wirtserythrozyten.^{[29][21][37]} In den endozytierten Vesikeln gelangt das Hämoglobin zur Nahrungsvakuole, mit der die Vesikel verschmelzen und so das Hämoglobin in die Nahrungsvakuole freisetzen.^{[29][21]} In dieser wird das Hämoglobin durch Proteasen in kleine Peptide, Aminosäuren und einen Häm-Anteil gespalten.^[38] Das Häm oxidiert zu dem für den Parasiten toxischen Hämatin (Ferriprotoporphyrin IX), das durch nicht-enzymatische Polymerisation^[39] zu Hämozoin (Malaria-Pigment) entgiftet wird.^[40]

In welchem Schritt Chinin in diesen komplexen Hämoglobin-Stoffwechseln eingreift ist unklar. Einerseits zeigen Studien, dass Chinin einen ähnliche Ansatzpunkt wie das 4-Aminochinolin Chloroquin hat, und somit in der Nahrungsvakuole den Entgiftungsprozess des Ferriprotoporphyrin IX zu Hämozoin stört.^{[32][41][42][43][44][45][33][46][42]} Dies wird wahrscheinlich durch eine Komplex-Bildung der Wirkstoffe mit Ferriprotoporphyrin (FPP) erreicht.^[47]

Andererseits wurde gezeigt, dass der Abbau von Hämoglobin nicht den ganzen Wirkmechanismus von Chinin erklären kann, und es differente Ansatzpunkte von Arylaminoalkoholen und 4-Aminochinolinen geben muss.^{[48][30][49]} So konnten bei beiden Chinolin-Gruppen gegensätzliche Effekte nachgewiesen werden.^[30] Bei 4-Aminochinolinen kann eine Anhäufung von FPP-Komplexen in der Nahrungsvakuole festgestellt werden, während dies bei Arylaminoalkoholen nicht der Fall ist.^{[50][51]} Es wird sogar von einem Abbau der durch Chloroquin gebildeten FPP-Komplexe durch Chinin und Mefloquin berichtet.^{[41][50][52][53]} Ursächlich für den verminderten Hämoglobingehalt im Parasiten wird eine gestörte Endozytose des Hämoglobins durch Arylaminoalkohole beschrieben.^{[50][30][47]}

Als weiterer Wirkansatz der Chinoline auf Plasmodium falciparum wurde für Chloroquin^[30] und Chinin^[28] zudem eine gestörte Fusion der endozytierten, hämoglobin-gefüllten Transportvesikel mit der Nahrungsvakuole gezeigt. Erklärbar ist dies mit der lipophilen Struktur der Arylaminoalkohole, die dazu neigt an Phospholipide und somit an Membranen zu binden.^{[54][45][55]}

Ansatzpunkt der Arylaminoalkohole ist somit nicht nur eine Wirkung auf den Hämatinabbau, sondern auch eine Störung der Phospholipidmembranen der Parasiten. Wie genau Chinin auf die Membranen wirkt, ist jedoch unbekannt. So ist eine Wirkung des Chinins über eine (bisher unbekannt) Membranstruktur möglich, die den Fusionsmechanismus der Transportvesikel mit der Nahrungsvakuole stört.^{[28][25]}

1.1.6 Resistenzentwicklung

Rasch zunehmende Resistenzen gegen antiparasitäre Medikamente untergraben die Bemühungen im Kampf gegen die Malaria.^{[56][57][58][59][60]} So sind bereits Resistenzen gegen die meisten gängigen Medikamente beschrieben.^{[61][62][63]} Auch gegen Chinin nehmen Resistenzen zu^{[64][65][66][67]} und es bleibt für die Zukunft zu hoffen, dass sie sich gegen neue Medikamente wie Artemisinin-Derivate nicht in dem Umfang entwickeln und verbreiten, wie dies bei Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin bereits geschehen ist.^{[68][69][70][71][72]}

Vor Beginn einer Malaria-Therapie gibt es im klinischen Alltag keine Möglichkeit eine Resistenz der Erreger zu testen. Die Therapie wird nach der regionalen Resistenzlage begonnen und bei Vorliegen einer Resistenz die Therapie möglichst rasch auf ein wirksame Medikation umgestellt.

Um den Erfolg einer antiparasitären Therapie abschätzen zu können, steht als einziger Parameter die quantitative Bestimmung der Parasitämie zur Verfügung. Da diese nach Beginn der Therapie noch über den ersten Tag hinaus weiter ansteigen kann,^{[73][74]} ist kein Parameter zur Hand, um die Wirksamkeit einer Therapie in den ersten Stunden zu beurteilen. Eine potentiell vorliegender Resistenz der Plasmodien kann somit nicht erkannt werden und entscheidende Stunden für die Umstellung auf eine effektive Therapie verstreichen, bei einer schweren *P. falciparum*-Infektion oft mit fatalen Folgen für den Patienten.^{[75][76]}

1.2 Zielsetzung

Aufgrund der Bedeutung der Malaria als eine der weltweit wichtigsten Infektionskrankheiten und angesichts der Problematik zunehmender Verbreitung resistenter Erreger stellt sich die Frage, in wie weit der Erfolg einer Therapie mit anderen Parametern frühzeitig festgestellt werden kann. Beim Studium der Parasiten am Lichtmikroskop im Verlauf der Therapie fällt auf, dass sich Plasmodien unter erfolgreicher Therapie qualitativ zu verändern scheinen. Eine Beobachtung, die medizinisch nutzbar gemacht werden könnte.

Können nun lichtmikroskopisch sichtbare Strukturveränderung der Plasmodien greifbar gemacht und als einfache, auch in der täglichen Praxis anwendbare Parameter zur Einschätzung eines Therapieerfolges verwendet werden? Ist die Ursache dieser Veränderungen einer direkten Wirkung der Medikamente auf die Plasmodien zuzuschreiben?

In dieser Arbeit habe ich anhand der folgenden Hypothese diese Fragestellungen untersucht und eingehend geprüft.

1.3 Hypothese

Bei Patienten mit einer schweren *Plasmodium falciparum* - Malaria kann der Erfolg der Therapie schon frühzeitig lichtmikroskopisch an morphologischen Veränderungen der Plasmodien festgestellt werden.

2. Methodik

2.1 Studienkonzept und Studienverlauf

Bei der Beurteilung der Plasmodien einer schweren *P. falciparum* Infektion fällt beim Blick durch das Mikroskop auf, dass sich das Aussehen der Plasmodien im Verlauf der Therapie verändert. Das dünne Zytoplasmaband der zunächst runden und regelmäßigen Ringformen scheint sich im Verlauf der Therapie aufzulockern. Vakuolen bilden sich, das Zytoplasma verbreitert sich und bewirkt dadurch eine Vergrößerung des Plasmodiums mit Störung der regelmäßigen und runden Struktur.

Um zu zeigen, ob dies im Verlauf der Therapie darstellbar und für diagnostische Zwecke anwendbar ist, habe ich die Plasmodien anhand einer Fallstudie eines an einer schweren *Malaria tropica* erkrankten Patienten in der Missionsärztlichen Klinik in Würzburg ausgewertet.

Vor und während der Therapie angefertigte Blutausstriche des Patienten wurden nach Lufttrocknung und Färbung in mehreren Schritten analysiert:

Zunächst galt es in einem ersten Teil der Studie Parameter zu postulieren, die ich in Gruppen zusammengefasst und über den Verlauf der Therapie ausgewertet habe. Anschließend habe ich Digitalbilder der dünnen Blutausstriche angefertigt und die Plasmodien zur Unterstützung der gewonnenen Ergebnisse am Computer vermessen. In einem abschliessenden Schritt bin ich anhand von Plasmodien-Kulturen der Frage nachgegangen, in wie weit sichtbare Veränderungen unter Therapie als eine direkte Einwirkung der Medikamente auf die Plasmodien zu werten sind.

2.2 Vorstellung des Patienten

Der in dieser Studie untersuchte Patient ist im Jahr 1970 geboren, männlich, chinesischer Abstammung und ca. 3 Wochen vor der stationären Aufnahme aus der Volksrepublik China illegal nach Deutschland gekommen. Hier hielt er sich in einem Asylbewerberheim auf und ist aufgrund seines zunehmend schlechteren Allgemeinzustandes in die Klinik gebracht worden.

Seit 4-5 Tagen hatte der Patient anhaltend hohes Fieber über 40°C mit Brechdurchfall. Bei Aufnahme auf die Intensivstation der Missionsärztlichen Klinik in Würzburg war der Patient in reduziertem Allgemeinzustand und zeigte eine Schock-Symptomatik mit Hämolysezeichen (*Tab. 2.2.1*). Im dünnen Blutausschrieb konnte eine schwere *Plasmodium falciparum* Infektion mit einer Parasitämie von initial 219‰ (*siehe Kap. 2.3.3.1*) diagnostiziert werden. Es wurde sofort eine intravenöse antiparasitäre Therapie mit Chinin und Doxycyclin begonnen und auf Grund der hohen Parasitenlast ein partieller Blutaustausch durchgeführt (*Tab. 2.2.2*).

Im Verlauf stabilisierte sich der Patient unter antiparasitärer und supportiver Therapie (*Tab. 2.2.2*) und konnte nach 10 Tagen in gutem körperlichen und neurologischen Status entlassen werden.

Klinik und Laborbefunde des Patienten bei Aufnahme:

- AZ reduziert, wach
- Temperatur: 40,5°C
- RR: 90/60mmHg
- Herzfrequenz: 140/min
- Atemfrequenz 35/min
- Blutzucker 129mg/dl
- Parasitämie 219‰
- CRP: 18,42mg/dl
- Hb: 7,6 g/dl, Erythrozyten: 2,9 Mio./µl, Hkt: 22%
- Leukozyten: 10.500/µl
- Gerinnung: Quick, 62,8%, PTT 46sec., INR 1,34, Antithrombin III 79,9%
- GOT 30U/l, GPT 13U/l
- Bilirubin: 3,13mg/dl
- Harnstoff: 102mg/dl, Kreatinin: 1,13mg/dl
- Natrium 129mmol/l, Kalium 4,48mmol/l, Calcium 1,91mmol/l
- LDH 651 U/l

Tabelle 2.2.1: Befunde des Patienten bei Aufnahme ^[77]

antiparasitäre Therapie:

- Chinin: loading dose 20mg/kgKG, dann 3 x tgl 10mg/kgKG. Initial i.v. je über 4h, ab dem 4.Tag oral (Lafran[®]-Tabletten) über insgesamt 10 d
- Doxycyclin initial 1x200mg, folgend 1x tgl. 100mg

supportive Therapie

- partieller Blutaustausch: 1.900ml an entnommenem Vollblut, durch 6 Erythrozyten-Konzentrate substituiert, Beginn 2h10min nach Chinin-Therapie, Austausch über ca. 2 Stunden.
- Flüssigkeitssubstitution (KCl, G10%, G5%, RingerLactat)
- Hämodilution mit Poly(O-2-hydroxythyl)stärke (Voluven[®]/HAES[®])
- FFP[®] (Fresh Frozen Plasma)
- Vitamin K (Konakion[®])
- Diurese mit Furosemid (Lasix[®])
- Paracetamol
- Metoclopramid (Paspertin[®]), Dimenhydrinat (Vomex[®])
- Heparin s.c. (Liquemin[®])
- Clomethiazolhemiedisilat (Distraneurin[®])
- Omeprazol (Antra[®])

Tabelle 2.2.2: antiparasitäre und supportive Therapie des Patienten ^[77]

2.2.1 Herkunft der Malaria-Infektion

Da in der chinesischen Heimatprovinz des Patienten (Jiangxi) *Malaria tropica* nicht endemisch ist,^[78] stellte sich die Frage wie und wo sich der Patient mit *P. falciparum* infizieren konnte. Leider konnte ich diese Fragestellung im Rahmen des stationären Aufenthaltes des Patienten nicht klären, zu vermuten ist aber, dass dies bei der illegalen Einreise mit Hilfe einer Schlepperbande über Nigeria als Transitland geschehen ist. Dieser Infektionsweg konnte bei anderen chinesischen Einwanderern, die ebenfalls zu diesem Zeitraum in Europa an einer schweren *Malaria tropica* erkrankt waren, gezeigt werden.^{[79][80]}

Die beschriebenen Infektionen der chinesischen Emigranten verliefen wie auch bei dem hier behandelten Patienten sehr schwer, da die Patienten auf Grund ihrer Herkunft aus einem Nicht-Endemiegebiet keine Teilimmunität gegenüber *P. falciparum* besaßen. Zudem dürfte ihr ungeregelter Aufenthaltsstatus einer frühzeitigen ärztlichen Betreuung mit raschem Therapiebeginn entgegengewirkt haben.

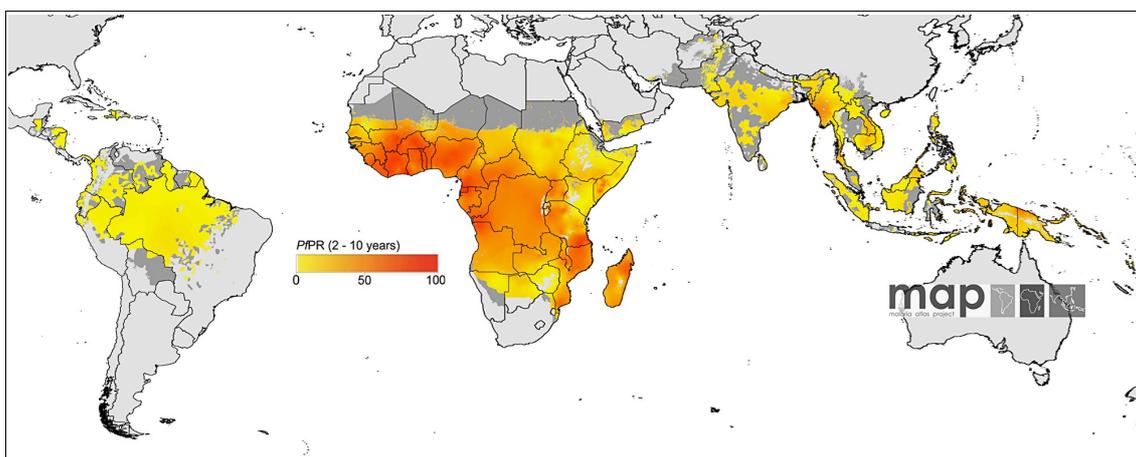


Abb. 2.2.1: Verbreitung und Endemiegebiete von *P. falciparum*, Quelle: Malaria Atlas Projekt^[81]

2.3 Material und Vorgehen

Zur lichtmikroskopischen Diagnostik der Plasmodien des Patienten wurde der „dünne Blutausschlag“ gewählt. In diesem bleiben im Gegensatz zum dicken Tropfen die Erythrozyten intakt und somit die Strukturen der Plasmodien gut erhalten. Eine gute Beurteilung der parasitären Strukturen ist dadurch möglich. Zudem ist dies eine Methode, die unter einfachsten Voraussetzungen zur Anwendung kommen kann. Die Anwendung der Ergebnisse – nachweisbare Veränderungen der Plasmodien unter Therapie mit folgender möglicher Indikation zur Therapieumstellung – können somit auch dort eingesetzt werden, wo es am häufigsten Malariaerkrankungen mit Resistenzen gibt: in den ärmsten Regionen dieser Erde.

Die folgende Tabelle zeigt die hierfür verwendeten Materialien:

<p>verwendete Materialien</p> <ul style="list-style-type: none"> • EDTA-Vollblut des Patienten • Objektträger • Giemsa-Färbung: Methanol, Giemsa-Stammlösung (Merck Nr.109204), Pufferlösung pH 7,2 und Aqua dest. • Lichtmikroskop: Olympus BH-2 Lichtmikroskops mit 1000facher Vergrößerung (Objektiv x 100, Okular x10) • Immersionsöl • Digitalkamera: <i>Nikon Coolpix 995, mit Lichtmikroskop-Adapter</i> • Okular mit µm-Skala • PC mit <i>Adobe Photoshop 7.0</i> Software

Tabelle 2.3.1: Material zur Bearbeitung der Studie

2.3.1 Probenentnahmen und Färbung

Vor Beginn der Therapie und folgend in stündlichen Abständen wurden wenige Tropfen EDTA-Vollblut entnommen. Die Abnahme erfolgte über einen ZVK des Patienten, das Blut wurde direkt im Anschluss auf einem Objektträger zu einem „dünnen Blutausschlag“ ausgestrichen. Nach Lufttrocknung wurden die intraerythrozytär gelegenen Plasmodien mit Methanol fixiert und nach Giemsa gefärbt. Die Färbung erfolgte nach den AWMF-Leitlinien,^[82] wobei ich zur besseren Darstellung der Plasmodien die Färbephase um 10 Minuten verlängert habe.

2.3.2 Randomisierung der Proben

Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die Kenntnis des jeweils zu betrachtenden Blutausstrichs zu vermeiden, wurde die Beschriftung der Blutausstriche kodiert und diese randomisiert beurteilt.

2.3.3 Untersuchungen am Lichtmikroskop

Die lichtmikroskopische Untersuchung der Blutausstriche erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung unter Öl-Immersion mit Hilfe einem *Olympus BH-2* Lichtmikroskops (Objektiv x 100, Okular x 10).

2.3.3.1 Bestimmung der Parasitämie

Zur Bestimmung der Parasitämie habe ich in den dünnen Blutausstrichen zufällig ein Bildausschnitt im Zentrum des dünnen Blutausstrichs ausgewählt und jeweils 100 Erythrozyten auf ihren parasitären Befall beurteilt. Dieser Vorgang wurde dreifach wiederholt und den Durchschnitt der Anzahl betroffener Erythrozyten als Parasitämie in Promille (‰) angegeben.

2.3.3.2 Morphologische Untersuchungen der Plasmodien

Es wurden jeweils 100 Plasmodien in den dünnen Blutausstrichen zufällig ausgewählt, indem ich zunächst die Plasmodien im ersten eingestellten Gesichtsfeld im Zentrum eines dünnen Blutausstrichs, und im Folgenden jeweils weitere Gesichtsfelder mäanderförmig in einer Richtung betrachtet habe. Eine mehrfache Beurteilung bereits betrachteter Plasmodien konnte ich so vermeiden.

2.3.4 Auswertung am Computer

Im zweiten Teil wurden die bereits im ersten Teil der Studie untersuchten Blutausstriche erneut ausgewertet. Zur Untersuchung wurde zusätzlich ein Okular mit μm -Skala, eine Digitalkamera (*Nikon Coolpix 995*) mit Adapter zum Lichtmikroskop sowie ein Computer mit Auswertungssoftware (*Adobe Photoshop 7.0*) verwendet (*Tabelle 2.3.2*).

Da besonders die Situation der Plasmodien am ersten Tag der Therapie von Interesse ist und hierbei besonders die ersten Stunden, habe ich die Plasmodien bis zur elften Stunde nach Therapiebeginn stündlich und anschließend bis zur 20. Stunde zu jeder 3. Stunde digitalisiert und analysiert. Hierfür wurden die Plasmodien in den gefärbten und kodierten Blutaussstrichen wie obig beschrieben (*siehe Kapitel 2.3.3.2*) am Lichtmikroskop randomisiert eingestellt und pro Blutaussstrich 100 Plasmodien mit der Digitalkamera fotografiert. Anschließend habe ich die Digitalfotos auf den Computer überspielt und mit der Software vermessen.

Zusätzliches Material zur digitalen Auswertung

- Okular mit μm -Skala
- Digitalkamera: *Nikon Coolpix 995* mit Adapter für Olympus-Lichtmikroskop
- PC mit *Adobe Photoshop 7.0* Software

Tabelle 2.3.2: zusätzliches Material zur Auswertung am Computer

2.3.4.1 Vermessung der Strukturen

Als kleinste messbare Einheit am Computer konnte ich die Parametergrößen mit der *Adobe Photoshop 7.0* Software (Werkzeug „Lineal“) in der Maßeinheit „Bildpunkte“ (*Pixel*) messen und anschließend in die Werte der metrischen Skala (μm) umrechnen. Der Umrechnungsfaktor wurde mittels einer in der Optik des Lichtmikroskops integrierten μm -Skala bestimmt. Es erfolgten 20 Vergleichsmessungen in denen eine - um die Messungenauigkeit gering zu halten - möglichst große Distanz im Gesichtsfeld des Mikroskops vermessen wurde. Dieselbe Distanz wurde auf dem Digitalbild am Computer in Bildpunkten gemessen und der erhaltene Mittelwert zur Umrechnung der digitalen Messwerte zur Darstellung auf μm -Basis verwendet. Die Vergleichsmessungen ergaben einen Mittelwert von 60,1Pixel Abstand im Digitalbild, dem ein Mikrometer im lichtmikroskopischen Bild entsprechen ($1\mu\text{m} = 60,1\text{Pixel}$ [Spannbreite 58,61-63Pixel]).

2.3.5 In vitro Plasmodien-Kulturen

Die zur Untersuchung des letzten Studienabschnitts verwendeten *in vitro* Kulturen von *P. falciparum* stellte freundlicherweise die Arbeitsgruppe Gelhaus/Leippe, Institut für Zoologie der Universität Kiel, als dünne Blutausstriche eines *P. falciparum* Stammes zur Verfügung. Die Kulturen wurden synchronisiert, um junge Entwicklungsstadien der Plasmodien zu selektieren und somit die Bedingungen *in vivo* zu imitieren. Hieraus wurde eine Serie an Blutausstrichen unter Chinin-Einfluss und eine Kontroll-Serie ohne antiparasitäre Therapie angefertigt. Die Ausstriche erfolgten jeweils zu Beginn der synchronisierten Formen bzw. vor Beginn der Medikamentenzugabe und im weiteren Verlauf stündlich über die ersten 11 Stunden und abschliessend zur 25. Stunde. Die Färbung der Blutausstriche, die Analyse am Lichtmikroskop und die Fotodokumentation mittels Digitalkamera erfolgte mit den gleichen Methoden und Apparaturen wie in den ersten Studienabschnitten beschrieben (vgl. 2.3.1-3).

2.4 In vivo-Studie am Lichtmikroskop

Im peripheren Blutausstrich lassen sich unterschiedliche Plasmodien-Formen erkennen, die teilweise nicht viel gemeinsam zu haben scheinen: von typischen Ringen bis zu morphologisch stark gestörten Plasmodien. Bei genauerer Analyse lassen sich Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Plasmodien feststellen, die es erlauben diese verschiedenen Gruppen zuzuordnen.

So habe ich zunächst nach Strukturen und Auffälligkeiten der Plasmodien im Verlauf der Therapie gesucht, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Plasmodien greifbar zu machen. Diese Strukturen habe ich dann zu Gruppen zusammengefasst, um die Plasmodien diesen Gruppen zuteilen zu können.

2.4.1 Festlegung morphologischer Kriterien

Bei einer schweren Infektion durch *P. falciparum* wird das Bild im dünnen Blutausstrich von Ringformen dominiert. Auf diese konzentrierte sich daher die Suche nach Kriterien zur Einteilung der Plasmodien.

2.4.1.1 Allgemeine Strukturen der Ringformen

Die Ringformen lassen sich durch äussere und innere Merkmale beschreiben. Zunächst sind die Plasmodien durch ihre Lage im Erythrozyten charakterisiert, indem sie eine unterschiedliche Beziehung zur Membran des Wirtserythrozyten zeigen.

Jedes Plasmodium ist zudem durch seine Größe, Form und intrazytoplasmatischen Strukturen gekennzeichnet. Zu unterscheiden sind runde und regelmäßige Ringformen mit dünnem, homogenem Zytoplasmaband von Ringformen mit verbreitertem, unregelmäßig strukturiertem Zytoplasma, die dadurch eine vergrößerte Ringform mit Störung der regelmäßig runden Plasmodien-Struktur haben.

Ein Überblick über die Charakteristiken und Strukturen der Plasmodien geben die *Tabelle 2.4.1* und *Abbildungen 2.4.1 bis 2.4.3*.

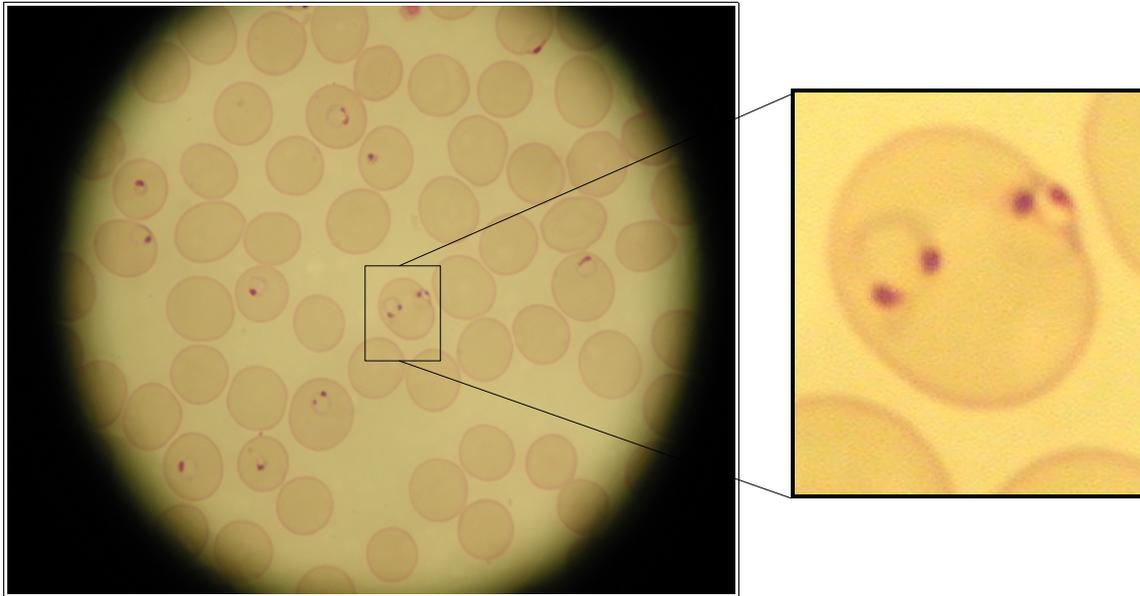


Abb. 2.4.1: a) *Malaria tropica*: Blick durch das Lichtmikroskop, b) Erythrozyt mit Plasmodien^[23]

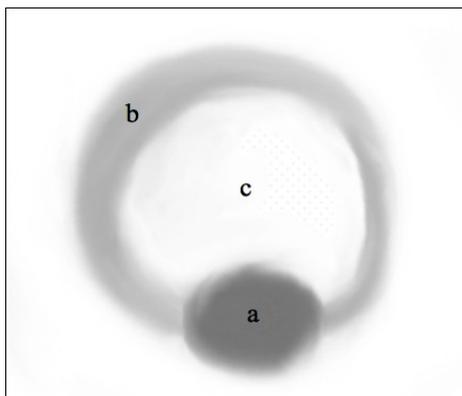


Abb.2.4.2: Skizze: Plasmodium-Ringform, dünnes, homogenes Zytoplasma
a) Kern, b) Zytoplasmaband, c) Vakuole^[23]

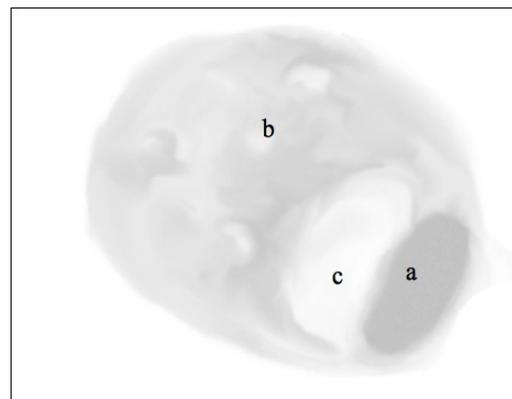


Abb.2.4.3: Skizze: Plasmodium-Ringform, verbreitertes, inhomogenes Zytoplasma
a) Kern, b) Zytoplasmaband, c) Vakuole^[23]

1. Plasmodium und dessen Beziehung zum Erythrozyten:
 - a) Lage im Erythrozyten
 - b) Form des Plasmodiums
 - c) Grösse des Plasmodiums

2. Plasmodien-Strukturen:
 - a) Kern
 - Kern-Durchmesser
 - Kernstruktur (homogen/inhomogen)
 - b) Zytoplasma
 - Zytoplasmaband-Breite (breitester Durchmesser wird gemessen)
 - Zytoplasma-Struktur (homogen/inhomogen)
 - c) Vakuole
 - Vakuolen-Durchmesser
 - d) Relationen
 - Kern-/Plasma-Relation (aus Zytoplasmabreite und Plasmodienkern-Querdurchmesser)
 - Zytoplasma/Plasmodien-Relation

Tabelle 2.4.1: lichtmikroskopische Parameter von Plasmodium falciparum

2.4.1.2 Parameter zur Beurteilung der Ringformen am Lichtmikroskop

Nicht alle im Lichtmikroskop sichtbaren Parameter sind zur Charakterisierung der Plasmodien gleichermassen sinnvoll und praktikabel. Die Folgenden bieten in der praktischen Anwendung eine gute Beurteilung der Plasmodien:

- a. Lage des Plasmodiums im Erythrozyten
- b. Form und Größe der Plasmodien
- c. Struktur des Zytoplasmabandes
- d. Kern-Plasma-Relation

Eine Beurteilung der Vakuole sowie der Relation des Zytoplasmas zum Plasmodium hat in der Beurteilung kein Vorteile gegenüber den anderen Parameter gezeigt, so dass ich im Folgenden nicht weiter auf diese eingehen werde.

2.4.1.2.1 Lage des Plasmodiums im Erythrozyten

Zu unterscheiden sind frei im Erythrozyten liegende Plasmodien ohne Kontakt zur Erythrozytenmembran, Formen die teilweise einen Kontakt zur Erythrozytenmembran haben, vollständig der Membran anliegende Formen (sog. *Accolé*-Formen)^[83] und Plasmodien, die die Kontinuität der Erythrozytenmembran durch eine Hervorwölbung stören. Durch ihre charakteristische Lage habe ich zur Beschreibung dieser als Arbeitstitel den Begriff „*Accentué*“-Formen eingeführt (Abb. 2.4.4 a-d).

Die Lage der Parasiten ist ein einfacher Parameter, der es erlaubt eine grobe Einteilung der Plasmodien vorzunehmen.

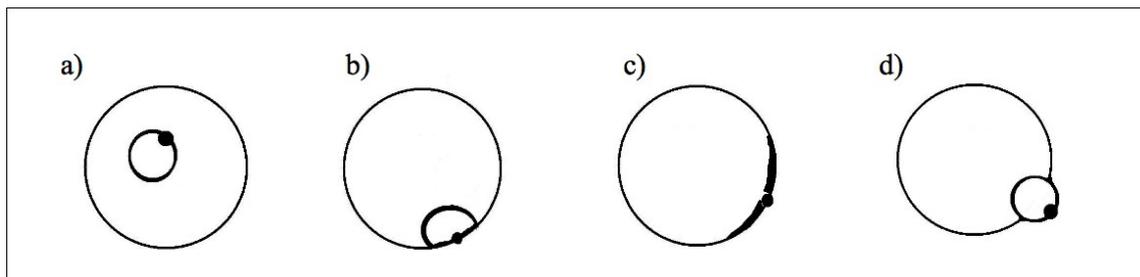


Abb. 2.4.4: Lage der Plasmodien im Erythrozyten (Skizze): a) frei im Erythrozyten liegend, b) partieller Kontakt zur Erythrozytenmembran, c) *Accolé*-Form, d) *Accentué*-Form ^[23]

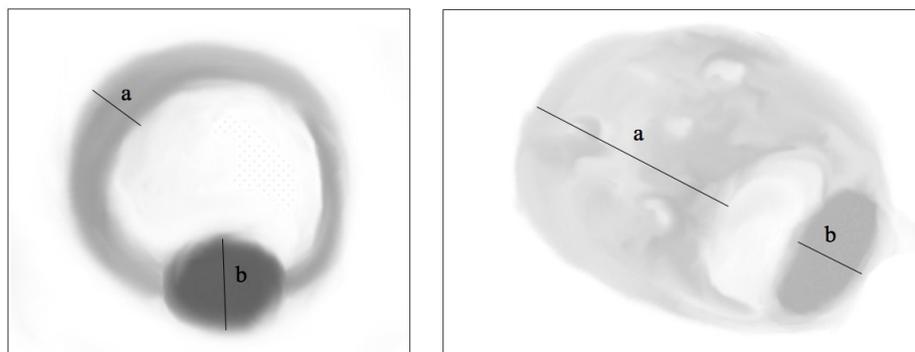


Abb. 2.4.5 & 2.4.6: Kern-Plasma-Relationen, a) größter Zytoplasmaband-Durchmesser b) größter Kern-Querdurchmesser ^[23]

2.4.1.2.2 Form und Größe der Plasmodien

Plasmodien können lichtmikroskopisch in unterschiedlichen Formen vorliegen. Zu unterscheiden sind Ringformen mit regelmäßiger, typisch runder Ringstruktur von Ringen mit einer ovalen Form, Plasmodien von gestörter Morphologie bis hin zu pyknotischen Formen mit stark verdichtetem Inhalt, ohne erkennbare Strukturen. Zudem beeinflusst die Lage der Plasmodien im Erythrozyten (s.o.) die Form der Plasmodien. Eine Einordnung der Plasmodien mit Ringstruktur und Plasmodien, die davon abweichende Formen haben, ist problemlos möglich.

Im Gegensatz zu der Plasmodien-Form ist deren Größe nur schwer lichtmikroskopisch fassbar. So sind kleine Plasmodien-Formen von vergrößerten Plasmodien zu unterscheiden. Prinzipiell ist eine Einteilung der Plasmodien-Größe in Relation zum Erythrozyten möglich, bringt jedoch in der Beurteilung der Plasmodien gegenüber anderer Parameter keine Vorteile, da diese mit einer Größenzunahme intraparasitären Strukturen einhergeht und diese lichtmikroskopisch besser beurteilbar sind (s.u.). Auf die Größe möchte ich in dieser Arbeit dennoch eingehen, da die Plasmodien im Verlauf der Therapie an Größe zuzunehmen scheinen. Bei der Vermessung der Plasmodien am Computer (*Kapitel 2.5*) werde ich hierauf näher eingehen.

2.4.1.2.3 Zytoplasmastruktur der Plasmodien

Im Trophozoiten ist das Zytoplasma als bandförmige, eine zentrale Vakuole umschließende Struktur zu sehen, die sich zum Kern hin verjüngt (sogenannte Ringstruktur, *Abb. 2.4.2 & 2.4.3*).

Beurteilt werden kann die Struktur des Zytoplasmas auf lichtmikroskopische Homogenität im Gegensatz zu Unregelmäßigkeiten im Sinne einer Auflockerung, die durch kleine Vakuolen oder Verdichtungen der Strukturen des Zytoplasma entstehen (*Abb. 2.4.3*). Der Übergang von einer homogenen Zytoplasmastruktur hin zu einer beginnenden sichtbaren Vakuolisierung ist fließend und daher als „weiches“ Zusatzkriterium zu verwenden.

2.4.1.2.4 Kern-Plasma-Relation

Zur Beurteilung der Zytoplasmabandbreite wird als einfacher und gut lichtmikroskopisch zu beurteilender Parameter die Kern-Plasma-Relation herangezogen. Es wird hierfür der breiteste Zytoplasmaband-Querdurchmesser in Relation zum Durchmesser des Kerns beurteilt. Bei ovalen Kernen wird der größte Querdurchmesser des Kerns gewählt, bei Plasmodien mit zwei oder mehr Kernen wird der größte Kern mit dessen Querdurchmesser gewählt (*Abb. 2.4.5 und 2.4.6*). Dies ist ein sehr guter Parameter, um eine Verbreiterung des Zytoplasmas zu zeigen.

2.4.2 Bildung von Gruppen

Um die Plasmodien im weiteren über den Verlauf der Therapie zu beurteilen, habe ich auf Grund der im vorigen Kapitel beschriebenen Parameter die Plasmodien zu Gruppen zusammengefasst. Als primäre Einteilungsparameter wurden die Lage der Plasmodien im Erythrozyten und die Kern-Plasma-Relation der Ringformen bestimmt, sekundär wurde die Struktur von Kern und Zytoplasma sowie die damit zusammenhängende Grösse der Plasmodien beurteilt (*Tabelle 2.4.2*).

2.4.2.1 Einteilungsschritte

2.4.2.1.1 Einteilung der Plasmodien nach Lage im Erythrozyten

Zunächst lassen sich die Plasmodien nach Form und Lage im Erythrozyten unterteilen: Es sind frei im Erythrozyten liegende Ringformen (*Abb. 2.4.4 a*) von *Accolé*-Formen (*Abb. 2.4.4 c*) und *Accentué*-Formen (*Abb. 2.4.4 d*) zu unterscheiden. Plasmodien, die der Erythrozytenmembran nur partiell anliegen und hierbei noch eine gut erkennbare Ringstruktur aufweisen (*Abb. 2.4.4 b*), werden mit den frei im Erythrozyten liegenden Plasmodien unter dem Begriff „Ringformen“ zusammengefasst. Plasmodien ohne die genannten Merkmale bilden eine Restgruppe (*Tabelle 2.4.3*).

2.4.2.1.2 Unterteilung der Ringformen

In einem weiteren Schritt lassen sich die im Erythrozyten liegenden Ringformen nach ihrer Kern-Plasma-Relation in drei weitere Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe umfasst die Ringe mit einem Zytoplasmaband, das kleiner dem Kerndurchmesser ist, eine zweite Gruppe beinhaltet die Plasmodien mit einer Breite des Zytoplasmabands die mehr als den doppeltem Kerndurchmesser entspricht. Eine Zwischengruppe bilden die Plasmodien mit einem Zytoplasmaband, das dem 1-2fachen Kerndurchmesser entspricht (*Tabelle 2.4.2*).

2.4.2.1.3 Beurteilung des Zytoplasmas

Bei Plasmodien mit verbreitertem Zytoplasma ist dieses meist inhomogen und durch Vakuolen aufgelockert. Besteht nun bei der Beurteilung der Kern-Plasma-Relation bei grenzwertigen Befunden eine Einteilungsunsicherheit, so ist die Beurteilung der Zytoplasma-Struktur ausschlaggebend für die Zuteilung in eine Gruppe. Mehr hierzu in Kapitel 2.4.2.3.

- I. Hauptkriterium: Form der Plasmodien und Lage der Plasmodien im Erythrozyten:
1. Ringformen: intraerythrozytär frei im Erythrozyten oder mit partiellem Kontakt zur Erythrozytenmembran liegende Ringstrukturen
 2. Accolé-Form: flach an die Membran angeheftete Formen
 3. Accentué-Form: Hervorwölbung der Erythrozytenmembran durch die Plasmodien
 4. Formen nicht obig einzuordnen, morphologisch gestörte Formen, pyknotische Formen
- II. Hauptkriterium: Unterteilung der Ringformen nach Kern-Plasma-Relation
1. Zytoplasmaband kleiner Kernquerdurchmesser
 2. Zytoplasmaband 1-2-facher Kerndurchmesser
 3. Zytoplasmaband > 2-facher Kerndurchmesser
- III. Nebenkriterium: Struktur von Zytoplasma
1. homogenes Zytoplasma
 2. inhomogenes Zytoplasma

Die Plasmodien werden zunächst nach ihrer Form und Beziehung zum Erythrozyten (I.) und die Ringstrukturen nach der Kern-Plasma-Relation (II.) eingeteilt. Bei Grenzfällen der Kern-Plasma-Relation wird als weiteres Kriterium die Struktur des Zytoplasmas bewertet.

Tabelle 2.4.2: Einteilung der Plasmodien in Gruppen

Bildung von Gruppen

Gruppe I-III:	Ringformen mit unterschiedlichen Kern-Plasma-Relationen
Gruppe IV:	Accolé-Formen
Gruppe V:	Accentué-Formen
Gruppe VI:	Rest (nicht in I-V einzuteilen)

Tabelle 2.4.3: Einteilung nach Lage im Erythrozyten und Struktur der Ringformen

2.4.2.2 Plasmodiengruppen

Aus der Lage im Erythrozyten und den Strukturunterschieden der Ringformen können somit sechs Gruppen gebildet werden, welchen die Plasmodien eindeutig zugeordnet werden können (Tab. 2.4.4 & 2.4.5).

2.4.2.2.1 Gruppe I - Ringformen

Das Zytoplasmaband der Plasmodien der Gruppe I ist in dessen breitem Durchmesser kleiner als der größte Querdurchmesser des Kerns (Zytoplasma < Kerndurchmesser). Des Weiteren zeigen der Kern und das Zytoplasma eine homogene Struktur. Insgesamt sind die Plasmodien intakte runde Ringe von geringer Größe.

2.4.2.2.2 Gruppe II - Ringformen

Diese Gruppe beinhaltet die Plasmodien, deren breiter Durchmesser des Zytoplasmabands größer als der einfache Kerndurchmesser, aber kleiner als der doppelte Kerndurchmesser ist (Zytoplasma 1-2 x Kerndurchmesser). Dabei ist das leicht vergrößerte Zytoplasma homogen bis beginnend inhomogen, das Plasmodium hat eine runde und gleichmäßige Form. Eine leichte Vergrößerung dieser Plasmodien ist bedingt durch die Zytoplasma-Verbreiterung festzustellen.

Diese Gruppe stellt als Zwischenform einen fließenden Übergang der Gruppe I zur Gruppe III dar.

2.4.2.2.3 Gruppe III - Ringformen

In dieser Gruppe befinden sich alle ringförmigen Plasmodien mit einem Zytoplasmaband mit mehr als doppelter Breite zum Kerndurchmesser (Zytoplasma >2x Kerndurchmesser). Des Weiteren ist die Zytoplasma-Struktur inhomogen durch Vakuolen aufgelockert und auch der Plasmodienkern zeigt teilweise eine leichte Auflockerung in seiner Struktur. Das Plasmodium ist durch die Verbreiterung des Zytoplasmabandes in der runden und gleichmäßigen Form gestört und erscheint insgesamt vergrößert. Das Plasmodium an sich hat jedoch weiterhin eine intakte Ringstruktur.

2.4.2.2.4 Gruppe IV - ‚Accolé‘-Formen

Das Zytoplasmaband mit Kern ist vollständig an die Erythrozytenmembran angeheftet, eine runde Form des Plasmodiums mit zentrale Vakuole ist nicht sichtbar.

2.4.2.2.5 Gruppe V - ‚Accentué‘-Formen

Das Hauptmerkmal dieser Gruppe ist, dass die Plasmodien über das Niveau der Erythrozytenmembran hervorstehen. Die Membran der Erythrozyten erscheint durch die Plasmodien hervorgewölbt und ist in der kontinuierlichen und gleichmässigen Begrenzung gestört. Morphologisch kann meist eine in der Struktur gestörte Ringform ausgemacht werden.

2.4.2.2.6 Gruppe VI - ‚Restgruppe‘

Alle Plasmodien, die morphologisch nicht eindeutig nach Lage und Form den obigen Gruppen zuzuordnen sind. Diese Gruppe beinhaltet somit stark dysmorphe Trophozoiten, pyknotische Formen und auch Schizonten oder Gametozyten.

Gruppe	Einteilungskriterien
I	<p>Ringform</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zytoplasma < Kern-Durchmesser • intakte runde Ringe, geringe Größe • Zytoplasma homogen, nicht durch Vakuolen aufgelockert
II	<p>Ringform (fliessender Übergang von I → III)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zytoplasma-Durchmesser 1-2 x Kern-Durchmesser • Zytoplasma homogen bis beginnend inhomogen • runde Form des Ringes noch intakt, leichte Größenzunahme
III	<p>Ringform</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zytoplasma-Durchmesser > 2 x Kern-Durchmesser • Zytoplasma verbreitert und inhomogen mit Vakuolen, Plasmodium vergrößert • Ring in der runden und gleichmäßigen Form gestört
IV	<p><i>Accolé</i>-Form:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zytoplasma und Kern vollständig an die Erythrozyten-Membran angeschmiegt • keine zentrale Vakuole oder andere Zellstrukturen sichtbar
V	<p><i>Accentué</i>-Form:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kontinuität der Erythrozytenmembran durch den vorgewölbten Parasiten gestört, meist morphologisch gestörte Ringformen
VI	morphologisch nicht den obigen Gruppen zuzuordnende Formen

Tabelle 2.4.4: Einteilung der Plasmodien in sechs Gruppen: Merkmale

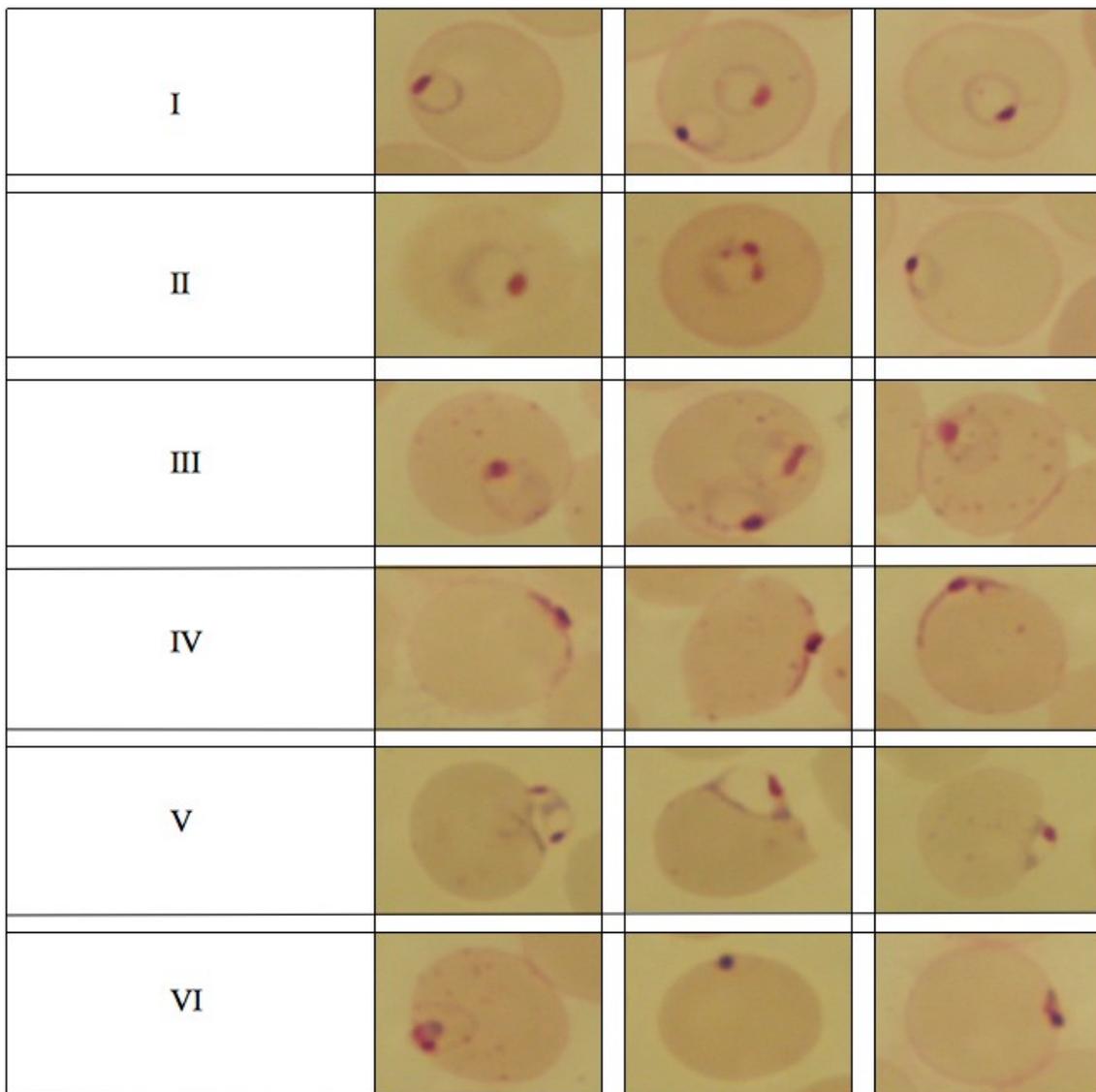


Tabelle 2.4.5: Einteilung der Plasmodien in sechs Gruppen: Aufnahmen durch das Lichtmikroskop ^[23]

2.4.2.3 Problemfälle der Einteilung und Nebenkriterien

Der Grossteil der Plasmodien lässt sich mit den obigen Kriterien problemlos den einzelnen Gruppen zuordnen. Es gibt jedoch Grenzfälle welche nicht eindeutig einzuteilen sind.

So können bei Einteilung der Ringformen in die Gruppen I, II oder III grenzwertige Kern-Plasma-Relationen zu Unklarheiten in der Gruppenzuteilung führen.

Für diese Fälle habe ich als weiteres Kriterium die Struktur des Zytoplasmas und des Kerns herangezogen. Liegt z.B. die Breite des Zytoplasmabands genau im Bereich des einfachen oder doppelten Kerndurchmessers (Einteilungsgrenzen der Gruppe II zu den Gruppen I und III) werden die Plasmodien bei homogener Zytoplasma-Struktur in die weniger veränderte Gruppe eingeteilt, da im Hinblick auf das Ziel der Studie stärker veränderte Plasmodien ein Hinweis auf eine wirksame Therapie sind und somit fälschlicherweise der Eindruck einer solchen entsteht.

Wenn jedoch Veränderungen der Zytoplasmastruktur vorliegen, wird das Plasmodium der nächst höheren Gruppe zugeteilt (*Tabelle 2.4.6*).

Des weiteren stellt sich die Frage, ab wann Ringformen mit Veränderungen in ihrer Struktur den dysmorphen Plasmodien der Gruppe VI zuzuordnen sind. Als sinnvoll hat sich gezeigt, die Plasmodien mit gut erkennbarer Ringstruktur und Bestimmbarkeit der Kern-Plasma-Relation den Ringformen der Gruppen I-III zuzuordnen. Eine deutliche Störung der Form ohne mögliche Bestimmung der Kern-Plasma-Relation führt zur Einteilung in die Rest-Gruppe.

Grenzfälle der Einteilung

Gruppe I oder II ?

- a) Zytoplasma homogen → Einteilung in Gruppe I
- b) Zytoplasma inhomogen → Einteilung in Gruppe II

Gruppe II oder III ?

- c) Zytoplasma homogen → Einteilung in Gruppe II
- d) Zytoplasma inhomogen → Einteilung in Gruppe III

Im Zweifelsfall erfolgt eine Einteilung in eine „niedere“ Gruppe:
Gruppe I ← Gruppe II ← Gruppe III

Einteilung als Ringform oder in Rest-Gruppe?

- e) Kern-Plasma-Relation beurteilbar → Einteilung in Gruppe I-III
- f) keine Kern-Plasma-Relation beurteilbar → Einteilung in Gruppe VI

Tabelle 2.4.6: Grenzfälle der Einteilung in die Gruppen

2.4.2.4 Beispiel zur Einteilung in eine Gruppe

Wenn nun ein frei im Erythrozyten liegendes Plasmodium ein Zytoplasmaband mit einer annähernd dem Kerndurchmessers entsprechenden Breite zeigt und die Unsicherheit besteht, welcher Gruppe dieses Plasmodium zugeordnet werden soll (nach der Kern-Plasma-Relation in die Gruppe I oder II), wird nun die Form des Plasmodiums und die Struktur des Zytoplasmabandes hinzugezogen. Ist das Plasmodium in der runden gleichmäßigen Form gestört oder stark vergrößert oder die Struktur des Zytoplasmabands aufgelockert, so erfolgt die Einteilung in die nächst höhere Gruppe.

Also erfolgt die Beurteilung wie folgt:

1. Hauptkriterium (Form und Lage)
 - ringförmiges Plasmodium frei im Erythrozyten liegend: Einteilung in die Gruppe I, II oder III
2. Hauptkriterium (Kern-Plasma-Relation)
 - Zytoplasmabandbreite in etwa dem Kerndurchmesser entsprechend: Einteilung in die Gruppe I oder II
3. Nebenkriterium (Struktur des Zytoplasmas)
 - a) Zytoplasma homogen → Einteilung in Gruppe I
 - b) Zytoplasma inhomogen → Einteilung in Gruppe II

2.4.3 Vorgehen bei der Beurteilung am Lichtmikroskop

Zur Analyse der Plasmodien über den Verlauf der Therapie habe ich jeweils 100 Plasmodien zunächst vor Therapiebeginn und folgend stündlich bis zur 31. Stunde (Parasitämie < 1%) aus den wie zuvor beschrieben kodierten und randomisierten Blutaussstrichen (siehe Kapitel 2.3.3) in die Gruppen I-VI eingeteilt. Die Auswertung der Plasmodien am Lichtmikroskop erfolgte unter 1000-facher Vergrößerung und Verwendung von Immersionsöl. Zunächst wurde ein zentral im Blutaussstrich liegendes Gesichtsfeld eingestellt und alle Plasmodien dieses Gesichtsfelds ausgewertet. Anschließend galt es weitere Gesichtsfelder mäanderförmig in eine Richtung wandernd auszuwerten.

2.4.4 Methoden zur Auswertung der Gruppen

Im Folgenden werden die am Lichtmikroskop erhobenen Daten in Diagrammen dargestellt und analysiert. Hierbei wird zunächst das *prozentuale Vorkommen* der verschiedenen Gruppen im Verlauf der Therapie ausgewertet und anschliessend mit den *Absolutzahlen* der Plasmodien der einzelnen Gruppen verglichen.

2.4.4.1 Prozentuale Verteilung der Plasmodiengruppen

Das prozentuale Verteilung der verschiedenen Gruppen im Verlauf der Therapie wird graphisch mittels Punktdiagrammen mit Trendlinien und in Balkendiagrammen dargestellt.

2.4.4.1.1 Punktdiagramme mit Trendlinie

Zur Veranschaulichung des prozentualen Vorkommens der Plasmodienformen über den Verlauf der Therapie habe ich Punktdiagramme mit ergänzenden Trendlinien gewählt. Die Abszisse zeigt jeweils die Dauer der Therapie in Stunden an, und die Ordinate den prozentualen Anteil der Plasmodien der Gruppe zu den jeweiligen Stunden.

Zur Veranschaulichung der Verläufe ist eine polynomische Trendlinie der Werte über die Kurve gelegt, die den Trend des Verlaufes der Plasmodien-Formen über die Zeit anzeigt.

2.4.4.1.2 Balkendiagramme

Zum Vergleich der verschiedenen Gruppen eignen sich Balkendiagramme. Die Abszisse zeigt wie in den Punktdiagrammen die Therapiedauer und die Ordinate den prozentualen Anteil der Gruppen an. Entsprechend zeigen die Balkendiagramme ebenfalls den prozentualen Anteil der Gruppen über den Verlauf der Therapie an.

2.4.4.2 Berechnung der Absolutzahlen der Plasmodiengruppen

Um die *prozentuale* Verteilung der Gruppen mit der *absoluten* Anzahl der Plasmodien zu vergleichen, wird anhand der Parasitämie und der Anzahl Erythrozyten im Patientenblut die Anzahl der Plasmodien *je Mikroliter Vollblut* zu der jeweiligen Therapiestunde berechnet (Tabelle 2.4.7). Die Erythrozytenmenge wurde im Verlauf der Therapie mehrmals laborchemisch bestimmt (Tab. 2.4.9), die im Intervall nicht gemessenen Erythrozytenwerte werden für die Berechnung approximiert (siehe Kap. 2.4.4.2.1, Tab. 2.4.10 und Diagr. 3.2.14). Mittels des prozentualen Anteils der Plasmodiengruppen wird dann die absolute Anzahl der Plasmodien je Gruppe errechnet (Tabelle 2.4.8). Die Absolutzahlen der einzelnen Gruppen werden entsprechend der Diagramme der prozentualen Verteilung in Balkendiagrammen dargestellt (siehe Kap. 2.4.4.1).

$$\text{Erythrozyten pro } \mu\text{l Vollblut} \times \text{Parasitämie} = \text{Anzahl Plasmodien pro } \mu\text{l Vollblut}$$

Tabelle 2.4.7: Formel zur Berechnung der Gesamtzahl der Plasmodien pro Mikroliter (μl) Vollblut je Therapiestunde

$$\frac{\text{Absolute Anzahl der Plasmodien pro } \mu\text{l Vollblut}}{\text{prozentualer Anteil der Gruppen (in \%)}} = \text{absolute Anzahl der Plasmodien je Gruppe pro } \mu\text{l Vollblut}$$

Tabelle 2.4.8: Absolute Anzahl der Plasmodien je Gruppe pro Mikroliter (μl) Vollblut je Therapiestunde

Therapiedauer (in h)	0	1	2	5	9	17	20	33
Erythrozyten (Mio/ μl)	2,9	2,7	2,6	3,6	3,5	3,4	3,5	3,5

Tabelle 2.4.9: laborchemisch bestimmte Erythrozyten des Patienten im Verlauf der Therapie (in Millionen pro Mikroliter Vollblut) ^[77]

2.4.4.2.1 Approximation der Erythrozytenwerte im Intervall

Um die Absolutwerte zu jeder Therapiestunde berechnen zu können, muss die Erythrozytenanzahl zu den Zeitpunkten im Intervall, an denen keine laborchemisch gemessenen Werten vorliegen (s. *Tabelle 2.4.9*), näherungsweise bestimmt werden.

Die Anzahl der Erythrozyten ist ein im Verlauf der Therapie dynamischer Wert mit linearem Verlauf. Zu- oder Abnahmen erfolgen kontinuierlich und werden durch die schwere Malariainfektion und deren Therapie beeinflusst. In dieser Studie haben zwei Faktoren einen grossen Einfluss auf die Anzahl der Erythrozyten des Patienten. Einerseits zerstören Plasmodien im Verlauf der erythrozytären Entwicklung ihre Wirtserythrozyten^[84] und verringern somit, wie in den ersten drei gemessenen Messwerten sichtbar, die Gesamterythrozytenzahl des Patienten (s. *Tabelle 2.4.9*). Andererseits steigert der in der dritten Therapiestunde begonnene partielle Blutaustausch über die zwei folgenden Stunden (s. *Kapitel 2.2, Tabelle 2.2.2*) die Gesamterythrozytenzahl.

Zur Approximation wird nun die Differenz der zwei aufeinanderfolgend gemessenen Erythrozytenwerte berechnet und diese durch die Anzahl der in dieser Zeit vergangenen Therapiestunden dividiert. Das Ergebnis wird dem Wert je nach Verlauf addiert oder subtrahiert. So können für die nicht gemessene Stunden näherungsweise die in *Tabelle 2.4.10* berechneten Erythrozytenzahlen angenommen werden.

Therapiedauer (in h)	0	1	2	3	4	5	6	7
Erythrozyten (Mio/ μ l)	2,9	2,7	2,6	2,93	3,27	3,6	3,58	3,55
	8	9	10	11	12	13	14	15
	3,53	3,5	3,49	3,48	3,46	3,45	3,44	3,43
	16	17	18	19	20	die folgende Stunden		
	3,41	3,4	3,43	3,47	3,5	konstant 3,5 Mio/ μ l		

Tabelle 2.4.10: approximierte Erythrozytenzahlen (in Millionen pro μ l Vollblut, fett gedruckt: gemessenen Werte (siehe Tab. 2.4.9))

2.5 Digitale Auswertung der Plasmodien

Die im ersten Teil der Studie vorgenommene Einteilung der Plasmodien in die verschiedenen Gruppen basiert auf der Bewertung der Plasmodien nach ihrer Lage im Erythrozyten und der Kern-Plasma-Relation der Plasmodien. Diese erlauben die Einordnung der Plasmodien in Gruppen. Um diese Veränderungen zu verifizieren und objektive Größen der beobachteten Parameter zu erhalten, habe ich im Folgenden Digitalfotos der Plasmodien angefertigt und am Computer ausgewertet.

2.5.1 Parameter zur Vermessung am Computer

Folgende Parameter wurden am Computer vermessen (vgl. *Abb. 2.5.1 und Abb. 2.5.2*):

1. Größe der Erythrozyten
2. Größe der Plasmodien
3. Zytoplasmaband-Durchmesser
4. Kern-Durchmesser

Aus diesen Parametern wurden folgende Relationen berechnet:

5. Kern-/ Plasma-Relation
6. Plasmodien-Erythrozyten-Relation

2.5.1.1 Größe der Erythrozyten

Hierfür habe ich den größten Durchmesser der von Plasmodien infizierten Erythrozyten bestimmt (*Abb. 2.5.2 a*). Bei ovalen oder deformierten Erythrozyten wurde ebenfalls jeweils der größtmögliche zu messende Durchmesser gemessen. Der Erythrozyten-durchmesser wurde zur Bestimmung der Relation der Plasmodien zum Erythrozyten verwendet.

2.5.1.2 Größe der Plasmodien

Der größte Durchmesser des Plasmodiums wurde gemessen. Bei ovalen Plasmodien wurde wie auch bei morphologisch gestörten Plasmodien der maximal messbare Durchmesser bestimmt (*Abb. 2.5.1 a & Abb. 2.5.2 b*).

2.5.1.3 Plasmodien-Erythrozyten-Relation

Die Breite des Plasmodiums wurde in Relation zum Erythrozyten gesetzt, um die Plasmodien-Größe am Lichtmikroskop einschätzen zu können.

2.5.1.4 Zytoplasmaband-Durchmesser

Der Querdurchmesser des Zytoplasmabandes wurde an der breitesten Stelle gemessen (*Abb. 2.5.1 b*). Bei pyknotischen Formen ohne erkennbares Zytoplasma wurde die Breite des Zytoplasmas ohne Wert belassen und somit nicht in die Auswertung miteinbezogen.

2.5.1.5 Kerndurchmesser

Der Querdurchmesser des Kerns wurde gemessen. Bei Plasmodien mit mehreren Kernen wurde der größere Kern gewählt, bei ovalen Kernen der schmalere Durchmesser bestimmt (*Abb. 2.5.1 c*).

2.5.1.6 Kern-Plasma-Relation

Die Kern-Plasma-Relation wurde aus dem Kerndurchmesser und der Zytoplasmabreite berechnet. Wie auch im ersten Teil der Studie wurde somit die Breite des Zytoplasmas in direkten Vergleich mit dem Querdurchmesser des Plasmodienkerns gesetzt. Dieser Parameter hat gegenüber den absoluten Größen der Einzelparameter durch die gute Beurteilbarkeit am Lichtmikroskop seine Bedeutung.

Wie auch bei der direkten Bestimmung am Lichtmikroskop kann dieser Parameter in 3 Gruppen unterteilt werden:

1. Zytoplasmabandbreite < Kerndurchmesser
2. Zytoplasmabandbreite zwischen 1 bis 2-fachem Kerndurchmesser
3. Zytoplasmabandbreite größer 2-fachem Kernquerdurchmesser

2.5.2 Erstellung der Digitalfotografien und Auswertung der Parameter

Da im ersten Teil der Studie hauptsächlich die ersten Stunden nach Therapie von Interesse sind, wurden die Plasmodien vor Therapie, dann bis zur 11. Stunde stündlich und danach zu jeder dritten Stunde bis zur 20. Stunde nach Therapiebeginn vermessen.

2.5.3 Auswertung der Parameter

Bei der Auswertung der Parameter habe ich den Median mit Standardabweichung verwendet. Zur graphischen Darstellung wurde zum Vergleich von absoluten Größen ein Boxplot mit Median, den Quartilen und dem Minimal- und Maximalwert angewendet, wobei die Ordinate die gemessenen Größen in μm und die Abszisse den Therapieverlauf in Stunden nach Therapiebeginn zeigt.

Zum prozentualen Vergleich von Gruppen kommen Balkendiagramme zur Anwendung: auf der Ordinate ist der prozentuale Anteil der Gruppen (in Prozent von hundert) angegeben, die Abszisse zeigt wiederum die Zeit nach Beginn der Therapie in Stunden an.

2.5.4 Auswertung der Plasmodien-Größe

Zunächst wurde die Plasmodien-Größe als absolute Größe mittels Median und Standardabweichung über den Therapieverlauf analysiert. Die graphische Darstellung erfolgt im Boxplot.

Im weiteren sind die Daten der obig gewonnenen Informationen zur Beurteilung der Plasmodien-Größen zu Gruppen zusammengefasst und die Verteilung dieser wird über den Therapieverlauf in Balkendiagrammen analysiert.

Um eine Relevanz dieser Daten für die praktische Anwendung bei der Einteilung am Lichtmikroskop abzuleiten, wurden die Plasmodien-Durchmesser in Relation zum Erythrozyten-Durchmesser gesetzt. Diese Werte sind ebenfalls im Balkendiagramm mit prozentualem Anteil der Gruppen auf der Abszisse und dem Therapieverlauf auf der Ordinate abgebildet.

2.5.5 Auswertung der Zytoplasmabandbreite

Die Breite des Zytoplasmabandes wurde wie auch die Plasmodien-Größe zunächst als absolute Größe mit Median, Standardabweichung und anschließend graphisch im Boxplot analysiert.

Anschließend habe ich in Anlehnung an den ersten Teil der Studie das Zytoplasma in Relation zum einfachen und doppelten Kerndurchmessers über den Verlauf der Therapie im Balkendiagramm betrachtet. Zudem wird der Einfluss des Kern-Querdurchmessers auf die Ausprägung der Kern-Plasma-Relation über den Verlauf der Therapie anhand eines Vergleichs der Zytoplasmabandbreite mit einem fixen Wert untersucht. Hierfür wurde als Vergleichsparameter ein aus dem Mittelwert aller gemessenen Kerne bestimmter Wert zu Hilfe genommen.

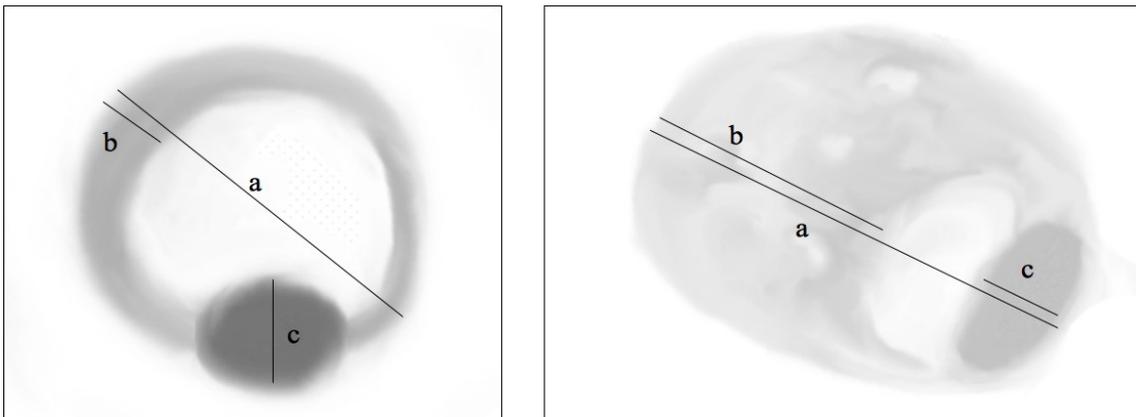


Abb. 2.5.1: Plasmodien (Skizzen) mit gemessenen Parametern: a) Durchmesser des Trophozoiten, b) Durchmesser des Zytoplasmas, c) Querdurchmesser des Kerns ^[23]

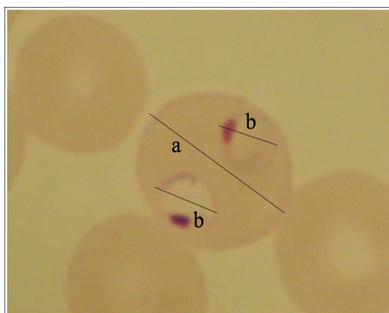


Abb. 2.5.2: Erythrozyt mit Plasmodien ^[23]
a) Erythrozyten-Durchmesser
b) Plasmodien-Durchmesser

2.6 Untersuchung der Plasmodien *in vitro*

Da die im ersten Studienabschnitt beobachteten Veränderungen bei noch unbehandelten Patienten vor Beginn der Therapie nicht zu sehen sind, und die Infektion bereits einige Tage bevor der Patient in die Klinik kam bestand (vgl. Kapitel 2.2), kann davon ausgegangen werden, dass die Veränderungen der Plasmodien durch den Einfluss der Therapie entstehen. Hier stellt sich nun die Frage, in wiefern diese Veränderungen Folge der direkten Wirkung der Medikamente auf die Plasmodien sind oder durch eine medikamentös bedingte verminderte Sequestration reiferer Plasmodien verursacht werden.

Zur Klärung dieser Frage wurde eine *in vitro*-Studie von *P. falciparum* in zwei Serien angefertigt. In der ersten Serie habe ich Plasmodien unter Chinin und in einer zweiten Serie ohne therapeutischen Einfluss beobachtet.

Ziel hierbei ist, alle natürlichen Entwicklungsstadien der Kontrollgruppe aufzuzeigen und mit den Plasmodien unter Medikation zu vergleichen. Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten sollen den Rückschluss über den Einfluss der Medikation auf die sichtbaren Veränderungen der Plasmodien *in vivo*-Studie geben (vgl. vorhergehende Studienabschnitte).

2.6.1 Bewertung der Ausstriche und Plasmodien

Beim Auswerten der *in vitro*-Ausstriche am Lichtmikroskop und der Fotodokumentation der Plasmodien fällt auf, dass gewisse Unterschiede der Plasmodien der Blutausstriche der Kulturen zu den Plasmodien *in vivo* bestehen. Diese machen einen direkten Vergleich schwierig.

2.6.1.1 Plasmodien-Formen

In den Blutausstrichen der Kulturen sind im Gegensatz zu den Blutausstrichen des Patienten prinzipiell *alle Formen* des erythrozytären Entwicklungszyklus der Plasmodien von Ringformen bis zu Schizonten zu sehen (Abb. 2.6.1, Tab. 2.6.1), da eine Sequestration der reifen Plasmodien-Formen in den Kapillaren nicht stattfindet.

So habe ich in diesem Studienteil die *in vitro*-Plasmodien zunächst nach dem Vorkommen der Entwicklungsstadien im Erythrozyten im Verlauf der Therapie analysiert und bin folgend auf strukturelle Unterschiede zwischen den Plasmodien der *in vitro*-Serien eingegangen. Die Strukturen wurden folgend mit den Plasmodien des Patienten auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede verglichen.

2.6.1.2 Plasmodien-Strukturen

Die in den vorangehenden Studienteilen beschriebenen Strukturen und deren Veränderungen während der Therapie betreffen die Ringformen, da diese in den Ausstrichen *in vivo* sichtbar sind (s.o.). So ist zum Bearbeiten der Fragestellung ein Vergleich der Ringformen der Studien sinnvoll. Jedoch können die Ringformen der *in vitro*-Serien nicht wie in der *in vivo*-Untersuchung größtenteils dünnen Ringen, sondern Ringformen mit verbreitertem Zytoplasmaband (Zytoplasma > 2x Kern) zugeordnet werden. Hinzu kommt, dass viele Plasmodien der *in vitro*-Serie bereits zu Beginn in ihrer Morphologie gestört sind. Dies zeigt sich ebenfalls in den folgenden Stunden nach Therapiebeginn der *in vitro*-Serien. Auf eine Einteilung in Gruppen wie im ersten Studienabschnitt musste ich in diesem Studienabschnitt verzichten, da bei der Einteilung der Ringe in die Gruppen I-III (vgl. Kapitel 2.5.) der Hauptteil der Ringformen der Gruppe III oder gar der Gruppe VI zugeordnet werden müsste.

Ein Vergleich der Studien konnte dennoch durch Analyse der Struktur des Zytoplasmas erfolgen.

2.6.1.3 Synchronisationsproblem

Im Vergleich der Ausstriche beider *in vitro* Serien fällt auf, dass die Plasmodien der Chinin-Serie in den Ausstrichen *vor* Zugabe von Chinin in stark gestörten Formen vorliegen. In der Kontroll-Serie ist dies nicht der Fall. Die beiden Serien dürften zu diesem Zeitpunkt jedoch keine Unterschiede der Plasmodien zeigen, da diese aus der selben Kultur stammen und somit identisch sein müssten. Zugrunde liegt diesem Befund ein Schaden der Plasmodien durch die übliche Synchronisation. Die Plasmodien der folgenden Blutausstriche der Chinin-Serie weisen diese Problematik nicht mehr auf.

2.6.2 Vergleich der *in vitro*-Ausstriche: Chinin- & Kontroll-Serie

Zum Vergleich der *in vitro*-Serien habe ich diese nach den Plasmodien-Formen der asexuellen Entwicklungsstadien und deren Vorkommen über den zeitlichen Verlauf beurteilt. Es erfolgte die Einteilung von jeweils 100 Plasmodien aus randomisierten Blutausstrichen der *in vitro*-Serien in Ringformen, Trophozoiten, reifen Trophozoiten und Schizonten (Tabelle 2.6.1, Abb. 2.6.1). Unter die „Trophozoiten“ wurden ebenfalls junge Trophozoiten mit noch diskret sichtbarer Vakuole eingeteilt. Plasmodien wurden, solange diese als Ringstruktur erkennbar waren, den Ringformen zugeteilt, auch bei deutlich gestörten Formen.

2.6.2.1 Graphische Darstellung der Verteilung der *in vitro*-Serien

Das Vorkommen der unterschiedlichen Formen über den Therapieverlauf wurde graphisch mit Hilfe von Balken-Diagrammen dargestellt. Hierbei wird auf der Abszisse der Verlauf der Therapie bzw. des Plasmodienzyklus in Stunden und auf der Ordinate der prozentuale Anteil der Plasmodien in den Gruppen zu den jeweiligen Stunden aufgetragen.

2.6.3 Vergleich der *in vitro*-Serien mit den *in vivo*-Plasmodien

Die Plasmodien der beiden *in vitro*-Serien wurden im weiteren nach strukturellen Unterschieden der vorkommenden Formen verglichen und die strukturellen Unterschiede anschließend im Vergleich zu den *in vivo*-Plasmodien analysiert. Hierfür habe ich die Plasmodien in den Blutausstrichen jeweils am Lichtmikroskop fotografiert und nach Form und Struktur verglichen.

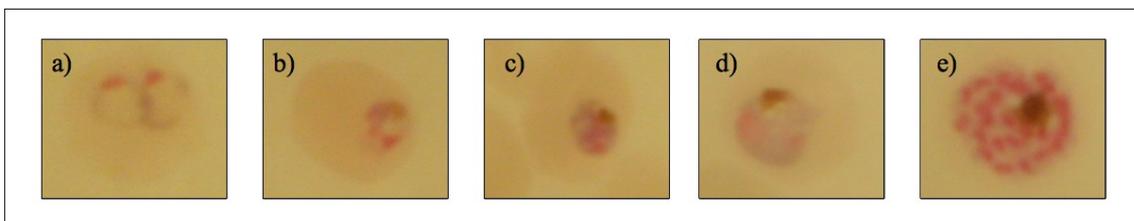


Abb. 2.6.1: Plasmodien-Formen der *in vitro*-Studie (Kontroll-Serie): ^[23]
 a) Ringformen, b) junger Trophozoit, c) Trophozoit, d) reifer Trophozoit, e) Schizont

In vitro-Studie: Formen der Plasmodiena) Ringformen

Zu diesen wird jegliche Ringform der Kulturen gezählt und weiter in intakte Ringe und gestörte Ringformen unterteilt. Die Plasmodien dieser Gruppe haben einen Kern und eine Vakuole die von einem Zytoplasmaband unterschiedlicher Breite und Struktur umschlossen wird. Es erfolgt keine weitere Unterteilung nach der Kern-Plasma-Relation, da bereits vor Therapiebeginn nur sehr wenige Plasmodien mit sehr dünnem Zytoplasma in den Ausstrichen sichtbar sind.

b) junge Trophozoiten

Trophozoiten an der Grenze zu den Ringformen. Eine diskrete Vakuole ist nahe dem Kern sichtbar, ansonsten Tendenz zu den Trophozoiten: das Zytoplasma zeigt eine inhomogene Struktur mit Verdichtungen (*siehe unter c*).

c) Trophozoiten

Leicht vergrößerte Plasmodienform, ohne zentrale Vakuole und dadurch von den Ringformen abgrenzbar. Zudem Unregelmäßigkeiten des Zytoplasma mit Strukturverdichtungen, beginnenden rot-gefärbten Bereichen oder Vakuolen im Zytoplasma. Die Plasmodien sind in der Größe kleiner als der halbe Erythrozyten-Durchmesser.

d) reife Trophozoiten

Plasmodium größer als die Hälfte des Erythrozyten-Durchmessers. Kernstruktur meist aufgelockert, Zytoplasma mit rot gefärbten Bezirken. Im Unterschied zu den Schizonten weiterhin nur eine Kern abgrenzbar, ansonsten nach Größe und Morphologie den Schizonten ähnlich.

e) Schizonten

Mehrkernige, den Wirtserythrozyten ausfüllende Plasmodienform.

f) Rest

Alle so stark morphologisch gestörte Formen die nicht in die obigen Gruppen eingeordnet werden können.

Tabelle 2.6.1 Plasmodien-Formen der in vitro-Studie

3. Ergebnisse

3.1 Rückgang der Parasitämie unter Therapie

Initial zeigte der Patient eine Parasitämie von 219‰, d.h. jeder 4. bis 5. Erythrozyt war von einem oder mehreren Plasmodien befallen (*Diagr. 3.1.1*). Nach Beginn der Therapie zeigte sich zunächst eine stabile Parasitämie bei durchschnittlich 218‰ (209-224‰). Im weiteren Verlauf erfolgte durch einen partiellen Austausch des Blutes (1.900ml), beginnend 10 min nach der 2. Therapiestunde über die Dauer von ca. 2 Stunden, die rasche Reduktion der Parasitenlast bis zur fünften Stunde auf 50-60‰. Im weiteren Verlauf noch bis zur 22. Stunde Parasitämien über 50‰, folgend über 4 Stunden Parasitämien bei ca. 30‰. Zur 27. Stunde waren noch 12‰ und folgend < 10‰ der Erythrozyten von Plasmodien befallen. Nach 40 Stunden Therapie waren noch 1‰ der Erythrozyten betroffen.

Anhand des Verlaufs der Parasitämie kann erst nach der 22. Stunde auf eine beginnende Wirkung der Therapie geschlossen werden.

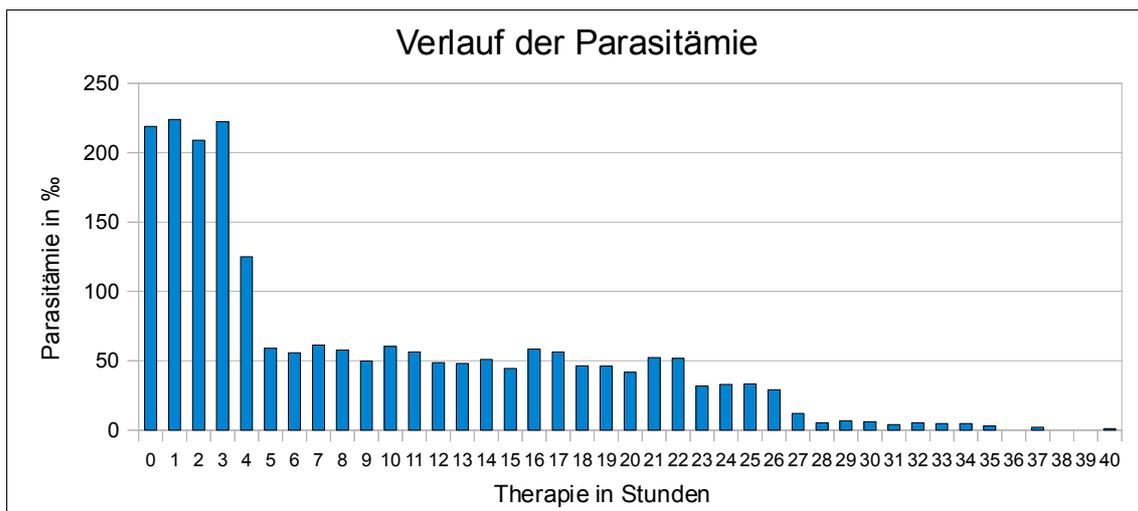


Diagramm 3.1.1: Verlauf der Parasitämie

3.2 Lichtmikroskopische Untersuchung der Plasmodien

Das Vorkommen der zu Gruppen zusammengefassten Plasmodien wurde über die Dauer der Therapie analysiert. Zunächst habe ich die Präsenz der einzelnen Gruppen über den Verlauf der Therapie untersucht und anschließend mit der Häufigkeit der anderen Gruppen verglichen.

3.2.1 Vorkommen der Gruppen I-VI über den Verlauf der Therapie

Folgend wird die Präsenz der einzelnen Plasmodien-Gruppen über den Verlauf der Therapie dargestellt.

3.2.1.1 Gruppe I (Ringformen)

Struktur: Die intakten runden Ringe der Gruppe I - Plasmodien sind von geringer Größe und haben ein dünnes Zytoplasmaband mit homogener Struktur (*Abb.3.2.1, Tab. 3.2.1*).

Vor Therapiebeginn dominieren sie das Bild deutlich im peripheren Blutausschlag und sind im Verlauf der ersten Stunden rasch rückläufig (*Diagramm 3.2.1a/b*). Während vor Therapiebeginn 64% der Plasmodien der Gruppe I zugeteilt werden, sinkt der Anteil der Plasmodien dieser Gruppe in den ersten beiden Stunden der Therapie bereits auf durchschnittlich 27% (22-31%). Nach drei Stunden Therapie liegt der Anteil bei 5%, im weiteren Verlauf zwischen 0-16%.

Bereits eine Stunde nach Therapiebeginn hat sich der Anteil der Gruppe I - Plasmodien mehr als halbiert und diese sind dann nur noch selten im peripheren Blutausschlag zu sehen.

I	<ul style="list-style-type: none"> - Zytoplasma < Kerndurchmesser - intakte, runde Ringe mit geringer Größe - Zytoplasma und Kern homogen, nicht durch Vakuolen aufgelockert
---	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Tabelle 3.2.1: Kriterien der Gruppe I - Plasmodien

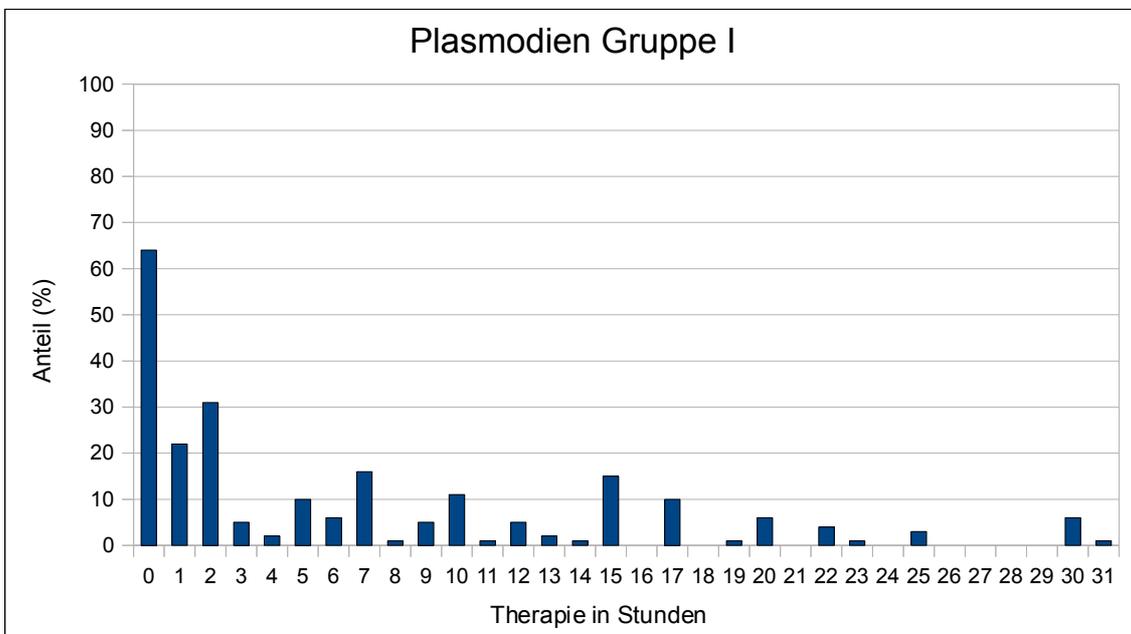
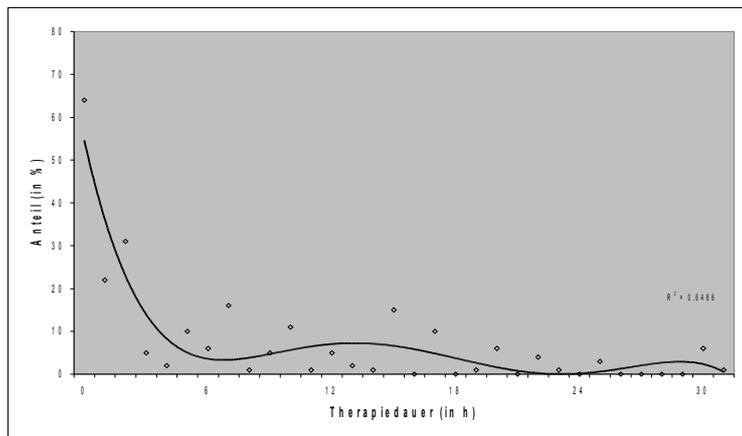
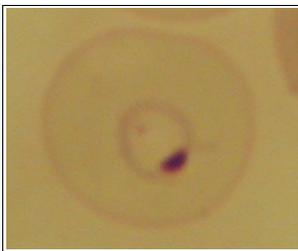


Abbildung 3.2.1, Diagramm 3.2.1a/b: Gruppe I - Plasmodien, im Punktediagramm mit Trendlinie und im Balkendiagramm, Anteil (%) im Therapieverlauf (h) ^[23]

3.2.1.2 Gruppe II (Ringformen)

Struktur: Die Ringformen der Plasmodien der Gruppe II zeigen im Vergleich zur Gruppe I leicht vergrößerte Ringformen mit etwas verbreitertem Zytoplasma. Die Struktur des Zytoplasmabands weist teilweise Inhomogenitäten auf (*Abb. 3.2.2, Tab. 3.2.2*).

Während vor Therapiebeginn 12% der Plasmodien dieser Gruppe zugehören, hat sich deren Anteil nach Beginn der Therapie mit 29% mehr als verdoppelt. Nach einer weiteren Stunde ist mehr als jedes dritte Plasmodium (37%) im peripheren Ausstrich dieser Gruppe zuzuordnen, um über die folgenden vier Stunden durchschnittlich 25% (20-28%) auszumachen.

Ab der 7. bis zur 17. Therapiestunde zeigen die Plasmodien dieser Gruppe eine breite Streuung in ihrem Vorkommen, die Werte schwanken von 4% bis 47% und liegen im Durchschnitt bei 23%. Von der 18. bis 25. Stunde bleiben die Werte bei durchschnittlich 10% (0-20%) und ab der 26. Stunde zwischen 1-11% (*Diagr. 3.2.2 a/b*)

Trotz einer großen Spannweite der Werte während der 7. - 17. Stunde kann eine Tendenz zu vermehrtem Vorkommen der Gruppe II innerhalb der ersten Stunden nach Therapiebeginn festgestellt werden.

II	<ul style="list-style-type: none"> - Zytoplasma 1-2 facher Kerndurchmesser - runde Form des Ringes noch intakt, Größenzunahme der Ringe - Zytoplasma homogen oder beginnend inhomogen, keine deutlichen Vakuolen - Plasmodien-Ringe nicht in Gruppe I oder III zuzuordnen (fließender Übergang)
----	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Tabelle 3.2.2: Kriterien der Gruppe II - Plasmodien

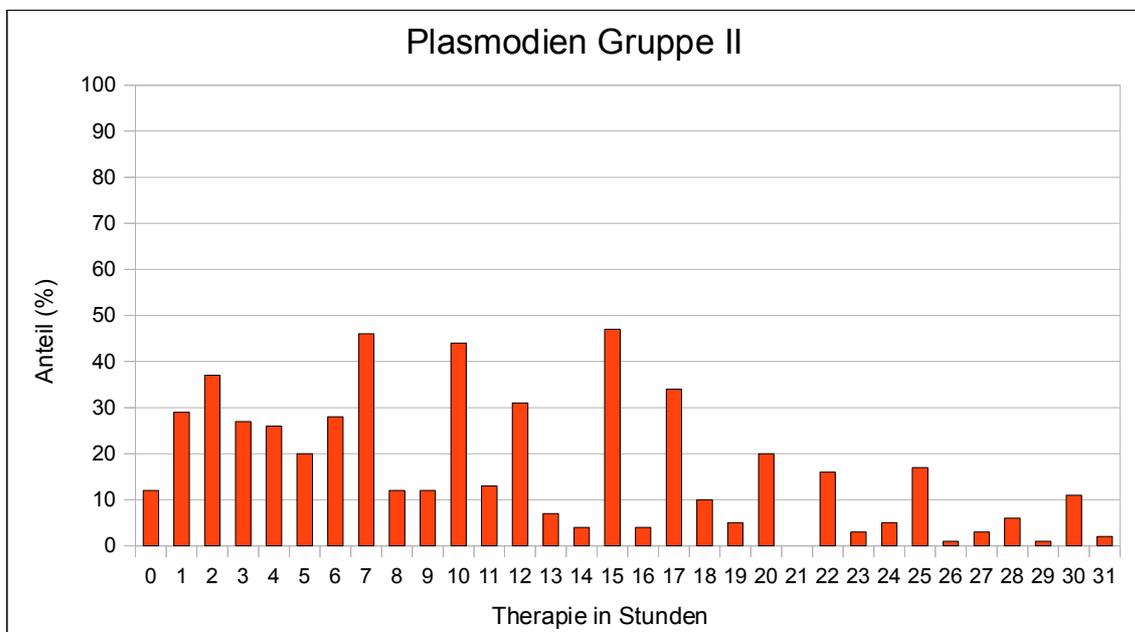
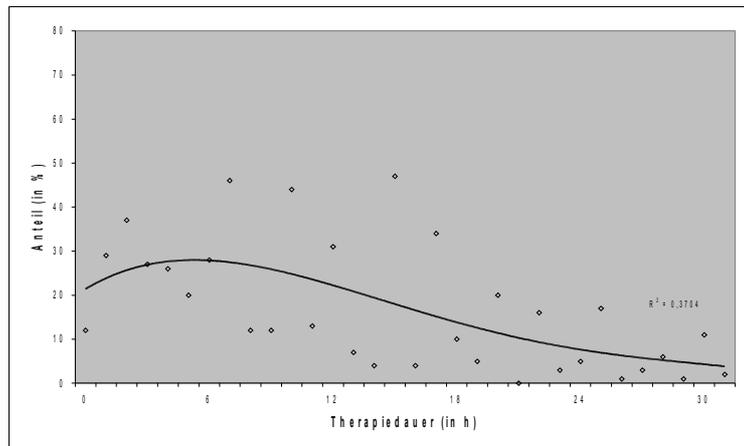
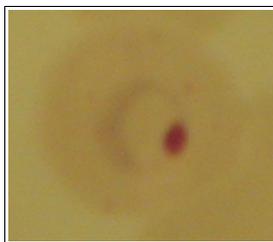


Abbildung 3.2.2, Diagramm 3.2.2a/b: Gruppe II - Plasmodien, im Punktediagramm mit Trendlinie und im Balkendiagramm, Anteil (%) im Therapieverlauf (h) ^[23]

3.2.1.3 Gruppe III (Ringformen)

Struktur: Im Unterschied zu den Ringformen der Gruppe I und II haben diese Plasmodien ein über den doppelten Kerndurchmesser verbreitertes Zytoplasmaband mit vakuolenhaltiger, inhomogener Struktur und zeigen hierdurch leichte Unregelmäßigkeiten in der Plasmodien-Form (*Abb.3.2.3, Tabelle 3.2.3*).

Vor Therapiebeginn sind 4% der im peripheren Blutausstrich sichtbaren Plasmodien in dieser Gruppe. Nach Therapiebeginn steigt der Anteil in den ersten beiden Stunden auf durchschnittlich 14% (8-19%), um dann von der 3. bis 5. Stunde mehr als 40% (40-45%) der Plasmodien auszumachen. Im weiteren zeigen die Plasmodien dieser Gruppe – wie auch die Plasmodien der Gruppe II – eine breite Streuung der Werte von der 6. bis 17. Stunde um durchschnittlich 39% (11-69%). Von der 18. bis 21. Stunde gehören im Mittel 47% (39-53%) den Gruppe III - Plasmodien an, um im weiteren Verlauf von der 22. bis 26. Stunde mit fallender Tendenz auf zunächst 39% (23-51%) und im weiteren von der 27. bis 31. Stunde auf durchschnittlich 21% (8-31%) zurückzugehen (*Diagr. 3.2.3*).

Es besteht eine große Spannweite der Werte, dennoch ist eine Tendenz über das Vorkommen der Plasmodien im Verlauf der Therapie auszumachen:

Vor Therapiebeginn ist die Gruppe III kaum im peripheren Ausstrich zu sehen. Mit beginnender Therapie steigt deren Anteil nach der 3. Stunde bis max. 69% an, um im späteren Verlauf nach der 26. Stunde wieder zurückzugehen.

III	<ul style="list-style-type: none"> - Zytoplasma breiter als doppelter Kerndurchmesser - Ringform in der „runden & gleichmäßigen“ Form gestört mit Größenzunahme - Zytoplasma und Kern verbreitert, inhomogen mit Vakuolen und Verdichtungen
-----	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Tabelle 3.2.3: Kriterien der Gruppe III - Plasmodien

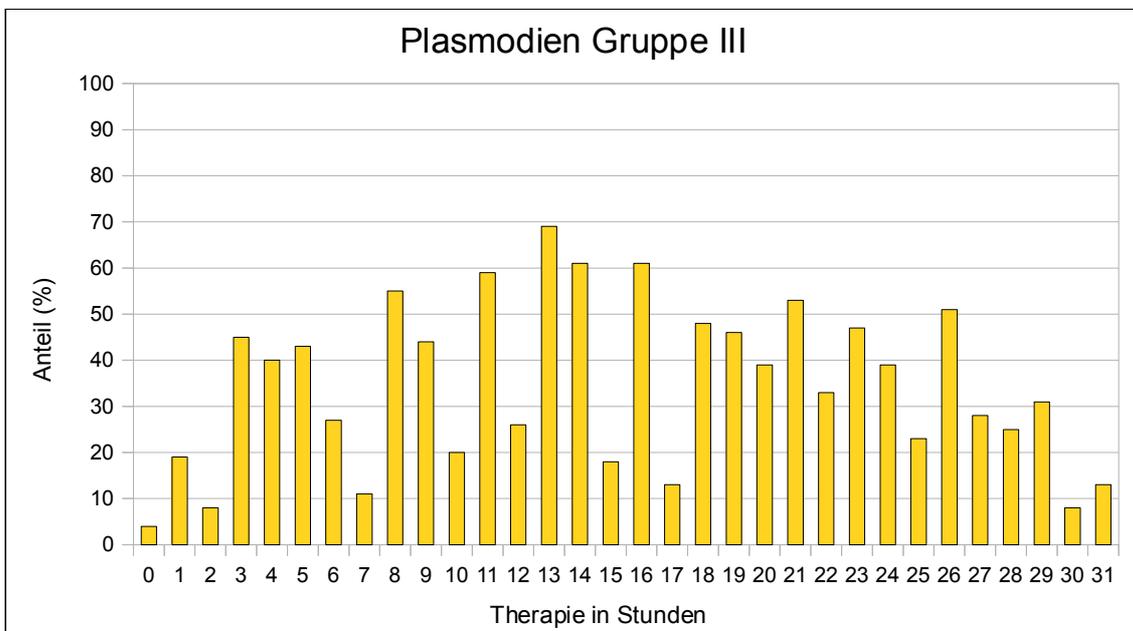
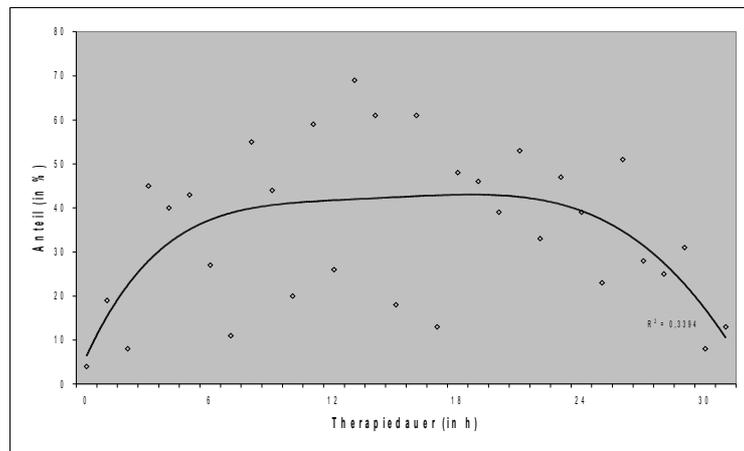
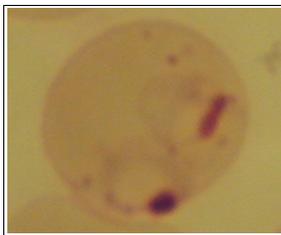


Abbildung 3.2.3, Diagramm 3.2.3a/b: Gruppe III - Plasmodien, im Punktediagramm mit Trendlinie und im Balkendiagramm, Anteil (%) im Therapieverlauf (h) ^[23]

3.2.1.4 Gruppe IV (Accolés)

Die Accolé-Formen der Gruppe IV mit ihrem vollständig dem Erythrozyten anliegenden Kern und Zytoplasma (*Abb.3.2.4, Tabelle 3.2.4*) kommen mit stets $\leq 9\%$ im Verlauf der Therapie vor und sind ohne Charakteristika zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach Therapiebeginn (*Diagramm 3.2.4a/b*).

Es kann kein charakteristisches Vorkommen der Accolé-Formen im Verlauf der Therapie beobachtet werden.

IV	Accolé – Form: - Zytoplasma ganz an die Erythrozyten-Membran angeschmiegt - keine zentrale Vakuole sichtbar
----	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Tabelle 3.2.4: Kriterien der Gruppe IV - Plasmodien

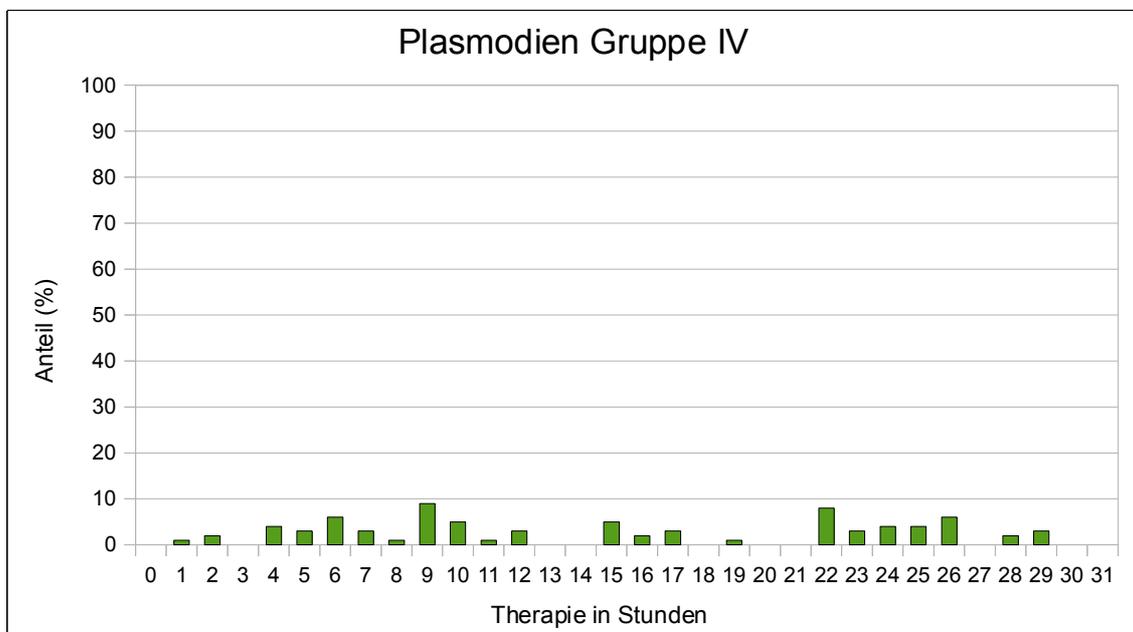
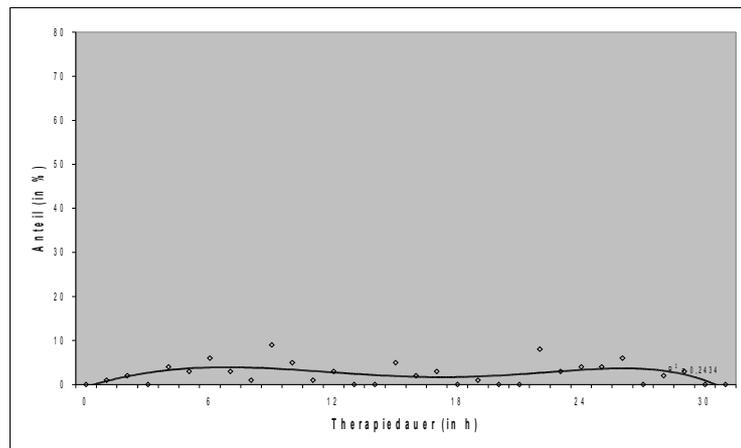


Abbildung 3.2.4, Diagramm 3.2.4a/b: Gruppe IV - Plasmodien, im Punktediagramm mit Trendlinie und im Balkendiagramm, Anteil (%) im Therapieverlauf (h) ^[23]

3.2.1.5 Gruppe V (Accentués)

Dieser Gruppe der Plasmodien, welche die Kontinuität der Erythrozytenmembran stören und die Erythrozyten-Membran hervorwölben (*Abb.3.2.5, Tabelle 3.2.5*), sind in den ersten sechs Stunden nach Therapiebeginn weniger als 2% der Plasmodien zuzuordnen. Ab der 7. bis zur 12. Stunde bleibt die Anzahl bei durchschnittlich 5% (0-7%) um im weiteren zunehmend im Bild des peripheren Ausstrichs sichtbar zu sein. So sind von der 13.-17. Stunde im Mittel 13% (6-22%) in dieser Gruppe. Von der 18. bis 23. Stunde erreicht die Anzahl der Plasmodien 24% (11-32%) um im weiteren von der 24. bis 28. Stunde ihren Höhepunkt mit durchschnittlich 34% (22-45%) zu erreichen. Im weiteren gehen die Plasmodien dieser Gruppe wieder von der 29. bis 31. Stunde auf 23% (18-31%) zurück (*Diagramm 3.2.5a/b*).

Die Accentué-Formen sind initial kaum im peripheren Blutaussstrich zu sehen und kommen zunehmend mit fortschreitender Therapie im peripheren Blutaussstrich vor.

V	<p>“Accentué” – Form: Kontinuität der Erythrozytenmembran wird durch sich stark vorwölbende Plasmodien gestört.</p>
---	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Tabelle 3.2.5: Kriterien der Gruppe V - Plasmodien

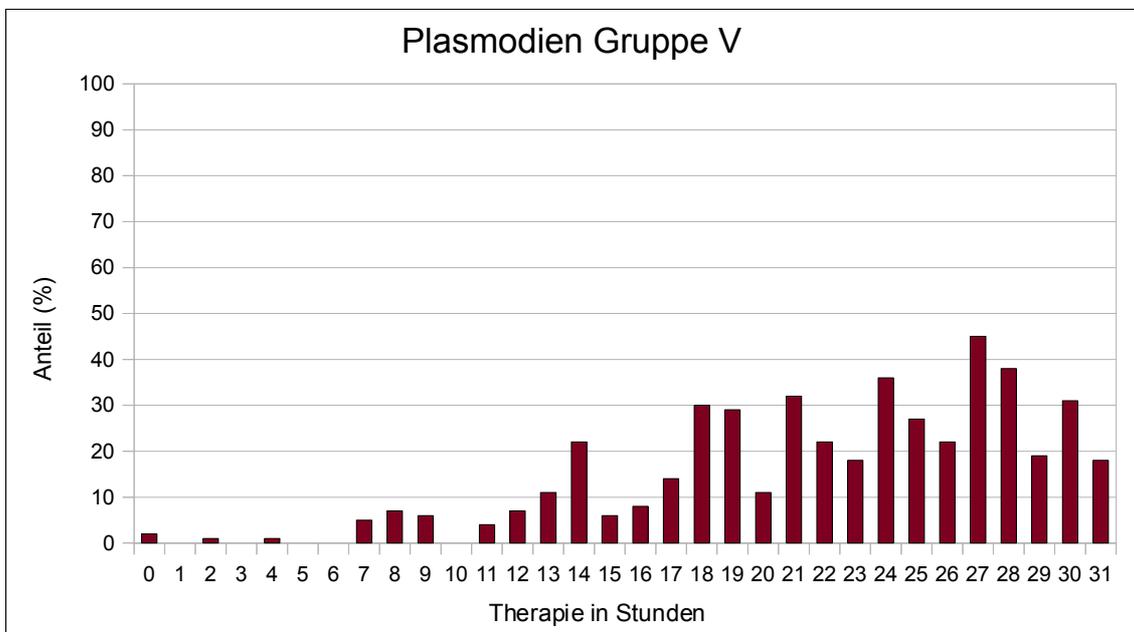
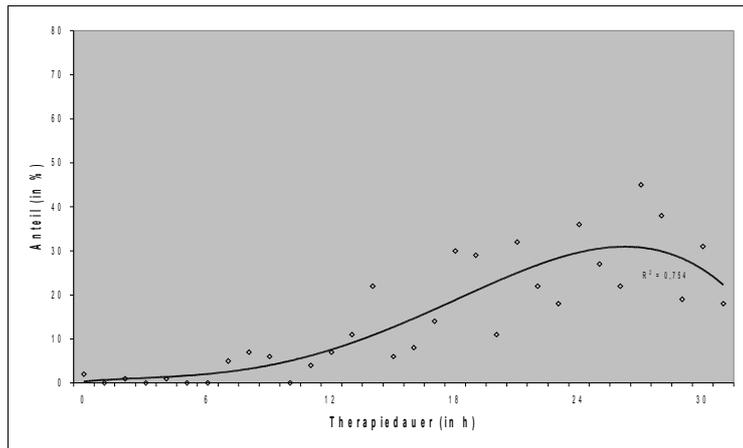
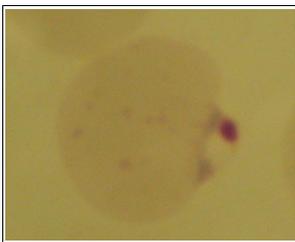


Abbildung 3.2.5, Diagramm 3.2.5a/b: Gruppe V - Plasmodien, im Punktediagramm mit Trendlinie und im Balkendiagramm, Anteil (%) im Therapieverlauf (h) ^[23]

3.2.1.6 Gruppe VI (Restgruppe)

Bereits vor Beginn der Therapie sind 18% der Plasmodien keiner der obigen Gruppen zuzuordnen. Bis 12 Stunden nach Therapiebeginn bleibt deren Anteil bei durchschnittlich 25% (19-33%) der Gesamtplasmodienzahl. Im weiteren sinkt der Anteil von der 13.-24. Stunde auf im Mittel 18% (9-28%), um mit weiter fortschreitender Therapie (25.-28. Stunde) auf 25% (20-29%) anzusteigen. Daraus folgt, dass insgesamt bis zur 28. Stunde im Durchschnitt 22% (9-33%) dieser Gruppe angehören. Im weiteren Verlauf beginnt der Anteil dieser Gruppe stark zuzunehmen, von der 29. bis 31. Stunde sind durchschnittlich 52% (44-66%) hier einzuteilen (*Abb.3.1.6, Tabelle 3.2.6, Diagramm 3.2.6 a/b*).

Die Plasmodien der Restgruppe machen bis zur 28. Stunde etwa ein Viertel der Plasmodien aus, um dann stark anzusteigen.

VI	Plasmodien morphologisch nicht in die anderen Gruppen einzuteilen
----	-------------------------------------------------------------------

Tabelle 3.2.6: Kriterien der Gruppe VI - Plasmodien

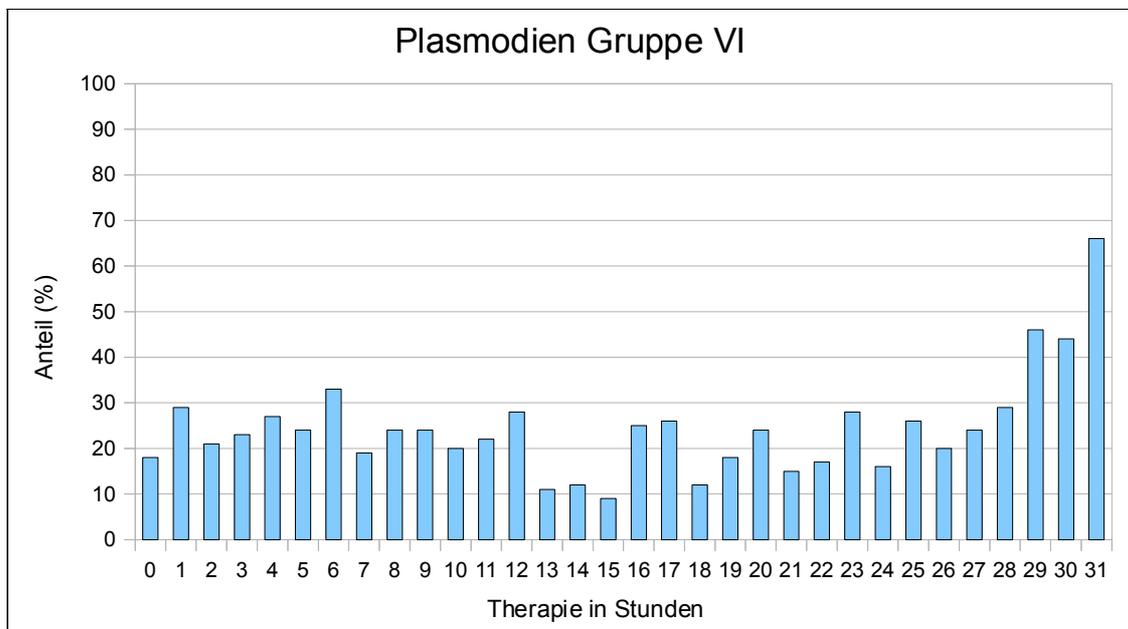
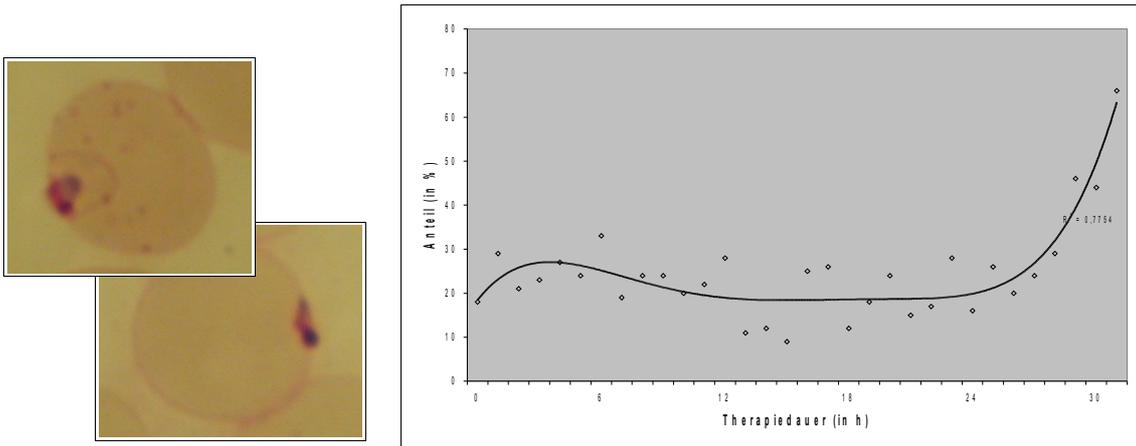


Abbildung 3.2.6, Diagramm 3.2.6a/b: Gruppe VI - Plasmodien, im Punktediagramm mit Trendlinie und im Balkendiagramm, Anteil (%) im Therapieverlauf (h) ^[23]

3.2.2 Vergleich der Gruppen

Die Gruppen einzeln betrachtet zeigen ein unterschiedliches Vorkommen der Plasmodien-Gruppen über den Verlauf der Therapie. Ein direkter Vergleich verdeutlicht dies nun im Folgenden.

Zunächst werden die Ringformen gemeinsam im Vergleich zu den Gruppen ohne typische Ringstruktur betrachtet (Gruppe I+II+III vs. Gruppe V und VI). Im weiteren werden dann die Einzelgruppen der Ringformen untereinander verglichen (Gruppe I, II & III).

Die Plasmodien der Gruppe IV (Accolé-Form) kommen in nur geringem Ausmass über den Verlauf der Therapie vor und zeigen zudem kein charakteristisches Vorkommen über die Zeit, so dass ich im Folgenden auf die Plasmodien dieser Gruppen nicht näher eingehen werde und die Ausführungen auf die Gruppen I-III, V und VI beschränke.

3.2.2.1 Ringformen vs. Accentué-Formen und Restgruppe

Zur besseren Übersicht werden die Ringformen in den folgenden Diagrammen einheitlich gefärbt dargestellt (*Diagr. 3.2.7*) und zusammengefasst als „Ringformen“ mit den Plasmodien der Accentué- und Restgruppe verglichen (*Diagr. 3.2.8, Diagr. 3.2.9*).

Vor Beginn der Therapie lassen sich 80% der im peripheren Blutausschlag sichtbaren Plasmodien den Ringformen (*Gruppe I, II und III*) zuordnen, das heisst es sind im peripheren Ausschlag größtenteils Ringstrukturen ohne, beziehungsweise mit nur geringem Kontakt zur Erythrozytenmembran sichtbar.

Die die Kontinuität der Erythrozytenmembran unterbrechende Accentué-Formen (*Gruppe V*) kommen vor Beginn der Therapie hingegen mit 2% nur sehr selten vor, und 18% der Plasmodien sind in ihrer Morphologie so gestört, dass sie der Restgruppe zugehören.

Die Gesamtzahl der **Ringstrukturen** (*Gruppe I-III*) bleibt im Verlauf der Therapie bis zur 16. Stunde dominierend bei durchschnittlich 70% (61-80%), während die **Accentué-**

Formen ab der 13. Stunde zunehmend vorkommen (13.-17. Stunde: Mittelwert 13%, 6-22%).

Im weiteren Verlauf nehmen die **Accentué-Formen** weiter zu (18.-23.h: Mittelwert 24%, 11-32%) und erreichen zur 24.-28. Stunde mit durchschnittlich 34% (22-45%) ihr Maximum, während die Ringformen ab der 17. Stunde beginnend zurückgehen (17.-23h: Mittelwert 56%, 51-65%; 24.-26.h: Mittelwert 46%, 43-52%; 27.-31.h: Mittelwert 30%, 25-31%).

Die Ring- und Accentué-Formen (*Gruppen I+II+III+V*) gemeinsam machen bis 28 Stunden nach Therapiebeginn durchschnittlich 76% (61-89%) der Plasmodien aus.

Mit beginnendem Rückgang der Accentué-Formen nach 29 Stunden und weiterem Rückgang der Ringformen sinkt der Anteil dieser Plasmodien innerhalb von zwei Stunden auf zunächst $\leq 50\%$, um dann innerhalb weiterer zwei Stunden auf $\leq 40\%$ zurückzugehen.

Die **morphologisch gestörte Formen** (Gruppe VI) nehmen im Gegensatz dazu von zuvor durchschnittlich 22% (9-33%) über die ersten 28 Stunden auf durchschnittlich 45% (44-46%) in der 29. und 30. Stunde und 66% zur 31. Stunde zu.

Vor Beginn der Therapie wird das Bild im peripheren Blutausschlag von Ringformen dominiert. Diese gehen zugunsten zunehmender Accentué-Formen im fortgeschrittenen Verlauf der Therapie zurück. Im weiteren findet ebenfalls ein Rückgang der Accentué-Formen und eine Zunahme der morphologisch gestörten Plasmodien im peripheren Blutausschlag statt.

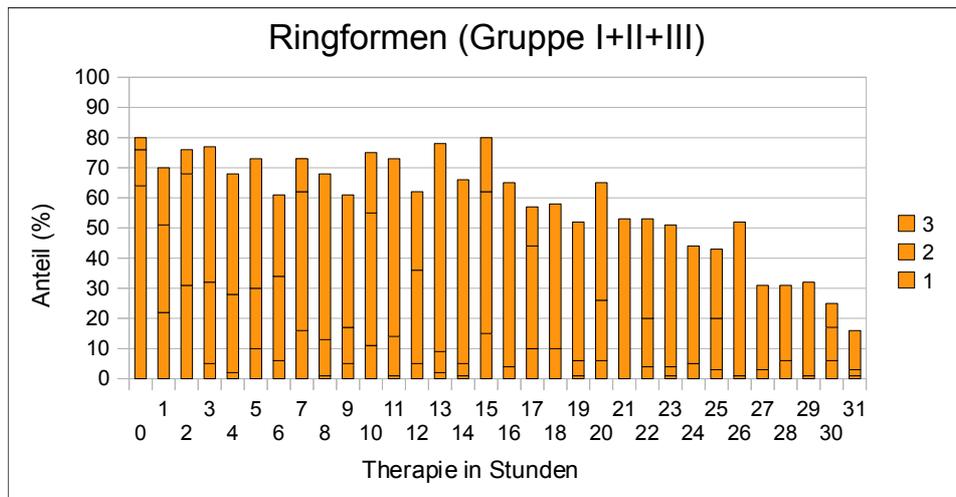


Diagramm 3.2.7: Ringformen im Verlauf der Therapie

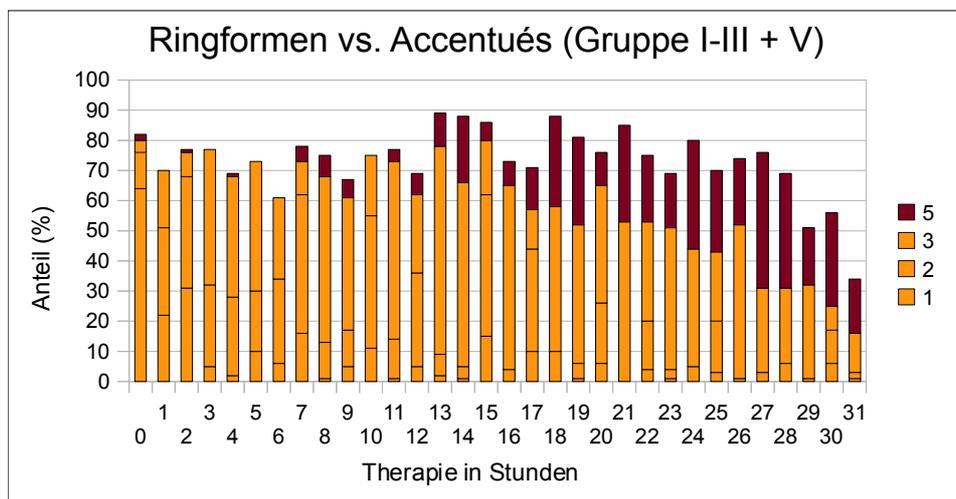


Diagramm 3.2.8: Ringe vs. Accentué-Formen im Verlauf der Therapie

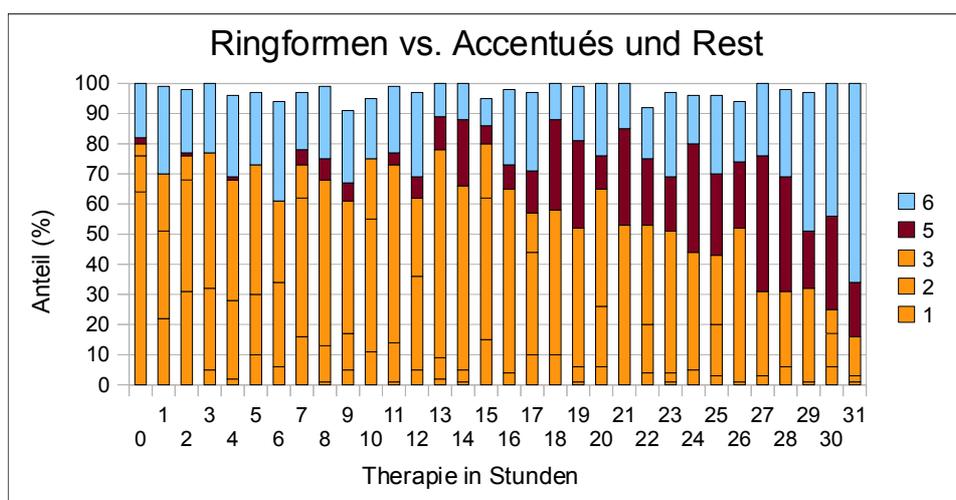


Diagramm 3.2.9: Ringe, Accentués und Rest im Verlauf über die Therapie

3.2.2.2 Vergleich der Ringformen

Nachdem im Vergleich der Ringformen zu der Gruppe V und Gruppe VI eine Veränderung der Plasmodien im weiteren Therapieverlauf gezeigt werden konnte, werden nun die Ringformen mit ihrem relativ konstanten Gesamtvorkommen über die ersten 16 Stunden der Therapie analysiert (*Diagramm 3.2.10*).

Vor Therapiebeginn dominieren die Plasmodien der Gruppe I mit 64%, 12% der Plasmodien sind der Gruppe II zuzuordnen und nur wenige der Ringstrukturen zeigen Charakteristika der Gruppe III.

Nach einer Stunde der Therapie hat sich das Verhältnis der drei Gruppen bereits geändert: die Gruppen I, II und III liegen nun in annähernd gleicher Anzahl mit leichtem Überwiegen der Gruppe II Plasmodien vor (I: 22%, II: 29%, III: 19%).

Die Plasmodien der Gruppe I sind auf $\frac{1}{3}$ ihres Ausgangswertes zurückgegangen (0h: 64% 1h: 22%), der Anteil der Plasmodien der Gruppe II hat sich mehr als verdoppelt (0h: 12% 1h: 29%) und die Plasmodien der Gruppe III haben sich annähernd verfünffacht (0h: 4%, 1h: 19%).

Nach der zweiten Stunde der Therapie ist das Verhältnis der Gruppen ähnlich der Stunde zuvor, die Gruppe II Plasmodien sind weiter etwas häufiger als die der Gruppe I im Ausstrich zu sehen, die Plasmodien der Gruppe III sind weiter nur selten sichtbar (I: 31%, II: 37%, III: 8%).

Nach 3 Stunden bis zur 5. Stunde der Therapie hat sich das Verhältnis der Plasmodiengruppen I-III im Vergleich zu der Situation vor Therapiebeginn gekehrt.

Die Plasmodien der Gruppe I haben nun einen Anteil von durchschnittlich 6% (2-10%), während die Plasmodien der Gruppe III 43% (40-45%) im peripheren Ausstrich ausmachen und somit am häufigsten im peripheren Blutaussstrich sichtbar sind (zuvor 10% (4-19%)). Die Gruppe II-Plasmodien sind wieder leicht rückläufig auf 24% (20%-28%) der Plasmodien.

In der 7. Stunde nach Therapiebeginn erreichen die Plasmodien der Gruppe I nochmals einen Anteil von 16% der Plasmodien, um im weiteren Verlauf bei durchschnittlich 3% (0-15%) zu bleiben.

Die Plasmodien der Gruppen II und III schwanken wie bereits obig beschrieben ab der 6./7. Stunde sehr in ihrem Vorkommen (Gruppe III: Mittelwert 39% (11-69%), Gruppe II: Mittelwert 23% (4% bis 47%).

Ab der 18. Stunde zunehmendes Überwiegen der Gruppe III-Plasmodien bei Rückgang des Anteils der Ringformen.

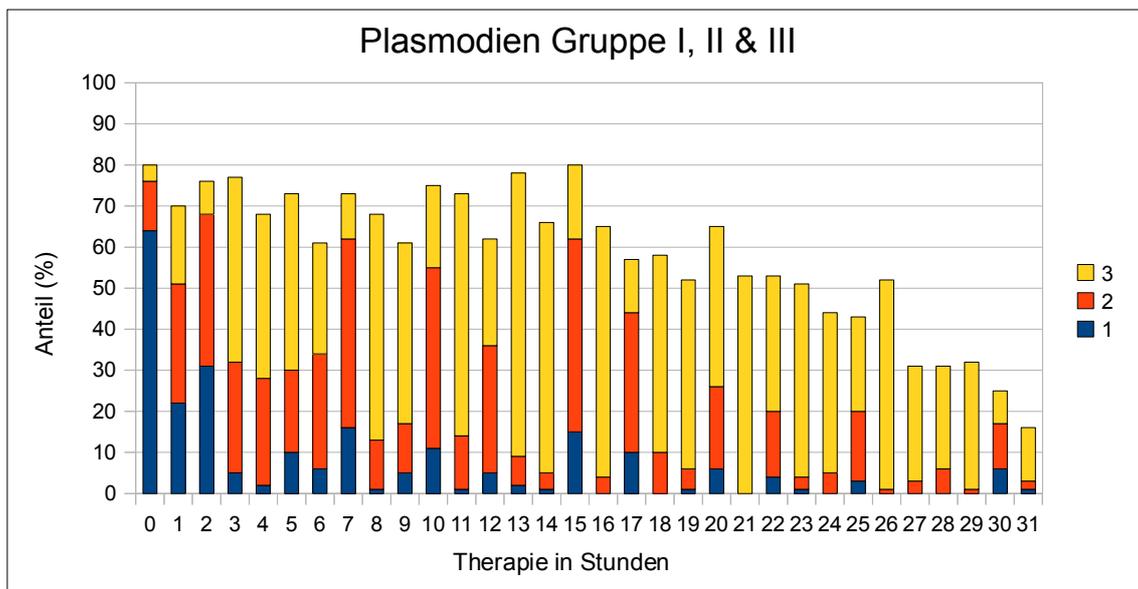


Diagramm 3.2.10: Vergleich der Ringformen (Gruppe I-III)

3.2.2.3 Kombination der Gruppen

Während die Plasmodien der Gruppe I ein Verlauf mit einer Dominanz vor Beginn der Therapie zeigen, weisen **die Plasmodien der Gruppen II und III** im Zeitraum von der 7. bis zur 17. Stunde eine große Streuung der Werte mit bis zu über 40% von einer Stunde zur nächsten auf.

Eine Ursache dieser Streuung könnte an den zu diesem Zeitpunkt vorliegenden

Veränderungen der Struktur des Zytoplasma *und* des Kerns bei Plasmodien sein, welche mit der Kern-Plasma-Relation grenzwertig zwischen der 2. und 3. Gruppe liegen. So sind in diesen Gruppe ein verbreitertes Zytoplasma mit beginnender Vakuolisierung und Inhomogenität und zudem eine Vergrößerung des Kerns festzustellen. Eine im Vergleich zum Kern stärkere Vergrößerung des Zytoplasmas verfälscht die Kern-Plasma-Relation. Die Plasmodien werden hierdurch trotz stärker verbreitertem Zytoplasma noch der Gruppe II zugeordnet.

Bei der Zusammenfassung der Gruppen II und III zu einer Gruppe zeigt sich ein deutlich homogenerer Verlauf der Werte, da sich die Werte dieser Gruppen ergänzen (*Diagramm 3.2.11*).

Bereits in der ersten Stunde nach Beginn der Therapie steigt der Anteil der zusammengefassten Gruppe von zunächst 16% vor Therapiebeginn auf 47% (45-48%). Nach der 3. Therapiestunde steigt die Anzahl der gemeinsamen Gruppe auf 72% an. Dies bedeutet, dass nach drei Stunden der Therapie mehr als 2/3 der im peripheren Ausstrich sichtbaren Plasmodien Ringe ein verbreitertes Zytoplasma besitzen und beginnende Veränderungen der Kern- und Zytoplasmastruktur zeigen.

Bis 16 Stunden nach Therapiebeginn bleibt der Anteil der zusammengefassten Plasmodien bei durchschnittlich 64% (55-76%), um im weiteren Verlauf zurückzugehen.

Beim Vergleich der Gruppe I mit der zusammengefassten Gruppe II und III zeigt sich, dass bei in etwa gleichbleibender Anzahl der Gesamtringformen die Gruppe I -Plasmodien innerhalb der ersten Stunden rasch von Formen mit beginnenden Veränderungen (Gruppe II und III) im peripheren Blutaussstrich abgelöst werden (*Diagramm 3.2.12*).

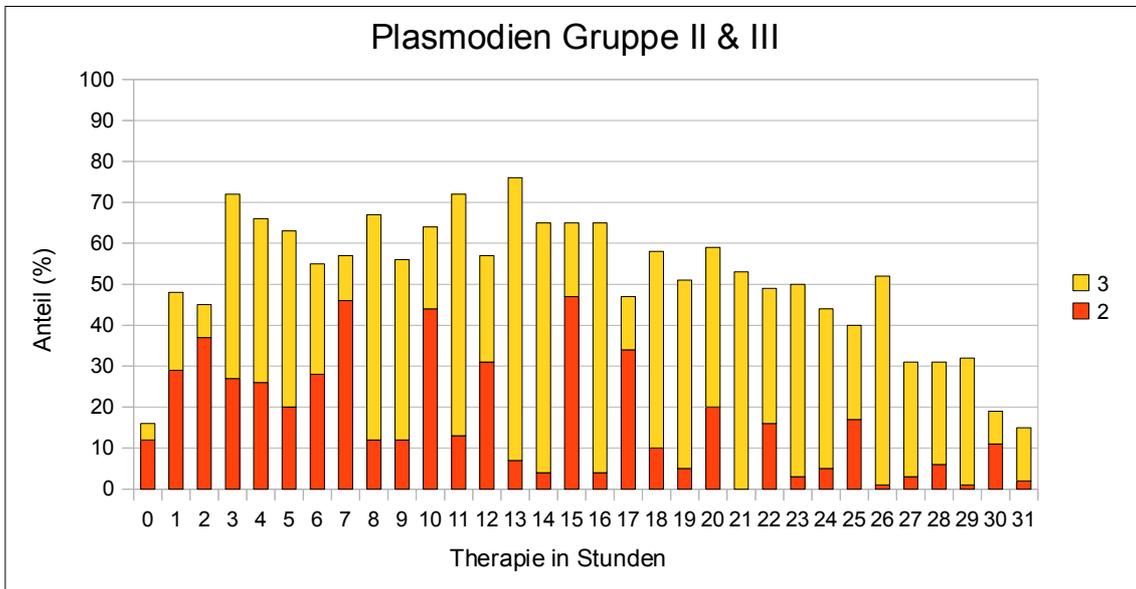


Diagramm 3.2.11: Ringformen II +III im Therapieverlauf

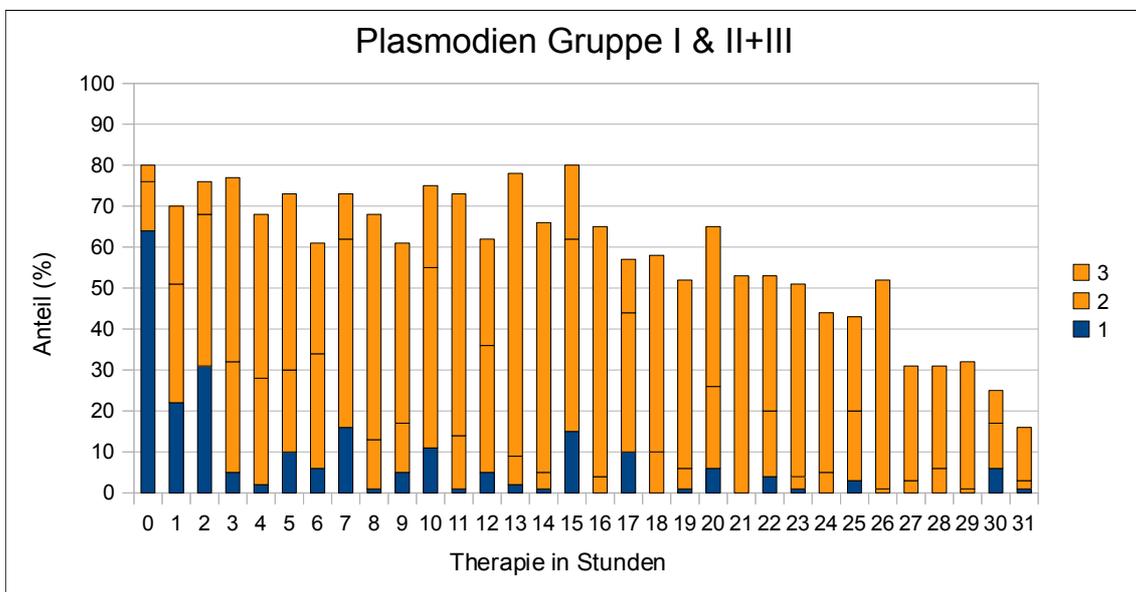


Diagramm 3.2.12: Ringformen I und II +III im Therapieverlauf

3.2.3 Absolutzahlen der Plasmodiengruppen

Um festzustellen, ob die Veränderungen der prozentualen Verteilung der Plasmodien die Folge der Selektion einer bestimmter Plasmodiengruppe ist, wurde die absolute Anzahl der Plasmodien berechnet und mit dem Verlauf der prozentualen Anteile der Plasmodiengruppen verglichen.

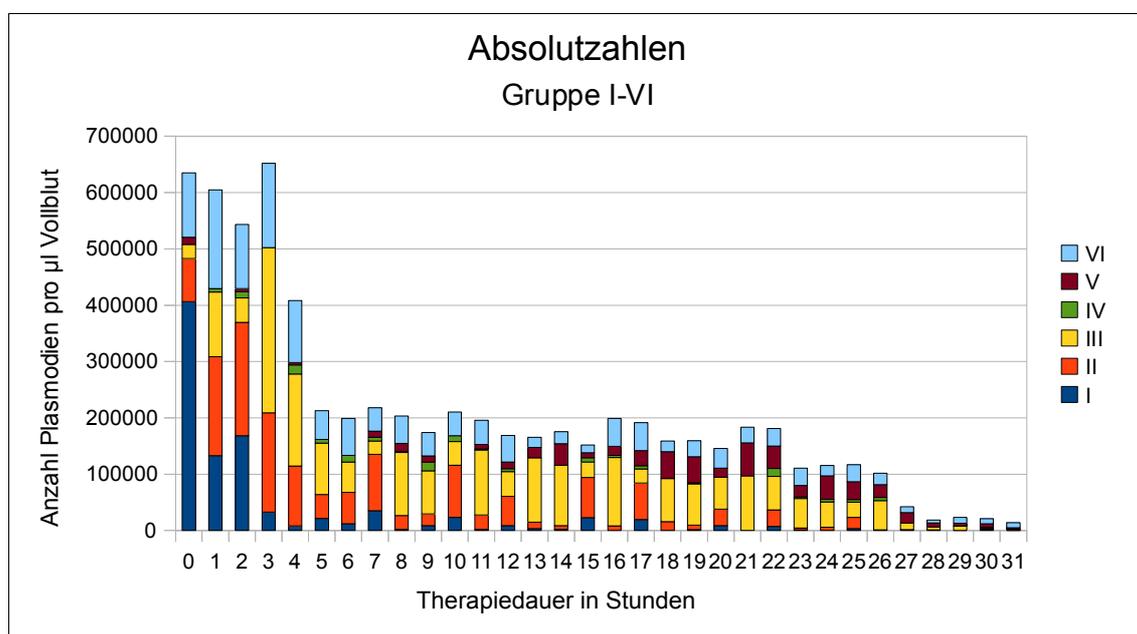


Diagramm 3.2.13: Gesamtzahl der Plasmodien im Therapieverlauf, unterteilt in die Gruppen I-VI

3.2.3.1 Gesamtanzahl der Plasmodien

Die Gesamtzahl der Plasmodien (*Diagr. 3.2.13*) entspricht ungefähr dem Verlauf der Parasitämie (*Diagramm 3.1.1*). Es lassen sich verschiedene Abschnitte erkennen:

Vor Beginn der Therapie bis nach der 3. Stunde befinden sich zunächst im Durchschnitt 620 000 Plasmodien pro Mikroliter (543-652 Tsd./ μl) im Vollblut des Patienten. Die in den ersten Stunden fallenden Werte der Absolutzahlen sind hierbei durch die vor Beginn des partiellen Blutaustauschs infektionsbedingt sinkenden Gesamterythrozytenzahl bedingt (*siehe Diagramm 3.2.14*).

Im Anschluss ist der deutliche Einfluss des partiellen Blutaustausches zu erkennen, der eine Reduktion der Plasmodienzahl über zunächst 408 000 Plasmodien/ μl zur 4. Stunde auf 212 000/ μl zur 5. Stunde bewirkt. Ab diesem Zeitpunkt besteht wieder ein relativ konstantes Niveau mit durchschnittlich 182 000 Plasmodien/ μl (146-218 Tsd./ μl) bis zur 22. Stunde. Im Anschluss fällt die Plasmodienzahl ab der 22. Stunde auf durchschnittlich 113 Tsd./ μl (102-117 Tsd./ μl). Zur 27. Stunde geht diese über zunächst 42 Tsd./ μl auf durchschnittlich 20 Tsd./ μl (14-23 Tsd./ μl) von der 28. bis 31. Stunde zurück.

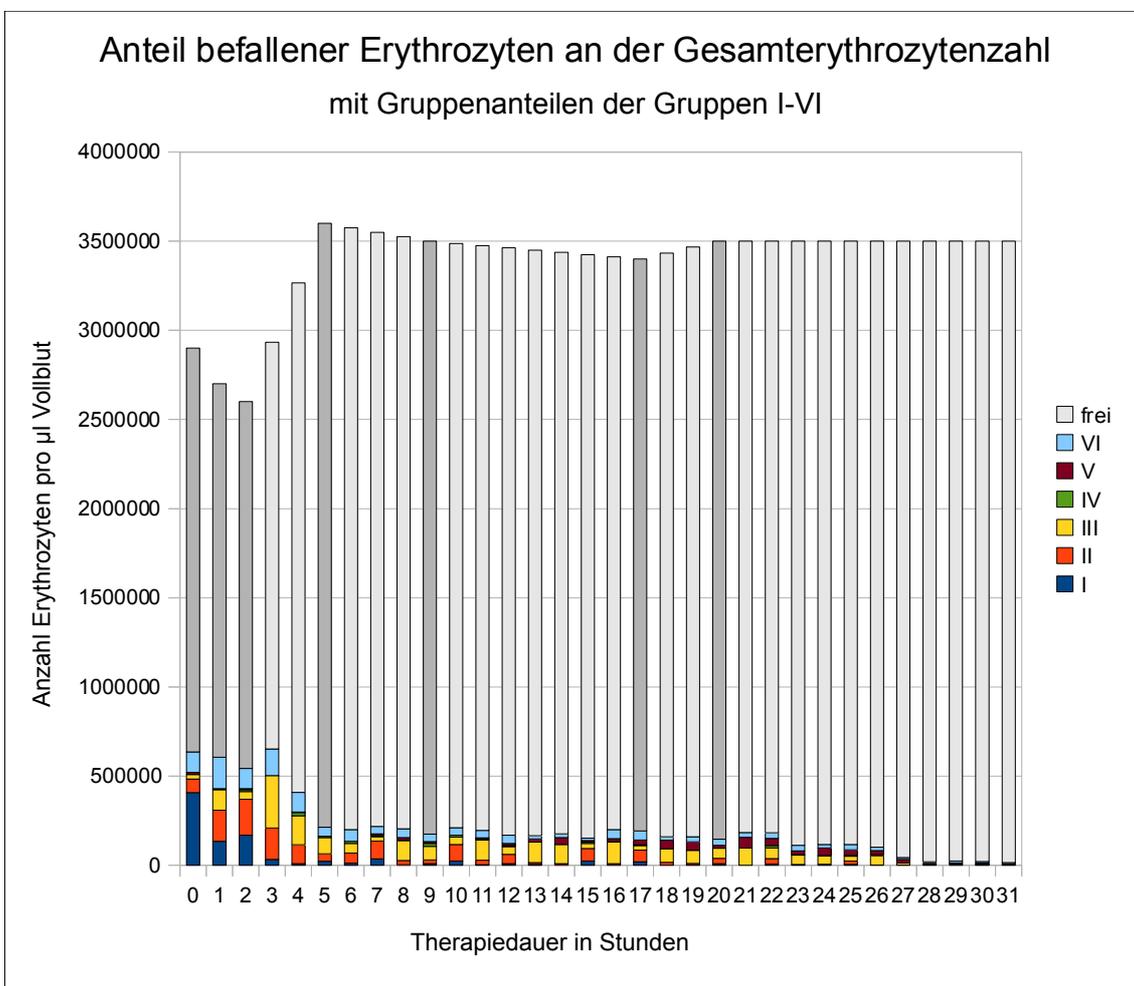


Diagramm 3.2.14: Abhängigkeit der Absolutzahlen von der Gesamterythrozytenzahl des Patienten. Die laborchemisch gemessenen Erythrozytenwerte sind dunkelgrau unterlegt. Die Absolutzahlen der Gruppen entsprechend denen im Diagramm 3.2.13

3.2.3.2 Absolutanteil der Plasmodien-Gruppen

Beim Vergleich der Verteilungskurven der Absolutzahlen-Gruppen mit der prozentualen Verteilung der Gruppen lassen sich zwei grundlegende Unterschiede ausmachen (*Diagr. 3.2.1-6 und Diagr. 3.2.15-20*):

Zum einen zeigt sich, entsprechend der Reduktion der Gesamtzahl der Plasmodien durch den partiellen Blutaustausch, ebenfalls eine Reduktion der einzelnen Plasmodien-Gruppen. Ausser dieser Verminderung der Parasitenzahl wird die Verteilung der Gruppen im Rahmen des partiellen Blutaustauschs jedoch weder durch die Entnahme des Patientenblutes noch durch die Gabe der Erythrozytenkonzentrate beeinflusst. Dies spiegelt sich in einem – vom partiellen Blutaustausch abgesehen – nahezu identischen Verlauf der absoluten Plasmodienzahlen im Vergleich mit der prozentualen Verteilung der Gruppen wieder, solange die Parasitämie auf relativ konstantem Niveau verläuft.

Ab der 22. Stunde, dem Zeitpunkt an dem die Parasitämie durch die Chinin-Therapie eindeutig reduziert wird, beginnt der Verlauf der Absolutzahlen von der prozentualen Verteilung der Gruppen abzuweichen. Dies zeigt sich hauptsächlich in den Gruppen III, V und VI, die ab diesem Zeitpunkt im peripheren Blutaustausch dominieren.

Die Verteilungskurve der Plasmodien der **Gruppe III** geht so bei der *absoluten* Anzahl der Plasmodien früher zurück, als deren *prozentualer* Anteil anzeigt. Weiterhin steigt der *prozentuale* Anteil der **Gruppe V** bis zu einem Maximum zur 27. Stunde, während die *absolute* Parasitenzahl ein Maximum bereits zur 21. Stunde erreicht und dann wieder zurückgeht. Die **morphologisch gestörten Plasmodien** zeigen im Vergleich zu der *prozentualen* Verteilung die deutlichste Abweichung: während die *absolute* Parasitenzahl sinkt, zeigt diese Gruppe einen Anstieg des *prozentualen* Anteils.

Die Ursache dieser Abweichung ist die Wirkung der Chinin-Therapie. So werden die Plasmodien durch die Medikation verändert und schliesslich eliminiert. Es erfolgt also eine Reduktion der absoluten Plasmodienmenge, und die noch verbleibenden Parasiten sind in einem relativ höheren prozentualen Anteil im peripheren Blutaustausch zu sehen.

Die im Gegensatz zur Parasitämie feststellbare Abnahme der Gesamtmenge der Plasmodien durch die verminderte Erythrozytenzahl in den ersten beiden Stunden der Therapie ist in den Absolutwerte der einzelnen Gruppen ohne Einfluss auf deren Verlauf. So geht die Anzahl der Gruppe I - Plasmodien wie auch im prozentualen Studienabschnitt innerhalb der ersten Stunden zurück, während die Plasmodien der Gruppe II und III vermehrt im peripheren Blutaussstrich sichtbar sind.

Die Absolutzahlen spiegeln in den diagnostisch wichtigen ersten Stunden der Therapie den Verlauf der prozentualen Verteilung wieder. Erst ab einer Reduktion der Parasitämie durch die Chinin-Therapie (s. Kapitel 3.1) zeigt sich ein relatives Überwiegen der prozentualen Anteile der zu diesem Zeitpunkt dominierenden Gruppen. Die Selektion *einer* Plasmodiengruppe ist somit in den ersten Stunden *nicht* die Ursache der in Kapitel 3.2 gezeigten prozentualen Veränderungen.

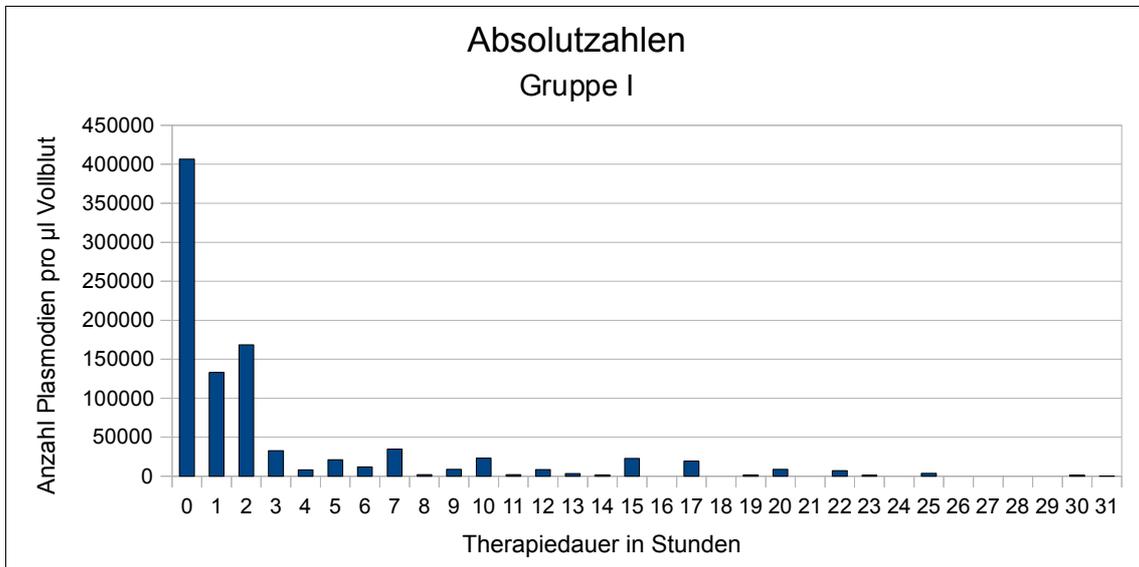


Diagramm 3.2.15: Anzahl der Gruppe I - Plasmodien im Therapieverlauf

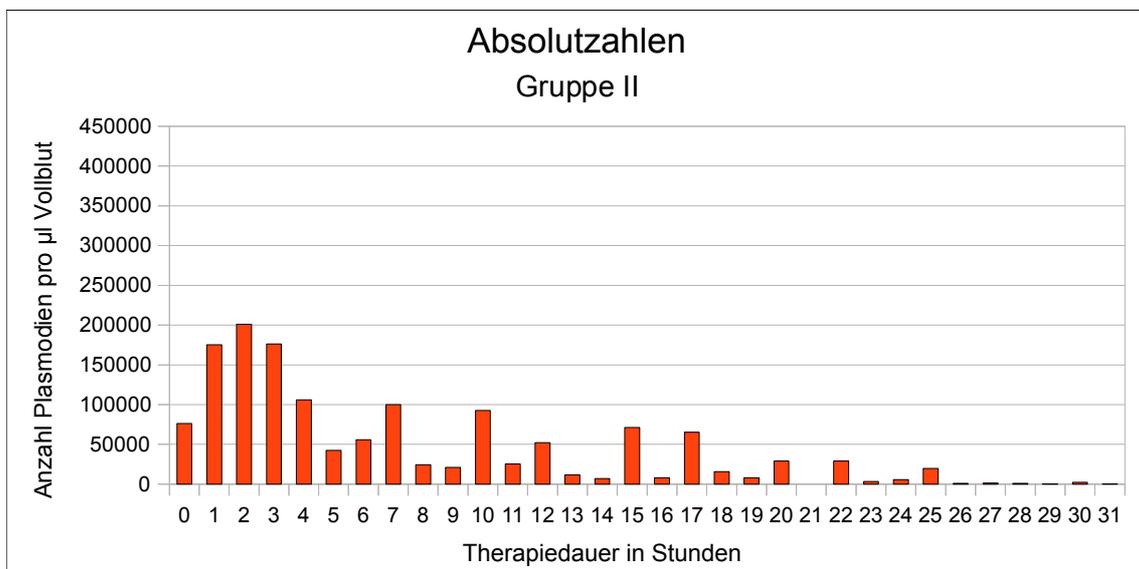


Diagramm 3.2.16: Anzahl der Gruppe II - Plasmodien im Therapieverlauf

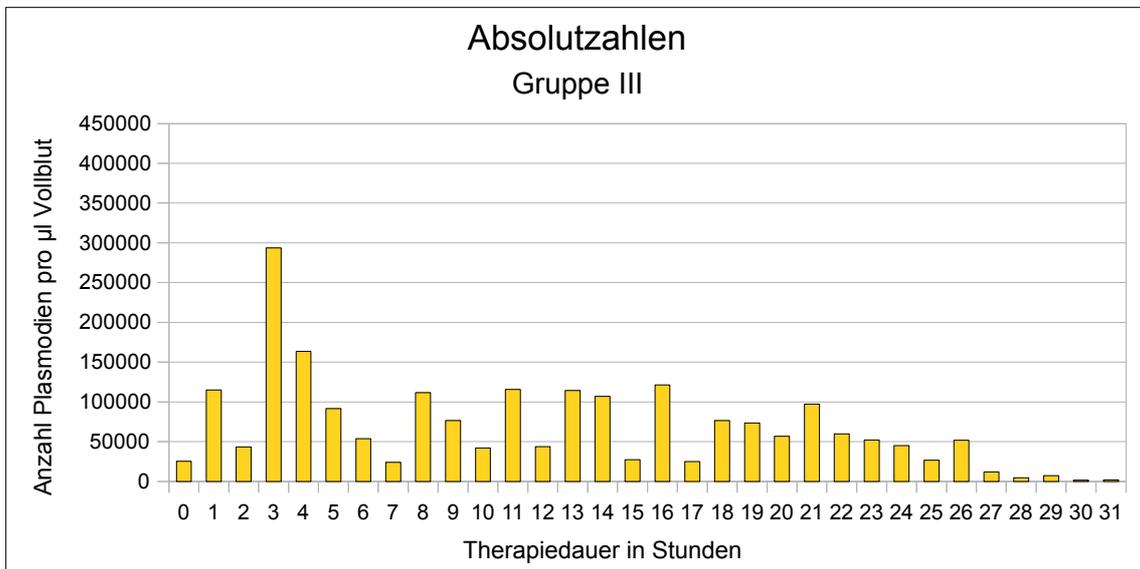


Diagramm 3.2.17: Anzahl der Gruppe III - Plasmodien im Therapieverlauf

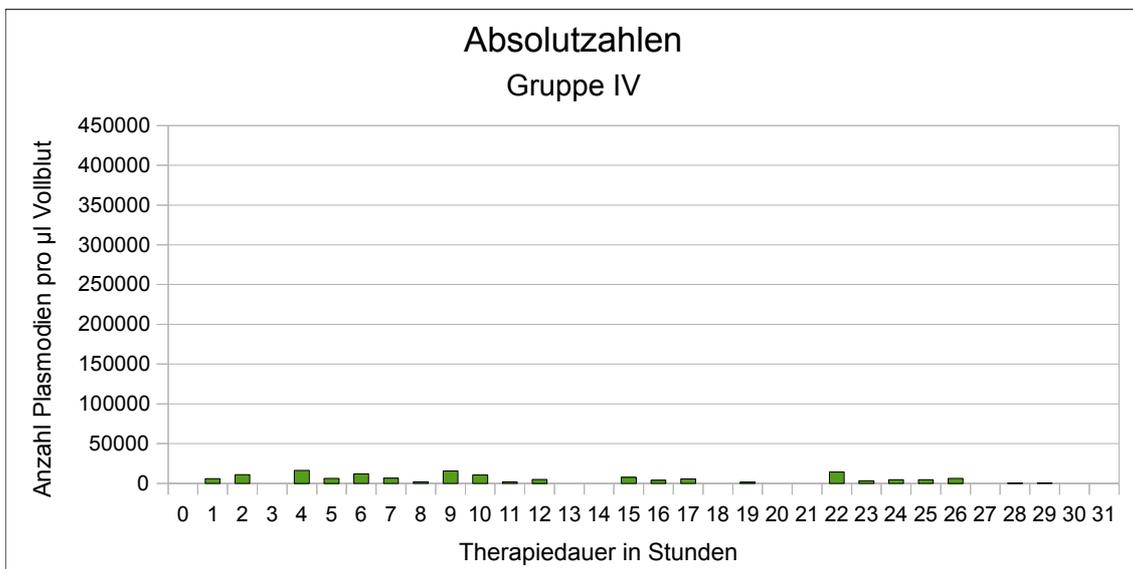


Diagramm 3.2.18: Anzahl der Gruppe IV - Plasmodien im Therapieverlauf

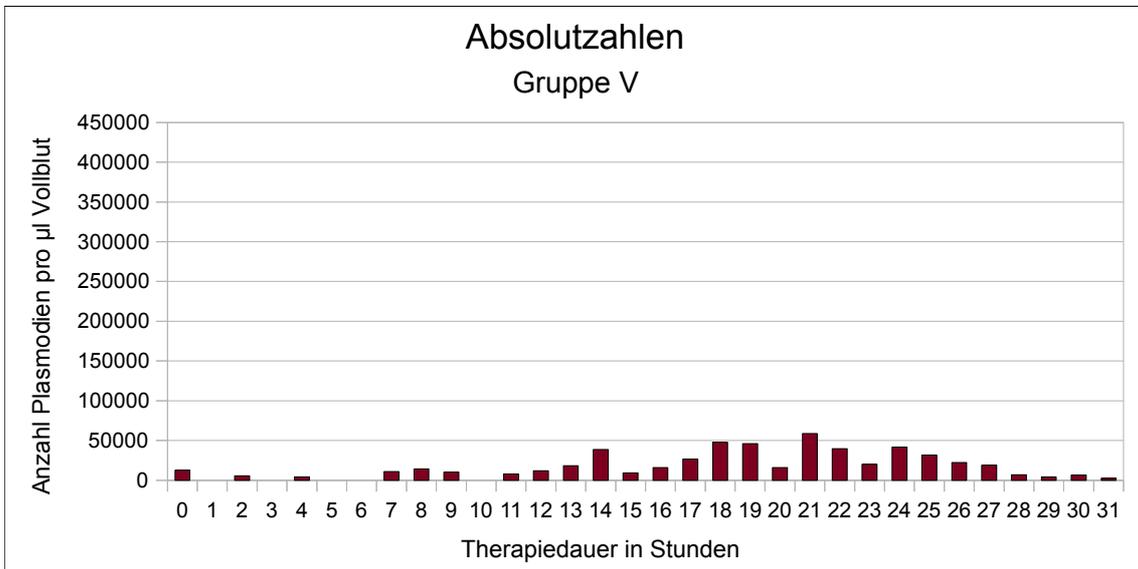


Diagramm 3.2.19: Anzahl der Gruppe V - Plasmodien im Therapieverlauf

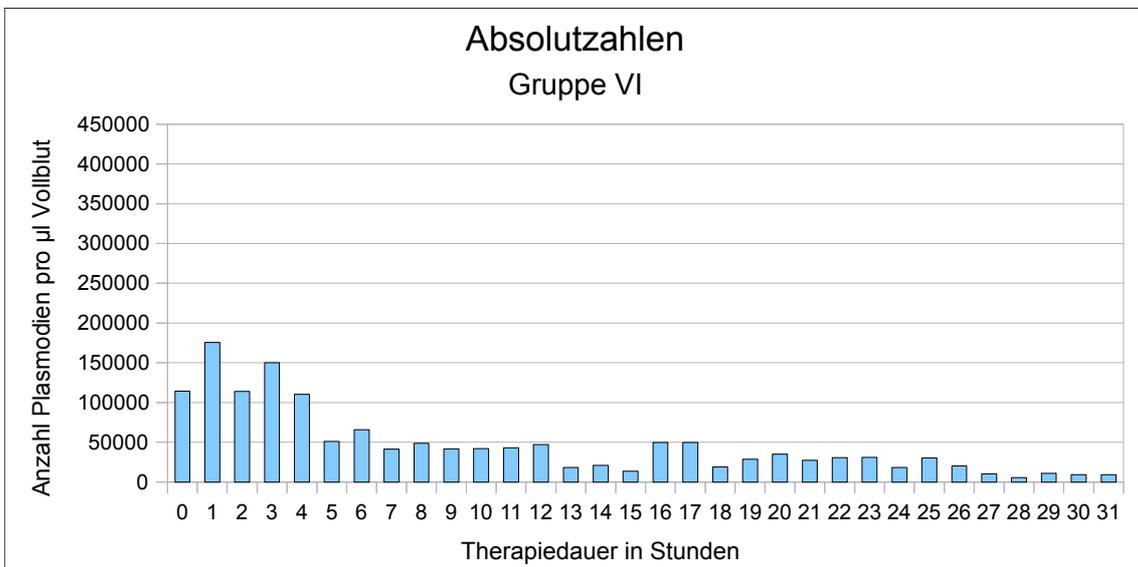


Diagramm 3.2.20: Anzahl der Gruppe VI - Plasmodien im Therapieverlauf

3.2.4 Zusammenfassung des ersten Studienteils

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass zu Beginn der Therapie Plasmodien der Gruppe I dominieren. Diese gehen dann bereits innerhalb der ersten beiden Stunden nach Therapiebeginn bei relativ konstanter Anzahl der Ringformen rasch zurück und die Plasmodien der Gruppen II und III nehmen zu. Mit dem Rückgang der Ringformen kommen vermehrt Accentué-Formen im peripheren Blutausschlag vor, um schliesslich beim Fortschreiten der antiparasitären Therapie ebenfalls zurückzugehen und morphologisch gestörten Plasmodien der Gruppe VI das Bild im Blutausschlag zu überlassen (*Diagramm 3.2.21 und 3.2.22*).

Somit kann bereits in den ersten Stunden nach Beginn der Therapie ein unterschiedliches Vorkommen der Plasmodien mit lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen der Plasmodien gezeigt werden.

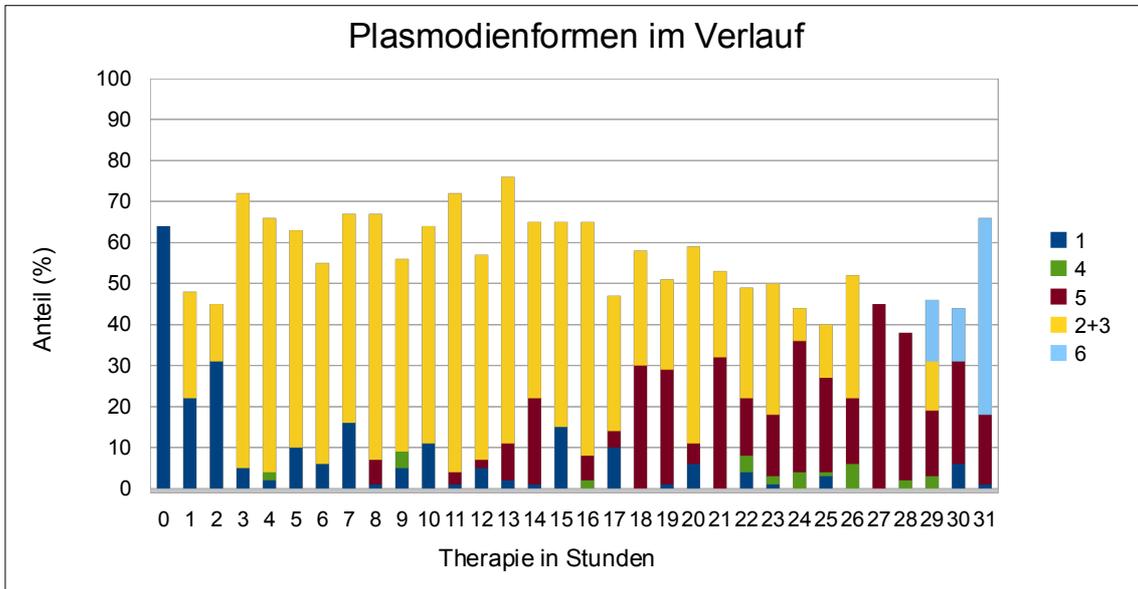


Diagramm 3.2.21: Hintereinander-projizierte Darstellung der Plasmodien- Gruppen, Gruppe 2 und Gruppe 3 zu einer Gruppe zusammengefasst.

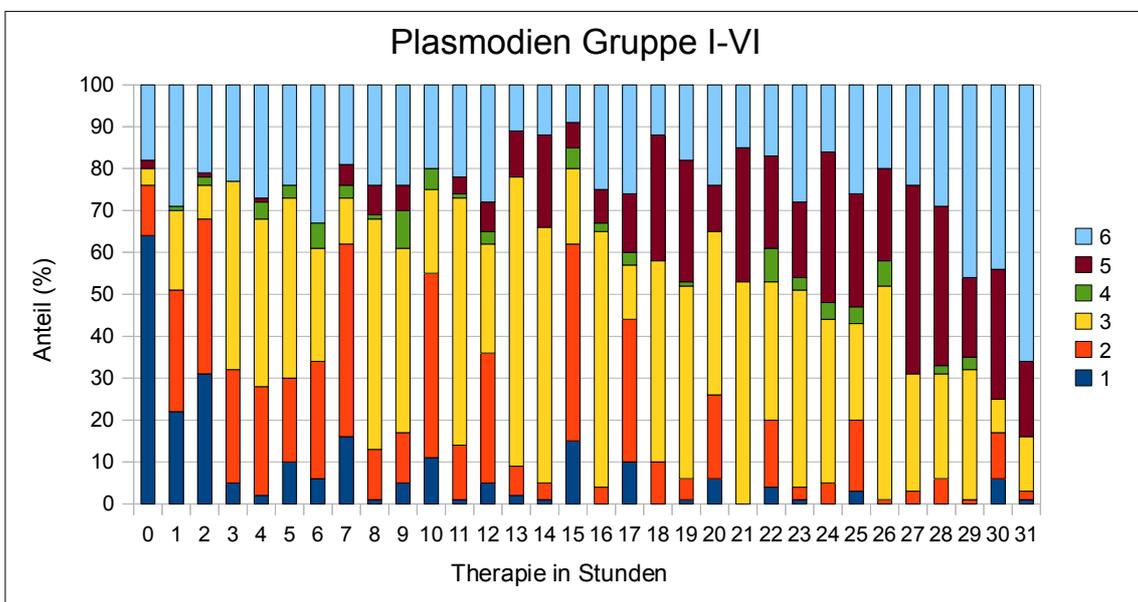


Diagramm 3.2.22: Plasmodien-Gruppen in prozentualer Verteilung im Therapieverlauf

3.3 Analyse der Blutausstriche am Computer

Im vorigen Kapitel (3.2) zeigte sich in der Analyse der Blutausstriche des Patienten über den Verlauf der Therapie Veränderungen der Plasmodienstrukturen. Um die am Lichtmikroskop postulierten und erhobenen Werte zu belegen, habe ich die Plasmodien am Computer vermessen und analysiert. Als gute Parameter zur Vermessung bietet sich die Größe der Plasmodien und die Kern-Plasma-Relation an (*Tabelle 3.3.1*).

<p><u>1. Zytoplasmabandbreite</u></p> <ul style="list-style-type: none">a) absolute Breiteb) Kern-Plasma-Relation <p><u>2. Größe der Plasmodien</u></p> <ul style="list-style-type: none">a) absolute Grösseb) Größe in Relation zum Erythrozyten

Tabelle 3.3.1: Parameter zur Messungen der Plasmodien anhand von Digitalfotos

3.3.1 Breite des Zytoplasmabandes

Ein wichtiges Einteilungskriterium der Plasmodien am Lichtmikroskop ist, wie im ersten Studienabschnitt beschrieben, die Vergrößerung des Zytoplasmas und die damit zusammenhängende Kern-Plasma-Relation. Die Verbreiterung des Zytoplasmabandes wurde anhand der absoluten Werte und im Vergleich mit dem Kerndurchmesser analysiert (Kern-Plasma-Relation).

3.3.1.1 Absolute Breite des Zytoplasmas

Der Durchmesser des Zytoplasmas wurde mit Hilfe des Verlaufs der Mediane mit Standardabweichung und den oberen und unteren Quartilen zu den jeweiligen Zeitpunkten der Therapie analysiert und im Boxplot graphisch dargestellt (*Tab. 3.3.2, Diagr. 3.3.1*).

Bei numerischer Analyse des Zytoplasmas kann die bereits im vorangehenden Teil der Studie gezeigte Verbreiterung des Zytoplasmabandes im Verlauf der Therapie verifiziert werden.

So zeigt der Median der Zytoplasmabänder zunächst einen Anstieg von initial $0,64\mu\text{m}$ (SD $\pm 0,3$) auf $0,85\mu\text{m}$ (SD $\pm 0,31$) nach einer Stunde Therapie. Im weiteren Verlauf steigt der Median nach zwei Stunden weiter auf $0,98\mu\text{m}$ (SD $\pm 0,44$). In den nächsten Stunden gehen diese wieder leicht zurück auf $0,88\mu\text{m}$ (SD $\pm 0,49$). In den weiteren Stunden steigt die Breite des Zytoplasmabands weiter auf bis $1,4\mu\text{m}$ (SD $\pm 0,42$) zur 10. Stunde, um im Folgenden zwischen $1,18\mu\text{m}$ (SD $\pm 0,53$) zur 17. Stunde und $1,5\mu\text{m}$ (SD $\pm 0,63$) zur 14. Stunde zu messen.

Eine Zunahme des Zytoplasmabandes kann somit festgestellt werden.

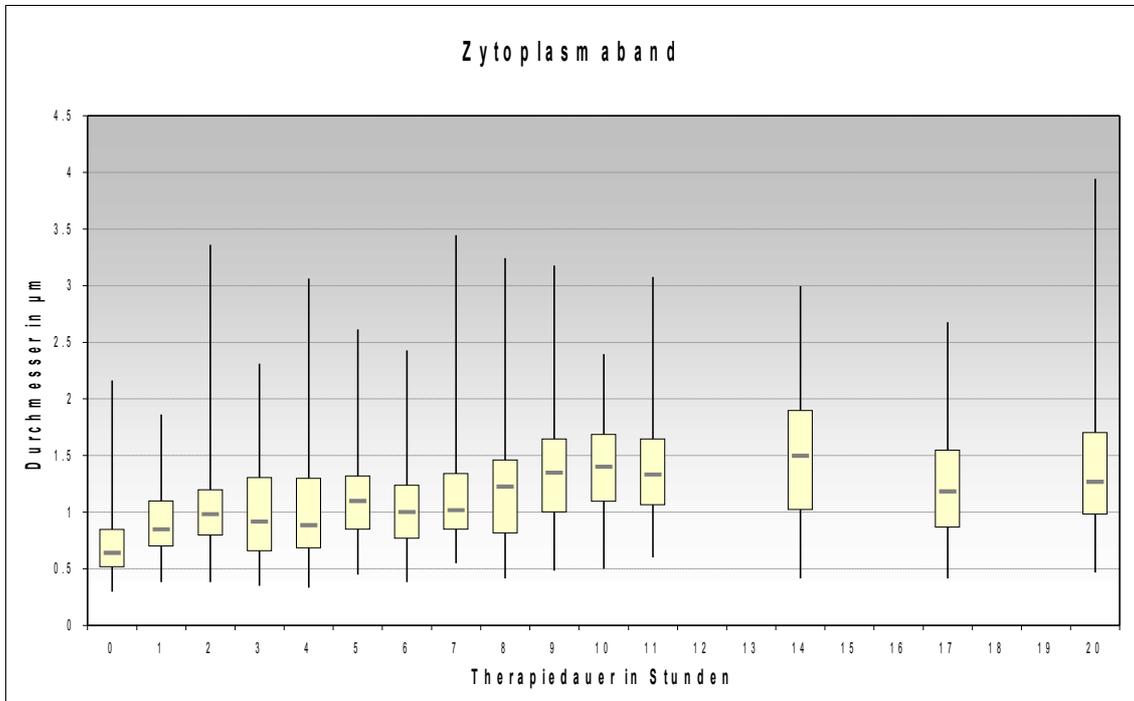


Diagramm 3.3.1: Boxplot der Durchmesser des Zytoplasmabands über den Verlauf der Therapie mit Median, 25. und 75. Quantil, Minimal- und Maximalwert

Stunde	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	14	17	20
Median	0,64	0,85	0,98	0,92	0,88	1,1	1	1,02	1,22	1,35	1,4	1,33	1,5	1,18	1,26
SD	0,3	0,31	0,44	0,43	0,49	0,42	0,4	0,44	0,48	0,5	0,42	0,51	0,63	0,53	0,62
25. Quantil	0,52	0,7	0,79	0,66	0,68	0,85	0,77	0,85	0,82	0,99	1,09	1,06	1,02	0,87	0,98
75. Quantil	0,85	1,1	1,2	1,31	1,3	1,32	1,24	1,34	1,46	1,65	1,69	1,65	1,9	1,55	1,7
Min	0,3	0,38	0,38	0,35	0,33	0,45	0,38	0,55	0,42	0,25	0,5	0,6	0,42	0,42	0,47
Max	2,16	1,86	3,36	2,31	3,06	2,61	2,43	3,44	3,24	3,18	2,4	3,08	3	2,68	3,94

Tabelle 3.3.2: Zytoplasmaband mit Median, 25. und 75. Quantil, Minimal- und Maximalwert über den Verlauf der Therapie (in µm)

3.3.1.2 Kern-Plasma-Relation

Da eine Beurteilbarkeit der Zytoplasma-Durchmesser am Lichtmikroskop angestrebt wird, hat die Kern-Plasma-Relation als Messinstrument zur Beurteilung der Breite des Zytoplasmas eine zentrale Bedeutung. Zur Analyse dieser mit den am Computer gemessenen Werten habe ich die Einteilungskriterien des ersten Studienabschnitts gewählt. Dies bedeutet, dass die Plasmodien nach dem Verhältnis des Zytoplasmas zu dem einfachen und doppelten Kerndurchmesser in drei Gruppen eingeteilt werden (*Tabelle 3.3.3, Diagramm 3.3.2*).

Vor Therapie haben 47% der im peripheren Blutausschlag sichtbaren Plasmodien ein **schmaleres Zytoplasma als Kerndurchmesser (Gruppe I)**. Nach einer Stunde Therapie fällt deren Anteil auf 20%, um im weiteren Verlauf bei durchschnittlich 18% (13-29%) zu bleiben. Im weiteren Verlauf der Therapie sinkt der Anteil weiter auf ca. 8% (6-11%).

Die Plasmodien mit einer Zytoplasmabreite des **1-2fachen Kerndurchmessers (Gruppe II)** beinhalten initial 44% der Plasmodien. Im weiteren steigt deren Anteil auf 66% nach einer Stunde Therapie, um im weiteren bis zur 8. Stunde durchschnittlich 59% (53-67%) der Plasmodien auszumachen. Ab der 9. Stunde bleibt der Anteil dieser Gruppe bei ca. 49% (45-56%). Die Plasmodien dieser Gruppe zeigen somit einen erhöhten Anteil zwischen der 1. und 8. Stunde nach Therapiebeginn.

Die Plasmodien mit einem **Zytoplasma größer dem doppelten Kerndurchmesser (Gruppe III)** liegen vor Beginn der Therapie bei einem Anteil von 7%. Nach einer Stunde Therapie erhöht sich deren Anteil auf 13%. Von der 3. bis 8. Stunde an sind durchschnittlich 21% (13-30%) dieser Gruppe zuzuordnen, ab der 9. Stunde ca. 42% (32-47%).

Die Kern-Plasma-Relation zeigt wie auch die alleinige Betrachtung des Zytoplasmas eine Vergrößerung desselben, wobei diese nicht so deutlich wie bei einer Betrachtung

der absoluten Größe des Zytoplasmas ausfällt. Dies ist die Folge eines im Verlauf der Therapie größer werdenden Kerndurchmessers (*Tabelle 3.3.4, Diagramm 3.3.3*). Dass der Erfolg der Therapie trotzdem an der Kern-Plasma-Relation sichtbar wird, ist Folge einer im Vergleich zum Kern deutlicheren Zunahme des Zytoplasmabandes.

Bei Betrachtung der Kern-Plasma-Relation kann bereits frühzeitig in den ersten Stunden nach Therapiebeginn eine Zunahme des Zytoplasma in Relation zum Plasmodien-Kern gezeigt werden.

Dies bestätigt die im ersten Studienabschnitt postulierten Gruppen I-III und die Veränderungen deren Verteilung über den Verlauf der Therapie. Die ausschliessliche Einteilung über die Kern-Plasma-Relation zeigt wie auch im ersten Studienabschnitt eine Schwankung der Werte im Zeitraum der 6. Stunde nach Therapiebeginn (*vgl. Kapitel 3.2.2.3*). Dass der zusätzlich zum Zytoplasma sich vergrößernde Kerndurchmesser die Ursache hierfür ist, zeigt die im nächsten Kapitel erfolgte Einteilung der Kern-Plasma-Relation mit Hilfe einer fixen Zahl anstatt des Kerndurchmessers.

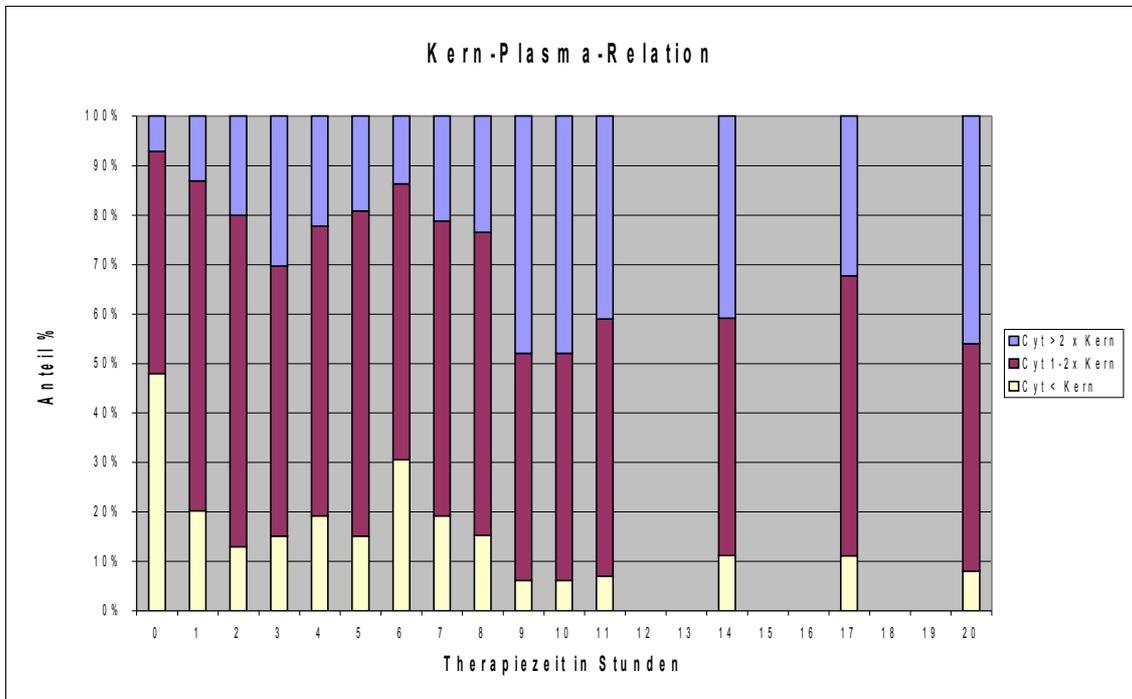


Diagramm 3.3.2: Kern-Plasma-Relation im Verlauf der Therapie mit Gruppeneinteilung: Zytoplasma < Kern, 1-2 x Kern und > 2 x Kerndurchmesser

Stunde	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	14	17	20
<1 x Kern	47	20	13	15	19	15	29	19	15	6	6	7	11	11	8
1-2 x Kern	44	66	67	54	58	65	53	59	60	45	45	52	47	56	46
>2 x Kern	7	13	20	30	22	19	13	21	23	47	47	41	40	32	46

Tabelle 3.3.3: Kern-Plasma-Relation im Verlauf der Therapie

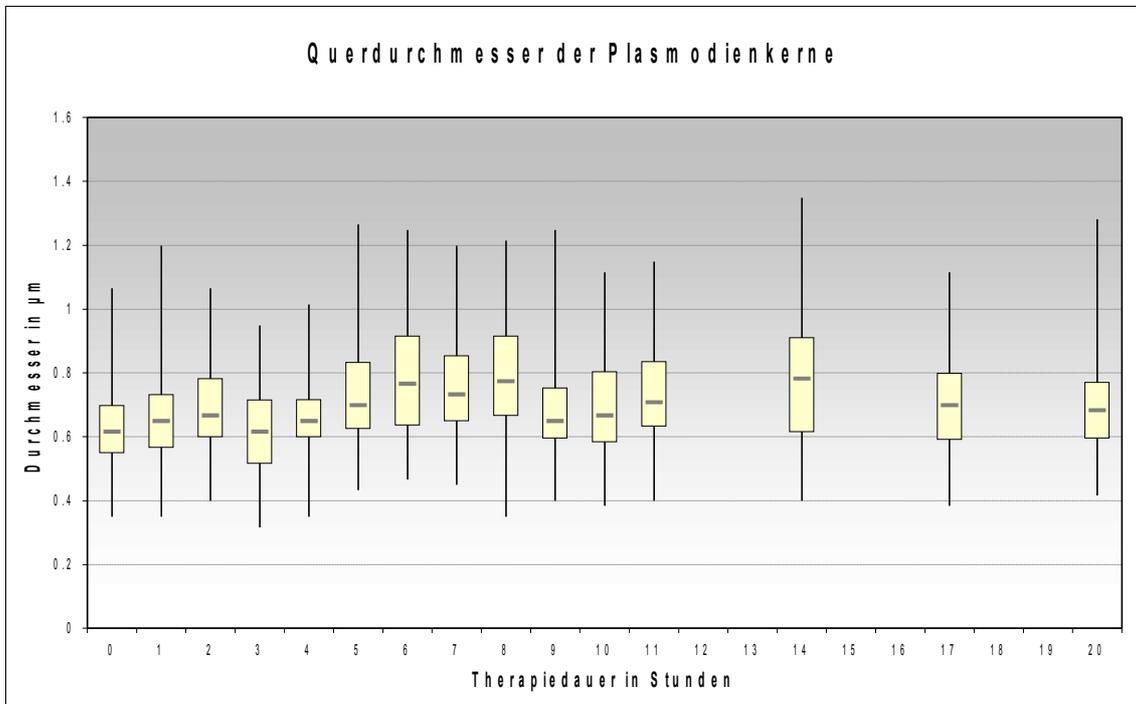


Diagramm 3.3.3: Querdurchmesser der Kerne im Verlauf über die Therapie mit Median, 25. und 75. Quantil, Minimal- und Maximalwert.

Stunde	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	14	17	20
Median	0,62	0,65	0,67	0,62	0,65	0,7	0,77	0,73	0,77	0,65	0,67	0,71	0,78	0,7	0,68
SD	0,13	0,14	0,13	0,14	0,12	0,16	0,19	0,16	0,19	0,15	0,16	0,14	0,21	0,16	0,16
25. Quantil	0,55	0,57	0,6	0,52	0,6	0,62	0,64	0,65	0,67	0,59	0,58	0,63	0,62	0,59	0,59
75. Quantil	0,7	0,73	0,78	0,72	0,72	0,83	0,92	0,85	0,92	0,75	0,8	0,84	0,91	0,8	0,77
Min	0,35	0,35	0,4	0,32	0,35	0,43	0,47	0,45	0,35	0,4	0,38	0,4	0,4	0,38	0,42
Max	1,06	1,2	1,06	0,95	1,02	1,26	1,25	1,2	1,21	1,25	1,11	1,15	1,35	1,11	1,28

Tabelle 3.3.4: Querdurchmesser der Kerne im Verlauf der Therapie mit Medianen, 25. und 75. Quantil, Minimal- und Maximalwert (in μm)

3.3.1.3 Vergleich der Zytoplasmabandbreite zu fixer Zahl 0,68

Um den Einfluss des im Verlauf der Therapie größer werdenden Kerns auf die Kern-Plasma-Relation zu zeigen, habe ich das Zytoplasma anstatt des reellen Kerndurchmessers jedes einzelnen Plasmodiums zu einer konstanten Zahl in Relation gesetzt und so die Plasmodien in drei Gruppen eingeteilt. Als Referenzwert hierfür wählte ich den Median der Mediane aller Querdurchmesser der Kerne (0,68 μ m).

Die Einteilung des Zytoplasmas entsprechend der Kern-Plasma-Relation in drei Intervall-Gruppen von $\leq 0,68\mu\text{m}$, $0,68-1,36\mu\text{m}$ und $\geq 1,36\mu\text{m}$ (Tabelle 3.3.5, Diagramm 3.3.4) zeigt ebenfalls ein kontinuierlicher Rückgang der Plasmodien mit einem dünnen Zytoplasmaband ($\leq 0,68\mu\text{m}$) von initial 56% auf bereits eine Stunde nach Therapiebeginn 24% und nach 2 Stunden Therapie auf 13%. Nach einem leichtem Anstieg auf max. 27% zur 3. Stunde, geht im weiteren diese Plasmodiengruppe nach 6 Stunden Therapie auf 16% zurück. Dies zeigt den Einfluss des ebenfalls ansteigenden Kerndurchmessers auf die Kern-Plasma-Relation.

Es erfolgt im Verlauf ein Rückgang auf 4% nach 11 Stunden Therapie. Mit zunehmend beeinträchtigten Plasmodien im weiteren, erfolgt erneut ein Anstieg auf max. 18% nach 17 Stunden Therapie. Nach 20 Stunden haben 6% der Plasmodien ein Zytoplasma $\leq 0,68\mu\text{m}$.

Die Plasmodien mit einem Zytoplasma-Durchmesser von **0,68-1,36 μ m** machen zunächst 38% der Gesamtplasmodien aus, steigen dann innerhalb der ersten beiden Therapiestunden von 66% auf 73% an, um im weiteren bis zur 8. Stunde zwischen 50-67% zu liegen. Im weiteren Rückgang dieser Plasmodien auf bis zu 31% zur 14. Stunde, um dann wieder auf 51% zur 20. Stunde anzusteigen.

Im Gegenzug zu den Plasmodien mit dünnem Zytoplasmaband steigt die Anzahl der Plasmodien mit deutlich vergrößertem Zytoplasma ($\geq 1,36\mu\text{m}$) von initial 4% auf 9% nach einer Stunde Therapie an, um dann von zunächst 18-24% (3.-7. Stunde) auf max. 56% zur 14. Stunde zuzunehmen. Im weiteren Verlauf wieder verminderter Anteil.

Diese Darstellung verdeutlicht die Zunahme der Breite des Zytoplasmabands über den Verlauf der Therapie. Da die Schwankungsbreite der Kerndurchmesser durch eine konstante Zahl ersetzt wurde, fällt der Anstieg im Vergleich zu der Kern-Plasma-Relation um die 6. Stunde weg.

Es kann bei den Vermessungen der Plasmodien anhand von Digitalbildern die frühzeitige Verbreiterung des Zytoplasmas und der Kern-Plasma-Relation gezeigt werden.

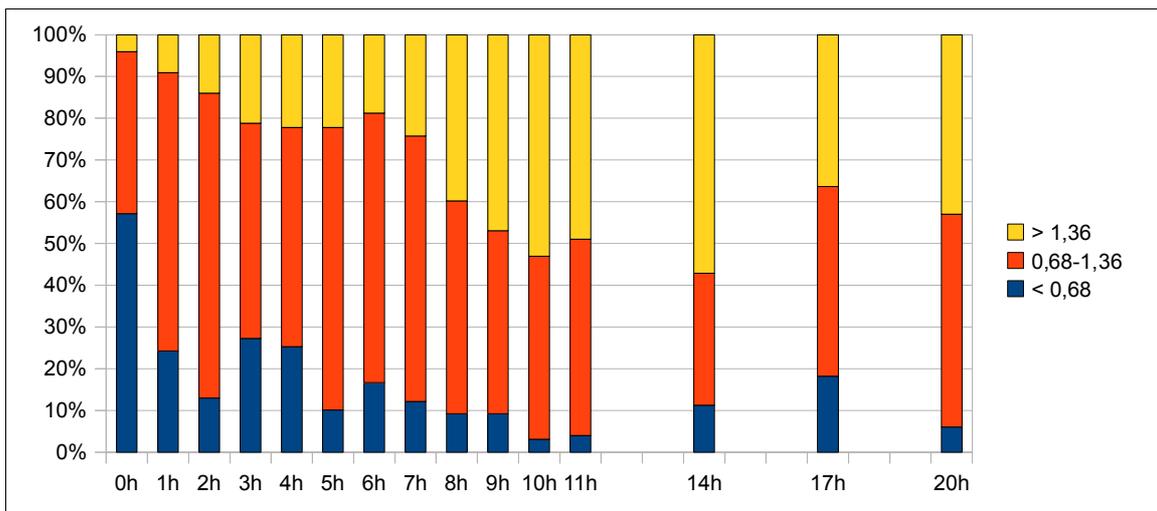


Diagramm 3.3.4: Zytoplasma in der Relation zum Median der Kern-Durchmesser-Mediane in Intervallen zu $<0,68\mu\text{m}$, $0,68-1,36\mu\text{m}$ und $>1,38\mu\text{m}$

Stunde	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	14	17	20
< 0,68	56	24	13	27	25	10	16	12	9	9	3	4	11	18	6
0,68-1,36	38	66	73	51	52	67	62	63	50	43	43	47	31	45	51
> 1,36	4	9	14	21	22	22	18	24	39	46	52	49	56	36	43

Tabelle 3.3.5: Zytoplasma in der Relation zum Median der Kern-Durchmesser-Mediane, Werte in Anzahl Plasmodien pro Intervall zu der jeweiligen Stunde

3.3.2 Größe der Plasmodien

Im Folgenden wird die im ersten Abschnitt der Studie beobachtete Größenzunahme der Plasmodien während dem Verlauf der Therapie näher untersucht. Hierfür wird in einem vorläufigen Schritt die absolute Größe der Plasmodien analysiert, anschließend wird anhand der Relation der Plasmodien zum Erythrozyten versucht ein Parameter für die Praxis am Lichtmikroskop zu erhalten.

3.3.2.1 Absolute Größe

Der maximale Durchmesser der Plasmodien wurde anhand des Verlaufs der Mediane mit Standardabweichungen und den oberen und unteren Quartilen zu den jeweiligen Verlauf der Therapie analysiert (*Tabelle 3.3.6*) und im Boxplot (*Diagramm 3.3.5*) graphisch dargestellt.

Vor Beginn der Therapie liegt der Median der Plasmodien-Größen bei $2,79\mu\text{m}$ (SD $\pm 0,56$), der Hauptanteil der Plasmodien misst weniger als $3,02\mu\text{m}$ ($< 75.$ Quantil). **Nach der ersten Stunde** der Therapie liegen die Plasmodien mit einem um ca. $\frac{1}{6}$ größeren Durchmesser bei einem Median von $3,18\mu\text{m}$ (SD $\pm 0,67$). **Nach der 2. Stunde der Therapie** steigt die Größe der Plasmodien weiter mit einem Median von $3,32\mu\text{m}$ (SD $\pm 0,64$) und der Hauptteil der Plasmodien hat mit $> 3,02\mu\text{m}$ (25.Quantil) einen grösseren Durchmesser als noch vor Beginn der Therapie ($< 3,02\mu\text{m}$, 75. Quantil).

Bis zur 4. Stunde der Therapie geht die Größe leicht auf eine Median von $3,17\mu\text{m}$ (SD $\pm 0,59$) zurück, um dann nach der **5. Stunde** erneut mit der unteren Quartil ($3,03\mu\text{m}$) über der oberen Quartil ($3,02\mu\text{m}$) vor Beginn der Therapie zu liegen.

In den folgenden Stunden nimmt der Durchmesser weiter kontinuierlich auf bis $3,85\mu\text{m}$ (SD $\pm 0,85$) **zur 10. Stunde** nach Therapie zu, um im Folgenden bei durchschnittlich $3,75\mu\text{m}$ ($3,64\mu\text{m}$ bis $3,93\mu\text{m}$) zu messen.

Die Plasmodien vergrößern sich somit bis zur 10. Stunde von einem initialen Median von $2,79\mu\text{m}$ um über ein Drittel des Durchmessers auf eine Median von $3,85\mu\text{m}$. Die Mehrzahl der Plasmodien vor Therapie messen weniger als $3,02\mu\text{m}$ (75. Quantil), um

bereits nach 5 Stunden Therapie keine Überschneidung mit dem unteren Quartil (3.03 μ m) mehr zu zeigen.

Die Auswertung der Plasmodien-Größe zeigt somit bereits ab der ersten Stunde der Therapie eine Vergrößerung der Plasmodien und im weiteren Verlauf bis zur 10. Stunde nach Therapiebeginn eine insgesamt zunehmende Größe der Plasmodien.

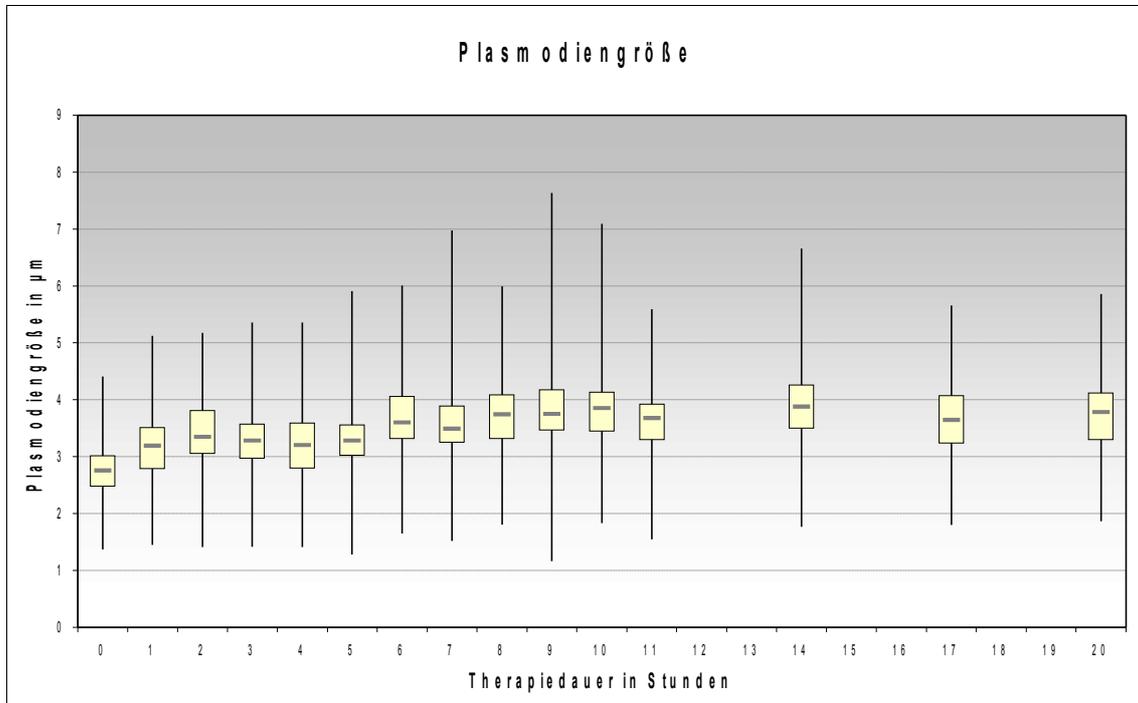


Diagramm 3.3.5: Boxplot der Plasmodien-Größe über den Verlauf der Therapie mit Median, 25. und 75. Quartil, Minimal- und Maximalwert

Stunde	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	14	17	20
Median	2,79	3,18	3,32	3,29	3,17	3,28	3,59	3,47	3,74	3,74	3,85	3,67	3,93	3,64	3,76
SD	0,56	0,67	0,64	0,57	0,59	0,67	0,7	0,71	0,63	0,77	0,85	0,63	0,81	0,66	0,74
25.Quartile	2,5	2,79	3,02	2,99	2,84	3,03	3,3	3,24	3,34	3,46	3,49	3,37	3,62	3,22	3,29
75.Quartile	3,02	3,52	3,81	3,61	3,54	3,58	4,06	3,88	4,05	4,16	4,14	3,91	4,34	4,04	4,13
Min	1,41	1,73	1,91	1,88	1,76	2	1,95	1,95	1,93	1,16	1,83	1,55	2,16	1,8	1,9
Max	4,41	5,13	5,18	5,36	5,36	5,91	6,01	6,97	5,99	7,64	7,09	5,59	6,66	5,66	5,86

Tabelle 3.3.6: Plasmodien-Größe mit Median, Standardabweichung, oberes und unteres Quartil, Minimal- und Maximalwert im Verlauf der Therapie (in µm)

3.3.2.2 Einteilung in Gruppen

Zum Vergleich der Plasmodien-Größen mit dem ersten Studienabschnitt werden diese nun in Gruppen eingeteilt. Da vor Therapiebeginn der Hauptanteil der Plasmodien (Median mit 25. und 75. Quantil) im Durchmesser $< 3,02\mu\text{m}$ messen und in den folgenden Stunden der Therapie die Mehrzahl der Plasmodien zunehmend größer sind und nunmehr zwischen ca. $3\mu\text{m}$ bis $3,5\mu\text{m}$ mit weiter im Verlauf zunehmenden Werten liegen ($> 3,5\mu\text{m}$), habe ich eine Verteilung in Gruppen anhand dieser Intervalle ($< 3\mu\text{m}$, $3-3,5\mu\text{m}$ und $> 3,5\mu\text{m}$) analysiert und im Balkendiagramm dargestellt (Tab. 3.3.3, Diagramm 3.3.2).

Vor Therapie sind 72% der Plasmodien kleiner als $3\mu\text{m}$, 18% der Plasmodien messen zu diesem Zeitpunkt $3-3,5\mu\text{m}$ und nur 10% sind größer als $3,5\mu\text{m}$.

Bereits eine Stunde nach Therapiebeginn hat sich die Anzahl der Plasmodien mit einem Durchmesser von $< 3\mu\text{m}$ auf 35% mehr als halbiert, bleibt im weiteren bis zur 5. Stunde bei durchschnittlich 27% (24-33%) um im Folgenden ab der 6. Therapiestunde ca. 10% (7-14%) der Plasmodien auszumachen.

Die Anzahl der Plasmodien mit einem Durchmesser von **$3-3,5\mu\text{m}$** verdoppelt sich in der ersten Stunde der Therapie von 18% auf 37%, bleibt dann über weitere sechs Stunden bei durchschnittlich 38% (33-46%), um dann im weiteren bei einem Anteil von ca. 22% (13-31%) unter einem Drittel der Gesamtplasmodien zu bleiben.

Die Anzahl der Plasmodien mit einem Durchmesser $> 3,5\mu\text{m}$ verdreifacht sich nahezu in der ersten Stunde nach Therapie von 10% auf 28%. Diese bleiben bis zur fünften Stunde bei einem Anteil von durchschnittlich $\frac{1}{3}$ der Gesamtplasmodien (Mittelwert 34%, 28-41%), um dann im weiteren Verlauf weiter anzusteigen. Nach acht Stunden Therapie liegt deren Anteil bei knapp $\frac{2}{3}$ (64%) und nach zehn Stunden bei 73%. Im Verlauf zählt weiterhin der Hauptanteil der Plasmodien zu dieser Gruppe bei einem durchschnittlich Anteil von $\frac{2}{3}$ der Gesamtplasmodienzahl (67%, 61-76%).

Der Vergleich dieser Intervalle zu den im Kapitel 3.2 beschriebenen Gruppen der Ringformen zeigt im Verlauf eine gute Korrelation mit der dort bereits vermuteten Größenzunahme der Plasmodien.

So kann nach dem Verlauf eine Beziehung der Plasmodien der Gruppe I zu einer Plasmodien-Größe von $< 3\mu\text{m}$, die Größe der Plasmodien der Gruppe III einer Größe von $> 3,5\mu\text{m}$ und der Zwischengruppe II mit einem Durchmesser von $3-3,5\mu\text{m}$ hergestellt werden.

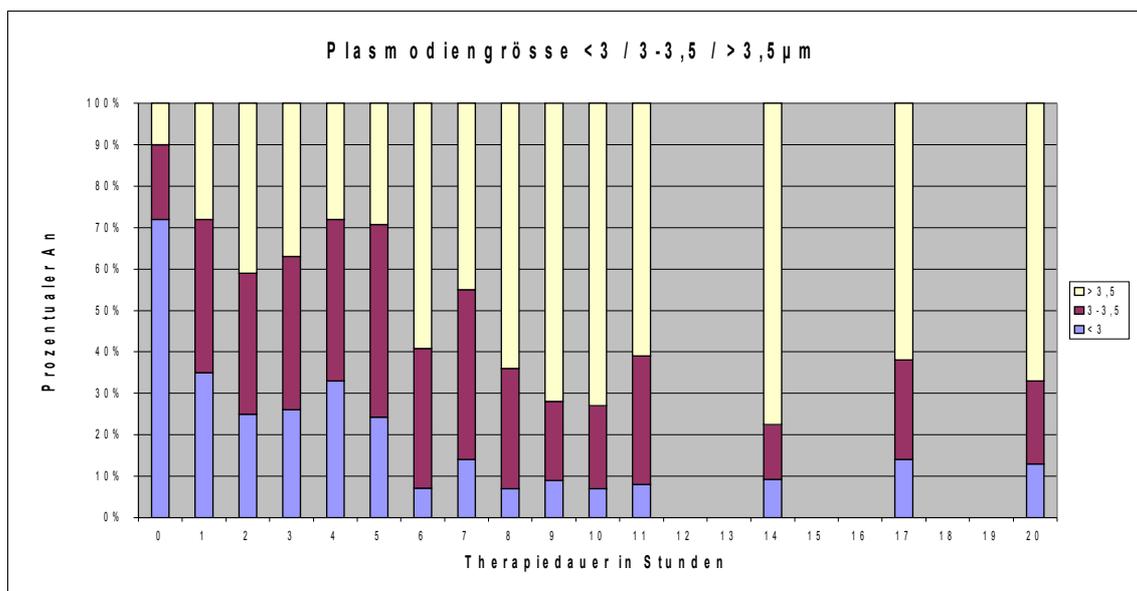


Diagramm 3.3.6: Größe der Plasmodien über den Therapie-Verlauf in Intervallen von $< 3\mu\text{m}$, $3-3,5\mu\text{m}$ und $> 3,5\mu\text{m}$

Stunde	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	14	17	20
$< 3\mu\text{m}$	72	35	25	26	33	24	7	14	7	9	7	8	9	14	13
$3\mu\text{m} - 3,5\mu\text{m}$	18	37	34	37	39	46	33	41	29	19	20	31	13	24	20
$> 3,5\mu\text{m}$	10	28	41	37	28	29	58	45	64	72	73	61	76	62	67

Tabelle 3.3.7: Verteilung der Plasmodien-Größen auf die Intervalle ($< 3\mu\text{m}$, $3-3,5\mu\text{m}$ und $> 3,5\mu\text{m}$) über den Verlauf der Therapie (in Stunden nach Therapiebeginn)

3.3.2.3 Plasmodien-Durchmesser in Relation zum Erythrozyten

Nachdem eine Zunahme der Plasmodien-Durchmesser im Verlauf der Therapie aufgezeigt werden konnte, soll nun diese für die Betrachtung unter dem Lichtmikroskop „fassbar“ gemacht werden. Die Schwierigkeit zur lichtmikroskopischen Bestimmung der Plasmodien-Größe besteht darin, eine günstige Vergleichsgröße zu finden, mit der die Größe der Plasmodien verglichen werden kann. Als Bezugsgröße wird hierfür der Erythrozyt verwendet. Der jeweils größte Durchmesser des vom Parasiten befallenen Erythrozyten wird zunächst gemessen und mit dem größten Plasmodien-Durchmesser in Relation gesetzt. Als Referenzgröße zum Vergleich am Lichtmikroskop werden die Intervalle mit den Relationen von $< 1/3$, $1/3-1/2$, $1/2-2/3$ und $> 2/3$ des Erythrozyten-Durchmessers angewandt (Tabelle 3.3.8, Diagramm 3.3.7).

Die Verteilung der Plasmodien in diesen Intervallen zeigt, dass **initial** 33% kleine Plasmodien mit einem Plasmodien-Durchmesser $< 1/3$ des Erythrozyten-Durchmessers vorliegen. Nur 5% sind innerhalb dieser Zeitspanne größer als der halbe Erythrozyten-Durchmesser (Intervall $1/2 - 2/3$ und $> 2/3$). Nach Beginn der Therapie fällt der Anteil der „**kleinen**“ Plasmodien auf 20%. Nach 4 Stunden Therapie liegen diese Plasmodien noch bei 18% um in den folgenden Stunden unter 15% zu fallen und ab der 8. Therapiestunde bei stets $\leq 6\%$ zu bleiben.

Dagegen liegt der Anteil der Plasmodien mit einem Durchmesser $\geq 1/2$ des **Erythrozyten-Durchmessers** anfangs bei 5%, bleibt in den ersten 5 Stunden nach Therapiebeginn $\leq 10\%$, und steigt dann im weiteren Verlauf ab der 6. Stunde auf über 15%. Von der 8. bis 17. Stunden liegen 19-31% der Plasmodien in dieser Gruppe und nach 20 Stunden Therapie umfassen diese mit 47% fast die Hälfte der Plasmodien.

Während in den ersten 5 Stunden kein Plasmodium eine deutliche **Vergrößerung** ($> 2/3$ des **Erythrozyten-Durchmessers**) zeigt, ist diese Gruppe im weiteren Verlauf zunehmend nachweisbar, der Anteil dieser Plasmodien bleibt jedoch stets unter 10%.

Einen stets hohen Anteil nehmen die **mittelgroßen Plasmodien** ($\frac{1}{3}$ - $\frac{1}{2}$ des Erythrozyten) mit 61-78% der Gesamtplasmodien ein. Erst nach 20 Stunden Therapie fällt deren Anteil auf 48%.

Da diese mittelgroßen Plasmodien im Vergleich zu den anderen Gruppen einen großen Anteil der Plasmodien umfassen, habe ich diese Gruppe nochmals in ihrer Hälfte unterteilt, um die Verschiebung hin zu größeren Plasmodien zu verdeutlichen. Die Gruppe der Plasmodien von $\frac{1}{3}$ - $\frac{1}{2}$ des Erythrozyten-Durchmesser wurde somit in der Mitte bei dem rechnerischen Wert von 0,415-fachem des Erythrozyten-Durchmessers geteilt (*Tab. 3.3.9, Diagr. 3.3.8*).

Diese Unterteilung zeigt dass 81% der Plasmodien vor Therapiebeginn kleiner dem 0,415-fachen Erythrozyten entsprechen. Deren Anteil fällt nach einer Stunde Therapie auf 57%. Nach 8 Stunden Therapie sind noch $\leq 35\%$ in dieser Gruppe und nach 20 Stunden Therapie 19%.

Im Gegensatz dazu steigt der Anteil der Plasmodien grösser dem 0,415-fachem Erythrozyten-Durchmesser von initial $< 20\%$ auf im Verlauf nach 8 Stunden $> 60\%$ und zuletzt nach 20 Stunden auf $> 80\%$. Somit kehrt sich das Verhältnis der Plasmodien innerhalb von 20 Stunden nach Therapiebeginn.

Damit kann gezeigt werden, dass die Plasmodiengröße im Verhältnis zum Erythrozyten-Durchmesser im Verlauf der Therapie zunimmt. Die Größe der Plasmodien liegt größtenteils zwischen dem $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{2}$ -fachem Erythrozyten-Durchmesser, wobei wiederum eine Verschiebung der Plasmodien-Größe im Verlauf der Therapie von $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{2}$ -fachem Durchmesser festgestellt werden kann.

Es kann somit gezeigt werden, dass die Plasmodien im Verlauf der Therapie eine Zunahme der Größe aufweisen. Da die lichtmikroskopische Beurteilung des Verhältnisses insgesamt nicht einfach ist und viele der Veränderungen in einem engen Bereich liegen, sind diese Werte in der praktischen Anwendung jedoch schwierig umzusetzen.

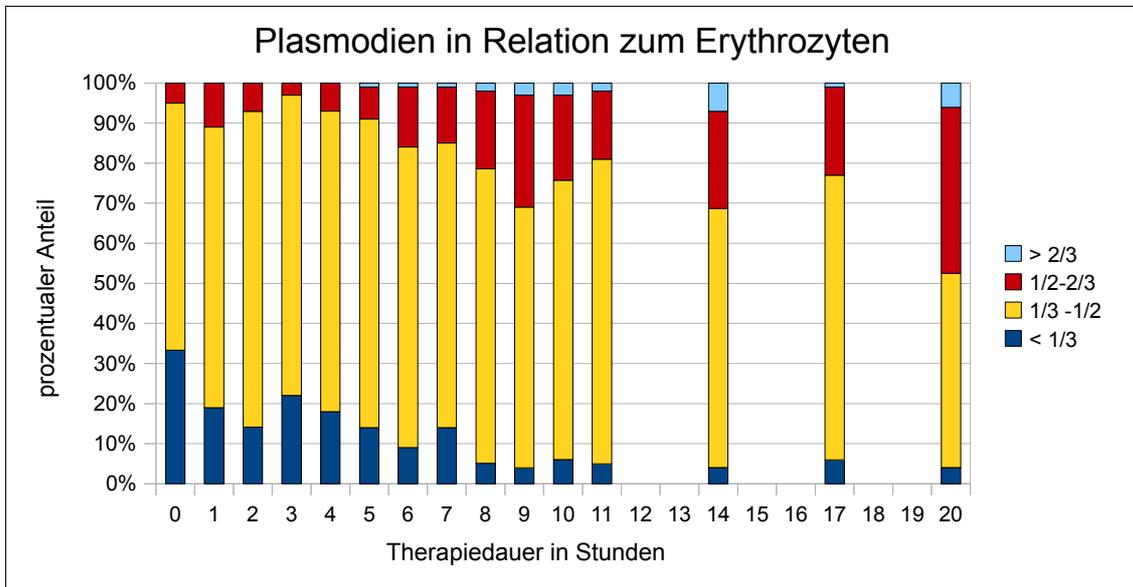


Diagramm 3.3.7: Relation der Plasmodien zum Erythrozyten in Intervallen der Plasmodien $< 1/3$, $1/3- 1/2$, $1/2-2/3$ und $> 2/3$ zum Erythrozyten-Durchmesser

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	14	17	20
<math>< 1/3</math>	33	19	14	22	18	14	9	14	5	4	6	5	4	6	4
$1/3-1/2$	61	70	78	75	75	77	75	71	72	65	69	76	64	71	48
$1/2-2/3$	5	11	7	3	7	8	15	14	19	28	21	17	24	22	41

Tabelle 3.3.8: Relation der Plasmodien zum Erythrozyten in Intervallen der Plasmodien $< 1/3$, $1/3- 1/2$, $1/2-2/3$ und $> 2/3$ zum Erythrozyten-Durchmesser

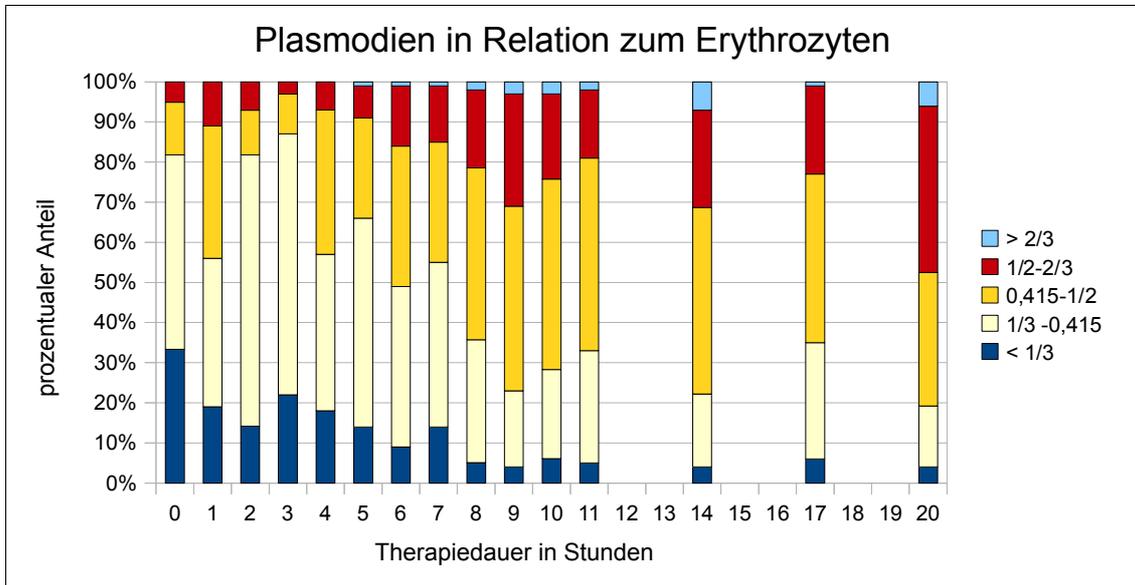


Diagramm 3.3.8: Unterteilung der Plasmodien der Gruppe $1/3$ - $1/2$ bei 0,415-fachem Erythrozyten-Durchmesser (vgl. Diagramm 3.3.7)

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	14	17	20
< 1/3	33	19	14	22	18	14	9	14	5	4	6	5	4	6	4
1/3 - 0,415	48	37	51	44	39	52	40	41	30	19	22	28	18	29	15
0,415 - 1/2	13	33	27	31	36	25	35	30	42	46	47	48	46	42	33
1/2 - 2/3	5	11	7	3	7	8	15	14	19	28	21	17	24	22	41
> 2/3	0	0	0	0	0	1	1	1	2	3	3	2	7	1	6

Tabelle 3.3.9: Unterteilung der Plasmodien der Gruppe $1/3$ - $1/2$ bei 0,415-fachem Erythrozyten-Durchmesser (vgl. Tabelle 3.3.8)

3.4 Sichtbare Veränderungen als direkte Folge der Medikamente?

Nachdem in dieser Arbeit Veränderungen der Plasmodien unter Therapie festgestellt werden konnten, stellt sich die Frage, inwieweit diese eine direkte Folge der Therapie auf die Plasmodien sind, oder auf eine Selektion reifer Plasmodien durch eine verminderte Sequestration zurückzuführen sind. Zur Untersuchung dieser Frage wurden *in vitro*-Kulturen von *P. falciparum* unter Chinin zunächst mit einer *in vitro*-Serie ohne antiparasitäres Medikament und des weiteren mit den Plasmodien des *in vivo* Studienabschnitts verglichen.

3.4.1 In vitro-Ausstriche: Plasmodien-Formen im zeitlichen Verlauf

Die in den *in vitro*-Ausstrichen vorkommenden Plasmodien wurden nach dem Auftreten der unterschiedlichen asexuellen Entwicklungsstadien (*Abb. 3.4.1 & 3.4.2, Tabelle 2.6.1*) über den Verlauf der beiden Serien, d.h. unter Einfluss von Chinin und einer Kontroll-Gruppe ohne antiparasitäres Medikament eingeteilt.

Im Vergleich der beiden *in vitro* Serien (*Diagr. 3.4.1/3.4.2.*) zeigt sich im Vorkommen der verschiedenen Plasmodien-Formen in der Chinin-Serie und der Kontroll-Serie bis zur 10. Stunde prinzipiell ein ähnliches Vorkommen der Plasmodien-Formen über den Beobachtungszeitraum: in den ersten Stunden der beiden Serien dominieren zunächst die Ringformen vor den Trophozoiten und den Plasmodien der Restgruppe. Reife Trophozoiten und Schizonten sind zu diesem Zeitpunkt in beiden Serien nicht anzutreffen. Der Anteil der Trophozoiten steigt in den folgenden Stunden auf Kosten der Ringformen langsam an, bis sich das Verhältnis der Ringformen zu den Trophozoiten nach 7 Stunden umkehrt und die Ringformen weiter zum Vorteil der Trophozoiten zurückgehen.

Ab der 11. Stunde beginnen in der Kontroll-Serie vermehrt reife Trophozoitenformen aufzutreten, während diese in der Chinin-Serie zu diesem Zeitpunkt weiter nicht zu beobachten sind. Nach der 25. Stunde zeigen sich in der Kontroll-Serie bei weiter zunehmend reifen Trophozoiten zudem Schizonten die das Bild in den Ausstrichen dominieren, während in der Chinin-Serie diese beiden Stadien der Plasmodienreifung

nur marginal zu sehen sind.

Dies zeigt, dass die Applikation von Chinin die Entwicklung der Plasmodien zu reifen Trophozoiten und somit die Reifung zu Schizonten verhindert.

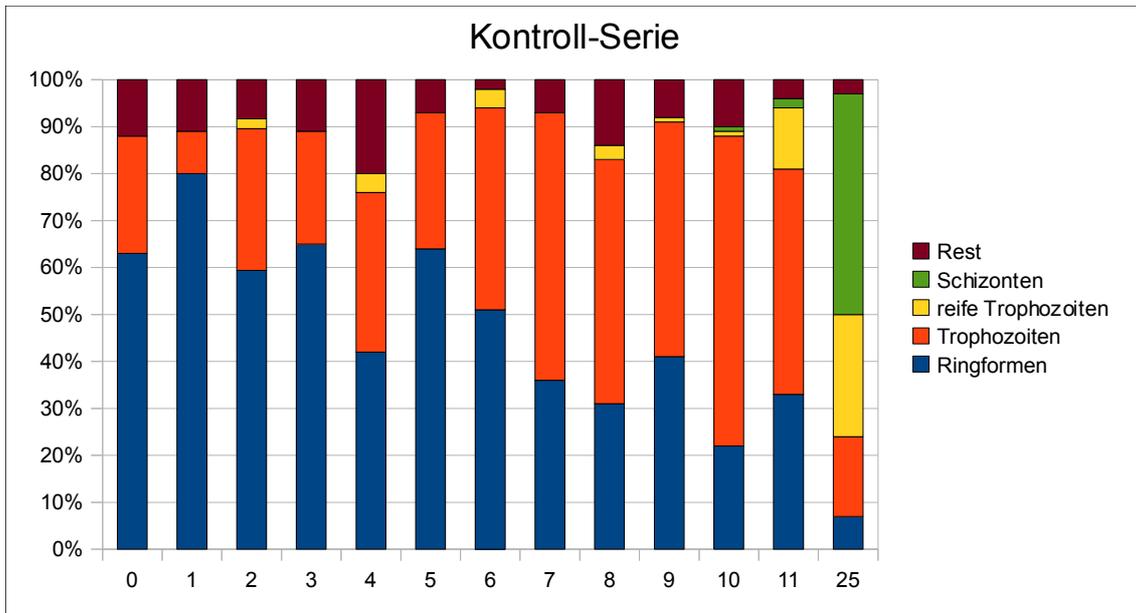


Diagramm 3.4.1: Kontroll-Serie: Ringe, Trophozoiten, reifen Trophozoiten, Schizonten und Rest

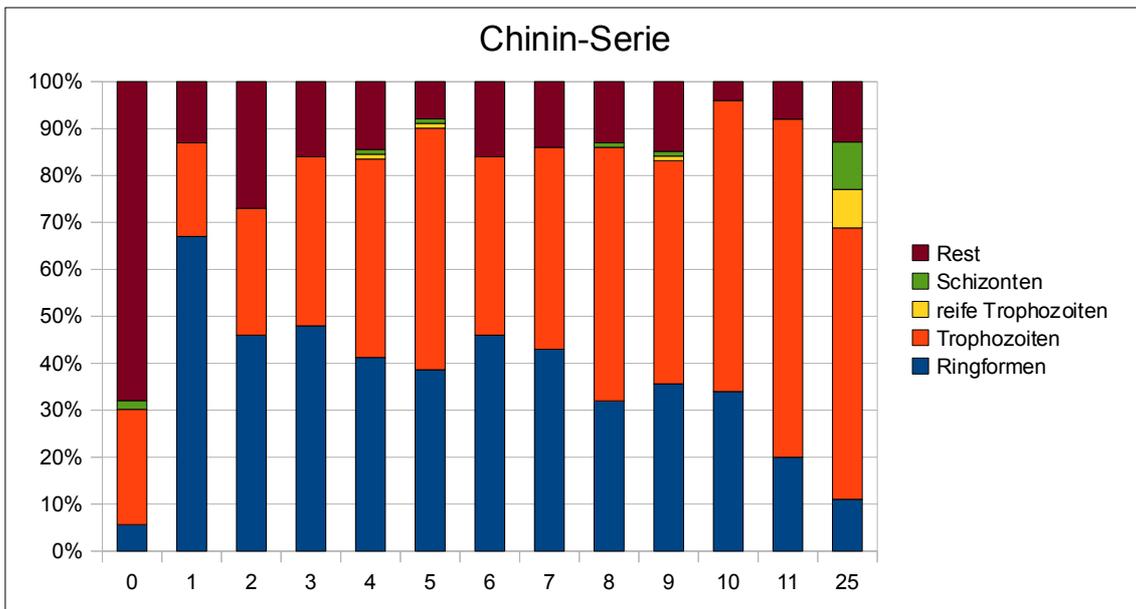


Diagramm 3.4.2: Chinin-Serie: Ringe, Trophozoiten, reifen Trophozoiten, Schizonten und Rest

3.4.2 Vergleich der Plasmodien-Struktur der *in vitro*-Serien

Beim direkten Vergleich der Strukturen der Plasmodien beider *in vitro*-Serien fällt auf, dass die Entwicklung der Ringformen zu Trophozoiten Unterschiede aufweisen. Während die Ringstrukturen jeweils zu Beginn beider Serien eine ähnliche Struktur mit meist verbreiterten Zytoplasmabändern aufweisen, zeigen die Plasmodien in der Weiterentwicklung zu Trophozoiten Veränderungen in der Zytoplasmastruktur.

So zeigt das Zytoplasma der Trophozoiten in der Kontroll-Serie in ihrer Umwandlung vom Ring zum Trophozoiten zunehmende Verdichtungen der Zytoplasmastruktur und im weiteren Verlauf beginnend rote Färbeanteile des Zytoplasmas (*Abb. 3.4.1c/d*), während bei den Ringformen der Chinin-Serie in der Entwicklung zu den Trophozoiten-Formen eine zunehmende Auflockerung des Zytoplasmas durch Vakuolen zu sehen ist. Rot-gefärbten Bereiche des Zytoplasmas können in der Chinin-Serie nicht festgestellt werden (*Abb. 3.4.2 b-e*), eine Weiterentwicklung zu Schizonten unterbleibt.

Dies zeigt, dass unter Einfluss von Chinin eine lichtmikroskopisch sichtbare gestörte Reifung der Trophozoiten stattfindet. So zeigen die Trophozoiten der obig getroffenen Einteilung zwar eine insgesamt ähnliche Verteilung über den Beobachtungszeitraum, hierbei jedoch eine unterschiedliche Struktur. Im Folgenden werden nun die Unterschiede der Struktur genauer differenziert.

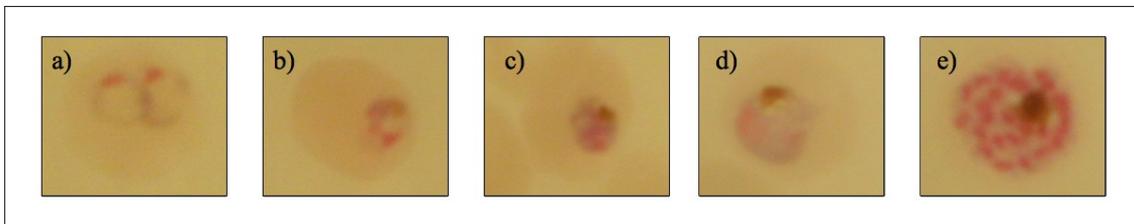


Abbildung 3.4.1: Plasmodienformen der *in vitro*-Kontroll-Studie: ^[23]

a) Ringformen, b) junger Trophozoit, c) Trophozoit, d) reifer Trophozoit, e) Schizont

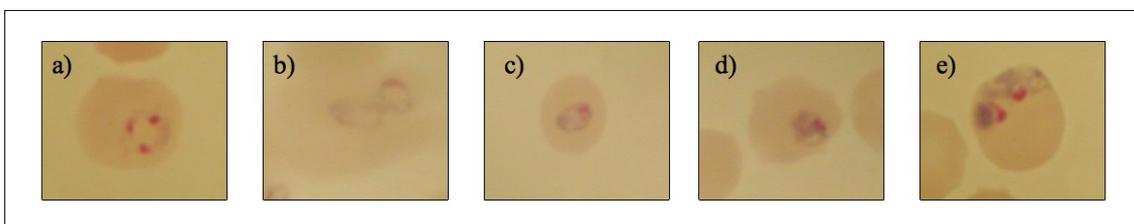


Abbildung 3.4.2: Plasmodienformen der *in vitro*-Chinin-Studie: ^[23]

a) Ringformen, b) junger Trophozoit, c), d) & e) gestörte Trophozoitenformen

3.4.3 Vergleich der *in vitro*-Serien mit der *in vivo*-Studie

Sind die Veränderungen, die in der *in vitro*-Serie unter Chinin Einfluss beobachtet werden, mit den Veränderungen, die unter *in vivo*-Bedingungen am Patienten zu sehen sind, vergleichbar? Um dies zu überprüfen habe ich die Strukturen der Plasmodien der *in vivo*-Studie mit den Plasmodien-Formen der *in vitro*-Serien verglichen.

Die Bedingungen sind für die Plasmodien nach Synchronisation unter *in vitro*-Bedingungen für einen Vergleich mit den *in vivo* Formen nicht optimal. Die Plasmodien zeigen in der Kultur insgesamt gestörtere, d.h. in ihrer Morphologie weniger schöne und intakte Plasmodien als in den peripheren Ausstrichen des Fallpatienten. Es sind zwar Plasmodien als Ringe mit Kern, Zytoplasmaband und Vakuole erkennbar, jedoch ist die runde gleichmäßige Form des Ringes oder die Homogenität des Zytoplasmabandes der Ringformen häufig gestört.

Dennoch können im Vergleich der beiden Serien Parallelen gezogen werden. So

dominieren in den ersten Stunden in der *in vivo*-Studie wie auch in den *in vitro*-Serien die Ringstrukturen. Während diese in der *in vivo*-Studie vor Beginn der Therapie meist Ringe mit schmalen Zytoplasmaband (Zytoplasmaband < Kern) sind, zeigen die Ringformen der *in vitro*-Serien zu diesem Zeitpunkt Ringformen mit verbreitertem Zytoplasma (Abb. 3.4.3).

Im Verlauf weniger Stunden beginnt sich das Bild der Plasmodien zu verändern (Abb. 3.4.4). Die Ringe der **Kontroll-Serie** beginnen zu Trophozoiten zu reifen, das Zytoplasma der Ringe verbreitert sich und beginnt Verdichtungen der Struktur mit beginnend rötlicher Färbung als Hinweis auf DNA-Synthese zu zeigen.^[85]

Eine Verbreiterung des Zytoplasmas ist ebenso bei den Plasmodien der *in vitro*-**Chinin-Serie** zu sehen. Im Gegensatz zu den Plasmodien der Kontroll-Serie ist das Zytoplasma vakuolig aufgelockert, Verdichtungen der Zytoplasmastruktur sind ebenfalls zu beobachten, jedoch keine rötliche Verfärbung des Zytoplasmas. Im Vergleich der Chinin-Serie zu den ***in vivo*-Plasmodien** zeigen sich Ähnlichkeiten der Veränderungen: die Verbreiterung des Zytoplasmabandes mit vakuoliger Strukturauflockerung, wobei diese Veränderungen in der *in vitro*-Serie deutlicher ausgeprägt sind. Während in der *in vitro*-Serie auch Trophozoiten-Formen (ohne zentrale Vakuole) zu finden sind, sind diese *in vivo* nicht zu beobachten. Dies liegt an der weiterhin stattfindenden Sequestration dieser Formen in den Kapillaren des Patienten.

Nach weiteren 3 Stunden (Abb. 3.4.5) zeigt die Kontroll-Serie vermehrt Trophozoiten mit zunehmend rot-gefärbten Bezirken im inhomogenen Zytoplasma der Plasmodien. In der Chinin-Serie sind ebenso zunehmend trophozoite Formen zu sehen, welche im Unterschied zu den Trophozoiten der Kontroll-Serie keine rot-gefärbten Bereiche, sondern vakuolige Veränderungen des Zytoplasmas zeigen. In der *in vivo*-Studie sind ebenfalls Ringformen mit durch Vakuolen aufgelockertes und verbreitertem Zytoplasma zu sehen.

Die Veränderungen der *in vivo*-Ringformen gleichen denen der *in vitro*-Kontroll-Serie mit der verbreiterten und durch Vakuolen aufgelockerten Zytoplasma-Struktur.

Trophozoiten treten aufgrund der Sequestration im peripheren Blutausschlag des Patienten nicht auf.

Nach 10 Stunden sind die Unterschiede der Kontroll-Serie zu den Plasmodien mit Chinin-Applikation noch deutlicher sichtbar. Die *in vitro*-Serien zeigen zu ca. 2/3 Trophozoiten-Stadien (*Diagr. 3.4.1 & 3.4.2, Kontrollgruppe 66%, Chinin-Gruppe 62%*), wobei die Struktur des Zytoplasmas immer offensichtlicher die obig beschriebenen Unterschiede zeigt (*Abb. 3.4.6*). Das Zytoplasma der Chinin-behandelten Plasmodien ähnelt den Gruppe III-Plasmodien der *in vivo*-Studie (*Kapitel 3.2.3*), wobei die Plasmodien der *in vivo*-Studie noch eine Vakuole zeigen. Veränderten Formen ohne Vakuole sind weiter in den Kapillaren sequestriert.

Nach einem Tag (*in vivo-Studie: 23.h, in vitro 25.h, Abb. 3.4.7*) dominieren die sehr reifen Trophozoiten und Schizonten das Bild im Ausstrich der Kontroll-Serie. Die rötlichen Veränderungen des Zytoplasmas haben sich zu Schizonten-Kernen differenziert. Diese Formen sind in der Chinin-Serie deutlich weniger häufig zu sehen (11%) und kommen zudem in gestörter Morphologie vor. Die Mehrzahl der Plasmodien-Formen sind Trophozoiten, welche ebenfalls in ihrer Form und Struktur gestört sind, das Zytoplasma zeigt deutliche Vakuolen.

Es können somit im Vergleich der *in vitro*-Serien untereinander Unterschiede in der Zytoplasma-Struktur festgestellt werden. Im Vergleich dieser Plasmodien mit den Plasmodien des *in vivo*-Studienabschnitts zeigen sich Gemeinsamkeiten der Zytoplasma-Strukturen unter Einfluss einer Medikation und Unterschiede zu der Kontrollgruppe ohne Einfluss von Medikamenten.

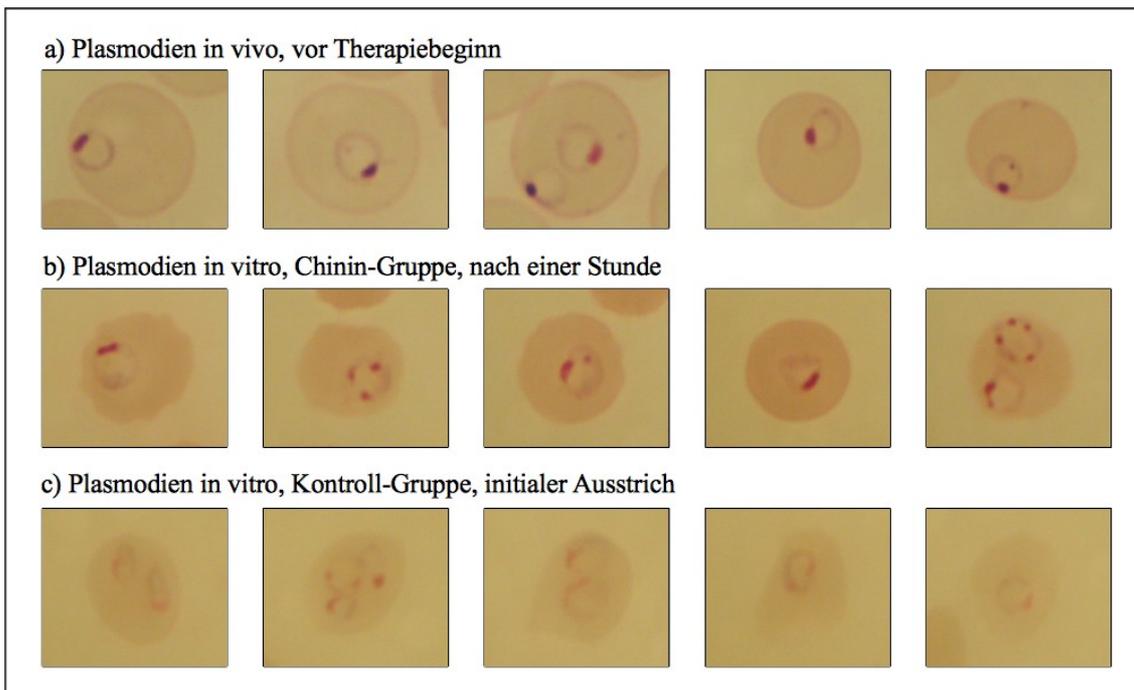


Abb. 3.4.3: Plasmodien der in vivo-Studie und den in vitro-Serien: initiale Ausstriche (zu beachten: in vitro-Chinin-Plasmodien nach 1 Stunde da die initialen Plasmodien mit Synchronisationsdefekt) ^[23]

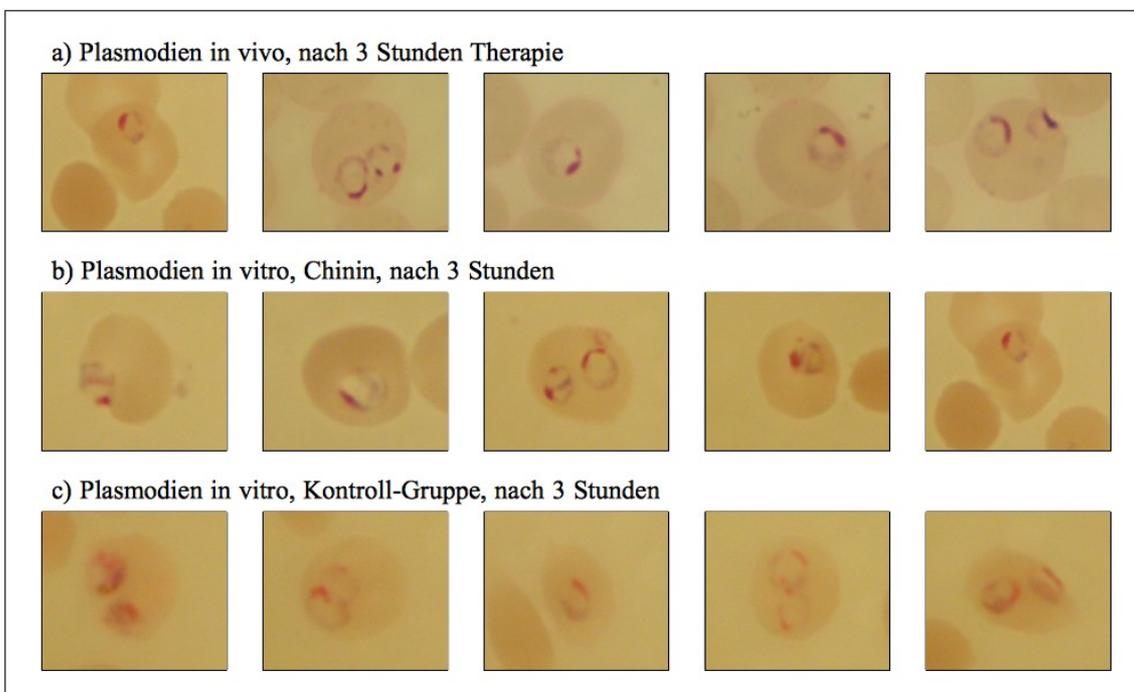


Abb. 3.4.4: Plasmodien der in vivo-Studie und den in vitro-Serien: nach 3 Stunden ^[23]

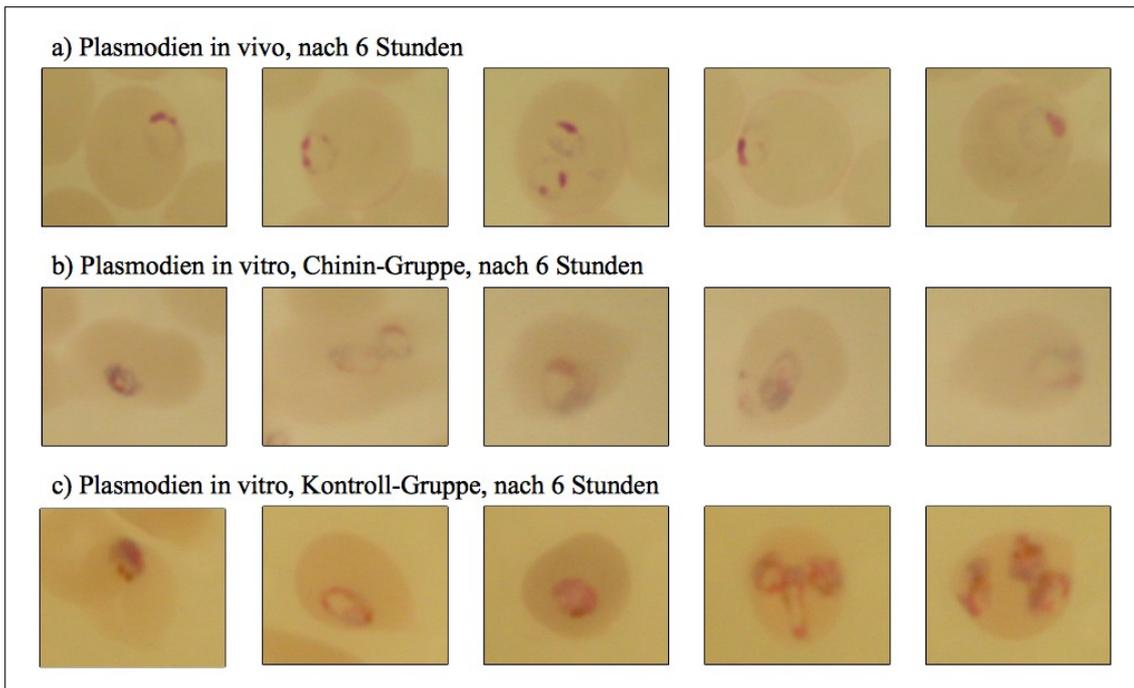


Abb. 3.4.5: Plasmodien der in vivo-Studie und den in vitro-Serien: nach 6 Stunden ^[23]

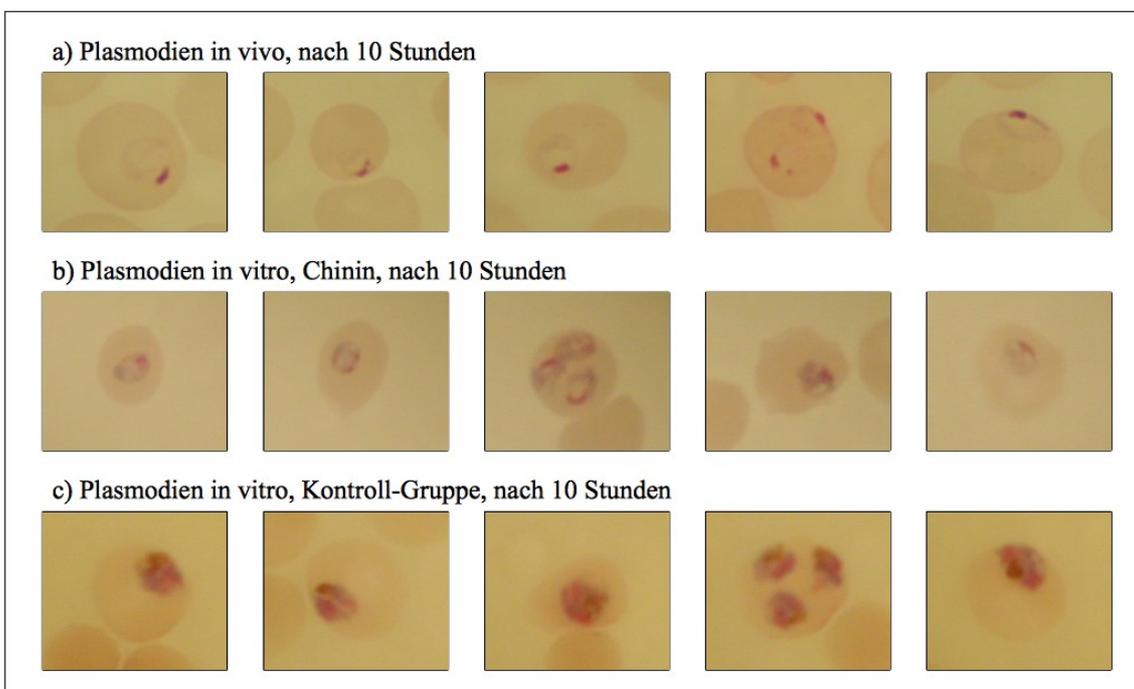


Abb. 3.4.6: Plasmodien der in vivo-Studie und den in vitro-Serien: nach 10 Stunden ^[23]

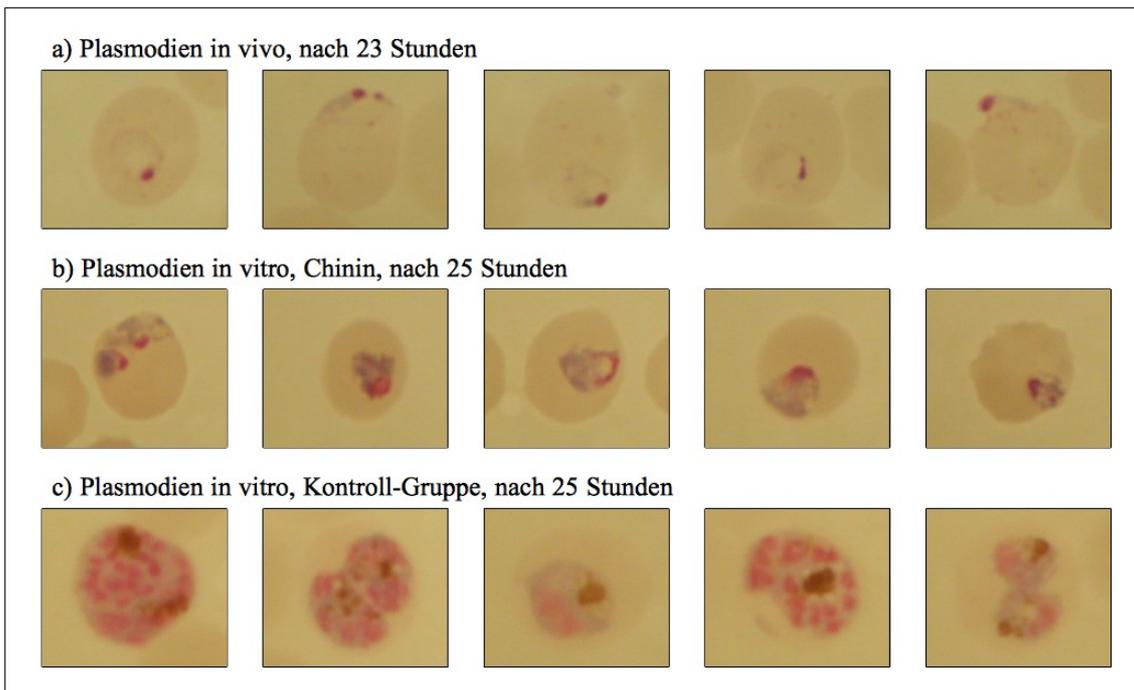


Abb. 3.4.7: Plasmodien der in vivo-Studie nach 23 Stunden, in vitro-Serien: nach 25 Stunden ^[23]

4. Diskussion

Die Eradikation von *P. falciparum* liegt trotz starker Bemühungen in den vergangenen Jahrzehnten noch in weiter Ferne. Nach wie vor lebt die Hälfte der Weltbevölkerung mit dem Risiko, an dieser potentiell tödlich verlaufenden Infektion zu erkranken.^{[14][15]}

Zunehmende Resistenzen der Plasmodien gegen gängige Therapeutika erschweren die Behandlung der Malaria-Infektion.^{[56][57][58][59][60]} Es existiert kein Parameter, frühzeitig eine Resistenz zu erkennen: so steigt die Parasitämie, die neben der Klinik des Patienten einzige Erfolgskontrolle einer Therapie, auch bei wirksamer Behandlung häufig am ersten Tag noch an.^{[73][74]} Eine Resistenz kann somit erst spät erkannt werden, mit oft fatalen Folgen für den betroffenen Patienten.^{[75][76]} In der aktuellen Literatur lassen sich keine Studien zur frühzeitigen Erkennung von Resistenzen von *P. falciparum* mit einfachen Methoden finden.

Die hier vorliegende Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, basierend auf der unter einfachsten Bedingungen durchführbaren lichtmikroskopischen Untersuchung der Plasmodien, Parameter für eine frühzeitige Diagnose von Resistenzen aufzuzeigen.

Hierfür wurden Plasmodien eines an einer schweren *Malaria tropica* erkrankten Patienten anhand einer Fallstudie auf frühzeitige Veränderungen unter Therapie untersucht. Dies erfolgte durch eine lichtmikroskopischen Analyse der Plasmodien-Strukturen mit Unterstützung digital angefertigter lichtmikroskopischer Photographien. Die so erhaltenen Daten zeigen frühzeitige Veränderungen der Plasmodien bereits in den ersten Stunden nach Therapiebeginn.

Dass diese Veränderungen einer direkten Medikamentenwirkung zuzuschreiben sind, konnte zusätzlich in einer *in vitro*-Studie gezeigt werden. In dieser wurden Plasmodien-Kulturen unter Chinin-Einfluss mit Kulturen ohne Medikamenteneinfluss verglichen.

4.1 Studienabschnitt – „in vivo“: Analyse der Plasmodien am Mikroskop

Die verwendete Untersuchung am Lichtmikroskop ist Mittel der Wahl in der Malaria-Diagnostik und bereits nach kurzer Einarbeitungszeit anwendbar. Die Beurteilung der Plasmodien auf die in dieser Studie postulierten Parameter ist ebenso nach kurzer Einarbeitungszeit gut zu handhaben.

Die Einteilung der Plasmodien erfolgte in **sechs Gruppen**. Zunächst anhand einer groben Unterteilung nach Lage der Plasmodien im Erythrozyten: frei im Erythrozyten liegenden Plasmodien und Erregern mit Kontakt zur Erythrozytenmembran.

Die Plasmodien mit Membran-Kontakt lassen sich weiter in der Membran vollständig anliegenden Erreger (*Accolé-Formen*) und zu Plasmodien, welche die Erythrozyten-Membran hervorwölben, einteilen. Für letztere habe ich in dieser Studie den Arbeitstitel „*Accentué-Formen*“ verwendet.

Die im Erythrozyten liegenden Ringformen lassen sich nach der Kern-Plasma-Relation und Struktur der Zellorganellen in drei Gruppen einteilen: Ringformen mit dünnem Zytoplasmaband und homogener Struktur, Ringformen mit breitem und inhomogenem Zytoplasma und Übergangsformen zwischen den genannten Formen. Alle Plasmodien, welche nicht den obigen Kriterien entsprechen, werden einer Restgruppe zugeteilt.

Die **Accolé-Formen** zeigen in den hier untersuchten Blutaussstrichen nur eine geringe Häufigkeit ohne typische Verteilung. Diese haben somit keinen Vorteil in der Bestimmung einer Therapiewirksamkeit. Bei einer Untersuchung der Blutaussstriche in der klinischen Praxis könnten sie somit der Restgruppe zugeordnet werden.

Im Gegensatz hierzu zeigen die **Accentué-Formen** ein charakteristisches Vorkommen. So treten diese vor Therapiebeginn und in den ersten Stunden der Therapie zunächst kaum auf und beginnen ab der 7. Stunde zunehmend im peripheren Ausstrich sichtbar zu werden, bis diese zur 27. Stunde maximal 45% der Plasmodien ausmachen.

Eine Wirkung der Therapie ist also bereits durch die Beurteilung der Lage der Plasmodien im Erythrozyten, beginnend ab der 7. Stunde (deutlich aber ab der 17. Stunde), anhand einer Zunahme dieser Formen feststellbar.

Im Gegensatz zu der Parasitämie des Patienten, welche abgesehen von dem deutlichen Rückgang nach dem Teilaustausch zunächst ab der 18. Stunde einen leichten und erst ab der 23. Stunde einen deutlichen Abfall der Plasmodienlast vorweist, zeigt die Bestimmung der Lage der Plasmodien im Erythrozyten einen Vorteil.

Über die genaue Ursache, welche zum zunehmenden Auftreten der Accentué-Formen im peripheren Ausstrich führt, kann im Rahmen dieser Studie keine Aussage gemacht werden. Eine mögliche Erklärung ist in einer gestörten Invasion der Plasmodien in den Erythrozyten zu vermuten. Nach Beginn der Behandlung werden weiterhin Merozoiten aus von der Therapie noch nicht betroffenen Schizonten freigesetzt, welche erneut Erythrozyten als Wirtszellen benötigen. Die Invasion in diese könnte durch die Wirkung der Therapie beeinträchtigt sein. Dies würde bedeuten, dass die Plasmodien bereits in einem frühen Stadium des asexuellen Entwicklungszyklus gestört wären. Die genaue Ursache kann jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden und muss in weiteren Studien untersucht werden.

Die Plasmodien der **Restgruppe**, als Gruppe von unterschiedlichen morphologisch gestörten Formen, kommen im Verlauf der Therapie zunächst in nicht charakteristischen, leicht schwankenden Anteilen vor, um dann ab der 27. Stunde bei gleichzeitig deutlichem Rückgang der Parasitämie anzusteigen. Für eine frühzeitige Diagnostik einer wirksamen Therapie sind diese Formen somit nicht relevant und zeigen keinerlei Vorteil gegenüber der Parasitämie.

Die in Bezug auf eine frühe Wirksamkeit der Therapie wichtigsten Plasmodien-Formen sind die **Ringformen**, insbesondere die Bestimmung von deren Kern-Plasma-Relation. Im Verlauf der Therapie zeigt sich, dass bei relativ konstanter Anzahl der Gesamt-Ringformen im Blutaussstrich die vor Beginn der Therapie dominierenden dünnen Ringformen der Gruppe I in den ersten Stunden rasch zurückgehen und von Ringformen der Gruppe II und Gruppe III abgelöst werden. So kehrt sich das Verhältnis der Ringe mit einem Zytoplasmaband, welches dünner als der Kerndurchmesser ist, im Vergleich zu Ringen mit verbreitertem Zytoplasma innerhalb der ersten drei Stunden komplett um. Im Vergleich hierzu zeigt in diesem Zeitraum die Parasitämie keine Veränderungen.

Die Einteilung der Ringformen nach der Kern-Plasma-Relation in die Gruppen I und III erfolgte mit einer Zwischengruppe, welche die Plasmodien mit einfachem bis doppeltem Kerndurchmesser umfasst (Gruppe II). Dies hat den Vorteil, dass bereits geringe Änderungen der Plasmodien unter Therapie dokumentiert werden können. Im weiteren Vorkommen der Plasmodien-Gruppen über den Verlauf der Therapie zeigt sich nun bei den Plasmodien der II. und III. Gruppe eine große Schwankungsbreite im Bereich der 7. und 17. Stunde. Diese beiden Gruppen zusammengefasst (**Gruppe II+III**) zeigen einen gleichmäßigen Verlauf. Die Ursachen hierfür sind einerseits in einem fließenden Übergang der Formen und andererseits in der Struktur des Zytoplasmas und des Kerns zu finden. Das verbreiterte und inhomogenes Zytoplasma steht in Relation zu einem ebenfalls vergrößerten Kern und fällt deshalb im Vergleich zur Relation mit einem durchschnittlichen Kerndurchmesser zu tief aus. Die Kern-Plasma-Relation ist dennoch ein guter Parameter zur Einschätzung eines Therapieerfolges, da die Kerne sich weniger deutlich vergrößern als das Zytoplasma.

Wichtig ist es, die Einteilung der Kern-Plasma-Relation mit der Beurteilung der Struktur von Zytoplasma und Kern zu *kombinieren* und Plasmodien mit Zeichen von Strukturänderungen in eine höhere Gruppe einzuordnen. Veränderungen können damit früher als mit der alleinigen Beurteilung der Kern-Plasma-Relation erkannt werden.

Der Verlauf der Gruppen zeigt, dass eine separate Einteilung in Gruppe II nur zu Beginn sinnvoll ist. Die Gruppe II wurde dennoch in der Einteilung der Plasmodien belassen, da gerade die ersten Stunden nach Therapiebeginn von Interesse sind und die Einteilung in die Gruppe II die initiale leicht beginnenden Veränderungen frühzeitig aufzeigt.

In **Grenzfällen**, in welchen Unsicherheiten zu verschiedenen Ringformgruppen bestehen, wird das jeweilige Plasmodium in die weniger veränderte Gruppe eingeteilt. Einer irrtümlichen Einschätzung der Wirkung des Medikaments wird hiermit entgegengewirkt und somit eine potentielle Resistenz nicht übersehen. Andererseits wird eine Ringform mit deutlichen Strukturanomalie, solange diese noch über die Kern-Plasma-Relation einteilbar ist, in die folgend höhere Gruppe eingeteilt, da hierbei von einer Störung durch die Therapie ausgegangen werden muss.

Was ist die **Ursache der morphologischen Veränderungen** der Plasmodien-Ringe? Bei der alleinigen lichtmikroskopischen Analyse der Blutaussstriche kann hierüber nur spekuliert werden.

Einerseits könnten die morphologischen Veränderungen der Ringe durch eine Selektion reiferer Plasmodien-Formen bedingt sein. Chinin würde in diesem Fall die Sequestration stören: durch eine verminderte Adhäsion der Erythrozyten mit reifen Ringstadien am Endothel der Kapillaren wären diese vermehrt im peripheren Blutaussstrich sichtbar.

Andererseits könnte die Schädigung durch die Chinin-Therapie direkt am Plasmodium sichtbar werden. Der genaue molekularbiologische Wirkmechanismus von Chinin im Plasmodium ist noch nicht geklärt und wird kontrovers diskutiert.^{[29][30]} Konsens besteht darin, dass Chinin im erythrozytären Entwicklungszyklus des Parasiten wirkt, und dort den Hämoglobin-Stoffwechsel stört^{[86][30][50][32]} (*s. Kapitel 1.1.5*).

Chinin scheint im Parasiten verschiedene Ansatzpunkte zu nutzen. So wurde eine gestörte Entgiftung des Hämatin (Ferriprotoporphyrin IX) in der Nahrungsvakuole ebenso gezeigt,^{[32][41][42][43][44][45][33][46][42]} wie eine eingeschränkte Aufnahme von Hämoglobin in den Parasiten durch gestörte Endozytose^{[50][30][47]} und eine gehemmte Fusion endozytierter Transportvesikeln mit der Nahrungsvakuole^[28] (*vgl. Kapitel 1.1.5*).

Die in der hier vorliegenden morphologischen Studie festgestellten Veränderungen der Parasiten, mit inhomogenem und verbreitertem Zytoplasma, stützen den letztgenannten Ansatzpunkt. Die morphologischen Änderungen der Parasiten könnten die lichtmikroskopisch sichtbare Anhäufung von Hämoglobin-Transportvesikeln sein, die ihre Fähigkeit mit der Nahrungsvakuole zu fusionieren durch eine Veränderung des (unbekannten) Fusionsmechanismus der Phospholipidmembran verloren haben. Dies ist im Rahmen dieser Arbeit aber reine Spekulation, da nur eine rein lichtmikroskopische Untersuchung der Plasmodien erfolgt ist.

4.2 Studienabschnitt – „in vivo“: digitale Vermessung der Plasmodien

Die am Lichtmikroskop beurteilten Parameter wurden ergänzend in einem zweiten Teil der Studie per digitalisierter und vermessener lichtmikroskopischer Fotos der Plasmodien gestützt. So konnten die im ersten Studienabschnitt postulierten Unterteilung der intraerythrozytären Formen in der **Vermessung der Ringformen** mit Kernen und Zytoplasma betätigt werden. Insbesondere der Einfluss eines im Verlauf der Therapie ebenfalls vergrößernden Kerndurchmessers und dessen Einfluss auf die Kern-Plasma-Relation konnte bestätigt werden. So zeigt das Zytoplasmaband alleine betrachtet eine deutlichere Verbreiterung gegenüber der Kern-Plasma-Relation über den Verlauf der Therapie. Ursache hierfür ist die bereits oben (*Kapitel 3.3.2*) beschriebene im Verlauf stattfindende Vergrößerung des Kerndurchmessers.

Die direkt am Mikroskop erhobenen Ergebnisse des ersten Studienabschnitts mit einer Einteilung der Plasmodien nicht nur über die Kern-Plasma-Relation, sondern mit zusätzlicher Berücksichtigung der Struktur der Plasmodien, zeigt im Gegensatz zu der reinen Vermessung der Parasiten deutlichere Ergebnisse bezüglich der Verteilung der Ringformen in die Gruppen. Ein Wechsel von Plasmodien mit einem dünnen Zytoplasmaband hin zu verbreiterten Formen konnte hier ebenfalls gezeigt werden, und somit die Ergebnisse des ersten Studienabschnitts gestützt werden.

Als zusätzlicher Parameter konnte in der Vermessung der Plasmodien am Computer eine mit der Zytoplasma-Verbreiterung einhergehende **Vergrößerung der Plasmodien** festgestellt werden, welche bereits im ersten Studienabschnitt vermutet wurde. So misst der Hauptteil der Plasmodien vor Therapiebeginn $< 3\mu\text{m}$, um im weiteren Verlauf bereits nach der ersten Stunde auf $3\text{-}3,5\mu\text{m}$, und dann zunehmend $>3,5\mu\text{m}$ zu messen. Eine praktikable Relation zur Beurteilung am Lichtmikroskop konnte jedoch nicht eruiert werden. Somit ist die Größe der Plasmodien für sich gesehen für eine frühzeitige Erkennung einer Therapiewirkung im Mikroskop nicht von Bedeutung.

4.3 Studienabschnitt – „in vivo“: gesamt

Die Untersuchung der Plasmodien am Lichtmikroskop und deren Vermessung am Computer zeigt somit eine Veränderung der Plasmodien im Verlauf der Therapie.

Während die Parasitämie erst gegen Ende des ersten Behandlungstages ein Wirken der Therapie anzeigt, ermöglicht dies die Einteilung der Plasmodien nach ihrer Lage im Erythrozyten beginnend mit der 7. Therapiestunde.

Durch die Beurteilung der Ringformen kann bereits in der ersten Stunde eine Veränderung festgestellt werden. Der Wechsel von Ringen mit dünnen, homogenen Zytoplasma zu solchen mit breitem, inhomogenen Zytoplasma lässt auf eine effiziente Medikation schliessen.

Somit kann die Hypothese bestätigt werden, dass bei Patienten mit einer schweren *Plasmodium falciparum* Infektion, der Erfolg der Therapie bereits frühzeitig an morphologischen Veränderungen der Plasmodien festgestellt werden kann.

Zu beachten ist jedoch, dass in dieser Studie die Veränderungen von *P. falciparum* anhand einer Fallstudie untersucht wurden, und sie daher nur eine eingeschränkte Aussagekraft hat. Es bleibt die Frage, inwieweit die bei diesem Patienten gezeigten Veränderungen der Plasmodien auch bei *anderen Patienten* mit einer wirksamen Therapie zu beobachten sind.

Des weiteren kann diese Arbeit nicht beantworten, wie sich die Morphologie von therapieresistenten Plasmodien unter Therapie darstellt. Diese Fragen muss in weiterführenden Studien nachgegangen und in der klinischen Praxis geprüft werden.

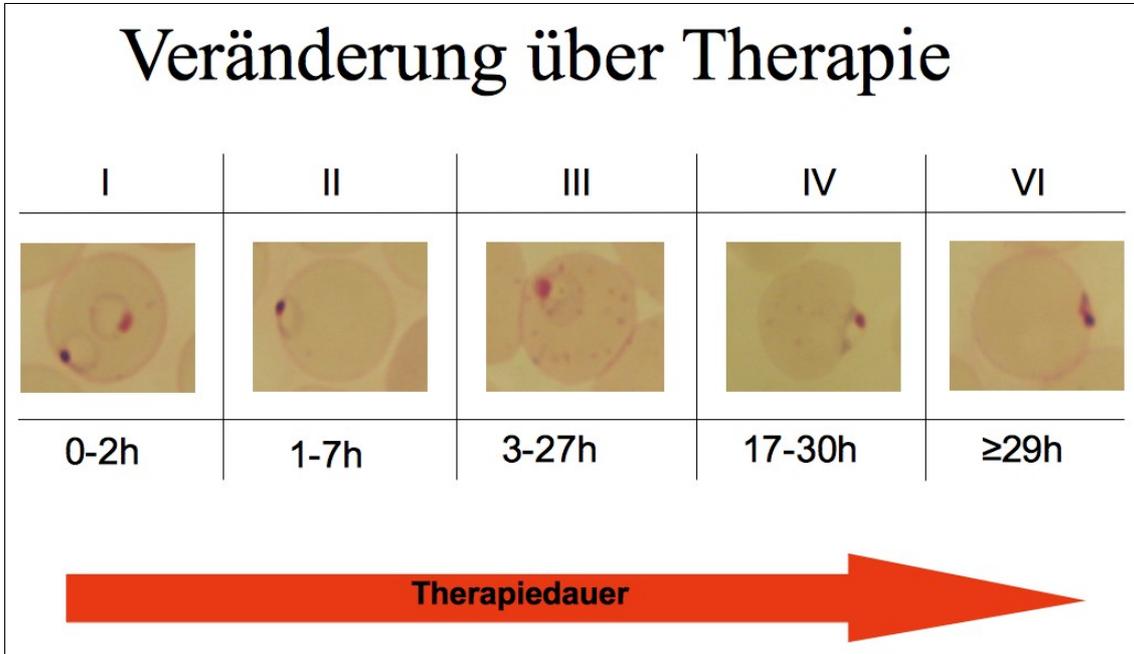


Abb.4.1: Veränderungen der Plasmodien im Verlauf der Therapie

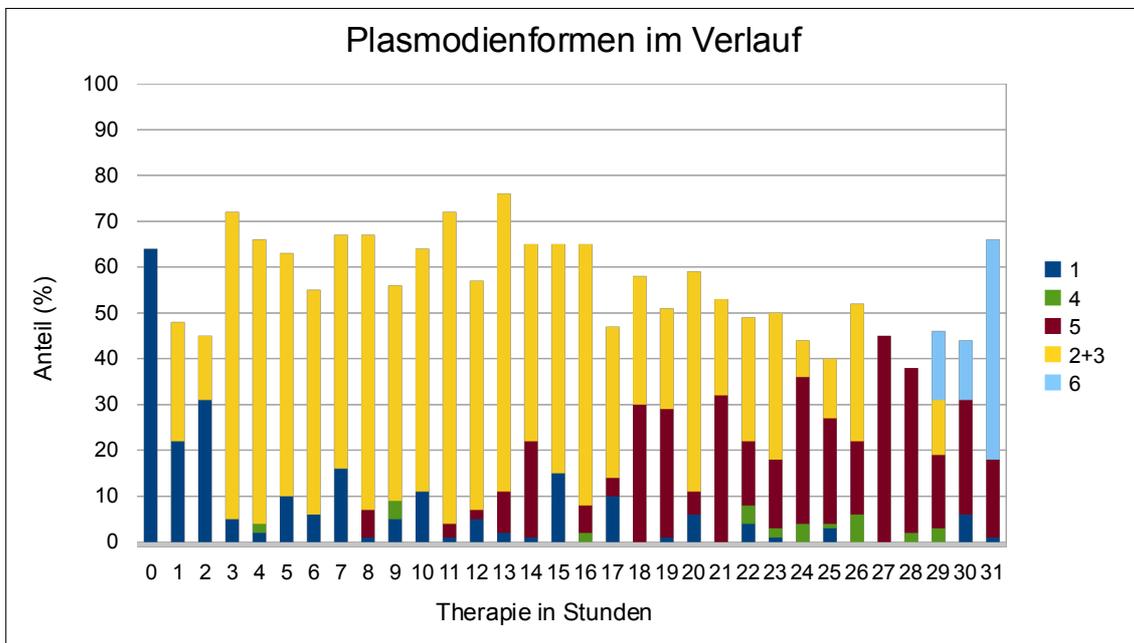


Diagramm 4.1: Veränderungen der Plasmodien im Verlauf der Therapie

4.4 Studienabschnitt – „*in vitro*“: Ätiologie der Strukturänderungen

Inwieweit nun die im ersten Studienabschnitt festgestellten Veränderungen der Plasmodien über den Verlauf der Therapie einer direkten Wirkung der Medikation zuzuschreiben sind, wurde *in vitro* an Kulturen von *P. falciparum* untersucht. Hierfür wurde die Morphologie der Plasmodien unter Einfluss von Chinin mit einer Kontroll-Serie ohne äusseren Einfluss verglichen und diese Ergebnisse den Plasmodien der *in vivo*-Studie gegenübergestellt.

Die Veränderung der **Ringformen** mit einem Wechsel von dünnen Ringformen (Gruppe I) zu Ringformen mit einem verbreiterten Zytoplasma (Gruppe III), die in den ersten Stunden der *in vivo*-Studie beobachtet wurde, können in den Plasmodien-Kulturen der *in vitro*-Serien leider nicht befriedigend beurteilt werden, da viele morphologisch gestörte Ringformen das Bild dominieren. Die dünnen Ringformen mit homogenem Zytoplasma machen nur einem sehr kleinen Anteil der Ringformen aus. In den *in vitro*-Serien wie auch in der *in vivo*-Studie sind jedoch in den ersten Stunden Ringformen dominierend.

Im weiteren entwickeln sich die Ringformen beider *in vitro*-Studien weiter zu **Trophozoiten**-Formen, gekennzeichnet durch den Rückgang der parasitären Vakuole. Dies unterscheidet die *in vitro*-Serien von der *in vivo*-Studie, in welcher keine Trophozoiten im Ausstrich zu sehen sind, da diese in den Kapillaren sequestriert werden.

Die Entwicklung zu Trophozoiten-Formen der *in vitro*-Serie findet bei den Plasmodien der Chinin- sowie Kontroll-Serie statt. Unterschied der beiden Serien ist, dass die Entwicklung der Plasmodien der Chinin-Serie gestört ist und dort somit deutlich weniger **Schizonten** zu sehen sind als in der Kontroll-Serie.

Während beide *in vitro*-Serien die Entwicklung der Ringformen zu Trophozoiten zeigen, beginnen sich in der Entwicklung des **Zytoplasmas** bereits frühzeitig **Unterschiede** im

Vergleich der Chinin- und Kontroll-Serie abzuzeichnen. Das Zytoplasma der Ringstrukturen unter Medikation zeigt bereits ab der 3. Stunde eine gestörte Entwicklung. So zeigen die Trophozoiten der Kontroll-Studie zu diesem Zeitpunkt in ihrem verbreiterten Zytoplasma bereits Hinweise auf eine beginnende DNA-Synthese^[85] während die Trophozoiten der Chinin-Serie beginnende Auflockerungen des ebenfalls verbreiterten Zytoplasmas aufweisen. Diese Veränderungen intensivieren sich über den weiteren Verlauf der Serien bis schließlich in der Kontroll-Serie hauptsächlich mehrkernige Schizonten und in der Chinin-Serie mehrheitlich Trophozoiten mit aufgelockertem Zytoplasma vorkommen.

Ein Vergleich der Zytoplasmastruktur von Ringformen der *in vitro*-Serien mit der *in vivo*-Studie zeigt, dass die Veränderungen des Zytoplasmas der Chinin-Serie denen der *in vivo*-Studie bezüglich der Auflockerung der Zytoplasmastruktur unter dem Lichtmikroskop gleicht. Zudem bestehen deutliche strukturelle Unterschiede zu der Entwicklung von Ringformen in der Kontroll-Serie.

Nach diesem Vergleich ist davon auszugehen, dass die Gruppe III-Plasmodien im Blutausschlag der *in vivo*-Studie des Patienten durch die Medikation in ihrer Reifung gestörte Ringformen sind.

Zudem sind im peripheren Blutausschlag der *in vivo*-Studie nur Ringformen und keine Trophozoiten-Stadien (fehlende zentrale Vakuole) der Plasmodien zu sehen, was für eine weiterhin bestehende Sequestrierung der gereiften Plasmodienformen in den Kapillaren spricht.

Die Auswertung der *in vitro*-Serie und der Vergleich zur *in vivo*-Studie zeigt somit eine Veränderung der Plasmodien unter Therapieeinfluss, die einer direkten Wirkung der antiparasitären Medikation zuzuschreiben ist. Die Schädigung der Plasmodien beginnt bei der Umwandlung von Ringformen zu Trophozoiten, diese bilden sich in gestörter Form aus und die Entwicklung zu reifen Trophozoiten und Schizonten wird unterbunden.

Es muss jedoch betont werden, dass die in den ersten Stunden nach Therapiebeginn vorherrschenden dünnen Ringformen in der *in vitro*-Serie durch das Vorkommen vieler morphologisch gestörter Ringformen nicht beurteilt werden kann.

4.5 Anwendung in der Praxis

Folgendes praktische Vorgehen zur Beurteilung eines Therapieerfolges bei einer schweren *P. falciparum* - Infektion kann ich nach den Ergebnissen dieser Studie vorschlagen:

Bei Aufnahme eines Patienten mit schwerer *Malaria tropica* wird ein initialer Blutaussstrich zur Beurteilung der Parasitämie und eine parallele Einteilung der Plasmodien in die obigen Gruppen angefertigt. Drei Stunden nach Therapiebeginn sollte dann ein erneuter Blutaussstrich mit einer Gruppen-Einteilung der Plasmodien erfolgen. Bei wirksamer Therapie zeigt sich hier bereits eine Verschiebung der Kern-Plasma-Relation hin zu breiteren Zytoplasmabändern. Dies wird nun in Abständen von je weiteren 3 Stunden beurteilt. Im Verlauf können dann zunehmend *Accentué*-Formen im Ausstrich festgestellt werden, bis schließlich die Plasmodien der Restgruppe bei rückläufiger Parasitämie dominieren. Die primäre Beurteilung der Klinik und der Parasitämie ist bis zur Bestätigung der Datenlage durch weitere Studien jedoch unerlässlich und es ist zu beachten, dass diese Studie unter einer Therapie mit Chinin erfolgte und die Wirkung anderer Medikamente auf die Morphologie der Plasmodien nicht untersucht wurde.

4.6 **Fazit**

Nach Beginn der antiparasitären Therapie bei einer schweren Malaria-Infektion kann innerhalb der ersten Stunden die Wirkung der Chinin-Medikation durch lichtmikroskopisch sichtbare Änderungen der Plasmodien festgestellt werden.

Die Einteilung der Plasmodien erfolgt nach der Lage der Parasiten im Erythrozyten und nach der Kern-Plasma-Relation der Ringformen, wobei die Kern-Plasma-Relation frühzeitig nach Beginn der Therapie eine Verbreiterung des Zytoplasmabandes anzeigt.

Zu beachten ist, dass diese Veränderungen in einer Fallstudie an *einem Patienten* nachgewiesen wurden. Weitere Studien müssen nun einerseits die Gültigkeit dieser Ergebnisse bei einer größeren Patientengruppe ohne resistente Plasmodien bestätigen und andererseits bei Resistenzen zeigen, dass diese Veränderungen nicht auftreten.

5. Zusammenfassung

Die Hälfte der Weltbevölkerung lebt mit dem Risiko, an einer schweren *Malaria tropica* zu erkranken. Zunehmende Resistenzen von *Plasmodium falciparum* gegen gängige Therapeutika erschweren eine Behandlung, und es existiert keine Möglichkeit frühzeitig die Wirksamkeit der angewandten Medikation festzustellen. Die Bestimmung der Parasitämie als einzig verfügbarer Parameter kann auch bei erfolgreicher Therapie noch über den ersten Tag ansteigen.

Das Ziel dieser Studie war, lichtmikroskopische Parameter zu finden, mit denen der Erfolg einer Therapie frühzeitig festgestellt werden kann. So wurden im Rahmen einer Fallstudie die Plasmodien eines an einer schweren *Malaria tropica* erkrankten Patienten auf morphologische Veränderungen im Verlauf der Chinin-Therapie untersucht.

Die Beurteilung der Plasmodien erfolgte durch eine Einteilung nach ihrer Lage im Erythrozyten und der Kern-Plasma-Relation der Ringformen, anschliessend wurden die Ergebnisse durch eine Vermessung der Plasmodien am Computer verifiziert.

Es zeigte sich, dass ein Therapieerfolg anhand der Veränderung in der Morphologie der Ringformen bereits in den ersten Stunden nach Therapiebeginn festgestellt werden kann. So lässt sich innerhalb der ersten drei Stunden ein Wechsel von kleinen Ringformen mit dünnem, homogenem Zytoplasmaband zu vergrösserten Ringformen mit einem verbreiterten und inhomogenem Zytoplasma finden.

Im weiteren konnten ab der 7. Therapiestunde eine zunehmende Lageveränderungen der Plasmodien im Erythrozyten aufgezeigt werden. So waren ab diesem Zeitpunkt zunehmend Plasmodien, die die Erythrozyten-Membran hervorwölben (Arbeitstitel „*Accentué*“-Formen), im peripheren Blutausschlag des Patienten zu sehen.

Dass die Änderung der Kern-Plasma-Relation der Ringformen ursächlich einer direkten Medikamentenwirkung zuzuschreiben sind, konnte in einem abschliessenden „*in vitro*“-Studienteil gezeigt werden, in welchem Plasmodien-Kulturen unter Chinin-Einfluss mit Kontrollkulturen ohne Medikamenteneinfluss verglichen wurden.

6. Literaturverzeichnis

- 1: White NJ. Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. Clin. Infect. Dis. (2008) 46(2):172–173.
- 2: Singh B, Sung LK, Matusop A et al.. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. The Lancet (2004) 363:1017-1024
- 3: Galinski MR, Barnwell JM. Monkey malaria kills four humans. Trends Parasitol (2009) 25:200-204
- 4: Putaporntip Ch, Hongsriruang Th, Seethamchai S et al.. Differential prevalence of Plasmodium infections and cryptic Plasmodium knowlesi Malaria in humans in Thailand. J Infect Dis (2009) 199:1143-1150
- 5: Janet Cox-Singh, Timothy M. E. Davis, Kim-Sung Lee, Sunita S. G. Shamsul, Asmad Matusop, Shanmuga Ratnam, Hasan A. Rahman, David J. Conway, Balbir Singh. Plasmodium knowlesi Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening. Clin Infect Dis. (2008) 46 (2): 165-171
- 6: Sadanand S. Malaria: An Evaluation of the Current State of Research on Pathogenesis and Antimalarial Drugs Yale J Biol Med. (2010) December; 83(4): 185–191.
- 7: Leonard J. Bruce-Chwatt, Lessons learned from applied field research activities in Africa during the malaria eradication era, Bull World Health Organ., (1984) 62(Suppl): 19–29.
- 8: Nájera JA. Malaria control: achievements, problems and strategies. Parasitologia (2001) 43(1-2):1-89
- 9: Keiser J, Singer BH, Utzinger J. Reducing the burden of malaria in different eco-epidemiological settings with environmental management: a systematic review. Lancet Infect Dis., (2005) Nov;5(11):695-708.
- 10: WHO: Key Malaria facts, Roll Back Malaria, (2010)
<http://www.rollbackmalaria.org/keyfacts.html> (accessed 20 August 2010)
- 11: Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Mynt HY and Hay SI. The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. Nature (2005) 434,214-217

- 12: Roca-Feltrer A, Carneiro I, Armstrong Schellenberg JR. Estimates of the burden of malaria morbidity in Africa in children under the age of 5 years. *Trop. Med. Int. Health.* (2008) 13(6):771–783
- 13: Guyatt HL, Snow RW. Impact of malaria during pregnancy on low birth weight in sub-Saharan Africa. *Clin. Microbiol. Rev.* (2004) 17(4):760–769
- 14: WHO: 10 facts on Malaria, World Malaria Report 2009 (03/2009)
http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/en/index.html (accessed 18. February 2010)
- 15: WHO: The global burden of disease, 2004 update (2008)
http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/
(accessed 20 April 2010)
- 16: Werner Lang, Thomas Löscher. *Tropenmedizin in Theorie und Praxis*. Georg Thieme Verlag (2010) Seiten 554-558
- 17: Newbold, C., Warn, P., Black, G., Berendt, A., Craig, A., Snow, B., Msobo, M., Peshu, N. and Marsh, K. Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 57 (1997) S.389-98
- 18: WHO: the lifecycle of Malaria, Roll back Malaria (2007)
<http://www.emro.who.int/rbm/AboutMalaria-QuickOverview.htm> (accessed 15 August 2010)
- 19: Craig MH, Sharp BL. Comparative evaluation of four techniques for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (1997) 91: 279-282
- 20: Moody AH, Choidini PL. Methods for the detection of blood parasites *Clin Lab Haematol* (2000) 22:189-201
- 21: Bannister LH, Hopkins JM, Fowler RE, Krishna S, Mitchell GH. A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of *Plasmodium falciparum* Asexual Blood Stages. *Parasitology Today* (2000) Vol.16, No 10; 427-433
- 22: <http://sites.huji.ac.il/malaria/FramUltrastructure.html> (accessed Juni 2010)
- 23: Im Rahmen der Arbeit erstellte eigene Darstellung (2010)
- 24: Malaria Manual (2003)

- <http://www.up.ac.za/academic/biochem/afr/malaria/MANUAL.pdf> (accessed March 2008)
- 25: Stich, G, Schlitzer, M.: Wirkstoffe zur Therapie und Prophylaxe der Malaria, *Chemotherapie journal*, 17. Jahrgang Heft 2 (2008) S.37-56
- 26: Sweetman SC (editor). *Martindale: The Complete Drug Reference*. 34th ed. London, UK: Pharmaceutical Press (2004)
- 27: Jong EC, Nothdurft HD. Current drugs for antimalarial chemoprophylaxis: a review of efficacy and safety. *J Travel Med* (2001) 8(Suppl 3):48-56.
- 28: Fitch CD. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life. Sci.* (2004) 74: 1957-72
- 29: Nuridanatasha Abu Bakar, Nectarios Klonis, Eric Hanssen, Cherrine Chan and Leann Tilley. Digestive-vacuole genesis and endocytic process in the early intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Cell Science* (2010) 123, 441-450.
- 30: Heinrich C. Hoppe, Donnelly A. van Schalkwyk, Ursula I.M. Wiehart, Sandra A. Meredith, Joanne Egan and Brandon W. Weber. Antimalarial Quinolones and Artemisinin Inhibit Endocytosis in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2004) Jul. Vol 48, No 7: 2370-2378.
- 31: Zarchin S, Krugliak M, Gin. Digestion of the host erythrocyte by malaria parasites is the primary target for quinoline-containing antimalarials. *Biochem Pharmacol*. (1986) Jul 15;35(14):2435-42.
- 32: Mathirut Mungthin, Patrick G. Bray, Robert G. Ridley and Stephen A. Ward. Central Role of Hemoglobin Degradation in Mechanisms of Action of 4-Aminoquinolines, Quinoline Methanols, and Phenanthrene Methanols. *Antimicrob Agents Chemother*. (1998) November;42(11): 2973–2977.
- 33: Hawley SR, Bray PG, Mungthin M, Atkinson JD, O'Neill PM, Ward SA. Relationship between antimalarial drug activity, accumulation, and inhibition of heme polymerization in *Plasmodium falciparum* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. (1998) Mar;42(3):682-6.
- 34: Francis SE, Sullivan DJ Jr, Goldberg DE. Hemoglobin metabolism in the malaria

- parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol.* (1997) 51:97-123.
- 35: Loria P, Miller S, Foley M, Tilley L. Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *Biochem J.* (1999) Apr 15;339 (Pt 2):363-70.
- 36: Rosenthal PJ, Meshnick SR. Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol.* (1996) Dec 20;83(2):131-9.
- 37: Slomianny C. Three-dimensional reconstruction of the feeding process of the malaria parasite. *Blood Cells.* (1990) 16(2-3):369-78.
- 38: Goldberg DE, Slater AF, Cerami A, Henderson GB. Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1990) Apr;87(8):2931-5.
- 39: Fitch CD, Cai GZ, Chen YF, Shoemaker JD. Involvement of lipids in ferriprotoporphyrin IX polymerization in malaria. *Biochim Biophys Acta.* (1999) May 31;1454(1):31-7.
- 40: Egan TJ, Combrinck JM, Egan J, Hearne GR, Marques HM, Ntenti S, Sewell BT, Smith PJ, Taylor D, van Schalkwyk DA, Walden JC. Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J.* (2002) Jul 15;365(Pt 2):343-7.
- 41: Chou AC, Fitch CD. Control of heme polymerase by chloroquine and other quinoline derivatives. *Biochem Biophys Res Commun.* (1993) Aug 31;195(1):422-7.
- 42: Dorn A, Vippagunta SR, Matile H, Bubendorf A, Vennerstrom JL, Ridley RG. A comparison and analysis of several ways to promote haematin (haem) polymerisation and an assessment of its initiation in vitro. *Biochem Pharmacol.* (1998) Mar 15;55(6):737-47.
- 43: Egan TJ, Ncokazi KK. Quinoline antimalarials decrease the rate of beta-hematin formation. *J Inorg Biochem.* (2005) Jul;99(7):1532-9.
- 44: Egan TJ, Ross DC, Adams PA. Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of beta-haematin (malaria pigment). *FEBS Lett.* (1994) Sep 19;352(1):54-7.
- 45: Ginsburg H, Demel RA. Interactions of hemin, antimalarial drugs and hemin-antimalarial complexes with phospholipid monolayers. *Chem Phys Lipids.* (1984) Oct;35(4):331-47.

- 46: Balasubramanian D, Mohan Rao C, Panijpan B. The malaria parasite monitored by photoacoustic spectroscopy. *Science*. (1984) Feb 24;223(4638):828-30.
- 47: Roberts L, Egan TJ, Joiner KA, Hoppe HC. Differential effects of quinoline antimalarials on endocytosis in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. (2008) May;52(5):1840-2. Epub 2008 Mar 3.
- 48: Foley M, Tilley L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance. *Int J Parasitol*. (1997) Feb;27(2):231-40.
- 49: Desneves J, Thorn G, Berman A, Galatis D, La Greca N, Sinding J, Foley M, Deady LW, Cowman AF, Tilley L. Photoaffinity labeling of mefloquine-binding proteins in human serum, uninfected erythrocytes and *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol*. (1996) Nov 25;82(2):181-94.
- 50: Famin O, Ginsburg H. Differential effects of 4-aminoquinoline-containing antimalarial drugs on hemoglobin digestion in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Biochem Pharmacol*. (2002) Feb 1;63(3):393-8.
- 51: Fitch CD. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life. Sci*. (2004) 74: 1957-72
- 52: Fitch CD, Cai GZ, Chen YF, Ryerse JS. Relationship of chloroquine-induced redistribution of a neutral aminopeptidase to hemoglobin accumulation in malaria parasites. *Arch Biochem Biophys*. (2003) Feb 15;410(2):296-306.
- 53: Fitch CD, Chen YF, Cai GZ. Chloroquine-induced masking of a lipid that promotes ferriprotoporphyrin IX dimerization in malaria. *J Biol Chem*. (2003) Jun 20;278(25):22596-9. Epub 2003 Apr 15.
- 54: Chevli R, Fitch CD. The antimalarial drug mefloquine binds to membrane phospholipids. *Antimicrob Agents Chemother*. (1982) Apr;21(4):581-6.
- 55: Zidovetzki R, Sherman IW, Atiya A, De Boeck H. A nuclear magnetic resonance study of the interactions of the antimalarials chloroquine, quinacrine, quinine and mefloquine with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *Mol Biochem Parasitol*. (1989) Jul;35(3):199-207.
- 56: White NJ Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest*. (2004) April 15; 113(8): 1084–1092.

- 57: WHO; Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs: Report on global monitoring: 1996-2004. Geneva, Switzerland. (2005)
- 58: Greenwood B, Mutabingwa T., Malaria in 2002, *Nature* (2002) Feb 7; 415(6872):670-2
- 59: White NJ. Antimalarial drug resistance: the pace quickens. *J Antimicrob Chemother.* (1992) Nov;30(5):571-85.
- 60: Kager PA, Wetsteyn JC. Malaria and drug resistance. *Ned Tijdschr Geneesk.* (1996) Jan 20;140(3):151-5.
- 61: Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis.* (2002) 2:209–218
- 62: Ambroise-Thomas P, Rossignol JF., Chemotherapy of resistant *falciparum* malaria. *Parasitol Today.* (1986) Mar;2(3):79-80.
- 63: Denis MB, Kouznetsov RL, Giboda M., In vivo response of multi-resistant *Plasmodium falciparum* infections to mefloquine and its combination with sulfadoxine/pyrimethamine in Cambodia. *Folia Parasitol (Praha)*; (1991) 38(2):187-8.
- 64: Bjorkman A, Phillips-Howard PA; The epidemiology of drug resistant malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* (1990) 84:177-180
- 65: Demar M, Carme B; *Plasmodium falciparum* in vivo resistance to quinine: description of two RIII responses in French Guiana. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (2004) 70(2): 125-127
- 66: Boulous M, Dutra AP, Di Santi SM, Shiroma M, Amato Nevo V, The clinical evaluation of quinine for the treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *Rec Soc Bras med Trop,* (1997) 30:211-213
- 67: Hüttinger F, Satimai W, Wernsdorfer G, Wiedermann U, Congpuong K, Wernsdorfer WH. Sensitivity to artemisinin, mefloquine and quinine of *Plasmodium falciparum* in northwestern Thailand. *Wien Klin Wochenschr.* (2010) Oct;122 Suppl 3:52-6.
- 68: Baird JK. Effectiveness of antimalarial drugs. *N Engl J Med.* (2005) 352:1565–1577
- 69: Payne D. Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today.* (1987) Aug;3(8):241-6.
- 70: WHO: Malaria, Fact sheet N°94 (April 2010)

- 71: Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, Lwin KM, Arie F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* (2009) Jul 30;361(5):455-67.
- 72: Noedl H, Socheat D, Satimai W. Artemisinin-resistant malaria in Asia. *N Engl J Med.* (2009) Jul 30;361(5):540-1.
- 73: Watt G, Shanks GD, Phintuyothin P: Prognostic significance of rises in parasitaemia during treatment of falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1992) 86:359-360.
- 74: Bertrand Gachot, Sandrine Houze, Jacques Le Bras, Guy Charmot, Jean-Pierre Bedos and Francois Vachon Possible prognostic significance of a brief rise in parasitaemia following quinine treatment of severe *Plasmodium falciparum* malaria *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (1996) 0,388-390
- 75: Aikawa M. Human cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg.* (1988) Jul;39(1):3-10.
- 76: Planche T, Krishna S. Severe malaria: metabolic complications. *Curr Mol Med.* (2006) 6:141–153.
- 77: Patientenakte (Missionsärztliche Klinik Würzburg)
- 78: WHO: Monitoring and Evaluation - China, Roll back Malaria (4/27/2005)
- 79: Bisoffi Z., Matteelli A., Aquilini D., Guaraldi G., Magnani G., Orlando G. et al.: Malaria Clusters among Illegal Chinese Immigrants to Europe through Africa. *Emerg. Infect Dis.* (2003, Sept;) 9(9):1177-8
- 80: Alberto Matteelli, Alberto Volonterio, Maurizio Gulletta, Laura Galimberti, Stefania Marocco, Giovanni Gaiera, Gloria Giani, Maurizio Rossi, Nicoletta Dorigoni, Luca Bellina, Giovanna Orlando, Zeno Bisoffi and Francesco Castelli Malaria in Illegal Chinese Immigrants, Italy *Emerging Infectious Diseases* Vol. 7, No. 6, November-December 2001 (2001) S. 1055-1058
- 81: Hay SI, Guerra CA, Gething PW, et al. A world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2007. *PLoS Medicine*, (2009) 6(3):e1000048. doi:10.1371/journal.pmed.1000048.
- 82: AWMF-Leitlinien: Färbungen bei Malaria (2010) (accessed 15 June 2010)

<http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/trop0011.html>

83: Steiger A.: Malaria MQZH2007-2/H3b Blickpunkt Hämatologie, (2007)

<http://www.mqnet.ch/bb/pafiledb/.../430db89a60ea1789612773b9f14d3f29.pdf>

(accessed 15 June 2010)

84: Warrell DA, Gilles HM; Essential malarology, 4th Edition (2002)

85: Firma Merck Giemsa Azur Eosin-Methylenblau für Mikroskopie, IVD- in vitro Diagnostikum (2010)

<http://pb.merck.de/servlet/PB/show/1239480/109204109203de.pdf> (accessed 15 June 2010)

86: Schlitzer M. Antimalarial drugs - what is in use and what is in the pipeline. Arch Pharm (Weinheim). (2008) Mar;341(3):149-63.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dem Vorsitzenden des Missionsärztlichen Instituts Würzburg **Prof. Dr. August Stich**, nicht nur für die hervorragende Betreuung und wichtigen Anregungen während der Entstehung dieser Arbeit, sondern auch als Vorbild u.a. im Einsatz mit „Ärzte ohne Grenzen“.

Den weiteren Mitarbeitern des Missionsärztlichen Instituts Würzburg für die gute Arbeitsatmosphäre, insbesondere **Hanne Fleischmann** für die sehr gute Betreuung im Labor.

Dr. Christoph Gelhaus und **Prof. Dr. Leippe**, Institut für Zoologie der Universität Kiel für die freundlicherweise zur Verfügung gestellten Plasmodien-Kulturen der „*in vitro*“-Versuchsreihen.

Meinen **Eltern** und **Geschwistern**, die es geschafft haben durch *kontinuierliches* Nachhaken den Motor der Arbeit am laufen zu halten.

Und besonders:

Meiner langjährigen Partnerin und zukünftigen Ehefrau **Manuela**, für ihre allumfassende Unterstützung – nicht nur wenn ich bei dieser Arbeit hin und wieder kleinere (und auch grössere) Durchhänger hatte...

Allen ein ganz herzliches: M E R C I !

Curriculum Vitae

Name **Daniel Johannes Zimmerer**
Geburtsdatum/-ort 19.10.1977 in Stuttgart
Nationalität deutsch
Zivilstand ledig

Schullaufbahn

1983-1987 Grundschule in Wüstenrot
1987-1993 Qscar-Paret-Gymnasium in Freiberg am Neckar
1993-1996 Technisches Gymnasium Öhringen
1996 Allgemeine Hochschulreife am Technischen Gymnasium Öhringen

Zivildienst

01/1997 - 04/1998 Arbeit mit Straßenkindern in Durazno, Uruguay

Universitäre Ausbildung

04/1998 - 11/2005 Medizinstudium an der Julius-Maximilians Universität Würzburg
November 2005 Staatsexamen

Berufstätigkeit

06/2006 - 07/2008 Assistenzarzt in der Kinderklinik Heilbronn,
akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Heidelberg
09/2008 - 06/2010 Assistenzarzt in der Kinderklinik Lörrach,
akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Freiburg
09/2010 - 03/2011 Einsatz in der Humanitären Nothilfe mit Ärzte ohne Grenzen
Kala Azar Emergency-Programm, Jonglei/Upper Nile State, Südsudan
07/2011 - 08/2011 Einsatz mit Ärzte ohne Grenzen in einem Flüchtlingslager,
Hungerkatastrophe am Horn von Afrika, Somali-Region, Äthiopien